

\*\*\*

# ANALYSE DE L'ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA GROTTE DE SULZBRUNN

*“Microbial megacities fueled by methane oxidation  
in a mineral spring cave”<sup>a</sup>*

publiée par *ISME Journal*

---

<sup>a</sup> [ISME J.](#) 2018 Jan;12(1):87-100. doi: 10.1038/ismej.2017.146. Epub 2017 Sep 26

# **Analyse réalisée à partir des résultats présentés dans l'article “*Microbial megacities fueled by methane oxidation in a mineral spring cave*” publié par *ISME Journal***

**KARWAUTZ Clemens<sup>1</sup>, KUS Günter<sup>2</sup>, STÖCKL Michael<sup>1</sup>, NEU Thomas R<sup>3</sup>, LUEDERS Tillmann<sup>1</sup>**

*1 Institute of Groundwater Ecology, Helmholtz Zentrum München - German Research Centre for Environmental Health, Neuherberg, Germany.*

*2 Bavarian Environment Agency (LfU), Department 10: Geological Survey, Hof/Saale, Germany.*

*3 Department of River Ecology, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Magdeburg, Germany.*

**Par M. Albert Demichelis**

*Bât. 6 ; Monte Renoso*

*Résidence les Cimes*

*20 200 Bastia Cardo*

*Tél : 06 19 29 35 86*

**Rapport réalisé de 2017 à 2019**

**Version finale novembre 2019**

<b>RÉSUMÉ</b>		<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b>		<b>425</b>
<b>CHAPITRE 1 / INTRODUCTION</b>		<b>17</b>
1.1	Préface	17
1.2	Traduction de la publication " <i>Microbial megacities fueled by methane oxidation in a mineral spring cave</i> "	17
1.2.1	Mégalopoles microbiennes d'une grotte alimentée par l'oxydation du méthane	17
1.3	Introduction	18
1.4	Localisation de la grotte	18
1.5	Formation géologique et hydrogéologie de la Bavière	20
1.6	Implantation de la flore biologique dans la grotte	21
1.7	La genèse des hydrocarbures ( <i>Planète Énergie</i> )	21
1.8	La lente formation d'une roche mère	22
1.9	Formation des biofilms	22
<b>CHAPITRE 2 / MÉTHODE D'ANALYSE DE LA GROTTE</b>		<b>24</b>
2.1	Mesure de l'activité	26
<b>CHAPITRE 3 / RÉSULTATS OBTENUS SUR LA GROTTE</b>		<b>27</b>
3.1	Visualisation des biofilms	27
3.2	Extraction de l'ADN	27
3.3	Analyse quantitative par CPR de l'ARNr 16s des gènes bactériens	28
3.3.1	Analyse phylogénétique en CPR	28
3.4	Caractéristiques physico-chimiques	28
3.5	Nos observations sur les données présentées	30
3.5.1	Tolérance en sel de l'eau	31
3.5.2	Proportion du mélange des eaux dans la grotte	31
3.5.3	Concentration estimée en chlorure de sodium	32
3.5.4	Analyse des résultats physico-chimiques	32
3.5.5	Analyse de l'atmosphère de la grotte	32
3.6	Composition des biofilms	33
3.6.1	Forme sous laquelle se trouvent les biofilms	33
3.6.2	Interprétation de l'analyse des biofilms	33
3.6.3	Équilibre en équivalent de sodium dans l'eau saumâtre et le biofilm immergé	34
3.6.4	Composition élémentaire des biofilms	34
3.6.5	Notre interprétation sur la constitution du biofilm	35
3.6.6	Étude élémentaire sur les snottites et les biofilms	36
3.7	Potentiels d'oxydation de méthane <i>in-vitro</i> du biofilm	36
3.7.1	Visualisation des structures du biofilm	36
<b>CHAPITRE 4 / ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE</b>		<b>38</b>
4.1	Comptage cellulaire	38
4.2	Composition de la communauté bactérienne dans l'eau et des biofilms	38
4.3	Discussion de la partie analytique	42
4.3.1	Composition de la communauté des biofilms	43
4.3.2	Rôle possible de l'iode	44

4.3.3	Observation des auteurs de la publication	45
<b>CHAPITRE 5 / CONCLUSION DES AUTEURS ET NOTRE ANALYSE DES RÉSULTATS</b>		<b>46</b>
5.1	Particularités de la répartition de la flore microbienne des sols	46
5.2	Les bactéries du sol ont plusieurs rôles environnementaux majeurs	47
<b>CHAPITRE 6 / FLORE INITIALE DE LA GROTTÉ DE SULZBRUNN</b>		<b>48</b>
6.1	Analyse partielle des germes telluriques non-apportés par l'eau de la cavité	48
6.2	Analyse partielle des bactéries aquatiques de ces biosystèmes	50
6.3	Analyse partielle des bactéries marines des mêmes biosystèmes	52
6.4	Analyse partielle de l'activité méthylo-trophe de ces biosystèmes	53
6.5	Analyse partielle de l'activité photosynthétique	54
<b>CHAPITRE 7 / ANALYSES GÉNÉRALES DE LA FLORE DE LA GROTTÉ</b>		<b>57</b>
7.1	Analyse générale de la flore tellurique de l'ensemble des classes	57
7.2	Les eaux de la grotte de Sulzbrunn et analyse de la flore aquatique	57
7.3	Caractéristiques bactériennes des eaux de la grotte	61
<b>CHAPITRE 8 / GÉNÉRALITÉS DES BIOFILMS ET SNOTTITES</b>		<b>63</b>
8.1	Particularités bactériennes dans les biofilms « submersed »	63
8.2	Caractéristiques de l'aérobiose dans les biofilms	63
8.3	Contaminations atmosphériques des biofilms dans la grotte	65
8.4	Formation des hydrocarbures dans la grotte de Sulzbrunn	66
8.5	Présence de bactéries typiques au parasitisme animal dans la grotte	66
<b>CHAPITRE 9 / FORMATION DES SNOTTITES ET BIOFILMS</b>		<b>68</b>
9.1	Fixation des biofilms	68
9.2	Adhérence des biofilms et des snottites	68
9.3	Fixation de l'azote dans le biofilm	68
9.4	Constitution des biofilms	68
9.5	Diffusion des bactéries entre le biofilm « submersed » et l'eau de mélange	69
9.6	Analyse du transfert bactérien de l'eau de mélange vers le biofilm « submersed »	70
9.7	Analyse du taux de pénétration des bactéries dans le biofilm en fonction de la teneur bactérienne de l'eau de mélange.	70
9.8	Graphique du taux de pénétration en fonction du pourcentage bactérien dans l'eau de mélange	71
9.9	Répartitions des groupes bactériens en fonction de leur taux de pénétration dans le biofilm	72
9.10	Analyse des valeurs résiduelles de la droite de régression, entre l'eau de mélange et le biofilm	73
9.11	Valeurs résiduelles et le passage passif, entre l'eau de mélange et le biofilm	74
9.12	Caractéristiques des valeurs résiduelles du graphique	75
9.13	Autres comportements dans le transfert bactérien entre biofilm « submersed » et eau de mélange	76
9.14	Correction graphique des valeurs résiduelles dans la droite de régression	77
9.15	Bactéries sédentaires dans le biofilm « submersed »	77
9.16	Bactéries de l'eau de mélange ne pénétrant pas dans le biofilm	78

	« submersed »	
9.17	Morphologique bactérienne en fonction du taux de pénétration dans le biofilm	79
9.18	Taux de pénétration dans le biofilm en fonction de la mobilité bactérienne	80
9.19	Influence de l'aérobiose sur la pénétration des bactéries dans le biofilm	81
9.20	Analyse du caractère « bactérie marine » dans la diffusion dans le biofilm	83
9.21	Influence de la taille des bactéries dans leur diffusion dans le biofilm « submersed »	85
9.22	Analyse de la longueur bactérienne dans la diffusion dans le biofilm « submersed »	85
9.23	Longueurs bactériennes maximales sur la pénétration des bactéries dans le biofilm	88
9.24	Le diamètre bactérien sur la diffusion dans le biofilm	90
9.25	Les diamètres bactériens minimums pénétrant le biofilm	91
9.26	Les diamètres maximums capables de pénétrer dans le biofilm	92
9.27	Croissance interne des bactéries dans les biofilms	95
9.28	Activité autotrophe de l'écosystème bactérien	98
9.29	Le caractère autotrophe et les indices de croissance	100
9.30	La flore marine de la grotte de Sulzbrunn	101
<b>CHAPITRE 10 / SPÉCIATION ET ÉVOLUTION MICROBIENNE</b>		<b>107</b>
10.1	Apparition de nouvelles espèces	107
10.2	Spéciation « par renforcement »	108
10.3	Les vecteurs de spéciation chez les bactéries	108
10.3.1	Facteurs de spéciation	112
10.3.2	Recherche des nouvelles espèces	115
10.4	Absence de spéciation observée	114
10.5	Dans le cas d'une non-spéciation	116
10.6	Le karst garde ses mystères	116
10.7	Conclusion de la spéciation	117
<b>CHAPITRE 11 / LA BIOCCÉNOSE BACTÉRIENNE</b>		<b>118</b>
11.1	Biocénose et association d'espèces	118
11.2	Formation de la biocénose dans la grotte de Sulzbrunn	120
11.3	La complémentarité entre bactéries	121
11.4	Biocénose des biofilms et des snottites	122
11.5	Bilan énergétique dans les biocénoses internes aux biofilms	124
<b>CHAPITRE 12 / CARACTÉRISTIQUES DES SNOTTITES ET BIOFILMS</b>		<b>127</b>
<b>CHAPITRE 13 / ÉVOLUTION ET RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE DE CETTE BIODIVERSITÉ MICROBIENNE</b>		<b>129</b>
13.1	Évolution de cette biodiversité microbienne	129
13.2	Répartition géographique de cette biodiversité microbienne	129
<b>CHAPITRE 14 / BIOTECHNOLOGIE AU SERVICE DE L'ENVIRONNEMENT</b>		<b>132</b>
14.1	Oxygénation terrestre due aux bactéries	132
14.2	La lutte contre le réchauffement climatique	133
14.3	Action du méthane sur la diversité animale	134
14.4	Utilisation des bactéries pour la diminution de rejet de gaz à effet de serre	135

	dans l'atmosphère	
14.5	Conception d'un procédé d'électrosynthèse microbienne	136
14.6	Utilisation d'une biocénose dans le traitement des ordures ménagères	137
14.7	Biocénose anoxique de la grotte de Sulzbrunn	137
14.8	La production de méthane par fermentation anaérobie des déchets anthropiques organiques	138
14.9	L'épandage des résidus de méthanisation	138
14.10	Dégradation spécifique microbiologique des polluants	138
14.11	Élimination des carburants fossiles	140
14.12	Utilisation de l'hydrogène comme source d'énergie	141
14.13	Bactéries de la grotte de Sulzbrunn fixant de l'azote de l'air	142
14.14	Autres bactéries fixant l'azote de l'air pour produire de l'hydrogène	142
14.15	Voie biotechnologie dans la production d'hydrogène	143
14.16	Production de la nitrogénase	143
14.17	Production d'électricité par des piles à combustibles microbiennes	143
14.18	Utilisation des bactéries méthanotrophes pour lutter contre les émissions méthanogènes animales.	144
14.19	Les bactéries dans les voyages interstellaires	146
14.20	Conclusion sur l'utilisation de la biotechnologie pour la protection de l'environnement	146
<b>CHAPITRE 15 / NOS REMARQUES</b>		<b>147</b>
15.1	Les études de la microbiologie cavernicole	147
15.2	La grotte de sulzbrunn est une réserve microbienne	149
15.19	Nos observations	149

## **ANNEXE**

### **CARACTÉRISTIQUES MICROBIENNES ET BIBLIOGRAPHIE SUR LES ORDRES, FAMILLES, GENRES ET ESPÈCES TROUVÉS DANS LA GROTTÉ DE SULZBRUNN**

<b>16</b>	<b>CLASSIFICATION PHYLOGÉNÉTIQUE</b>	<b>150</b>
16.1	Arbre phylogénétique	150
16.1.1	Les Phyla	151
16.2	Analyse des embranchements bactériens de la flore de la grotte de Sulzbrunn	152
16.3	Embranchements et familles observés dans la cavité de Sulzbrunn	153
<b>17</b>	<b>EMBRANCHEMENT <i>SPHINGOBACTERIA</i> (GROUPE FCB)</b>	<b>155</b>
17.1	Phylum <i>Bacteroidetes</i>	155
17.1.1	Ordre <i>Bacteroidales</i>	155
17.1.1.1	Famille <i>Bacteroidaceae</i>	155

17.1.1.1.1	Genre <i>Bacteroides</i>	155
<b>17.1.2</b>	<b>Ordre <i>Cytophagales</i></b>	<b>158</b>
17.1.2.1	Famille <i>Cytophagaceae</i>	158
17.1.2.1.1	Genre <i>Cytophaga</i>	160
17.1.2.1.2	Genre <i>Sporocytophaga</i>	162
17.1.2.1.3	Genre <i>Spirosoma</i>	163
<b>17.1.3</b>	<b>Ordre <i>Flavobacteriales</i></b>	<b>165</b>
17.1.3.1	Famille <i>Flavobacteriaceae</i>	165
17.1.3.1.1	Genre <i>Flavobacterium</i>	166
17.1.3.1.2	Genre <i>Capnocytophaga</i>	170
17.1.3.1.3	Genre <i>Arenibacter</i>	172
17.1.3.2	Famille <i>Myroidaceae</i> (Grotte de Magura, Bulgarie)	177
17.1.3.2.1	Genre <i>Myroides</i> (Grotte de Magura, Bulgarie)	178
<b>17.1.4</b>	<b>Ordre <i>Sphingobacteriales</i></b>	<b>179</b>
17.1.4.1	Famille <i>Sphingobacteriaceae</i>	179
17.1.4.1.1	Genre <i>Sphingobacterium</i> (Grotte de Magura et grotte de Sulzbrunn)	179
17.1.4.2	Famille <i>Flexibacteraceae</i>	180
17.1.4.2.1	Genre <i>Flexibacter</i>	180
17.1.4.3	Famille <i>Saprospiraceae</i>	183
17.1.4.3.1	Genre <i>Aureispira</i>	184
17.1.4.3.2	Genre <i>Haliscomenobacter</i>	185
17.1.4.3.3	Genre <i>Lewinella</i>	186
17.1.4.3.4	Genre <i>Saprospira</i>	187
<b>18</b>	<b>EMBRANCHEMENT <i>PLANCTOMYCETES</i></b>	<b>190</b>
<b>18.1</b>	<b>Phylum <i>Planctobacteria</i></b>	<b>190</b>
18.1.1	Ordre <i>Planctomycetales</i>	190
18.1.1.1	Famille <i>Planctomycetaceae</i>	191
18.1.1.1.1	Genre <i>Planctomyces</i>	193
18.1.1.1.2	Genre <i>Gemmata</i>	194
18.1.1.1.3	Genres Souches <i>Planctomycetes</i> Pla 46 (Pir 4)	195
<b>18.2</b>	<b>Phylum <i>Phycisphaerae</i></b>	<b>197</b>
18.2.1	Ordre <i>Phycisphaerales</i>	197
18.2.1.1	Famille <i>Phycisphaeraceae</i>	197
18.2.1.1.1	Genre <i>Algisphaera</i>	198
18.2.1.1.2	Groupe <i>Phycisphaera</i> , souche SM 1A02	200
<b>19</b>	<b>EMBRANCHEMENT <i>NC 10</i></b>	<b>202</b>
<b>19.1</b>	<b>Phylum <i>Candidatus NC10</i></b>	<b>202</b>
19.1.1.1.1	Genre <i>Methylomirabilis</i>	203
<b>20</b>	<b>EMBRANCHEMENT <i>VERRUCOMICROBIÆ</i></b>	<b>213</b>
<b>20.1.1</b>	<b>Ordre <i>Verrucomicrobiales</i></b>	<b>213</b>
20.1.1.1	Famille <i>Verrucomicrobiaceae</i>	213
20.1.1.1.1	Genre <i>Verrucomicrobium</i>	213
20.1.1.1.2	Genre <i>Fuku N18</i>	218

<b>20.2</b>	<b>Classe <i>Spartobacteria</i></b>	<b>219</b>
<b>20.2.1</b>	<b>Ordre <i>Chthoniobacterales</i></b>	<b>219</b>
<b>20.2.1.1</b>	<b>Famille <i>Chthoniobacteraceae</i></b>	<b>220</b>
<b>20.2.1.1.1</b>	<b>Genre <i>Chthoniobacter</i></b>	<b>220</b>
<b>20.2.1.1.2</b>	<b>Genre <i>Terrimicrobium</i></b>	<b>221</b>
<b>20.2.1.1.3</b>	<b>Genre <i>Candidatus Xiphinematobacter</i></b>	<b>222</b>
<b>21</b>	<b>EMBRANCHEMENT ALPHAPROTEOBACTERIA (BV2)</b>	<b>224</b>
<b>21.1.1</b>	<b>Ordre V <i>Caulobacterales</i></b>	<b>225</b>
<b>21.1.1.1</b>	<b>Famille <i>Caulobacteraceae</i></b>	<b>226</b>
<b>21.1.1.1.1</b>	<b>Genre <i>Caulobacter</i></b>	<b>226</b>
<b>21.1.1.1.2</b>	<b>Genre <i>Brevundimonas</i></b>	<b>228</b>
<b>21.1.2</b>	<b>Ordre <i>DB1-14</i></b>	<b>229</b>
<b>21.1.3</b>	<b>Ordre VI <i>Rhizobiales</i></b>	<b>229</b>
<b>21.1.3.1</b>	<b>Famille <i>Rhizobiaceae</i></b>	<b>231</b>
<b>21.1.3.2</b>	<b>Famille <i>Beijerinckiaceae</i></b>	<b>232</b>
<b>21.1.3.2.1</b>	<b>Genre <i>Beijerinckia</i></b>	<b>233</b>
<b>21.1.3.2.2</b>	<b>Genre <i>Methylocella</i></b>	<b>234</b>
<b>21.1.3.2.3</b>	<b>Genre <i>Methylorosula</i></b>	<b>241</b>
<b>21.1.3.3</b>	<b>Famille <i>Methylobacteriaceae</i></b>	<b>244</b>
<b>21.1.3.3.1</b>	<b>Genre <i>Methylobacterium</i></b>	<b>244</b>
<b>21.1.4</b>	<b>Ordre III <i>Rhodobacterales</i></b>	<b>249</b>
<b>21.1.4.1</b>	<b>Famille <i>Rhodobacteraceae</i></b>	<b>249</b>
<b>21.1.4.1.1</b>	<b>Genre <i>Rhodobacter</i></b>	<b>251</b>
<b>21.1.4.2</b>	<b>Famille <i>Hyphomicrobiaceae</i></b>	<b>253</b>
<b>21.1.4.2.1</b>	<b>Genre <i>Hyphomicrobium</i></b>	<b>254</b>
<b>21.1.4.3</b>	<b>Famille <i>Hyphomonadaceae</i></b>	<b>255</b>
<b>21.1.4.3.1</b>	<b>Genre <i>Hyphomonas</i></b>	<b>255</b>
<b>21.1.5</b>	<b>Ordre <i>Rhodospirillales</i></b>	<b>256</b>
<b>21.1.5.1</b>	<b>Famille <i>Rhodospirillaceae</i></b>	<b>257</b>
<b>21.1.6</b>	<b>Ordre <i>Rickettsiales</i></b>	<b>262</b>
<b>21.1.6.1</b>	<b>Famille <i>Rickettsiaceae</i></b>	<b>262</b>
<b>21.1.6.1.1</b>	<b>Genre <i>Rickettsia</i></b>	<b>263</b>
<b>21.1.6.2</b>	<b>Famille <i>Anaplasmataceae</i></b>	<b>267</b>
<b>21.1.6.2.1</b>	<b>Genre <i>Anaplasma</i></b>	<b>268</b>
<b>21.1.6.2.2</b>	<b>Genre <i>Ehrlichia</i></b>	<b>270</b>
<b>21.1.6.2.3</b>	<b>Genre <i>Cowdria</i></b>	<b>272</b>
<b>21.1.6.2.4</b>	<b>Genre <i>Neorickettsia</i></b>	<b>272</b>
<b>21.1.6.2.5</b>	<b>Genre <i>Eperythrozoon</i></b>	<b>272</b>
<b>21.1.6.2.6</b>	<b>Genre <i>Haemobartonella</i></b>	<b>272</b>
<b>21.1.6.2.7</b>	<b>Genre <i>Aegyptianella</i></b>	<b>272</b>
<b>21.1.7</b>	<b>Ordre IV <i>Sphingomonadales</i></b>	<b>272</b>
<b>21.1.7.1</b>	<b>Famille <i>Sphingomonadaceae</i></b>	<b>273</b>
<b>21.1.7.1.1</b>	<b>Genre <i>Sandarakinorhabdus</i></b>	<b>275</b>
<b>21.1.7.1.2</b>	<b>Genre <i>Stakelama</i></b>	<b>275</b>

21.1.7.1.3	Genre <i>Porphyrobacter</i>	275
21.1.7.2	Famille des <i>Erythrobacteraceae</i>	279
21.1.7.2.1	Genre <i>Erythrobacter</i>	280
<b>22</b>	<b>EMBRANCHEMENT DES BETAPROTEOBACTERIA</b>	<b>282</b>
<b>22.1.1</b>	<b>Ordre I <i>Burkholderiales</i></b>	<b>284</b>
22.1.1.1	Famille <i>Comamonadaceae</i>	284
22.1.1.1.2	Genre <i>Comamonas</i>	285
<b>22.1.2</b>	<b>Ordre II <i>Hydrogenophilales</i></b>	<b>286</b>
22.1.2.1	Famille <i>Hydrogenophilaceae</i>	286
22.1.2.1.1	Genre <i>Hydrogenophilus</i>	287
<b>22.1.3</b>	<b>Ordre <i>Rhodocyclales</i></b>	<b>287</b>
22.1.3.1	Famille <i>Rhodocyclaceae</i>	289
22.1.3.1.1	Genre <i>Rhodocyclus</i>	289
22.1.3.1.2	Genre <i>Propionivibrio</i>	290
22.1.3.1.3	Genre <i>Azospira</i>	290
22.1.3.1.4	Genre <i>Dechloromonas</i>	290
22.1.3.2	Famille <i>Azonexaceae</i>	291
22.1.3.2.1	Genre <i>Ferribacterium</i>	291
22.1.3.3	Famille <i>Sterolibacteriaceae</i>	292
22.1.3.3.1	Genre <i>Sulfuritalea</i>	293
22.1.3.4	Famille <i>Thiobacillaceae</i>	298
22.1.3.4.1	Genre <i>Thiobacillus</i>	298
<b>22.1.4</b>	<b>Ordre <i>Nitrosomonadales</i></b>	<b>303</b>
22.1.4.1	Généralités sur les ferrobactéries	305
22.1.4.2	Famille <i>Gallionellaceae</i>	308
22.1.4.2.1	Genre <i>Gallionella</i>	310
22.1.4.2.2	Genre <i>Ferriphasselus</i>	314
22.1.4.2.3	Genre <i>Siderooxydans</i>	318
22.1.4.2.4	Genre <i>Sulfuricella</i>	326
<b>22.1.5</b>	<b>Ordre <i>Methylophilales</i></b>	<b>328</b>
22.1.5.1	Famille <i>Methylophilaceae</i>	329
22.1.5.1.1	Genre <i>Methylotenera</i>	329
<b>23</b>	<b>EMBRANCHEMENT DES GAMMAPROTEOBACTERIA</b>	<b>332</b>
<b>23.1.1</b>	<b>Ordre IX <i>Pseudomonadales</i></b>	<b>333</b>
23.1.1.1	Famille <i>Pseudomonadaceae</i>	333
23.1.1.1.1	Genre <i>Pseudomonas</i>	336
<b>23.1.2</b>	<b>Ordre IV <i>Methylococcales</i></b>	<b>345</b>
23.1.2.1	Famille <i>Crenothrichaceae</i>	346
23.1.2.1.1	Genre <i>Crenothrix</i>	346
23.1.2.2	Famille <i>Methylococcaceae</i>	348
23.1.2.2.1	Genre <i>Methylovulum</i>	353
23.1.2.2.2	Genre <i>Methylobacter</i>	355
23.1.2.2.3	Genre <i>Methylomicrobium</i>	356
23.1.2.2.5	Genre <i>Methylosoma</i>	364

23.1.2.3	Famille <i>Methylomonadaceae</i>	364
23.1.2.3.1	Genre <i>Methylomonas</i>	365
<b>23.1.3</b>	<b>Ordre VI Legionellales</b>	<b>367</b>
23.1.3.1	Famille <i>Legionellaceae</i>	367
23.1.3.1.1	Genre <i>Legionella</i>	369
<b>23.1.4.</b>	<b>Ordre X Alteromonadales</b>	<b>372</b>
23.1.4.1	Famille <i>Alteromonadaceae</i>	372
23.1.4.1.1	Genre <i>Marinobacter</i>	373
<b>23.1.5</b>	<b>Ordre III Xanthomonadales</b>	<b>376</b>
23.1.5.1	Famille <i>Xanthomonadaceae</i>	377
23.1.5.1.1	Genre <i>Stenotrophomonas</i> (grotte ornée de Magura et du Rideau de fer)	378
23.1.5.2	Famille <i>Rhodanobacteraceae</i>	380
<b>24</b>	<b>EMBRANCHEMENT DELTAPROTEOBACTERIA</b>	<b>381</b>
<b>24.1</b>	<b>Classe Deltaproteobacteria</b>	<b>381</b>
<b>24.1.1</b>	<b>Ordre Bdellovibrionales</b> (gouffre de Sambuy)	<b>381</b>
24.1.1.1	Famille <i>Bdellovibrionaceae</i> (gouffre de Sambuy)	381
24.1.1.1.1	Genre <i>Bdellovibrio</i>	381
<b>24.1.2</b>	<b>Ordre Desulfuromonadales</b> (gouffre de Sambuy)	<b>383</b>
24.1.2.1	Famille <i>Geobacteraceae</i>	383
24.1.2.1.1	Genre <i>Geobacter</i> (gouffre de Sambury)	383
24.1.2.2	Famille <i>Desulfuromonadaceae</i>	386
<b>24.1.3</b>	<b>Ordre Myxococcales</b>	<b>390</b>
24.1.3.1	Famille <i>Cystobacterineae</i>	390
24.1.3.1.1	Genre <i>Myxococcus</i> (gouffre de Sambury et Magura)	390
<b>25</b>	<b>EMBRANCHEMENT EPSILONPROTEOBACTERIA (BV2)</b>	<b>394</b>
<b>25.1.1</b>	<b>Ordre Campylobacterales</b>	<b>396</b>
25.1.1.1	Famille <i>Helicobacteraceae</i>	396
25.1.1.1.1	Genre <i>Sulfurimonas</i>	396
25.1.1.1.2	Genre <i>Helicobacter</i>	404
25.1.1.2	Famille <i>Campylobacteraceae</i>	403
25.1.1.2.1	Genre <i>Campylobacter</i>	404
25.1.1.3	Famille <i>Phyllobacteriaceae</i>	410
25.1.1.3.1	Genre <i>Candidatus Magnetobacterium</i> (gouffre de Sambuy)	410
<b>26</b>	<b>EMBRANCHEMENT ARCHAEA</b>	<b>412</b>
<b>26.1</b>	<b>Règne des Archaea</b>	<b>412</b>
26.1.1	Généralités sur les <i>Archaea</i>	412
26.1.2	Historique sur la classification des <i>Archaea</i>	413
26.1.3	Taxonomie des autres <i>Archaea</i> méthanogènes	414
26.1.3.1	Famille <i>Methanobacteriaceae</i>	415
26.1.3.2	Famille <i>Methanothermaceae</i>	415
26.1.3.3	Famille <i>Methanococcaceae</i>	415
26.1.3.4	Famille <i>Methanomicrobiaceae</i>	415
26.1.3.5	Famille <i>Methanocorpusculaceae</i>	415

26.1.3.6	Famille <i>Methanosarcinaceae</i>	416
26.1.3.7	Famille <i>Methanosaetaceae</i>	416
26.1.3.8	Méthanogènes thermophiles	416
<b>27</b>	<b>EMBRANCHEMENT <i>EURYARCHAEOTA</i></b>	<b>417</b>
<b>27.1</b>	<b>Phylum <i>Methanomicrobia</i></b>	<b>417</b>
<b>27.1.1</b>	<b>Ordre <i>Methanomicrobiales</i></b>	<b>417</b>
<b>27.1.1.1</b>	<b>Famille <i>Methanomicrobiaceae</i></b>	<b>417</b>
<b>27.1.1.1.1</b>	<b>Genre <i>Methanolacinia</i></b>	<b>417</b>
<b>28</b>	<b>AUTRES MÉTHANOGENÈS POSSIBLES DANS LA GROTTÉ DE SULZBRUNN</b>	<b>419</b>
<b>28.1</b>	<b>Classe <i>Methanococcus</i></b>	<b>419</b>
<b>28.1.1</b>	<b>Ordre <i>Méthanococcales</i></b>	<b>419</b>
<b>28.1.1.1</b>	<b>Famille <i>Methanococcaceae</i></b>	<b>419</b>
<b>28.1.1.1.1</b>	<b>Genre <i>Methanococcus</i></b>	<b>419</b>
<b>29</b>	<b>OBSERVATIONS GÉNÉRALES SUR LES CARACTÉRISTIQUES BACTÉRIOLOGIQUES DE LA CAVITÉ DE SULZBRUNN</b>	<b>424</b>
<b>29.1</b>	<b>Conclusion des auteurs de la publication</b>	<b>424</b>
<b>30</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE DE LA PUBLICATION : “MICROBIAL MEGACITIES FUELED BY METHANE OXIDATION IN A MINERAL SPRING CAVE”</b>	<b>429</b>
<b>31</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE (FFS)</b>	<b>433</b>

## RÉSUMÉ

Cette étude réalisée par des instituts bavarois<sup>b</sup>, détaillant les formations exceptionnelles de biofilms étendues, massives et récemment découvertes dans une grotte semi-artificielle située dans le sud de l'Allemagne préalpine, alimentée par une source thermale historique appelée Sulzbrunn (Schott, 1858). Les biofilms microbiens subaériens et submergés (« subaerial » = non-immersé ; « submersed » = immergé), recouvrent complètement les parois et le plafond de cette grotte semi-naturelle, donnant naissance à de vastes structures muqueuses pendantes jusqu'à 15 cm de longueur, également connues sous le nom de snottites (Hose et Piszgrowski, 1999).

La formation naturelle de cette grotte de Sulzbrunn date de 15 millions d'années lorsque la Bavière était recouverte par la mer (la mer en Bavière est apparue il y a 30 millions d'années). Les molasses alpines ont recouvert la côte bavaroise entraînant ainsi une isolation microbienne anaérobie.

En 2014 des analyses de l'eau trouvée dans ce forage montrent une concentration élevée en iode jusqu'à 23 mg/l, avec une forte salinité, à l'émergence de l'eau de source minérale, laquelle se mélange à de l'eau douce d'origine météoritique récente dans la caverne de la source dans, ceci étant un indicateur de formation d'un « upwelling » (partie côtière recevant le ressac).

Les dépôts de sédiments organiques datant du Länden, en contact avec cette eau, expliquent la production de pétrole et de gaz (Lu et al., 2015).

En 2015 les instituts bavarois décident de mettre en œuvre des investigations plus poussées pour comprendre l'évolution de cette cavité artificielle.

Le 22 septembre 2017, la revue *ISME Journal* publie les résultats des analyses de la grotte de Sulzbrunn. Une synthèse a pu établir que la géomorphologie de la formation de cette cavité aux origines marines, date de 15 millions d'années. Malgré le nombre d'années écoulées la microbiologie marine reste encore active. Cette caractéristique peut permettre de faire des investigations sur les causes d'une aussi grande longévité microbiologique.

En faisant le parallélisme entre les analyses microbiologiques des sols, des eaux douces et des eaux de mer, dans les biofilms, les snottites, les eaux présentes dans la grotte, on met en évidence une différenciation entre les snottites et les biofilms subaerial comparativement à l'eau de la grotte et aux biofilms « submersed ».

Cette différence porte sur le fait que les parties aériennes des structures (snottites et biofilms) sont pourvues de bactéries du type *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, la classe *NC10*, ainsi que des *Alphaproteobacteria*, contrairement aux autres structures comme les eaux, qui en sont dépourvues. Les biofilms « submersed » eux en sont très peu pourvus.

L'absence de ces bactéries dans les eaux de la grotte, nous permet de supposer que cette contamination était présente à la formation de cette cavité, définissant ainsi l'évolution de l'écosystème.

Cette observation montre que les snottites ont dû être formés avant les biofilms, hypothèse renforcée par la présence de la flore d'eau douce dans les snottites.

Des *Arenibacter* et des *Porphyrobacter*, bactéries marines benthiques, sont absentes dans l'eau de mélange et dans l'eau de source, mais présentes dans les snottites et biofilm subaerial, elles sont une preuve de la formation de ces structures à l'origine de la cavité.

Les méthylotrophes et des méthanotrophes ont dû apparaître bien après la formation des snottites et des biofilms « submersed », car cette activité vient de la méthanogenèse liée au catabolisme de la matière organique.

---

• <sup>b</sup> Institute of Groundwater Ecology, Helmholtz Zentrum München - German Research Centre for Environmental Health, Neuherberg, Germany.

• Bavarian Environment Agency (LfU), Department 10: Geological Survey, Hof/Saale, Germany.

• Department of River Ecology, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Magdeburg, Germany.

**« Le milieu anoxique ayant subsisté pendant de nombreuses années a dû jouer un rôle sélectif dans la flore générale de la cavité. Cette sélection a dû être alimentée par la source d'origine profonde, en apportant de ce fait des bactéries anaérobies, des Archaea, ayant produit le méthane et les hydrocarbures étant actuellement dans l'eau et l'atmosphère de cette grotte. »**

Toutefois, étant plus difficile à comprendre, c'est comment une telle flore microbienne, vivant en endosymbiose (comme les *Rickettsiaceae*), puisse vivre sans la présence d'une faune adaptée à son biotope. De plus comment ont-ils pu s'introduire dans cette cavité étant restée fermée un grand nombre d'années. Ce parasitisme n'est présent que dans la partie aérienne.

La présence importante de *Pseudomonas* et de *Legionella* dans les snottites et les biofilms « subaerial », fait penser à une contamination aérienne en raison de leur existence dans ces structures et de leur absence dans les eaux et dans le biofilm « submersed ». Ces bactéries peuvent être véhiculées par les gouttelettes d'eau (brumisation, brouillard).

Les snottites et les biofilms jouent un rôle dans la protection et la conservation microbienne, pour se défendre des risques de changement de biotope (comme le changement de climat, changement de luminosité, changement d'oxygénation...) et des agressions extérieures.

Ce n'est donc pas l'activité ni méthanotrophe, ni méthylotrophe, ayant été le seul facteur favorisant la formation des biofilms et des snottites, mais bien le fait d'une adaptation à un biotope nouveau, protégé par une isolation dans un écosystème nouveau.

De telles structures demandent un écosystème équilibré. Au départ des colonies vont se regrouper et se développer, puis faire une fixation dans un emplacement déterminé (comme une colonie dans une boîte de Petri).

Dans les biofilms et les snottites examinés nous pouvons constater qu'il y a un ensemble de bactéries formant une biocénose, afin que cette flore bactérienne puisse vivre d'une synusie de complémentarité commune permettant la pérennité de l'ensemble.

## **Analyse de la biocénose**

La diversité bactérienne dans le biofilm semble être un facteur de pérennité de celui-ci. Cette diversité n'est pas identique d'une structure à l'autre, cela signifie qu'il n'y a pas d'ordre taxonomique, mais qu'elle dépend sur tous des caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des bactéries mises en biocénose.

Ce n'est donc pas la définition de l'espèce étant un facteur de choix, mais la fonction de chacune des bactéries qu'elles doivent remplir dans l'écosystème.

Vu la diversité bactérienne observée on ne peut pas dire que les biofilms et les snottites ont été fait par une souche bactérienne, mais qu'un ensemble bactérien a mis en place une ou des structures permettant une longévité et une résistance au fil des d'années.

## **L'équilibre énergétique**

Les résultats obtenus donnent un équilibre énergétique relativement bon pour les biofilms « submersed ». Par contre les snottites et les biofilms « subaerial » semblent moins pourvus à ce niveau. Il y a donc une plus grande utilisation du méthane atmosphérique, du gaz carbonique, de l'azote atmosphérique, pour ces deux structures.

Les carences en phosphore dans les biofilms et les snottites « subaerial », ayant fait l'objet d'une observation dans l'étude bavaroise, ne semblent pas aussi justifier. Le calcul fait en prenant en considération la masse de la membrane de ces structures dans l'apport C et N, cette carence semble minimisée.

Le turnover (mortalité et naissance des bactéries) et les catabolismes microbiens (destruction des bactéries mortes pour alimenter les bactéries vivantes) jouent un grand rôle dans la préservation de l'équilibre énergétique de l'écosystème. La famille des *Saprospiraceae* se trouvant dans les biofilms « subaerial » et les snottites doit jouer un grand rôle dans la fourniture d'éléments alimentaires et

énergétiques aux bactéries de ces structures. Il en est de-même pour les *Bdellovibrio* bactéries endo-bactériophages ayant la capacité de parasiter et de tuer les autres bactéries (présentes dans 1,4 à 2,2 % dans les snottites et les biofilms).

## Transfert bactérien entre l'eau de mélange et les snottites et les biofilms

Mécanisme d'échange entre l'eau de mélange et les biofilms « submersed »

L'étude des transferts possibles entre les biofilms « submersed » et l'eau de mélange en partant du principe qu'il y a deux possibilités :

- **Un transfert actif** ou il y a un tri ou une sélection des bactéries entrantes dans les biofilms « submersed ».
- **Un transfert passif**, ou seules les lois de la diffusion physique dans une membrane sont prises en considération (type : vases communiquant).

L'analyse réalisée dans cette étude est une analyse statique car aucune des données dynamiques étaient à notre portée.

- **Mobilité dans le transfert passif**

Il a été mis en évidence que les bactéries mobiles étaient plus aptes à un transfert passif entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed » (cette relation est relativement faible, environ 5 % estimée sur le coefficient de corrélation).

- **Aérobiose dans le transfert passif**

L'aérobiose peut être un facteur limitant par le fait que le biofilm « submersed » est en semi aérobiose. Dans cette étude nous n'avons pas mis en évidence de lien entre la pénétration des bactéries entre l'eau et le biofilm.

- **Bactéries marines dans le transfert passif**

Seules les bactéries capables de vivre dans les sols et les eaux se différencient des autres bactéries.

Ce sont les bactéries aquatiques, étant le mieux tolérées dans le transfert entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed ». Il existe une différence très faible entre les bactéries telluriques et les bactéries purement marines dans ce transfert.

- **Estimation des bactéries de l'eau de mélange ayant pu avoir un passage passif**

### Dans le cas d'un passage passif

Cette forme de pénétration dans le biofilm « submersed » est estimée aux environs de 42 % de la flore de l'eau de mélange.

La forme en coque des bactéries semble être un des critères favorisant le passage passif.

### Dans le passage actif

On peut l'estimer ce type de transfert par la valeur complémentaire du passage passif (toutefois il y aura une source d'erreur due au développement interne des bactéries dans le biofilm). Par déduction, on peut donc estimer qu'environ 58 % de la flore de l'eau de mélange a subi un passage actif.

Dans ces 58 % nous avons :

- Bactéries restant dans le biofilm « submersed » sans en sortir  $\approx$  38 %
- Bactéries présentes dans l'eau de mélange et absentes dans le biofilm « submersed », elles représentent  $\approx$  6 %
- Bactéries de la famille des *Methylophilaceae* représentant 3 % de l'eau de mélange.

Soit un total d'environ  $\approx$  47 % de passage actif de l'eau de mélange vers le biofilm « submersed ».

Sur les 58 % il resterait  $\approx$  11 % pouvant être :

- Soit un développement de la flore dans le biofilm « submersed », faisant la différence.
- Soit la mortalité dans l'eau de mélange pouvant être aussi un biais.

L'absence d'analyse dynamique de la flore des biofilms « submersed », ne nous permet pas de pouvoir affirmer en toute sécurité les valeurs analysées, mais elles restent quand même une base d'estimation.

- **Taille des bactéries en fonction du taux de pénétration**

L'étude des valeurs théoriques de longueurs et largeurs bactériennes, montre que la diffusion passive des bactéries de l'eau de mélange dans le biofilm « submersed », semble plus influencée par la forme bactérienne que par les dimensions de celle-ci.

La forme coque (*Cocci*) a plus de facilité pour un passage passif. La longueur des bactéries semble être un facteur de moindre importance (si la bactérie est de forme spiralée ou si elle a des flagelles péritriches ou des flagelles polaires très longues).

Les dimensions bactériennes étant des valeurs théoriques de la littérature, ces observations doivent être confirmées par des mesures en microscopie électronique.

## **La spéciation bactérienne<sup>c</sup>**

Pendant 15 millions d'années où la grotte a été isolée du monde extérieur, dans l'épigé l'évolution des êtres vivant faisait son chemin, une partie de la faune et de la flore se transformées et les hominidés évolués vers... *Homo sapiens*. Les bactéries dans la grotte de Sulzbrunn semblent avoir arrêté leurs évolutions.

Toutes les formes possibles d'évolutions microbiennes, que les bactéries de la grotte pouvaient utiliser pour se transformer et s'adapter à un nouveau milieu terrestre, ont été analysées et ont montré, qu'il n'y avait aucune raison d'avoir d'inhibition ou un arrêt de la spéciation.

Suite aux observations précédentes, il est difficile à admettre qu'après 15 millions d'années de vie dans un milieu défavorable, il n'y est pas eu d'évolution et une spéciation nouvelle pour s'adapter au milieu.

En prenant pour base une anomalie tous les 210 jours<sup>1,2</sup>, étant les cas les plus favorables, cela donne après 15 millions d'années d'isolement bactérien, une valeur d'erreurs de transcriptions génétiques possibles de plus de 26 millions par lignée de bactéries, par exemple : dans le cas de l'eau de mélange de la grotte ayant en flore bactérienne  $1,6 \cdot 10^6$  g/l, cela donne en 15 millions d'années un nombre d'erreurs de transcriptions possible de  $4,16 \cdot 10^{13}$ , soit 7 600 erreurs par jour et par ml.

Les hypothèses pourraient être les suivantes :

- Soit une vie au ralenti dans cette cavité, mais sur 15 millions d'années cela n'aurait pas eu d'influence sur l'inhibition de la spéciation.
- Soit une analyse taxonomique insuffisamment poussée pour connaître les modifications faibles ayant pu se produire.
- Soit les radiations dont la terre est bombardée et pouvant provoquer des mutations, ont épargné la cavité.
- Soit il y a eu une évolution parallèle entre le karst et l'épigé, couvrant toutes formes évolutives et de ce fait effaçant ainsi le différentiel d'évolution entre ces deux écosystèmes.

C'est pour cela que la recherche d'évolution possible dans cette cavité, présente un intérêt majeur dans la connaissance de l'évolution et de la spéciation à travers les âges.

## **Épidémiologie liée aux bactéries de la flore de Sulzbrunn**

Analyse de la géolocalisation de l'épidémiologie actuelle des bactéries présentes dans la grotte.

La répartition mondiale de certaines bactéries identifiées dans cette cavité, fait penser, que dans sa formation initiale il y a eu :

- Soit une homogénéité planétaire de la flore marine et terrestre relativement importante dans la période de la formation de cette cavité.

---

<sup>c</sup> **Spéciation** : évolution processus par lequel les populations évoluent, pour devenir des espèces distinctes. Le biologiste Orator F. Cook a inventé le terme en 1906 pour cladogénèse, la séparation des lignées, par opposition à anagénèse, évolution phylétique au sein des lignées. Charles Darwin a été le premier à décrire le rôle de la sélection naturelle dans la spéciation dans son livre de 1859 *L'origine des espèces*, il a également identifié la sélection sexuelle comme un mécanisme probable. Il existe quatre modes géographiques de la spéciation dans la nature, basée sur la mesure dans laquelle la spéciation des populations sont isolés l'un de l'autre : allopatriques, peripatriques, parapatriques, et sympatriques. Spéciation peut également être induite artificiellement, par le biais de l'élevage, l'agriculture ou des expériences en laboratoire. Si la dérive génétique est un contributeur mineur ou majeur à la spéciation est l'objet de nombreuses discussions en cours.

- Soit il y a un parallélisme évolutif, ayant produit une évolution identique dans la grotte et dans l'épigé.

L'isolement de la flore marine et terrestre lors du recouvrement (ex : la présence du genre *Arenibacter* étant une bactérie isolée d'échantillons de sédiments marins dans la grotte, a été aussi collectées en Chine et en Inde) cela voudrait dire, que cette bactérie aurait été présente sur la totalité de notre planète ou que ses origines ont évolué uniformément sur la terre.

## Utilisation de l'analyse de cette cavité au service de l'environnement

Après la découverte de la diversité de la grotte de Sulzbrunn, étude aussi importante, la question pouvant se poser : à quoi sert une telle réalisation ?

L'étude, des écosystèmes, n'est jamais une tâche inutile, elle permet d'analyser les mécanismes naturels mis en place pour retrouver l'équilibre écologique protégeant la pérennité de notre planète. C'est bien cela que l'on observe dans cette étude. C'est bien la pérennité, le point important des 15 millions d'années, permettant à cette cavité de continuer à vivre dans un univers complètement transformé de la vie maritime à la vie terrestre.

Pourquoi ne pas utiliser le savoir-faire-bactérien pour nous sortir de l'impasse dans laquelle notre société est tombée, par la pollution, par l'utilisation de carburant produisant des gaz à effet de serre, par l'augmentation démographique...

La connaissance de la vie microbienne, la culture bactérienne et les pratiques d'enrichissement, c'est-à-dire la biotechnologie nous permettra de résoudre de nombreux problèmes que l'évolution de notre société a engendrés.

La recherche biotechnologique doit s'orienter vers la protection de l'environnement : le but est de produire des souches natives ou génétiquement modifiées pour répondre aux besoins des organismes et des industriels, afin d'éliminer les polluants de notre planète.

Les domaines pouvant être couverts par la biotechnologie :

- La production de bactéries capables de consommer du méthane, dans le cadre de traiter biologiquement les productions naturelles de ce gaz à effet de serre.
- La production de bactéries autotrophes capables de consommer le gaz carbonique à des fins énergétiques, serait là aussi une mesure de réduire la pollution.
- La production de biomasse anoxique (biocœnose artificielle) pouvant transformer les déchets anthropiques et industriels dans le procédé de l'enfouissement sans rendre les sols anoxiques.
- La transformation des déchets par méthanisation pour le chauffage urbain et traitement des résidus de méthanisation par des bactéries capables d'utiliser les hydrocarbures.
- La production de l'hydrogène par voie microbienne : l'hydrogène peut remplacer les carburants fossiles, sa production par voie biologique serait possible.
- Faire produire de l'oxygène par des bactéries comme le *Methylomirabilis* pour les vols orbitaux et les voyages interstellaires...
- ...

La grotte de Sulzbrunn est un musée, elle nous raconte la vie passée de notre planète. Si les bactéries ont créé la vie, elles peuvent nous aider à la faire subsister encore de nombreuses années.

**« La biotechnologie peut être une clef importante dans l'écologie pour la maîtrise du réchauffement climatique.**

**Les bactéries ont rectifié le climat il y a 3 milliards d'années. Il y a 1,5 milliards d'année, elles nous ont permis de pouvoir vivre dans un milieu aérobie nous convenant en oxygène, elles ont rendu notre planète vivable. Elles peuvent donc rectifier notre climat actuel, étant loin de la pollution de ces périodes géologiques. »**

## CHAPITRE 1 / INTRODUCTION

### 1.1 Préface sur la grotte de Sulzbrunn

Faisant suite à la réception par la commission scientifique de la FFS, d'une étude sur une grotte bavaroise réalisée par les institutions suivantes : *Institute of Groundwater Ecology, Bavarian Environment Agency, Department of River Ecology* — étude publiée par *ISME Journal* le 26 septembre 2017 —, consistant en une analyse géochimique et bactériologique de la grotte de Sulzbrunn en Bavière, il nous a paru judicieux d'analyser la diversité microbienne de la flore ayant été identifiée par les auteurs.

La microbiologie cavernicole est de plus en plus étudiée, elle ouvre une voie nouvelle de la microbiologie terrestre et nous fait prendre conscience du peu de connaissances que nous avons sur cette flore microbienne terrestre

*« La Terre est un ensemble d'êtres vivants et de matière s'étant fabriqués mutuellement selon des cycles géochimiques. Autrement dit, les organismes vivants ne sont pas en résidence sur la terre, mais ils en constituent l'environnement : l'atmosphère, les sols, les océans, etc. sont façonnés par eux. C'est donc une extension de la notion, déjà présente chez Charles Darwin, que les vivants sont eux-mêmes les ingénieurs de leur propre monde sans avoir besoin pour cela d'être guidés par une intention.*

*Tous les êtres vivants sont impliqués dans le processus, mais ce sont les bactéries ayant fait le gros du travail de transformation de l'atmosphère et de la géologie terrestres depuis 3,7 milliards d'années. Puis les plantes, les animaux et l'homme ce dernier pendant une courte période seulement, 2,5 millions d'années. » James Lovelock (chimiste britannique)<sup>3</sup>.*

### 1.2 Traduction de la publication "**MICROBIAL MEGACITIES FUELED BY METHANE OXIDATION IN A MINERAL SPRING CAVE**" (*ISME Journal*)

#### 1.2.1 Mégalopoles microbiennes d'une grotte alimentée par l'oxydation du méthane

*Des biofilms massifs ont été découverts dans la grotte d'une ancienne source médicinale riche en iode dans le sud de l'Allemagne. Les biofilms couvrent complètement les murs et les plafonds de la grotte, donnant lieu à des spéculations sur leur métabolisme.*

*Dans un premier aperçu, nous présentons la structure et la fonction du microbiote du biofilm, combinées à l'analyse géochimique, à l'imagerie et à l'analyse moléculaire. Une analyse des isotopes stables a indiqué que le méthane thermogénique émergeant dans la caverne a joué un rôle important dans la formation du biofilm. L'atmosphère de la caverne non perturbée contenait jusqu'à 3 000 ppm de méthane et était micro-oxique<sup>d</sup>.*

*Une grande abondance et une grande diversité de méthanotrophes aérobies principalement dans les Methylococcales (Gammaproteobacteria) et méthylootrophe, dans les Methylophilaceae (Betaproteobacteria) ont été trouvées dans les biofilms, avec une diversité surprenante de bactéries hétérotrophes associés.*

*Les potentiels d'oxydation du méthane les plus élevés ont été mesurés pour les biofilms immergés sur la paroi de la caverne. Des structures globulaires hautement organisées de la matrice de biofilm ont été révélées par coloration à la lectine fluorescente. Nous proposons que la matrice extracellulaire serve non seulement de puits d'électrons pour les méthylootrophes des biofilms à teneur limitée en nutriments, mais aussi potentiellement comme barrière de diffusion contre la toxicité de l'iode atmosphérique volatilisé. Les liens possibles entre le cycle du carbone et de l'iode dans cet habitat particulier sont discutés.*

### 1.3 Introduction

*Le microbiote naturel s'organise souvent en biofilms, où les caractéristiques structurales et les interactions microbiennes augmentent la capacité du microbiote du biofilm à être actif et à persister dans des conditions environnementales difficiles. La production extensive de biofilm a été*

<sup>d</sup> **Micro-oxique** : pauvre en oxygène

précédemment rapportée principalement pour les systèmes d'eau de surface riches en énergie dominés par la production primaire phototrophique (Battin et al., 2016) ou dans les systèmes d'eau artificiels (Boltz et al., 2017). Dans les systèmes souterrains, les biofilms sont largement considérés comme oligotrophes (Griebler et Lueders, 2009 ; Ortiz et al. 2014). Néanmoins, il a été rapporté qu'un certain nombre de grottes et de systèmes karstiques hébergeaient des biofilms riches en diversité microbienne et avec des activités biogéochimiques élevées, principalement lithotrophes (Holmes et al., 2001 ; Engel et al. ;2010 ; Jane et al., 2010 ; Ruzsnyák et al. 2012 ; Barton et al., 2014 ; Riquelme et al, 2015). Dans cette étude, nous rapportons une formation de biofilm exceptionnellement étendue et massive ayant été récemment découverte dans une grotte semi-artificielle d'une source médicinale historique à Sulzbrunn (Schott, 1858), située dans le sud de l'Allemagne préalpine. Les biofilms microbiens subaériens et submergés recouvrent complètement les parois et le plafond de cette grotte semi-naturelle, donnant naissance à de vastes structures muqueuses pendantes jusqu'à 15 cm de longueur, également connues sous le nom de snottites (Hose et Pisgrowicz, 1999) diversifiées dans des habitats acidophiles, thermophiles ou sulfurés (Bond et al., 2000 ; Holmes et al., 2001 ; Northup et al., 2003 ; Jones et al., 2010 ; Ziegler et al., 2013). Notre objectif était donc de comprendre les principaux facteurs biogéochimiques de cet habitat microbien particulier.

## 1.4 Localisation de la grotte de Sulzbrunn

(ISME Journal)

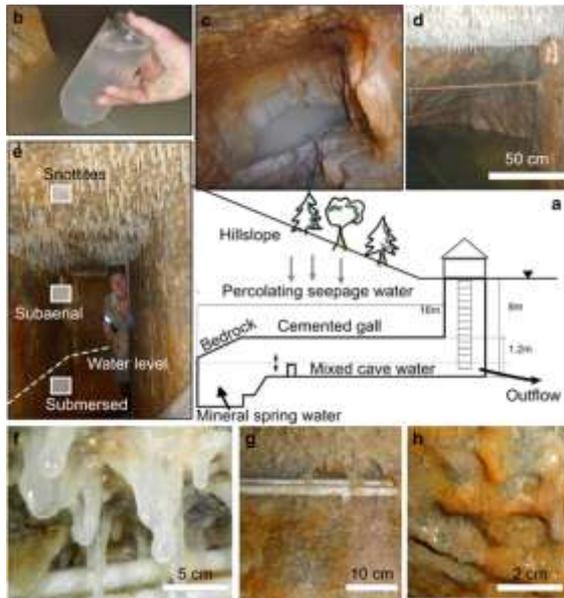


La grotte de Sulzbrunn est située dans les Alpes « d'Allgäu » (Bavière, Allemagne) à une altitude de 875 m.

La grotte se trouve dans un grès bien jointé du « Weissach-Schichten » constitué par de la molasse d'eau douce subalpine inférieure. Dans un rayon de 18 km autour de Sulzbrunn, on a observé à plusieurs reprises que du gaz naturel émergeait de trous de forage profonds atteignant des formations tertiaires molasses subalpines.

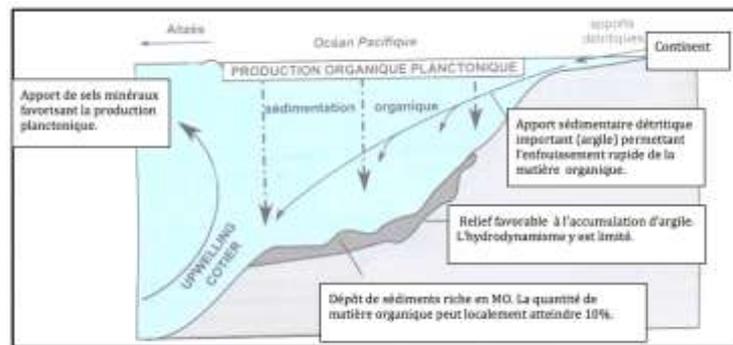
La grotte semi-artificielle de Sulzbrunn (47,67° N, 10,39° E) est accessible en descendant une échelle métallique de 8 m.

L'entrée dans la grotte peut se faire sans équipement respiratoire. Les visites ne sont possibles que pendant les saisons froides où les échanges d'air entre l'intérieur et l'extérieur sont limités. Pendant les périodes chaudes où la température extérieure est élevée, il y a risque de formations micro-oxydantes. Le grès poreux de « Bausteinschichten » de la Molasse du bassin subalpin est identifié comme un réservoir d'hydrocarbures migrants. Les argiles riches en matières organiques sous-jacentes sont une source potentielle de saumures à fortes concentrations en iode (Hesse et Schmidt-Thomé, 1975).



L'eau pénètre dans la grotte sous la forme d'eau de source minérale « d'upwelling », et d'eau de percolation d'infiltration. Sous des régimes hydrauliques normaux, cette cavité semi-artificielle est approximativement à moitié remplie d'eau, le niveau d'eau étant contrôlé par un simple système de trop-plein (Schott, 1858), ainsi que des analyses d'eaux récentes montrent (LfU-Bavarian Environment Agency, communication personnelle 2014), des charges en d'iode élevées dans le mélange aux eaux souterraines des prélèvements de printemps, allant jusqu'à 23 mg/l, provenant principalement de l'eau de source minérale.

Ces niveaux élevés d'iode, dépassant mille fois les concentrations normales d'eau douce (Whitehead, 1984) et la salinité élevée dans l'eau de source minérale, sont un indicateur de l'eau de formation « d'upwelling »<sup>e</sup>, ayant été en contact avec des dépôts de sédiments organiques de Länden riches en pétrole et en gaz (Lu et al., 2015).



Le modèle du upwelling côtier des côtes péruviennes

Les sources d'hydrocarbures dans la molasse du bassin subalpin sont autochtones, issues des sédiments mésozoïques (Hiltmann et al., 1999), surmontées par les formations de molasse au cours de l'orogénèse alpine.

La biomasse d'algues fossilisées est généralement fortement enrichie en iode, ayant été trouvée à des concentrations allant jusqu'à 150 mg/l dans un puits artésien foré dans la région (LfU, communication personnelle 2014).

Les formations d'hydrocarbures à Sulzbrunn sont plus profondes, dues à des systèmes de failles pénétrantes. On peut supposer que l'upwelling des eaux riches en iode produise les infiltrations de gaz naturel.

<sup>e</sup> **Upwelling** : traduction : la remontée d'eau, c'est un phénomène océanographique qui se produit lorsque de forts vents marins (généralement des vents saisonniers) poussent l'eau de surface des océans laissant ainsi un vide où peuvent remonter les eaux de fond et avec elles une quantité importante de nutriments. Les phénomènes de remontée d'eau se localisent par leurs résultats : une mer froide et riche en phytoplancton. Concrètement pour les pêcheurs, la remontée d'eau se traduit par une augmentation importante du nombre de poissons.

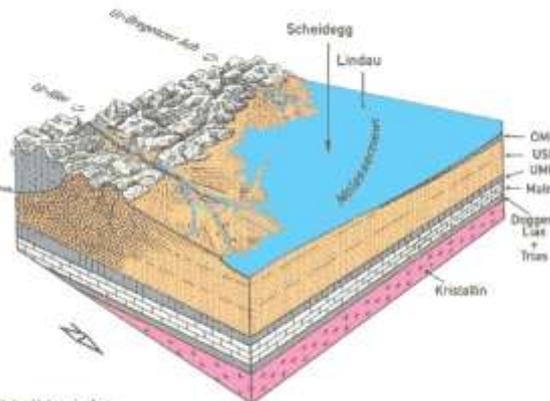
## 1.5 Formation géologique et hydrogéologie de la Bavière<sup>4</sup>

### Les chutes d'eau autour « d'Oberstaufen » (*Oberallgäu*)

#### Description du Bureau géologique bavarois

##### *Pétrographie*<sup>f</sup>

Die Molassezone in Ober- und Westallgäu



zur Zeit des Untermisziens.

Die Festlandsökonterite der Unteren Süßwassermolasse (USM) werden von Molassendeck überflutet. Es entstehen die marinen Ablagerungen der Oberen Meeresmolasse (OMM).

Les couches de grès et de conglomérats les plus anciens du dépôt de la rivière Weißach sont accessibles dans le ravin de Buchenegger. Les couches les plus profondes de Weißach sont dans les couches fluviales les plus basses de la molasse d'eau douce. Le réseau hydrographique des sédimentations produit dans l'Oligocène au Miocène, provenant des hautes crêtes alpines appartient à la zone ouest de la rivière amont l'Iller. L'origine des conglomérats est marquée de « faciès gris » partageant les affleurements du ravin de Weissach. Ce faciès « faciès des hautes crêtes » se situe en amont du centre de distribution. On a des affleurements rocheux à la basse Weißach Tobey.

#### **Quand et comment ont été formées les chutes Oberstaufen ?**

Les chutes d'eau ont été formées dans les roches de basse molasse d'eau douce. Ceux-ci ont été déposés sur le continent au cours du Miocène, il y a 17 à 15 millions d'années. À cette époque, la vitesse d'écoulement des rivières torrentielles apporte des graviers de dimension relativement grossiers. Les couches de conglomérats composées de galets de tailles différentes, ainsi que de beaux fragments de roches et des minéraux, ont été cimentées par une masse de mortier (pouding). C'est pourquoi dans la région du lac de Constance ce gravier est appelé gravier « Dominant ». Parfois les rivières, avec des vitesses d'écoulement plus faibles, donnent des dépôts de limon – sableux, qui après solidification ont fourni les pierres formées d'agglomérats de sable de la Marne, ayant servi à la construction d'usines aujourd'hui fermées, dont les vestiges sont encore présents. Ces pierres ont conservé des fossiles d'animaux.

#### **La zone des molasses<sup>g</sup>**

Les dépôts de débris dus aux intempéries dans les montagnes des Alpes du Nord a formé la zone de molasse détritique terrigène, il y a environ 35 millions d'années. Ce phénomène s'est renouvelé au cours du temps, afin que les anciens débris fussent recouverts à nouveau. Un énorme rocher de plusieurs milliers de mètres d'épaisseur a été inclus sur ses franges sud et même dans le pli de la

<sup>f</sup> **Pétrographie** : science traitant de la description des roches, de leur classification et de leur origine.

<sup>g</sup> **Molasse** : roche sédimentaire, essentiellement détritique, et post-orogénique, s'accumulant dans des bassins d'avant-pays en périphérie des chaînes de montagnes. Les molasses sont souvent des grès à ciment de calcaire argileux, parfois de couleur verte à cause de la glauconie. Ils incorporent aussi régulièrement d'épais niveaux conglomératiques. Ce sont généralement des roches friables, tendres et perméables formant des reliefs modérés.

<sup>g</sup> **Roche détritique** : roche sédimentaire composée d'au moins 50 % de débris. Si les débris sont issus de l'érosion d'autres roches, alors on la qualifie de roche détritique terrigène. Si au contraire les débris sont formés par des squelettes d'organismes vivants alors la roche est qualifiée de biodétritique ou biogénique.

Les roches détritiques terrigènes représentent entre 80 et 90 % des roches sédimentaires.

Les roches détritiques sont classées en trois groupes selon la taille des débris :

- Rudite (grains de taille supérieure à 2 mm)
- Arénite (grains de taille entre 1/16 et 2 mm)
- Lutite (grains de taille inférieure à 1/16 mm).

montagne. Cette plaque s'étend sur plus de 1 000 km et environ 130 km de large dans la partie bavaroise (MMO). Alors que la mer a inondé temporairement la zone de molasse au cours de l'histoire, après la mer un lac s'est formé dans le paysage fluvial. En conséquence différents sédiments se sont déposés, donnant maintenant la formation des molasses de mer et des molasses d'eau douce.

USM : Sédiment de la partie continentale d'eau douce.

UMM : Molasse due à l'inondation par la mer.

OMM : Molasse de dépôts marins de la mer supérieure.

OSM : Terre fine formée par la dégradation des roches supérieures en molasse d'eau douce.

Cette étude bavaroise montre que la formation de la grotte de Sulzbrunn a une origine marine, lui donnant sa spécificité avec une grande biodiversité dans sa flore microbienne.

## 1.6 Implantation de la flore biologique dans la grotte

(ISME Journal)

Bien que le microbiote des suintements de gaz marins ait fait l'objet d'études approfondies (Ruff et al., 2015 ; Paul et al., 2017), il existe relativement peu d'informations sur ces systèmes dans le sous-sol terrestre. Des méthanotrophes et des biofilms aérobies ont déjà été trouvés dans les systèmes d'eau souterraine et d'eau potable, où ils peuvent être impliqués dans l'oxydation du méthane ou des composés méthyles (Newby et al., 2004 ; Stoeker et al., 2006). La grotte de « Movile » en Roumanie, recevant des eaux thermales profondes riches en sulfure d'hydrogène (Sarbu et al., 1996), héberge également des tapis microbiens de méthanotrophes actifs (Hutchens et al. 2004 ; Chen et al., 2009). Récemment, le rôle de l'oxydation microbienne du méthane dans les écosystèmes des cavernes et des karsts a été abordé à l'échelle mondiale (Fernandez-Cortes et al., 2015 ; McDonough et al., 2016 ; Lennon et al., 2017). Les communautés entraînées par le méthane peuvent comprendre une multitude d'interactions entre les méthanotrophes, les méthylotrophes et les hétérotrophes (beck et al., 2013, Kalyuznaya et al., 2013 ; Paul et al, 2017). Les contraintes énergétiques imposées par les diverses voies d'assimilation du carbone sous de faibles concentrations d'oxygène et de méthane ont entraîné une production substantielle d'exo-polysaccharides chez les méthanotrophes (Linton et al., 1986 ; Strong et al., 2015), pouvant expliquer la production d'un tel biofilm massif.

L'apparence et la distribution uniforme des snottites ont montré qu'ils utilisaient un substrat gazeux pour leur croissance. Ainsi, nous postulons que les apports d'énergie gazeuse profonde émergeant avec l'eau « d'upwelling », éventuellement des alcanes légers ou du méthane, pourraient être un facteur important de formation de biofilm dans la caverne de Sulzbrunn. Nous émettons l'hypothèse que les snottites, ainsi que les biofilms subaériens et submergés, sur le mur devraient être dominés par une faible diversité d'autotrophes capitalisant sur les apports énergétiques disponibles. La compartimentation de la grotte et les distinctions possibles dans l'approvisionnement en substrat doivent être reflétées dans des sous-types de biofilm distincts, des taux de renouvellement du substrat et des signatures isotopiques. Enfin, nous nous demandons si des liens possibles entre le cycle du méthane et de l'iode peuvent être déduits pour cet habitat microbien particulier.

## 1.7 La genèse des hydrocarbures (Planète énergie)

Dans les profondeurs de la Terre, pétrole et gaz naturel naissent d'une transformation de la matière organique d'origine végétale ou animale. Leur genèse s'étale sur des millions d'années et nécessite des conditions de pression et de température particulières. Des millions d'années sont nécessaires à la formation des hydrocarbures, au cœur des grands plissements géologiques.

Quand un organisme vivant meurt, la matière le composant est généralement recyclée de deux manières différentes :

- Des charognards ou des bactéries s'en nourrissent...
- Exposée à l'air ambiant ou à des eaux chargées en oxygène, la matière résiduelle s'oxyde : carbone, azote, soufre et phosphore qu'elle contient se combinent avec les atomes d'oxygène et se changent en eau (H<sub>2</sub>O), en gaz carbonique, en nitrates, en sulfates et en phosphates pouvant alimenter la croissance des bactéries et des algues marines.

- En état d'anaérobiose les *Archaea* (qui sont souvent autotrophes, anaérobies, extrémophiles, méthanogènes...) sont capables de transformer en absence d'oxygène la matière organique, en gaz comme le méthane (méthanogenèse) et de se servir de l'azote et de l'oxygène de leurs substrats pour créer leurs propres organismes. Cette réduction carbonée peut-être à l'origine des hydrocarbures.

## 1.8 La lente formation d'une roche mère

Une infime partie de cette masse organique, de l'ordre de 0,1 %, échappe à ce destin. Transportée par les cours d'eau, cette matière se dépose parfois au fond des mers ou au fond de grands lacs continentaux. Dans ces milieux peu oxygénés, peu agités par les courants, elle est en partie préservée. Elle se mêle à des matières minérales (particules d'argile ou sables très fins), mais aussi au plancton marin mort (animaux et végétaux microscopiques). Sous l'action de bactéries anaérobies, ce mélange se transforme en boues sombres et malodorantes.

Au fil du temps, ces boues s'accumulent et durcissent. Si elles contiennent au moins 1 à 2 % de matière organique, elles pourront jouer le rôle de roches mères sédimentaires riches en matières organiques s'étant déposées dans des conditions marines profondes ou lacustres, et qui, à terme conduiront à des gisements d'hydrocarbure et de gaz.

Un climat chaud favorisant le développement d'importante quantité de plancton, la proximité de l'embouchure de grand fleuve charriant beaucoup de débris végétaux et organiques, l'absence de montagne à proximité pour retenir les sédiments et limiter le volume de dépôt vont conduire à la formation des gisements de pétrole et de gaz. Ce pourcentage semble faible.

Ces dépôts vont conduire à une activité vivante (coquillages, les algues, le phytoplancton, les mollusques, les bactéries...).

Très lentement, la roche mère s'enfonce dans la croûte terrestre sous le poids des sédiments : elle parcourt quelques mètres ou quelques centaines de mètres par million d'années. Cet affaissement progressif porte le nom de subsidence et débouche sur la formation d'un sédiment argilo-calcaire et organique, allant s'enfoncer petit à petit dans la croûte terrestre par l'intermédiaire des mouvements des plaques continentales.

En s'enfouissant dans le sol, la roche mère est soumise à des températures de plus en plus fortes et la matière organique la composant se retrouve écrasée par le poids des sédiments, la pression augmentant en moyenne de 25 bars pour 100 mètres. À un kilomètre sous terre, il fait 50 °C pour une pression de 250 bars ! Ce mélange sédimentaire va transformer le milieu en hydrocarbure et en gaz.

## 1.9 Formation des biofilms<sup>5</sup>

Les bactéries ne peuvent pas vivre en solitaire, elles prospèrent au sein d'une population microbienne lui apportant une protection et une biocœnose par la diversité de ses membres. Or ces souches structurées sont difficiles à éliminer. La raison de cette résistance, vient du fait qu'elles s'organisent en groupe pour former une matrice de protection entourée par un film de poly-glycane et poly-galactane leur permettant de s'isoler de l'extérieur (biofilm). Cette structure fermée leur permet d'être résistante aux attaques chimiques ou antimicrobiennes provenant de l'extérieur. La matrice interne du biofilm contient des molécules d'ADN constituant un réseau de fibres allant protéger les bactéries des attaques extérieures.

Lorsque les conditions extérieures sont favorables les bactéries peuvent sortir de ce biofilm et reprendre leurs activités.

### La genèse du biofilm

Les bactéries commencent par se rassembler grâce aux lectines et à la sécrétion de traceurs chimiques leur permettant de communiquer entr'elles. Elles activent des gènes codant des protéines que les bactéries isolées ne peuvent pas produire. Ces protéines vont leur servir à adhérer sur les surfaces des parois. Puis elles vont former une enveloppe visqueuse allant les protéger des toxines et des antibiotiques. Au sein de cette structure elles forment une micro-colonie, envoient des signaux afin

d'échanger des gènes bénéfiques et des nutriments. Lorsqu'il y a un risque de surpopulation, ses membres envoient un signal biochimique déclenchant la dispersion. Des cellules sont alors libérées et partent coloniser de nouvelles surfaces.



***Biofilms « subaerial » observé sur les plafonds  
et les murs de la grotte de Sulzbrunn.***

*Ce biofilm couvre complètement les murs et les plafonds, donnant lieu à des spéculations sur le métabolisme de ces complexes microbiens. Cette structure du microbiote combinant l'analyse géochimique et microbiologique a un intérêt à la fois environnement et médical pour mieux connaître les systèmes microbiens de défense.*

*L'écosystème que représente la vie microbienne dans un biofilm est d'autant plus intéressant par le fait que le biofilm est un système fermé et auto-régulé.*

Photo : ISME Journal

## CHAPITRE 2 / MÉTHODE D'ANALYSE DE LA GROTTÉ

(ISME Journal)

**L**es biofilms de la galerie artificielle cimentée de la grotte et les parois distales du substratum rocheux ont été échantillonnés au cours de deux années consécutives (novembre 2012 et décembre 2013) pour des analyses moléculaires. En octobre 2015, des échantillons de biofilm supplémentaires ont été prélevés pour la microscopie.

Afin d'échantillonner les biofilms et l'eau de source minérale provenant des fissures rocheuses à l'extrémité de la grotte, l'eau remplissant la galerie a été pompée. Des échantillons de biofilm ont été collectés dans trois compartiments différents : des biofilms submergés (~ 30 cm du fond du mur), des biofilms subaériens (~ 20 cm sous le plafond) et des snottites prélevés au plafond. À chaque point temporel d'échantillonnage, les trois compartiments ont été échantillonnés en répétitions le long d'un transect horizontal couvrant 16 m de la galerie de la grotte. Les échantillons de biofilms ont été directement transférés par raclage dans des tubes de polypropylène stériles (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) et tous les échantillons ont été congelés (-20° C) dans les 6 heures après l'analyse moléculaire.

Des échantillons d'eau d'infiltration par percolation, d'eau de source minérale et d'eau souterraine mélangée ont été recueillis dans des bouteilles en verre stériles de 1 litre pour des analyses microbiologiques et physico-chimiques. Une eau de source minérale a été prélevée à plusieurs reprises (novembre 2012, décembre 2013) à partir d'un canal d'échantillonnage en acier inoxydable installé dans une fissure à l'arrière de la grotte, alors que l'eau d'infiltration a été recueillie (décembre 2013). L'eau des grottes mixtes a été collectée à plusieurs occasions (octobre 2012, novembre 2013, décembre 2014, octobre 2015) à l'aide d'un échantillonneur « Ruttner » (KC Denmark A / S, Silkeborg, Danemark). Les cellules microbiennes dans les échantillons d'eau ont été comptées en utilisant SybrGreen pour la coloration de l'ADN sur un cytomètre de flux (Beckmann Coulter FC 500, Beckmann Coulter, München, Allemagne) comme décrit précédemment (Bayer et al., 2016).

La température, le pH, l'oxygène dissous et la conductivité spécifique des échantillons d'eau ont été mesurés à l'aide de capteurs de champ étalonnés (Hach, Düsseldorf, Allemagne).

Les échantillons d'eau ont été analysés pour le carbone organique dissous (COD) en utilisant un TOC-V (Shimadzu, Neufahrn, Allemagne). Avant l'injection, les échantillons de COD (0,45 µm filtré) ont été automatiquement acidifiés (pH <2), aspergés d'oxygène pour éliminer le carbone inorganique et analysés par combustion à haute température (Mathis et al., 2007). Les principaux cations (calcium, magnésium, potassium, ammonium, sodium) et les anions (nitrite, nitrate, chlorure, bromure, sulfate) ont été mesurés sur un chromatographe ionique DX-100 (Dionex, Germering, Allemagne) comme décrit (Stoewer et al., 2015)<sup>h</sup>.

Le CH<sub>4</sub> et CO<sub>2</sub> ont été quantifiés par injection de 250 µl de gaz dans une colonne HayeSep<sup>i</sup> (80-100



<sup>h</sup> Échantillonneur Ruttner d'eau limnologique avec intérieur sans métal. L'échantillonneur d'eau industriel est une version spécialisée de l'échantillonneur d'eau standard selon Ruttner. Il a été développé pour répondre aux exigences d'une analyse chimique plus précise des échantillons d'eau.

<sup>h</sup> TOC-V- Analyse du COD (Carbone organique dissous) Table Catalytique Oxydation NDIR méthode modèle



La fonctionnalité de mesure automatique continue à abeille, ajouté à la capacité de la combustion catalytique oxydation/NDIR TOC-V Séries pour mesure de haute performance, haute sensibilité de substances organiques. La table des matières-V en ligne peut être utilisée pour une surveillance permanente haute sensibilité automatique des échantillons d'eau comme l'eau pure et l'eau du robinet.

<sup>i</sup> Colonne HayeSep D : matrice HayeSep D, 100-120 mesh, bouteille de 75 cc

mesh<sup>j</sup>, 6 mx 1/8 ') d'un chromatographe en phase gazeuse (GC) équipé de détecteurs à ionisation d'hélium et de conductivité thermique (SRI Instruments, Bad Honnef, Allemagne).

Les concentrations d'iode total dans les échantillons d'eau ont été analysées par spectrométrie de masse à couplage inductif et par chromatographie ionique (Michalke et Witte, 2015).

L'analyse des isotopes stables à l'eau a été réalisée par spectrométrie à cavités cavitaires (Picarro L2120-I, Picarro, Santa Clara, CA, USA) pour <sup>2</sup>H et <sup>16</sup>O et avec comptage par scintillation liquide pour <sup>3</sup>H et a été utilisée pour estimer le mélange d'eau ratios (Stoewer et al., 2015).

Les échantillons de gaz ont été prélevés directement en recueillant des bulles de gaz émergeant du bassin à ressorts distal dans des bouteilles inversées remplies d'eau ou en pompant l'atmosphère de la grotte non perturbée vers l'extérieur de la caverne par des tuyaux installés au plafond.

Le volume de la tubulure a été purgé cinq fois avant la collecte de l'échantillon. Le méthane et le CO<sub>2</sub> ont été quantifiés dans les 24 heures suivant l'échantillonnage des gaz, tandis que les gaz pour l'analyse isotopique ont été conservés dans l'obscurité à 4 C dans des récipients en verre appropriés jusqu'à la mesure.

Le méthane dissous dans l'eau a été quantifié à l'aide de la méthode d'équilibrage de l'espace de tête (Kampbell et vandegrift, 1998). L'abondance des gaz <sup>13</sup>C et <sup>2</sup>H a été mesurée par séparation sur une colonne RT-QPLOT (30 mx 0,32, Restek, Bad Homburg, Allemagne) et mesurée à l'aide d'un TRACE GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, München, Allemagne), couplée à un spectromètre Finnigan MAT 253 (Thermo Fisher Scientific) via une interface Finnigan GC Combustion III comme décrit précédemment (Bergmann et al., 2011).

Pour l'analyse isotopique et élémentaire, les biofilms ont été lyophilisés et broyés en poudre. L'abondance des <sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N a été mesurée sur un analyseur élémentaire (EA, Euro Vector SPA, Redavalle, Italie) avec une unité de combustion (Hekatech, Wegberg, Allemagne) connectée à un IRMS Mat 253 comme décrit précédemment (Bernstein et al., 2010).

L'analyse des éléments traces de biofilms lyophilisés a été réalisée pour l'iode total, le phosphore, le fer et le soufre par spectrométrie d'émission plasma-plasma à couplage inductif (Hou et al., 2006).

---

<b>Propriétés</b>	Adsorbent Analytique /Chromatographie phase gaz
Catégories apparentées,	Ai Sep Poreux polymère absorbant Plus...
Emballage	Bouteille de 75 cc
Paramètre	290 ° C temp. Limite de
Application (s)	Chromatographie en phase gazeuse (GC) : adapté
Matrice	HayeSep D
Taille des particules	100-120 mesh
Surface spécifique	~ 795 m <sup>2</sup> /g
Densité	~0.33 g/ml (densité de chute libre)

#### Description

Les polymères poreux sont l'adsorbant plus adapté pour les applications basées sur l'analyse des gaz, acides, amines, composés organiques de faible teneur en carbone et eau, ils sont plus adaptés pour la chromatographie en phase gazeuse et sont essentiellement des copolymères de poly-di-vinylbenzène (DVB), qui sont très poreux dans la nature allant de méso-poreux à microporeux.

« HayeSep » possède une surface importante en raison de ses micropores ce qui en fait un candidat approprié pour la séparation des gaz et des composés organiques volatils (COV). En outre ils sont relativement inertes et hydrophobe.

**Application :** D HayeSep en association avec Tenax TA a été utilisé pour analyser les composés polaires, de faible poids moléculaire de poids, tels que le méthanol et l'éthanol et des composés organiques volatils non polaires, tels que le benzène et du toluène dans une désorption programmées par température combinée à la masse spectrométrie et spectroscopie Infra-rouge à transformées Fourier (FTIR).

<sup>j</sup> **Mesh :** La mesure en mesh est une mesure inverse de la taille d'une maille : la valeur en mesh diminue quand la taille de la maille augmente. La correspondance n'est toutefois pas parfaitement proportionnelle : doubler la taille d'une maille ne divise pas toujours exactement sa mesure en mesh par deux (nombre de mailles par pouce carrée).

## 2.1 Mesure de l'activité

(ISME Journal)

Les vitesses d'oxydation du méthane ont été mesurées pour des « triplicats »<sup>k</sup> d'échantillons de biofilm frais prélevés dans les trois compartiments différents. Pour cela, ~ 6 g d'échantillons de biofilm ont été dispersés dans 20 ml de nitrate de milieu minéral (Whittenbury et al., 1970) rempli dans des bouteilles en verre de 250 ml et scellé avec des bouchons en caoutchouc butyle. En tout, 16 000 ppm de CH<sub>4</sub> (Linde, München, Allemagne) ont été ajoutées aux bouteilles remplies d'air et l'oxydation du méthane a été suivie au cours du temps en utilisant les mesures de GC décrites ci-dessus. Les incubations ont été continuellement secouées (150 tr/min) et maintenues à l'obscurité à 12 °C. Les analyses de gaz ont été effectuées après 0, 24, 48 et 72 h d'incubation. Les taux d'absorption de méthane ont été normalisés en poids frais de biofilm (g<sub>FW</sub>).<sup>l</sup>

---

<sup>kk</sup> **Triplicats** : une analyse caryotypique, à l'aide de plusieurs techniques de coloration, a été réalisée en *triplicat*. Normalement, on utilise un *triplicat* d'échantillons, à cause de la très grande disparité dans la répartition des cellules d'algues dans les échantillons d'eau.

**Exemple de l'unité de mesure :**

Taille du tamis (µm)	4750	3350	2360	1 000	<b>500</b>	250	149	125	74	37
Taille de mesh	4	6	8	18	35	60	100	120	200	400

Pour des mailles assez petites, on peut utiliser la correspondance grossière : mesure en µm = 15 000 / mesure en mesh.

**Équipement de chromatographie phase gaz** couplée avec un détecteur une spectroscopie de masse.

### 3.1 Visualisation des biofilms

(ISME Journal)

Les caractéristiques structurales des biofilms ont été examinées par microscopie confocale à balayage laser de substances polymères extracellulaires et de glycoconjugués avec des lectines marquées par fluorescence comme décrit (Zang et al., 2015).

Les biofilms ont été utilisés frais, fixés dans du paraformaldéhyde ou incorporés dans un composé OCT (Tissue-Tek, Sakura GmbH, Staufen, Allemagne).

Les échantillons ont été coupés en coupes fines en utilisant une lame de rasoir ou un cryotome<sup>m</sup> CM 3050S (Leica, Wetzlar, Allemagne).

Divers colorants spécifiques à l'acide nucléique, par exemple SybrGreen, Syto 9 et Syto 60 (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas) ont été utilisés pour la coloration de cellules bactériennes. Les glycoconjugués ont été mis en contraste avec la lectine AAL<sup>n</sup> spécifique au fructose (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) marquée avec des fluorochromes Alexa-488, Alexa-568 ou Alexa-633 (Molecular Probes). Un microscope confocal à balayage laser (TCS SP5X, Leica)<sup>o</sup> équipé d'une source de lumière super continuum et contrôlé par le logiciel LAS AF (version 2.6.1., Leica) a été utilisé pour l'imagerie.

Les images ont été collectées à des intervalles de coupe de 1 µm en utilisant les lentilles d'objectif 25 x NA 0,95 wi et 63 x NA 1,2 wi. Les rapports signal / bruit ont été optimisés à l'aide de la table de conversion glow-over-under<sup>p</sup>. Des ensembles de données d'images multicanaux ont été projetés en utilisant le logiciel Imaris (version 8.2.0, Bitplane, Zurich, Suisse).

### 3.2 Extraction de l'ADN

(ISME Journal)

L'ADN a été extrait à partir d'échantillons biologiquement répliqués (n = 2-4). Les biofilms congelés ont été remis en suspension dans un tampon salin tamponné au phosphate 1X et dispersés par sonication<sup>q</sup> (Cury et Koo, 2007). Une « sonication » répétitive (3x) (35 kHz, Sonorex RK102, Bandelin Electronic GmbH & Co., Berlin, Allemagne), secouée et centrifugée (5500 g pendant 10 minutes à 4° C)

<sup>m</sup> **Cryotome** : l'équipement microtome cryotome en microscopes est réalisé par un congélateur constitué d'un réservoir d'azote liquide, qui est l'unité de froid, positionnée adjacente au couteau du microtome de manière que les fragments soient aspirés et retirés simultanément ou immédiatement après leur production.

<sup>n</sup> **Lectine AAL** : des tests cellulaires montrent que, la lectine d'*Agrocybe aegerita* AAL-2 séparée par la présente invention a une excellente activité anti-tumorale, et peuvent induire une apoptose significative.

<sup>o</sup> **TCS SP5X, Leica** : le microscope confocal TCS SP5 Leica répond à une large gamme d'applications dans le domaine du confocal et de l'imagerie multiphoton tout en offrant une excellente performance générale. Le système fournit toutes les différentes vitesses de balayage à la plus haute résolution possible. Grâce à sa détection SP éprouvée et hautement performante (cinq canaux en simultané), ainsi qu'un AOB (Acousto-Optical Beam Splitter – pour séparateur de faisceaux acousto-optiques) en option, le Leica TCS SP5 offre des images claires, sans bruit avec des photo-dommages minimes en haute vitesse.

<sup>p</sup> **Imagerie micrographique de zooplancton**

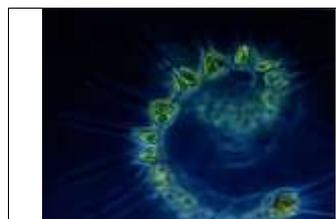


Image d'un zooplancton trouvé dans la grotte de Sulzbrunn

**Zooplancton** : plancton animal, extrêmement varié, comprenant des représentants d'à peu près tous les grands groupes d'animaux marins : Protistes, Coelenteres, Ctenophores, vers, mollusques, Crustacés, Échinodermes, Tuniciers, Poissons.

Sur cette photo on peut penser à un type de Ctenophore.

Photo : (ISME Journal advance online publication 26 september 2017)

<sup>q</sup> **Sonication** : Ultrasons Lyse pour Western Blot Le western blot est une méthode d'analyse pour la détection de protéines spécifiques dans un échantillon d'homogénat de tissu ou d'un extrait cellulaire. Pour exécuter un transfert Western ou pour mesurer l'activité enzymatique, de nombreux tests nécessitent un accès aux matériaux (par exemple les protéines, l'ADN, des fragments subcellulaires) piégées dans la cellule. Le traitement par ultrasons est une méthode fiable et facile à manipuler pour la rupture et la lyse cellulaire contrôlée.

a été utilisée pour interrompre la matrice extracellulaire. L'ADN des pastilles cellulaires et des filtres provenant de l'échantillonnage de l'eau ont été extraits en suivant les protocoles précédemment publiés (Pilloni et al., 2012).

### 3.3 Analyse quantitative par CPR de l'ARNr 16S des gènes bactériens

#### 3.3.1 Analyse phylogénétique en CPR

(ISME Journal)

La PCR quantitative des gènes de l'ARNr bactérien dans l'ADN extrait des échantillons de biofilm et d'eau a été réalisée telle que publiée par Pilloni et al. (2011)

De plus, un criblage préliminaire de la diversité des gènes marqueurs méthanotrophes dans les biofilms a été effectué par empreinte digitale de polymorphisme de longueur de fragment de restriction terminal comme décrit par la méthode.

Des amplicons<sup>r</sup> codés codant pour les gènes de l'ARNr 16S, couvrant la région V1-3, ont été générés et séquencés sur un séquenceur de génome FLX + (454 Sciences de la vie, Roche, Indianapolis, IN, USA) comme décrit précédemment (Pilloni et al., 2014 ; Lueders, 2014)<sup>6</sup> mais analysées et classées à l'aide de la plate-forme d'analyse de données SILVAngs (Pruesse et al., 2012 ; Quast et al., 2013). Les paramètres par défaut ont été utilisés pour le contrôle de la qualité, la déduplication, le regroupement des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) et la classification à un niveau d'identité de séquence de 97 %. Les assignations taxonomiques étaient basées sur la version de base de données SILVA 123 (24 juillet 2014). L'ensemble de données de séquençage a ensuite été traité à l'aide du progiciel phyloseq (McMurdie et Holmes, 2013) dans la version 3.1.2 de l'environnement (R\_Development CoreTeam, 2013). L'abondance moyenne des taxons les plus répandus (abondance relative > 3 %) provenant d'échantillons répétés a été représentée sous forme de parcelles de Krona (Ondov et al., 2011) Toutes les données de séquençage ont été déposées avec l'archive de lecture de séquence EBI sous l'ID BioProject PRJEB14605.

### 3.4 Caractéristiques physico-chimiques

(ISME Journal)

L'eau de source minérale était saline, micro-oxique et ne contenait que de faibles quantités de COD, d'éléments nutritifs, de phosphate et autres accepteurs d'électrons, tels que le nitrate ou le sulfate. La concentration totale d'iode était d'environ 20 mg l<sup>-1</sup> dans l'eau de source et diluée jusqu'à environ 3 mg l<sup>-1</sup> dans l'eau souterraine mélangée.

La température de l'eau de la grotte mixte se situait entre 8 et 11° C selon les points temporels d'échantillonnage, tandis que la source minérale semblait constante à ~7° C Le pH de l'eau souterraine mélangée était pratiquement neutre (pH ~7,5).

L'analyse des isotopes stables à l'eau ( $\delta^{18}\text{O}$  et  $\delta^2\text{H}$ ) a permis d'estimer les rapports de mélange entre l'eau de source profonde et l'eau météorique récente dans la caverne, d'après les calculs de mélange des membres terminaux.

À deux dates d'échantillonnage de l'eau, la contribution de l'eau d'infiltration météorique de la surface a été estimée à 58 ± 17 % ou 54 ± 18 % de l'eau souterraine mélangée, respectivement.

L'eau de source minérale était saline, micro-oxique et ne contenait que de faibles quantités de COD, d'éléments nutritifs, de phosphate et d'autres accepteurs d'électrons, tels que le nitrate ou le sulfate. La concentration totale d'iode était d'environ 20 mg l<sup>-1</sup> dans l'eau de source et diluée jusqu'à environ 3 mg l<sup>-1</sup> dans l'eau souterraine mélangée.

---

<sup>r</sup> Amplicon : fragment d'ADN amplifié par PCR (réaction en chaîne par polymérase).

**Température, pH, dissolution de l'oxygène et conductivité spécifique des échantillons d'eau »  
(Hach, Düsseldorf Germany)**

**Résultats :** (ISME Journal)

**Abréviations du tableau ci-dessous :**

DOC = carbone organique dissous ; CE = conductivité électrique (en microsiemens) ; Bd = non décelable Nd = non-analysé et non défini	TU= unités de tritium définies comme rapport de 1 atome d'hydrogène à 10 atomes de carbone. a) une mesure unique en décembre 2012. b) Cette étude (n = 4) et les données de surveillance de routine de LfU (n = 4).	c) Données de suivi LfU (n = 4) d'octobre 2011 à avril 2012. d) Cette étude (n = 3) et les données de surveillance LfU (n = 4). (Analyse de la publication)
---	---	---

**Analyse physico-chimique des différentes origines d'eaux dans la grotte**

Caractéristiques Physico-chimiques	Mélange des eaux		Eau de la source minérale		Eau météorique	
	Médiane	Min/Max	Médiane	Min/Max	Médiane	Min /Max
T° °C de l'eau	7,9	7,2 / 11,7	7,2	S. R.	8,6 <sup>a</sup>	S. R.
Cond. (µS/cm)	2100	2020/2200	6200	5890/6900 <sup>b</sup>	526 <sup>a</sup>	S. R.
pH	7,5	7,2/7,6	7,6	7,2/8,3 <sup>b</sup>	8,3 <sup>a</sup>	S. R.
O <sub>2</sub> (mg /l)	4,3	2,3/5,5	3,2	2,3/3,4	8,5 <sup>a</sup>	S. R.
DOC (mg/l)	1,2	0,8 / 1,4	0,7	0,5 / 0,9 <sup>b</sup>	0,6 <sup>a</sup>	S. R.
NO <sub>2</sub> mg/l	1,9	0,8 / 3,4	Bd	Bd / 0,2	5,6	4 / 5,6
PO <sub>4</sub> <sup>---</sup> mg/l	Bd	Bd	Bd	Bd / 0,02	0,01	0,01 / 0,02
SO <sub>4</sub> <sup>--</sup> mg/l	2,1	1,1 / 3	Bd	Bd / 1,7	4,2	3,4 / 4,2
Fer (total) mg/l	Nd	0,8	0,73	0,46 / 1	Nd	Nd.
Na <sup>+</sup> mg/l	93,9	51,9 / 328,6	649,8	561,3/1131,1	5	5 / 18,8
K <sup>+</sup> mg/l	1,6	1,2 / 3	4,6	4,2 / 8,6	1	1 / 1,4
Mg <sup>++</sup> mg/l	22,8	20,7 / 140,7	24,4	23,1 / 55,3	23	22,2 / 23,3
Ca <sup>+</sup> mg/l	97,2	62,1 / 205,1	51,5	50,2 / 111,9	82,2	76,9 / 82,5
Cl <sup>-</sup> mg/l	154	77,5 / 606,6	1301,7	1237,9/2248,3	1,1	1,1 / 4 ; 6
Br <sup>-</sup> mg/l	1,3	0,7 / 1,6	19,2	16,1 / 29,4	0,01	0,01 / 0,03
<b>Isotopes de l'eau</b>						
<sup>17</sup> O <sup>--</sup>	- 10,5	-10 8/ - 12,2	- 8	-9,6 / -7,7	- 11	-11,8 / - 10
<sup>2</sup> H <sup>+</sup>	- 73,9	- 74,7 / - 73,2	- 67,2	-69,1/-66,5	- 75,4	-82,3/- 68
TU	7,1		4,8		8,3	

**« L'eau météorique est une eau de pH basique avec une teneur en calcium plus fort que l'eau de source, cela définit le passage de cette eau dans une zone karstique entre l'épigé et l'endo-karst. La composition très marquée dans l'eau de source comparativement à l'eau météorique : en Na, Br, Cl, peut laisser penser à un origine marine lointaine. »<sup>5</sup>**

<sup>5</sup> « **Web. BioProject** » est un portail central permettant de représenter le plus haut ordre organisation, description et classification des données présentées sur plusieurs bases de données d'archivage « NCBI ». Il constitue un cadre souple permettant de décrire la portée et les objectifs du projet, pour regrouper les sous-projets et les projets connexes et de rassembler des dérivés des enregistrements de données qui seraient autrement dispersées. La base de données échantillon fournit un espace dédié permettant de décrire les matières biologiques sous enquête dans un projet et favorise l'utilisation de descriptions des échantillons structurées et cohérentes. « Objets BioProject » et échantillon peuvent être mutuellement liés entre eux et aux données expérimentales correspondantes dans le quelconque des bases de données d'archivage. Ni la base de données est limitée par la taxonomie et ce titre inclut des informations couvrant les procaryotes, les eucaryotes et les échantillons environnementaux. Pour prendre en charge ces bases de données et les données principales archives à NCBI, élabore actuellement un nouveau portail de présentation de NCBI pour guider et encourager les auteurs de la communication pour fournir le projet riche et exemple de métadonnées ainsi que leurs données expérimentales.

### 3.5 Nos observations sur les données présentées

#### Équilibre en équivalent des eaux, calculé sur les valeurs médianes

Les résultats ont été traités en milliéquivalent (méqv) afin de pouvoir analyser l'équilibre stœchiométrique.

#### Équilibre ionique de l'eau :

Différence en milliéquivalent (méqv) pris sur les moyennes :

Méqv = (anions - cations) en méqv

Méqv = (méqv NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + méqv PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> + méqv SiO<sub>4</sub><sup>2-</sup> + méqv Cl + méqv Br) - (méqv Na<sup>+</sup> + méqv K + méqv Mg + méqv Ca + méqv Fe)

#### Valeurs moyennes en milliéquivalent

Caractéristiques	Mélange des eaux	Eau de la source minérale	Eau météorique
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,034	0,003	0,1018
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0	0	0,0003
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,0456	0,0004	0,0912
Fer (total)	Nd	0,042	Nd
Na <sup>+</sup>	4,0844	28,2644	0,21748
K <sup>+</sup>	0,0409	0,1176	0,0255
Mg <sup>++</sup>	1,8756	2,0072	1,8920
Ca <sup>++</sup>	4,76	2,5245	4,0294
Cl <sup>-</sup>	4,3437	36,716	0,03102
Br <sup>-</sup>	0,0162	0,2403	0,0001

L'équilibre (anions - cations) de l'eau de mélange = - 5,986 méqv /l

L'équilibre (anions- cations) de l'eau de source minérale = - 4,002 méqv/l

L'équilibre (anion – cations) de l'eau météorique = - 5,9405 méqv /l

Considérons que le déséquilibre ionique peut être dû à la présence d'acide carbonique dans l'eau. Nous obtenons les concentrations suivantes en acide carbonique (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) dans les eaux de la grotte :

#### Teneurs estimées en CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> dissous obtenue sur méqv exprimée mg/l

Mélange des eaux en CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> = 263,4 mg/l.

Eau de source minérale en CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> = 176,0 mg/l

Eau météorique en CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> = 261,4 mg /l

L'état des carbonates dans l'eau nous permet de définir l'état d'incrustation de l'eau et les dépôts calciques.

#### Dissociations ioniques

La dissociation ionique s'exprimée par le logarithme base 10 du rapport forme salifère(S) /forme libre (L). Le pH définit le taux de carbonate libre et salifié par la formule :

$$\text{pH} - \text{pK} = \Rightarrow \log_{(10)} (\text{S/L}) \quad \log (\text{S/L}) \log_{(10)}^* (\text{forme : Salifié/Libre})$$

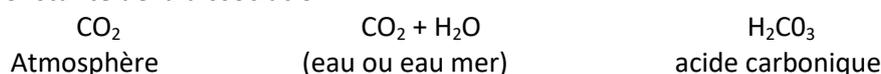
$$\text{pKa}^1 \text{CO}_3\text{H}^- 6,4 ; \quad \text{pKa}^2 \text{CO}_3^{2-} 10,25$$

#### Taux de la forme libre ou de la forme salifiée du dioxyde de carbone (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) à 15°C

Les eaux	CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ou CO <sub>2</sub> f(T°) = 20°C
Mélange des eaux (pH 7,5)	242,5 mg/l	20,9 mg/l
Eau de source minérale (pH 7,6)	164,9 mg/l	11,1 mg/l
Eau météorique (pH 8,3)	258,1 mg/l	3,3 mg/l

Le mécanisme de la dissolution du gaz carbonique se divise en deux phases :

#### La première constante de la dissociation



## La deuxième constante de dissociation (variation)

$\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$   
Les bicarbonates avec variation de pH

$\text{CO}_3^{--} + 2\text{H}^+$   
les carbonates avec variation de pH ( $2\text{H}^+$ )

### Formation des concrétions dans le karst :

$(\text{CO}_3\text{H})_2\text{Ca} + \text{choc}^{(\text{stalagmites})}$  ou  $\text{évaporation}^{(\text{stalactites})}$   $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{CO}_3\text{Ca} \downarrow^{(\text{insolubilisation})}$   
**Bicarbonate de calcium soluble dans l'eau**      **Eau + Gaz + Concrétions insolubles**

La régulation du pH à cette valeur légèrement alcaline en dépit de toutes les causes chimiques et biologiques de variation, est essentiellement le fait d'un enchaînement de réactions de dissociation réversibles réunissant les différentes formes minérales sous lesquelles le carbone est présent, selon le schéma précédant.

Un tel système inclue plusieurs constantes de dissociation et plusieurs vitesses de réactions.

Dans les conditions habituelles, environ 90 % du carbone de l'eau de mer se trouve sous la forme de bicarbonates  $\text{HCO}_3^-$ , 9 % sous la forme de carbonates  $\text{CO}_3^{--}$ , 1 % sous la forme de  $\text{CO}_2$  moléculaire (Morel, 1989).

Dans la grotte, l'eau météorique est plus incrustante et apporte plus de calcaire pour les concrétions. Cette caractéristique doit venir des terrains traversés par l'eau dans épi-karst la grotte devant d'être calcaire. Le taux de calcium est plus fort dans cette eau et le pH plus fort dû à la neutralisation de l'eau.

### 3.5.1 Tolérance en sel de l'eau

Dans les zones désertiques, l'utilisation des eaux fortement salées présente des difficultés en raison du goût et de l'action laxative des sels associés. Toutefois les eaux contenant 3 à 5 g/l de minéralisation (1 g/l de Na) paraissent physiologiquement tolérables, que le sujet soit acclimaté ou non.

Du point de vue agricole, le sodium est un élément des bases alcalines et alcalino-terreuses jouant un rôle dans le maintien de la perméabilité des sols pour l'irrigation. On utilise assez souvent un coefficient correspondant au pourcentage de sodium, celui-ci est donné par la formule suivante :

**Coefficient de salinité** (ou coefficient neuro musculaire) :

$$\% \text{Na}^t = \frac{(\text{Na} + \text{K}) * 100}{(\text{Ca} + \text{Mg}) + (\text{Na} + \text{K})}$$

Ce coefficient doit être inférieur à 60 % pour que l'eau soit considérée comme eau à usage agricole :

Dans les eaux de la grotte :

L'eau minérale :                      89,5    Na % (eau non-utilisable pour la culture et irrigation)

L'eau météorique :                    7,5     Na %

L'eau de mélange :                    44,3    Na % (limite à l'utilisation ou la consommation eau saumâtre)

L'eau source minérale de la grotte n'est pas bonne pour l'utilisation agricole, seule l'eau de mélange peut éventuellement être utilisée.

### 3.5.2 Proportion du mélange des eaux dans la grotte

Calcul fait sur le coefficient de salinité :

Nous pouvons nous baser sur ces rapports pour établir la constitution de l'eau de mélange :

L'eau minérale :                      44,8 %

L'eau météorique :                    55,2 %

<sup>t</sup> **Na pourcentage** : Dans l'eau de mer la salinité globale tourne autour de 35 ‰ (pour mille) c'est-à-dire 35 g de sel par kg d'eau de mer. La densité de l'eau est alors de 1,026 à la température de 15 °C.

Cette salinité est variable selon les mers : 40 ‰ pour la Mer Rouge en raison d'une forte évaporation autour ; 38 ‰ en Méditerranée ; 35,5 ‰ Atlantique Nord ; 10 ‰ en certains points de la Mer Baltique en raison d'apports d'eau douce de cette mer très fermée (et moins à proximité des estuaires du monde entier, où il y a un passage d'eau douce dans la mer).

### 3.5.3 Concentration estimée en chlorure de sodium

En prenant l'eau de mer à 3,5 % de NaCl la différence entre le nombre d'équivalent de chlore et le nombre d'équivalent de sodium nous donne une estimation de la présence de chlorure de sodium (le chlore est un acide fort) dans l'eau, valeur en méqv :

- L'eau source minérale :  $28,2644 (\text{Na}^+) - 36,716 (\text{Cl}^-) = - 8,4516$  ; soit 8,4516 d'excès de chlore en méqv. Soit 23 % de  $(\text{Cl}^-)$  sur les chlores totaux n'étant pas neutralisé par l'ion sodium. Le taux de chlorure en NaCl réel en chlore dans l'eau est estimé à 1002 mg/l de Cl, correspondant à 4,7 % d'eau de mer dans l'eau de source minérale.
- L'eau météorique :  $0,21748 (\text{Na}^+) - 0,03102 (\text{Cl}^-) = 0,18646$  méqv ( $\text{Na}^+$ ) soit 100 % du chlore neutralisé le sodium en chlore en NaCl et 85% du sodium n'étant pas neutralisé par le chlore mais par d'autres anions (sulfate, carbonate, et autres).

L'équivalent en eau de mer sera 0,005 % (soit une absence d'eau de mer).

- L'eau de mélange :  $4,0844 (\text{Na}^+) - 4,3437 (\text{Cl}^-) = - 0,27$  méqv ( $\text{Na}^+$ ) soit 0,27 méqv ( $\text{Cl}^-$ ) soit un excès de chlorure. Il y a 6,2 % de chlorures n'étant pas du NaCl. La teneur réelle en chlorure de sodium en chlore de 144 mg/l Cl, soit une équivalence en eau de mer de 0,7 % dans l'eau de mélange.

### 3.5.4 Analyse des résultats physico-chimiques

- L'eau météorique : ayant un pH de 8,2, a un excès de sodium non neutralisé pouvant être en partie sous forme de base, de bicarbonate, de carbonate.
- L'eau source minérale : ayant un pH de 7,6, a un excès de chlore non NaCl de 20 %, comparativement à une eau de mer standard ayant un excès de chlore non NaCl de 11,5 % et un rapport en équivalent Na/Cl de 88,5 %.

L'eau minérale correspondrait à une eau saumâtre, contenant **4,7 % d'eau de mer**. L'eau de mélange serait d'après les analyses à **0,75 % d'eau de mer** (Il y a eu sûrement un rééquilibrage ionique dans les chlorures, du au pH élevé de l'eau météorique).

Le taux d'iode de l'eau minérale de 20 mg/l est très élevé, comparativement à l'eau de mer étant de 0,05 mg/l soit **400 fois plus élevé que l'eau de mer**.

L'iode vient de la décomposition de la flore marine (algues) à l'origine du recouvrement par les molasses (il y a 15 millions d'années).

Il faudrait établir les flux hydriques de la grotte, afin de définir les pertes en sel et en iode depuis le recouvrement par les molasses.

### 3.5.5 Analyse de l'atmosphère de la grotte

(ISME Journal)

*Le gaz naturel s'échappant directement des fissures de la roche dans la cavité a été capturé et caractérisé par spectrométrie de masse à rapport isotopique GC (chromatographie phase gaz).*

*Les signatures isotopiques l'identifient comme du méthane thermogénique, indiqué par ses valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^2\text{H}$  est respectivement de  $-43,6 \pm 0,2 \text{ ‰}$  et de  $-164,9 \pm 2,2 \text{ ‰}$ . Des concentrations élevées de méthane allant jusqu'à 50 % ont été mesurées dans le gaz émergeant.*

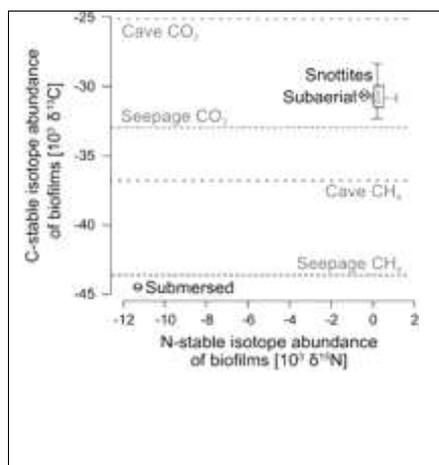
*Les concentrations moyennes de méthane dans l'eau mélangé de la grotte était 6 000 ppm et dans l'atmosphère de la grotte était de 3 000 ppm. La signature isotopique du carbone dans l'atmosphère souterraine non perturbée était de  $-36,8 \pm 0,1 \text{ ‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ .*

*Les concentrations moyennes de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) de 8 000 ppm dans l'air de la grotte étaient également nettement plus élevées que les concentrations ambiantes.*

*Le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  dans le gaz de fuite était de  $-33,2 \pm 0,1 \text{ ‰}$  et dans l'atmosphère de la grotte était de et de  $-25,2 \pm 0,1 \text{ ‰}$ .*

*Les concentrations d'oxygène dissous dans l'eau de source était de 3,2 % et dans les eaux de mélange souterraines était de 4,3 % en moyenne.*

*L'échantillonnage de l'atmosphère de la grotte non-perturbée prélevé par des tubes à gaz a révélé des conditions micro-oxiques stationnaires de ( $\text{O}_2$  :  $15,1 \pm 4 \text{ ‰}$ ,  $n = 5$ ).*



Rapports isotopiques mesurés pour des compartiments distincts de biofilm, ils sont stables pour le carbone et de l'azote

Signatures isotopiques stables du méthane et du dioxyde de carbone dans les bulles de gaz s'échappant de la nappe du fond de la cavité.

Dans le graphique l'atmosphère de la grotte est indiquée en gris.

Le domaine de variations des mesures est indiqué par la longueur de la boîte (snottites et biofilms « subaerial »), représentant les quartiles et le réticule dans l'intervalle (min, max.) des mesures d'isotopes pour les snottites.

### 3.6 Composition des biofilms

(ISME Journal)

Le pH des échantillons de biofilm était similaire à celui de l'eau (pH~7,5). L'analyse élémentaire des biofilms lyophilisés a permis de retrouver une signature isotopique du carbone léger (-44,4 ‰), correspondant directement au méthane infiltrant, en particulier dans les biofilms submergés.

Les snottites et les biofilms subaériens présentent une signature  $\delta C^{13}$  significativement plus élevée (-30,7 ± 1,1 ‰) que celle observée dans l'atmosphère de la grotte, pouvant signifier une séquestration de ces isotopes dans ces formations.

Un modèle similaire de signatures isotopiques, quoique moins prononcé, a également été récupéré pour les isotopes stables de l'azote. Le nitrate était la forme azotée la plus répandue dans l'eau, tandis que l'ammonium et le nitrite étaient inférieurs aux limites de détection. La teneur totale en azote est plus faible dans les biofilms du plafond. Cependant, les signatures azotées distinctes dans l'eau et les biofilms n'ont pas été analysées indépendamment.

#### 3.6.1 Forme sous laquelle se trouvent les biofilms

- Soit immergée par l'eau, ils seront dits « anoxique »
- Soit non-immersée par l'eau, ils seront dits « oxic »

Tableau résultat : ICP MS/OES

Échantillons	Ca (OES) mg/l	Fe (OES) mg/l	K (OES) mg/l	Mn (OES) mg/l	Cu (MS) mg /l
Biofilms anoxic	393,00 1	2628 6	27,80 0,1	32,54 0,06	210,50 0,4
Biofilms oxic	433,63 0,03	2807 5	39,73 0,01	34,79 0,07	214,00 2
Delta (anoxi-oxic)	- 40,63	- 179	- 11,93	- 2,25 <sup>(NS)</sup>	- 3,5 <sup>(NS)</sup>
Delta en méqv	- 1,99 méqv (Ca <sup>++</sup> )	- 9,12 méqv (Fe <sup>3+</sup> )	- 0,30 méqv (K <sup>+</sup> )	- 0,12 méqv (Mn <sup>3+</sup> )	- 0,11 méqv (Cu <sup>++</sup> )
Échantillons	P (OES) mg/l	S (OES) mg/l	Na (OES) mg/l	Ni (MS) mg /l	V (MS) mg/l
Biofilms anoxic	8,8 0,2	2949 9	251,80 0,3	527 7	66,5 0,8
Biofilms oxic	9,3 0,2	3125 9	157,59 0,009	578 5	61,00 0,5
Delta (anoxic-oxic) en mg/l	- 0,5 <sup>(NS)</sup>	- 176	+ 94,21	- 51, 00	+ 1,5 <sup>(NS)</sup>
Delta en méqv	-0,08 méqv (P <sup>5+</sup> )	-32,2 méqv (S <sup>6+</sup> )	+ 4,1 méqv (Na <sup>+</sup> )	- 2,6 méqv (Ni <sup>3+</sup> )	+ 0,08 méqv (V <sup>3+</sup> )

#### 3.6.2 Interprétation de l'analyse des biofilms

(Notre interprétation)

Dans ce tableau, il existe une différence entre les biofilms « oxic » (oxiques) et « anoxic » (anoxiques). Cette différence semble être due à la dilution de certains composants dans la partie immergée des biofilms.

Diminution des ions dans le biofilm anoxique comparativement à l'ensemble des biofilms en % due sûrement à l'équilibre ionique osmotique entre l'eau saumâtre et le biofilm :

Ca mg /l	Fe	K	S	Ni	P	Mn	Cu
9,83 %	6,58 %	3,53 %	5,79 %	9,2 %	5,52	6,6	1,64

La diminution dans le biofilm immergé est en moyenne pour ces ions de : **6.08 % ± 2.39**

Pour le sodium, il semble y avoir un phénomène d'osmose, répondant à la loi de Fick, augmentant sa teneur interne du biofilm immergé de 59,8 % de Na, comparativement au biofilm submergé. Cette augmentation est sûrement due à l'équilibre osmotique entre l'eau saumâtre riche en sodium et le biofilm faible en sodium.

La membrane du biofilm peut jouer un rôle de membrane osmotique, entre l'eau externe et l'eau interne du biofilm répondant à un équilibre et jouant un rôle dans la concentration des ions.

### 3.6.3 Équilibre en équivalent de sodium dans l'eau saumâtre et le biofilm immergé

- Sodium biofilm méqv / sodium de l'eau saumâtre en méqv = 0,38
- Sodium biofilm méqv / sodium de l'eau de mélange en méqv = 2,68

Pour que l'on puisse faire un calcul de l'équilibre osmotique entre la source saumâtre et le biofilm, il faudrait avoir fait les mêmes analyses dans le biofilm et dans l'eau de la source saumâtre (n'étant pas le cas), afin de définir les forces osmotiques étant de part et d'autre du biofilm.

De plus il ne nous est pas spécifié si le biofilm était dans l'eau saumâtre ?

Mais nous voyons que l'hypothèse d'un équilibre osmotique entre biofilm et eau est possible. Ceci pouvant expliquer que la différence analytique ionique entre les biofilms immergés et les biofilms submergés soit possible.

#### Rapport ionique en méqv à souligner

Échantillon	Ca <sup>2+</sup> / P <sup>5+</sup>	Fe <sup>+3</sup> / Mn <sup>+3</sup>	Cu <sup>+2</sup> / S <sup>+6</sup>	Fe <sup>+3</sup> / Cu <sup>+2</sup>	Na / K	Fe <sup>+3</sup> / S <sup>+6</sup>
Biofilms anoxic	13,80	79,78	0,012	21,31	15,37	0,25
Biofilms oxic	14,42	79,32	0,0115	22,39	6,75	0,25
Delta des rapports (anoxi-oxic)	- 0,6	- 0,46	- 0,0005	- 1,08	+ 8,62	0

La différence entre rapport (biofilm anoxic - biofilm oxic) :

- Dans l'ensemble seul le rapport (Na/K) a eu une différence forte entre (biofilm anoxic - biofilm oxic). Montrant qu'il y a bien un phénomène osmotique entre l'eau et le biofilm.
- Pour les autres rapports la différence a été très faible
- Le rapport Ca/P et le pH définissent la solubilité du phosphore et du Calcium, donc leurs disponibilités plus le rapport est faible plus la disponibilité en Ca et P est grande.

Le Fer, Cu et le Soufre entrent dans le transfert d'électrons pour la respiration anaérobie.

Nous voyons que le soufre, le fer, le cuivre sont relativement abondants dans les biofilms. Mais leur équilibre reste identique, aussi bien dans le biofilm immergé que le biofilm submergé, malgré la dilution.

### 3.6.4 Composition élémentaire des biofilms

(ISME Journal)

*Le pH du biofilm est identique au pH de l'eau c'est-à-dire 7,5.*

*Les éléments de carbone analysés dans les biofilms ont une signature isotopique de C<sup>13</sup> de 44,4 pour mille, correspondant à la valeur observée dans le méthane.*

*Snotites et biofilms submergés possèdent une signification en C<sup>13</sup> de 30,7 ± 1,1 pour mille étant entre les signatures de CH<sub>4</sub> et de CO<sub>2</sub> de l'atmosphère de la grotte.*

*Les analyses effectuées de l'eau des biofilms ont donné une valeur en ion ammonium et en nitrites inférieures aux limites de détection.*

*Les éléments fer et soufre sont comparativement plus abondants dans les biofilms*

Une teneur totale en carbone totale de  $\sim 372 \text{ mg g DW}^{-1}$  en moyenne a été mesurée pour les snottites.

Les concentrations d'azote et de phosphore étaient faibles, en particulier pour les snottites au plafond, donnant une composition élémentaire de :

**Composition des snottites**  
Résultats :(ISME Journal)

Composants	Rapports		
37 % C,	C / N	61	rapport élevé,
0,6 % N,	C / P	4727	rapport élevé
0,01% P	N / P	82	ratios

### 3.6.5 Notre interprétation sur la constitution du biofilm

Dans la constitution des snottites, il faut considérer la biomasse répondant aux lois de l'équilibre vital microbien et la partie enveloppe étant une partie carbonée (*glycoconjugués*)<sup>u</sup> étant inerte et ne rentrant pas dans l'équilibre vital.

Cette partie va engendrer un déséquilibre de l'ensemble carboné comparativement à l'équilibre vital. Le rapport C/N de 61 est très important pour une matière vivante, devant être comprise entre 6 et 10 dans une biomasse normale, signifiant que le taux de carbone est plus important que la matière vivante, ceci peut provenir des structures de l'enveloppe des snottites, étant une structure carbonée (*glycoconjugués*).

Voulant dire que la part de constituant chimique de la biomasse est relativement faible comparativement à la masse de de constituant de l'enveloppe des snottites.

Si nous prenons un rapport C/N de 6 pour la biomasse active du snottite nous avons dans ce cas un taux de la biomasse de 10% du carbone pour la biomasse et dans ce cas les parois des snottites représente aurait 27% du carbone analysé.

Cette valeur forte rejoint le rapport C/N par le fait que la structure de l'enveloppe du snottite est un polymère organique non-phosphoré.

La teneur en phosphore présentée dans le rapport est une teneur globale du *snottite* et non la teneur de la biomasse, il est donc difficile d'estimer le rapport N/P pour la biomasse, car il peut y avoir une partie de l'azote fixé dans l'enveloppe du *snottite*, dans ce cas, fausserait la valeur en carbone biomasse.

Le rapport observé N/P de 82, au lieu de 7 pour une biomasse, est un rapport relativement élevé, pouvant nous faire penser à un déficit en phosphore.

Si on admet une biomasse marine normale avec un rapport N/P de 7 (donné par Redfield)<sup>v</sup>.

Dans le cas où il n'y a pas de déficit en phosphore, l'azote de la biomasse du snottite serait de 0,07 % au lieu de 0,6 % en ramenant le rapport de C/N à 528,5 au lieu de 61<sup>7</sup>.

#### Dans ce cas on aurait dans les snottites :

Carbone provenant de la biomasse = 0,416 %

Carbone provenant de la paroi glycoconjugué = 36,58 %

Azote provenant de la biomasse = 0,07 %

Azote provenant de la paroi glycoconjugué = 0,53 %

Dans ce cas la paroi glycoconjugué aurait un rapport C/N de 69,01.

<sup>u</sup> Des oligosaccharides se lient à des protéines ou à des lipides pour former des glycoconjugués.

Le terme glycoconjugué définit des produits d'association covalente de glucides, qui prennent alors le nom de glycanes ou glycannes (les deux orthographes sont permises), soit avec une protéine, soit avec un lipide. On parle alors de glycoprotéine, ou de glycolipide. Dans la majorité des cas, les glycanes sont des oligosaccharides liés aux protéines ou aux lipides par leur extrémité réductrice.

Les protéoglycanes se distinguent des autres glycoconjugués par le fait que leurs glycanes ne sont pas des oligosaccharides, mais des polysaccharides pouvant atteindre une centaine de résidus.

<sup>v</sup> Ratio de Redfield stoechiométrique : rapport atomique du carbone, azote et phosphore, trouvé dans le phytoplancton dans les profondeurs des océans. Ce rapport empirique de la description stoechiométrique développé a été reconnu comme une constante C /N/ P égale à la proportion 106 /16 /1. Cette proportion est nommée par l'*Américan Océanographe Alfred C. Redfield* ayant décrit ce ratio dans l'article écrit en 1934.

Un déficit en phosphore, ayant une pérennité aussi longue dans une structure vivante est difficile à admettre. C'est pour cela que ce dernier calcul semble plus probable.

Redfield donne pour une biomasse marine séchée la valeur de 35,8 % de carbone.

**« Dans ce cas, la part de biomasse séchée des snottites serait exprimée à 1,2 % du poids sec du snottite et son enveloppe à 98.8 % du poids sec. Au lieu de 26 % de biomasse obtenu avec les 10 % du premier calcul sur la valeur C/N. Dans le cas d'un déficit en phosphore, la seule possibilité de survie de la flore des snottites est un recyclage permanent de la biomasse morte, car il ne semble pas y avoir un apport suffisant de phosphore par les eaux de la grotte pour entretenir la biocœnose de l'ensemble ».**

La vitesse de recyclage et de minéralisation de l'ensemble microbien a, dans ce cas une importance primordiale pour la pérennité de la flore et demande un bon équilibre de cette biocœnose.

Toute fois la présence bactérienne de l'ordre des *Caulobacterales* peut être une hypothèse explicative de cette pérennité avec un tel déficit. Le *Caulobacterales* est une bactérie fixant le phosphore sous forme de tiges minérales pouvant servir de réserve en phosphore pour l'ensemble de la flore microbienne.

### **3.6.6 Étude élémentaire sur les snottites et les biofilms**

*(ISME Journal)*

*Les nutriments, plus le fer et le soufre, étaient comparativement plus abondants dans les biofilms submergés tout en restant dans des proportions stœchiométriques équilibrés quelque-soit le biofilm (voir rapport Fe/S).*

*En revanche, les concentrations totales d'iode dans les biofilms étaient les plus élevées au plafond, mais variaient considérablement dans l'ensemble des sites d'échantillonnage et étaient en moyenne de  $482,1 \pm 197,6 \mu\text{g g DW}^{-1}$ .*

### **3.7 Potentiels d'oxydation de méthane *in-vitro* du biofilm**

*(ISME Journal)*

*Les taux potentiels d'oxydation du méthane ont été quantifiés pour les biofilms des trois compartiments afin d'étayer notre hypothèse selon laquelle le méthane est un facteur important de la formation de biofilm.*

*En laboratoire des échantillons de biofilms frais dispersés dans un milieu composé de sels minéraux nitrés ont été mis en contact avec 16 000 ppm de  $\text{CH}_4$  dans un récipient fermé, afin de mesurer le taux d'oxydation dû à la présence de nitrite et nitrate, l'augmentation des taux d'oxydation ont été enregistrés par chromatographie phase gaz.*

*Pour tous les échantillons de biofilm, les taux d'oxydation du méthane substantiels ont été enregistrés dans des conditions de laboratoire. Ils étaient  $3 \sim \mu\text{mol g biofilm FW}^{-1}\text{jour}^{-1}$  pour les biofilms subaériennes et snottites et presque un ordre de grandeur plus élevé ( $\sim 26 \mu\text{mol g biofilm FW}^{-1}\text{jour}^{-1}$ ) pour les biofilms « submersed ».*

Cette différence nous montre que dans les biofilms « submergés » l'activité méthyrotrophe et méthanotrophe est plus importante due à la vivacité microbienne entretenue par son  $A_w$  du milieu.

La différence d'oxydation du méthane, alors que ce biofilm est dans une condition « anoxique » peut être expliqué par la diversification microbienne dans les biofilms « submersed ».

#### **3.7.1 Visualisation des structures du biofilm**

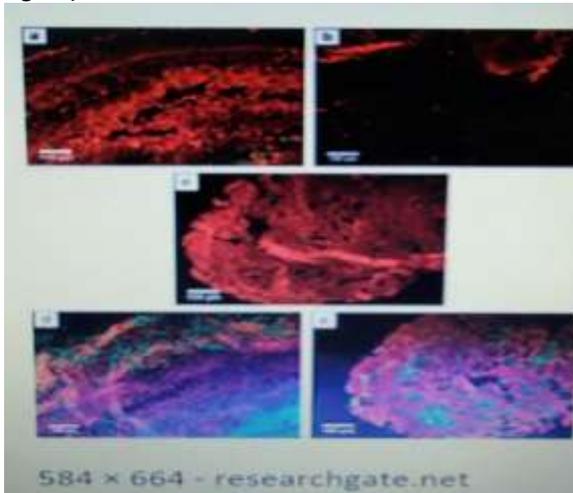
*(ISME Journal)*

*Les premiers aperçus structuraux dans les matrices de biofilm ont été générés par microscopie confocale laser en combinaison avec la coloration de lectines de glycoconjugués.*

*Les données d'image ont révélé des structures de type capsule inhabituellement grandes, semblant intégrer un petit nombre de cellules étant partiellement connectées (image a).*

Souvent, ces glycoconjugués formaient des brins multicouches plus grands avec des vides (zones non colorées par la lectine) entre les deux (b).

Les structures de glycoconjugués sont apparues uniformément distribuées avec des cellules bactériennes uniques incorporées dans certaines images (image a et b), alors que seulement une partie des cellules formait des glycoconjugués spécifiques d'AAL dans d'autres (image c). Des caractéristiques globulaires multicouches avec des groupes de structures semblables à des capsules, ainsi que des globules avec des niveaux d'organisation plus élevés, ont également été observés (image d).



Visualisation des structures de biofilm dans snottites par microscopie laser en combinaison avec la coloration de la lectine.

(a) formes globulaires glycoconjugués avec signaux (verts) environnants individuelle des cellules bactériennes (rouge)).

(b) brins des formes glycoconjugués avec signaux (rouge)...

(ISME Journal)

Le criblage par PCR de gènes marqueurs fonctionnels indicatifs de méthanotrophes ou de méthyloxygénases a été réalisé comme premier test qualitatif de la présence de tels microbes dans le système. Tous les échantillons d'eau et de biofilm testés étaient positifs à la PCR (données non présentées) pour les gènes codant pour le méthanol déshydrogénase (*mxhF*) et la méthane mono-oxygénase particulaire (*pmoA*), mais pas pour la méthane mono-oxygénase soluble.

## CHAPITRE 4 / ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE

### 4.1 Comptage cellulaire

Résultats : (ISME Journal)

Les abondances microbiennes déterminées par cytométrie de flux étaient d'environ  $3,1 \times 10^3$  cellules  $\text{ml}^{-1}$  dans l'eau de source minérale et beaucoup plus élevées d'environ  $1,6 \times 10^6$  dans l'eau souterraine mélangée.

Résultats des analyses de comptage cellulaire dans les eaux  
(ISME Journal)

Caractéristiques Des comptages cellulaires	Mélange des eaux		Eau de la source minérale		Eau météorique	
	Médiane	Min/Max	Médiane	Min/Max	Médiane	Min/ Max
Nombres de cellules par ml	$1,6 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5 /$ $1,9 \times 10^6$	$3,1 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3 /$ $1,9 \times 10^6$	$6,7 \times 10^3$	$6,6 \times 10^3 /$ $2,4 \times 10^5$
pH	7,5	7,2/7,6	7,6	7,2/8,3	8,3	S. R.

Le nombre de cellules comptées semble augmenter avec le pH. La moyenne du nombre de cellules semble liée au pH mais les variations observées rendent ces observations non-significatives.

#### Numération des cellules par comptage électronique

(ISME Journal)

La numération des cellules d'eau des grottes mixtes était en grande partie compatible avec la quantification du gène de l'ARNr 16S, mais les comptes de PCR quantitatifs pour l'eau de source étaient plus élevés que les numérations cellulaires. La quantification des gènes a révélé une abondance élevée de  $\sim 3,6 \times 10^9$  gènes de l'ARNr 16S bactérien g biofilm FW -1 pour les biofilms submergés.

Donc les biofilms ont une activité bactérienne supérieure à l'eau de la grotte. C'est donc dans les biofilms que l'on a l'activité microbienne maximale.

### 4.2 Composition de la communauté bactérienne dans l'eau et des biofilms

(ISME Journal)

Des banques de séquençage d'amplicon<sup>w</sup> répliquées ont été générées pour les trois échantillons de compartiment de biofilm et d'eau. Le traitement des données a abouti à 482 UTO affiliées à la bactérie. Parmi ceux-ci, 363 UTO ont été trouvés dans des échantillons de biofilm et 297 UTO dans l'eau, avec un chevauchement de 178 UTO.

## Analyse microbiologique de l'eau et des biofilms (analyse par CPR)

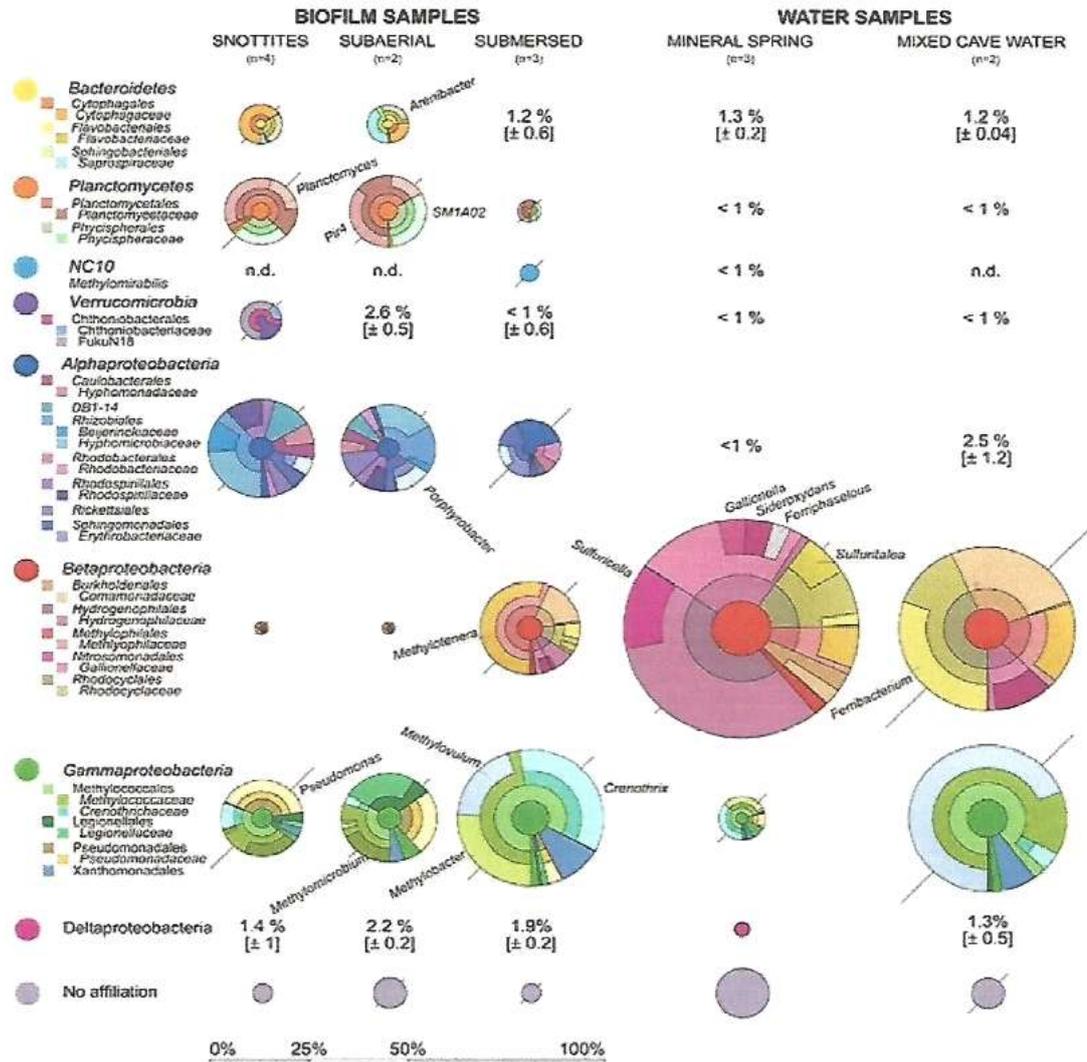


Tableau publié dans ISME Journal

L'empreinte digitale du polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminale du pool de gènes *pmoA* a révélé une diversité considérable de T-RF de *pmoA*<sup>X</sup> dans tous les biofilms. Au total, 13 des 30 fragments *pmoA* détectés se chevauchaient entre les échantillons, tandis que 14 apparaissaient uniques pour l'eau souterraine mélangée (non représentée).

Outre les Proteobacteria (en particulier les Alphaproteobacteria, les Betaproteobacteria et les Gammaproteobacteria), les Planctomycetes, les Bacteroidetes et les Verrucomicrobia ont également apporté une contribution substantielle aux communautés. Un total de huit phylums étaient présents à une abondance > 1% dans au moins un des échantillons.

<sup>X</sup> T-RF de *pmoA* : structure de la diversité et de la communauté d'aérobie bactéries oxydant le méthane dans les sédiments littoraux du lac de Constance a été étudiée par clonage analyse et terminale restriction fragment longueur le polymorphisme T-empresintes de l'*pmoA* gène. L'analyse phylogénétique a révélé une grande diversité de type I et type II méthanotrophes dans le centimètre sommital oxygéné du sédiment.

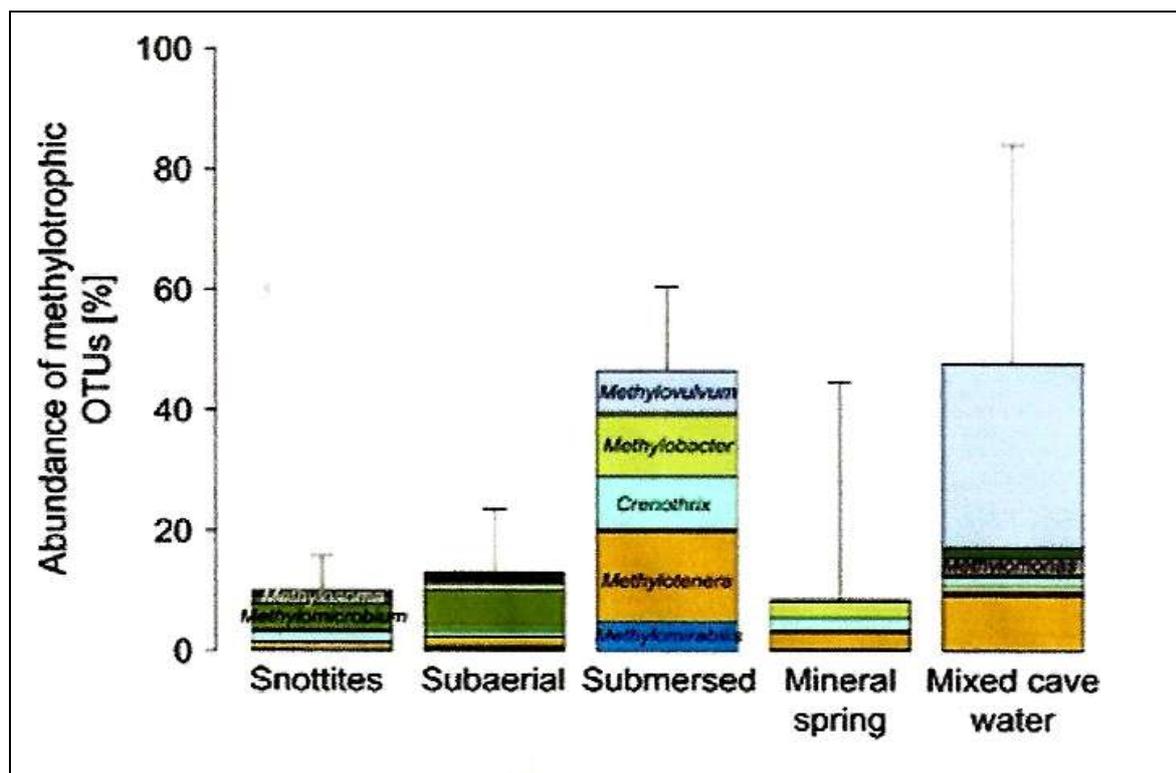
Profils T-RFLP a indiqué une grande similarité entre la communauté méthanotrophe active dans la couche oxique et la communauté inactive dans une couche de sédiments anoxiques à une profondeur de 10 cm. Il n'y a également aucun changement majeur dans la structure de la communauté entre les carottes de sédiments littoraux échantillonnés en été comme en hiver.

Les Betaproteobacteria étaient particulièrement abondantes (59 %) directement dans l'eau de source, détectables à une abondance notable dans les eaux souterraines mixtes et les biofilms submergés (respectivement 44 % et 25 %), mais presque absentes des biofilms subaériens et des snottites. En revanche, les membres des Alphaproteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes et Verrucomicrobia étaient généralement plus abondants dans les biofilms subaériens que dans les échantillons submergés

Toutes les classes phyla (Planctobacteria) ou protéobactériennes (Proteobacteria) abondantes (abondance relative >3%) sont représentées sous la forme de parcelles composites de Krona « graphique circulaire » (Ondoy et al, 2011) résolues jusqu'au niveau de la famille. Les taxons sélectionnés mentionnés dans le texte sont montrés au niveau du genre. Le diamètre des cercles de couronnes est proportionnel à l'abondance moyenne des phylums ou des classes. Les variations d'abondance des taxons entre les échantillons répétés, soit données en tant que pourcentage, soit l'écart par rapport à la moyenne (si n = 2), sont représentées par des barres diagonales.

Une analyse taxonomique approfondie dans les biofilms a révélé de nombreuses populations méthylophiles et méthanotrophes connues (Knief, 2015) Les Alphaproteobacteria méthylophiles potentielles étaient apparentes comme les Beijerinckiaceae, Hyphomicrobiaceae, Rhodobacteraceae, Erythrobacteraceae et Sphingomonadaceae, détectées en particulier dans les biofilms subaériens.

Plusieurs méthanotrophes facultatives au sein des Alphaproteobacteria, telles que Methylocella, Methylosula et Methylobacterium spp<sup>y</sup>, ont également été identifiés mais seulement à faible abondance (tous <1 %).



Chez les Betaproteobacteria, les membres des Methylophilaceae (dont beaucoup sont méthylophiles) étaient abondants dans les biofilms submergés (14 %), mais aussi dans les échantillons d'eau minérale de source (4 %) et d'eau souterraine mélangée (8 %). Les taxons dominants de ce groupe étaient associés à Methylobacter spp. Plus particulièrement, une dominance

<sup>y</sup> spp : comme en botanique ou en mycologie :

- Le rang de sous-espèce est admis et noté subsp. (*subspecies*) suivi du nom latin en italiques (ou souligné).
- L'appartenance d'une souche isolée à un genre, sans précision de l'espèce, est notée du nom du genre suivi de sp. (*species*) tant que l'isolat n'est pas identifié à une espèce.
- Pour désigner toutes les espèces d'un genre, on fait suivre le nom du genre de spp.

d'Hydrogenophilaceae (27 %) et de Gallionellaceae (14 %) a été observée dans l'eau de source, alors qu'elle était presque absente de tous les autres échantillons. Les Rhodocyclaceae ont également contribué à la communauté bactérienne de l'eau de source, de l'eau souterraine mixte et des biofilms submergés.

Les Methylococcales (Gammaproteobacteria) représentaient les groupes les plus connus de méthanotrophiques (Kneif, 2015) dans tous les échantillons.

Au total, 15 lignées divergentes ont été trouvées, les Crenothrichaceae et les Methylococcaceae étant les plus abondantes.

Les taxons dominants dans l'eau de mélange dans la grotte étaient associés au **Methylovulum spp.** (28 %). **Crenothrix** et **Methylobacter spp.** étaient abondants dans les biofilms submergés (13 % et 10 %, respectivement) mais apparemment remplacés par **Methylomicrobium spp.** dans les biofilms subaériens (4 %). Les membres des Pseudomonadaceae étaient également abondants dans les snottites et les biofilms subaériens (8 % et 6 %, respectivement) De façon inattendue, les communautés aériennes sont apparues plus diversifiées et moins clairement dominées par des taxons méthanotrophiques ou méthylotrophes connus que les biofilms submergés et les eaux souterraines mixtes.

Les Planctomycetes dans les biofilms aériens étaient principalement associés à la lignée Pir4 et à Planctomyces spp. (Planctomycetaceae), ainsi que les Phycisphaeraceae. Le phylum candidat NC10 récemment découvert, y compris les méthanotrophes **Methylomirabilis spp.** (Ettwig et al., 2010), a été détecté uniquement dans des biofilms submergés. Les Bacteroidetes, principalement présents dans les biofilms subaériens et les snottites, comprenaient une population notable d'**Arenibacter spp.**

Résumant l'abondance des taxons méthanotrophiques et méthylotrophiques les plus connus, les biofilms subaériens et les snottites contenaient significativement moins de lignées respectives que les biofilms submergés et l'eau souterraine mixte ( $t = 3,9$  ;  $y = 2,7$  ;  $P < 0,05$ ).

En plus des antioxydants connus  $C_1$ , d'autres taxons de connotation fonctionnelle ont également été détectés, tels que Sulfuritalea (Betaproteobacteria), Sulfurimonas (Epsilonproteobacteria) et **Sulfuricella spp.** (Betaproteobacteria) dans l'eau de source minérale, tous sont bien connus pour être capables d'oxydation du soufre. En outre, plusieurs taxons putatifs oxydant le fer tels que Siderooxydans, Ferriphaseus et **Gallionella spp.** (Gallionellaceae), ainsi que des proches parents de **Ferribacterium spp.** (Rhodocyclaceae), ont été trouvés avec une distribution distincte entre les prélèvements et l'eau de mélange de la grotte.

#### Quantité de méthylotrophe dans les différents éléments de la cavité en pourcentage

Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »	Eau de source minérale	Eau de mélange
10 ± 5,2	12,6 ± 10,5	46,3 ± 14,2	8,4 ± 36,8	47,4 ± 36,8

#### Nos observations :

Les valeurs des coefficients de variation des méthylotrophes, en prenant l'intervalle de confiance comme variation en % on obtient :

Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »	Eau de source minérale	Eau de mélange
52 %	83,3 %	30,6 %	438 %	77,6 %

Dans les biofilms « submersed » la variation reste proche des snottites ;

Dans les biofilms « subaerial » les variations en méthylotrophes sont proches des valeurs de l'eau de mélange, mais plus fortes que dans les biofilms « submersed », les snottites. Dans l'eau de source cette variation est très forte en fonction des prélèvements, ceci peut provenir de la faible présence de méthylotrophes dans cette eau.

### 4.3 Discussion de la partie analytique

(ISME Journal)

L'eau de source minérale était saline, micro-oxique et ne contenait que de faibles quantités de COD, d'éléments nutritifs, de phosphates et autres accepteurs d'électrons, tels que le nitrate ou le sulfate. La concentration totale d'iode était d'environ 20 mg l<sup>-1</sup> dans l'eau de source et diluée jusqu'à environ 3 mg l<sup>-1</sup> dans l'eau souterraine mélangée. La température de l'eau de la grotte mixte se situait entre 8 et 11 °C selon les points d'échantillonnage, tandis que la source minérale semblait constante à ~ 7 °C. Le pH de l'eau souterraine mélangée était pratiquement neutre (pH ~ 7,5).

L'analyse des isotopes stables à l'eau ( $\delta^{18}\text{O}$  et  $\delta^2\text{H}$ ) a permis d'estimer les rapports de mélange entre l'eau de source profonde et l'eau météorique récente dans la caverne, d'après les calculs de mélange il a été défini :

Suivant deux dates d'échantillonnage de l'eau, la contribution de l'eau d'infiltration météorique de la surface a été estimée à  $58 \pm 17\%$  ou  $54 \pm 18\%$  pour les dates respectives, comparativement à l'eau souterraine de mélange.

La signature  $\delta^{13}\text{C}$  identifie le méthane thermogénique comme le principal moteur de la formation de biofilms. En particulier pour les biofilms submergés présentant des taux d'oxydation du méthane les plus élevés et une abondance de méthanotrophes comparativement aux méthyloxydants.

Les taux de consommation de CH<sub>4</sub> atteignaient 25  $\mu\text{mol}$  par biofilm/ jour étant quatre fois plus élevé que les taux récemment rapportés pour la colonne d'eau au-dessus des suintements de méthane dans le lac de Constance (Bornemann et al., 2016) et un niveau élevé similaire à celui observé pour d'autres sites géothermiques de dégagement de méthane (Gagliano et al., 2016 ; Lennon et al., 2007).

En extrapolant cela pour les estimations de masse de biofilm dans la grotte, un renouvellement potentiel du méthane de ~ 1,6 mol jour<sup>-1</sup> (~ 35,8 l CH<sub>4</sub> jour<sup>-1</sup>) peut être estimé pour les biofilms submergés.

Dans cette étude, les taux d'oxydation du méthane n'ont malheureusement pas été déterminés pour l'eau souterraine mélangée. La forte abondance de méthanotrophes dans l'eau et les concentrations d'oxygène réduites par rapport aux eaux d'infiltration de surface suggèrent qu'au moins une partie de l'oxydation du méthane aurait pu également être attribuée au plan d'eau lui-même. Cependant, les populations bactériennes beaucoup plus faibles dans l'eau de mélange avec un débit régulier, impliquent donc une purge des populations lotiques<sup>2</sup> pouvant encore conduire à ce que les biofilms soient les plus pertinents pour le renouvellement total du méthane. Contrairement aux biofilms immergés, la signature  $\delta^{13}\text{C}$  des biofilms « subaerial » et des snottites montre, qu'ils sont moins concernés dans l'utilisation du méthane thermogénique.

Cependant, les signatures isotopiques de CH<sub>4</sub> et CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère de cette grotte étaient toutes deux plus marquées ayant suggéré dans l'atmosphère de la grotte un fort fractionnement des isotopes stables (Preuss et al. 2013).

Les biofilms aériens avec une signature d'environ - 31‰ de  $\delta^{13}\text{C}$  entre les deux extrémités gazeuses de l'atmosphère de la caverne indique une importance méthanotrophique égale à la fixation du CO<sub>2</sub> autotrophique ou hétérotrophique pour l'accumulation du carbone dans les biofilms comme en déduisent Sarby et al., 1996 ; Cen et al., 2009.

Néanmoins, les faibles taux d'oxydation du méthane et l'abaissement de l'abondance des microbes potentiellement oxydants en C<sub>1</sub> semblent tous deux indiquer un rôle possible des donneurs d'électrons autres que le méthane dans les biofilms aériens.

L'interprétation des signatures d'isotopes d'azote observées dans les biofilms n'a pas été possible en raison de l'absence de signaux d'entrée définis. Les valeurs isotopiques  $\delta^{15}\text{N}$  appauvries des

---

<sup>2</sup> **Lotique** : en écologie le système lotique est l'étude des interactions biotiques (du vivant sur le vivant) et abiotiques (du vivant sur les actions des paramètres physiques extérieures) dans les flux d'eaux courantes continentales. Contrairement à l'écologie des systèmes lentiques, qui implique des eaux continentales moins dynamiques comme celle des lacs ou des étangs ces domaines forment le champ d'études plus générale de l'eau douce ou de l'écologie aquatique. Les milieux lotiques prennent des formes très diverses, allant du ruisseau peu large au grand fleuve, mais présentent des invariances qui justifient leur étude commune. On observe donc quelques caractéristiques communes rendant l'écologie des eaux coulantes unique par rapport aux autres habitats aquatiques :

biofilms « submersed » (-11 ‰) étaient comparables aux valeurs trouvées dans les biofilms dans la partie basse de la grotte (Sarbu et al., 1996). Les valeurs beaucoup plus élevées des biofilms « subaerial » suggèrent des intrants distincts (éléments entrant dans un processus de produit), possiblement liés à la capacité connue de nombreux méthanotrophes de fixer le diazote atmosphérique « N<sub>2</sub> » (Knief, 2015). Néanmoins, les principales sources et voies du cycle de l'azote dans le système de cavernes restent à élucider.

#### 4.3.1 Composition de la communauté des biofilms

La formation de snottites pendantes et d'autres structures de biofilms macroscopiques dans d'autres grottes a été observée, mais surtout dans des conditions acides ou extrêmes. Par rapport aux structures de biofilm massives (pH ~ 7,5) maintenant rapporté pour la grotte Sulzbrunn, les snottites précédemment découverts dans les autres structures sont apparus être en forme beaucoup plus mince, ont été moins densément répartis et formaient des quantités plus faibles de substances polymères extracellulaires (Bond et al., 2000 ; Holmes et al., 2001 ; Northup et al., 2003 ; Ziegler et al., 2013).

La riche diversité des méthylophiles et d'autres lignées bactériennes découvertes dans les biofilms de la grotte de Sulzbrunn, indique que des facteurs biogéochimiques (lithoautotrophe, lithohétérotrophe<sup>aa</sup> et écophysiologicals [ex : photosynthèse]) distincts interviennent dans la formation de biofilms dans les différents systèmes.

Nous suggérons que les compartiments de biofilms identifiés soient fonction de l'afflux de méthane, de l'immersion dans l'eau et de l'apport d'oxygène et de nutriments dans la grotte. La forte abondance de méthanotrophes et de méthylophiles allant jusqu'à ~ 45 % dans les biofilms submergés et entre 10 et 20 % dans les autres compartiments de biofilms était en accord avec l'importance du méthane comme facteur de formation du biofilm.

Une abondance de méthanotrophes aérobies allant jusqu'à 40 % a déjà été rapportée pour un suintement terrestre de méthane (Gagliano et al., 2016).

Cependant, des questions centrales demeurent : comment les flux de carbone et d'énergie sont-ils partagés entre les méthanotrophes, les autres méthylophiles et les diverses lignées non-méthylophiles découvertes dans les biofilms de Sulzbrunn.

La distinction entre les méthanotrophes obligatoires et facultatives nécessite des informations génomiques et protéomiques, n'étant pas encore disponibles pour le système étudié. Cependant, l'écophysiological de certains des microbes détectés peut être extrapolée avec prudence à partir de la littérature. Par exemple, **Methylobacter spp** sont généralement considérés comme des méthanotrophes obligatoires (Knief, 2015), tandis que **Methylotenera spp** et d'autres méthylophilacées sont principalement connus sous le nom de méthylophiles non-méthanogènes (Kalvuzhna et al., 2012)<sup>b</sup>.

La concurrence de ces méthanotrophes et méthylophiles, en particulier dans les biofilms submergés, suggère une plus grande affinité pour l'utilisation du méthane (Chen et al., 2009).

Des membres de la famille des **Methylococcaceae** et des **Methylophilaceae** ont déjà été signalés comme ayant des interactions trophiques dans des systèmes alimentés en méthane dans des conditions oxiqes et micro-oxiqes (Beck et al., 2013 ; Oshkin et al., 2015). Il a été montré que les membres des Methanococcaceae shuntaient le carbone vers divers membres de la communauté non-méthylophiles dans des tapis microbiens situés au niveau des suintements d'hydrocarbures marins (Paulet et al., 2017).

Ainsi, dans les biofilms de Sulzbrunn, des communautés complexes et des réseaux d'interactions peuvent être considérés comme catalysant l'oxydation du méthane plutôt que comme des espèces microbiennes uniques.

Les méthanotrophes sont également bien connus en tant que producteurs de polysaccharides extracellulaires abondants (Linton et al., 1986 ; Strong et al., 2015)<sup>c</sup>. Beaucoup d'entre eux possèdent

<sup>aa</sup> **Lithohétérotrophe** : qui utilise les minéraux pour produire leur énergie.

<sup>bb</sup> **Protéomique** : désigne la science qui étudie les protéomes, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un organisme, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme à un moment donné et sous des conditions données.

la voie du monophosphate de ribulose pour fixer les dérivés du groupe méthyle du carbone.

La production de polysaccharides extracellulaires à partir du méthanol est équilibrée en termes d'adénosine triphosphate et d'équivalents réducteurs (Linton et al., 1986). La production d'exopolysaccharides observée est concevable comme une réaction de gaspillage d'énergie, empêchant l'accumulation de formaldéhyde toxique sous un excès de méthane et fournissant du carbone réduit dérivé du méthane à d'autres membres hétérotrophes de la communauté du biofilm.

Il a été démontré que certains méthanotrophes fermentent le méthane et libèrent de grandes quantités de carbone réduit dans des conditions limitées en oxygène (Kalyuzhnava et al. 2013).

La limitation de la croissance par une carence limitée d'azote ou de phosphore, comme cela est montré dans la formation des biofilms « subaerial » par les ratios C : N : P élevés, étayerait cette limitation.

Bien que de nombreux méthanotrophes soient capables de fixer le diazote atmosphérique ( $N_2$ ) (Knief, 2015)<sup>10</sup>, la limitation du phosphore ne sera pas facilement complétée dans les biofilms aériens. Les rapports C : P (~ 4700) et N : P (~ 80) observés dans les biofilms sont nettement plus élevés que les ratios canoniques Redfield ou que les rapports C : N : P suggérant une limitation bactérienne du phosphore (Vrede et al., 2002). Par conséquent, nous proposons que la matrice extracellulaire massive formée dans les biofilms Sulzbrunn serve, au moins en partie, comme un puits d'électrons pour les méthylotrophes limités en nutriments.

En plus des méthanotrophes et des méthylotrophes protéobactériens bien connus, des membres du genre candidat *Methylomirabilis* ont également été détectés mais semblaient restreints aux biofilms submergés à Sulzbrunn. Ceux-ci sont connus sous le nom d'oxydants méthaniques anaérobies dépendants des nitrates, proposés pour l'oxydation intra-aérobie du méthane sous dis-mutation du NO (Ettwila et al., 2010), La détection de l'oxydation anaérobie reste une possibilité de l'oxydation méthanique anaérobie dans des micro-niches spécifiques des biofilms de Sulzbrunn.

En outre, nous étudions actuellement si *Archaea* pourrait également être impliqué dans le cycle du méthane dans le système. Les données préliminaires suggèrent qu'une faible abondance de lignées d'*Archaea* en grande partie non cultivées peut être trouvée dans les biofilms submergés et les échantillons d'eau, mais pas dans les biofilms aériens.

En outre, la détection abondante de l'oxydation putative du soufre (connu pour être l'oxydant du soufre, mais dans notre cas sans certitude scientifiques) (Watanabe et al. 2014) et de l'oxydation du fer (Emerson et al., 2013), ainsi que la réduction du fer (Cumminas et al, 1999), sont des *Betaproteobacteria*, surtout au printemps et dans les eaux souterraines mixtes, les points vers le soufre actif et le cycle du fer dans la grotte. Cependant, ces processus, ainsi que leur lien possible avec le cycle du carbone, n'ont pu être retracés dans la présente étude mais feront l'objet de travaux futurs.

#### 4.3.2 Rôle possible de l'iode

La visualisation de la matrice de biofilm a révélé des caractéristiques structurelles uniques des biofilms.

Bien que de grandes structures globulaires aient déjà été observées pour des biofilms dans d'autres systèmes de biofilms (Okabe et al., 1999 ; Weissbordt et al 2013), un enrobage relativement massif de cellules uniques ou de petites formations de capsules avec des réseaux de glycoconjugués de la grotte de Sulzbrunn, n'a pas été observé dans les autres structures à notre connaissance.

Il est tentant de spéculer qu'en plus d'un rôle possible en tant que puits d'électrons, la matrice de biofilm pourrait également servir de barrière protectrice contre les agents nocifs éventuellement présents dans le système de Sulzbrunn.

Le concept de biofilms en tant que barrière diffusive contre les antimicrobiens est bien établi (Flemmeing et al., 2016). Dans les eaux riches en iode et les biofilms de la grotte de Sulzbrunn, la possibilité d'activité bactéricide des espèces d'iode devrait être discutée.

L'iode est bien connu comme désinfectant, mais il est intéressant de noter que les mécanismes de sa toxicité ne sont pas encore complètement élucidés, probablement en raison de sa chimie complexe (Küpper et al. 2011).

L'iode élémentaire ( $I_2$ ) n'est pas stable en solution aqueuse, où il s'hydrolyse facilement en iodure ( $I^-$ ), en acide hypo-iodéux ( $HOI$ ) et en plusieurs autres espèces d'iode (Gottardi, 1999). En cas de pH élevé, la formation d'iodate ( $IO_3^-$ ) par disproportionation chimique est également possible. L'iodure et l'iodate sont considérés comme non toxiques, tandis que l'iode élémentaire, l'acide hypo-iodéux et le tri-iodure ( $I_3^-$ ) sont suggérés comme agents oxydants bactéricides (Gottardi, 1999). En raison de son comportement complexe en tant que soluté, la caractérisation complète de l'iode est difficile et n'a pas encore été accomplie pour différents échantillons de Sulzbrunn.

Bien que nous présumions que la plus grande partie de l'iode total émergé avec l'eau minérale sous forme réduite était de l'iodure, cela pourrait subir un certain nombre de réactions d'oxydation et de volatilisation entraînées par les microbes dans la caverne (le microbisme pour se défendre de l'iode produit des méthylation de l'iode pour le rendre volatil).

L'oxydation de l'iodure en iode élémentaire en présence de polysaccharides a été démontrée pour **Pseudomonas iodooxidans** (Gazlan et Mararlith, 1974) et les Alphaproteobacteria distinctes (Amachi et al., 2005), ayant même été stimulées sous de fortes concentrations d'iodure (Arakawa et al., 2002).

Un **Arenibacter sp.** (Bacteroidetes) a été signalé pour accumuler de l'iode au cours de ce processus (Ito et al., 2016).

De plus, divers isolats provenant d'habitats riches en iode, notamment **Erythrobacter**, **Pseudomonas** et **Rhizobium spp** se sont révélés être des formes méthylées d'iodures volatiles ainsi en tant qu'iodo-méthane hautement réactif ( $CH_3I$ ) (Amachi et al., 2005, Fujimori et al., 2012).

Et enfin, pour **Pseudomonas sp.**, on a montré que le SCT était capable de croissance anaérobie avec de l'iodate comme seul accepteur d'électrons ou tout en réduisant simultanément le nitrate (Amachi et al., 2007).

La détection abondante de tous les genres ci-dessus dans les biofilms de Sulzbrunn, ainsi que les concentrations d'iode plus élevées trouvées dans les snottites, impliquent que des processus de volatilisation peuvent effectivement avoir été entrepris dans la grotte. La volatilisation sous forme d'iodo-méthane et l'oxydation subséquente par les oxydants à l'halogénure de méthyle dans les biofilms aériens (McDonald et al., 2002) semblent plausibles et pourraient établir un lien dans le système entre le cycle du méthane et celui de l'iode.

On peut spéculer avec précaution que l'iodure libéré lors de l'oxydation de l'iodo-méthane par les méthylophiles des snottites pourrait ensuite être oxydé en iode par d'autres membres de la communauté, pouvant contribuer au stress iodé et à la production de glycoconjugués dans les biofilms. Dans un premier temps, nous avons tenté de quantifier l'iodo-méthane dans l'atmosphère de la grotte par chromatographie en phase gazeuse. Bien que nous ayons pu le détecter à plusieurs reprises (données non présentées), une quantification cohérente et reproductible n'a pas été réalisée jusqu'à présent, peut-être en raison de la nature hautement réactive de cet agent de méthylation.

#### 4.3.3 Observation des auteurs

La grotte de Sulzbrunn a été visitée à des époques bien déterminées afin de ne pas perturber la flore microbienne ambiante. Ces visites se font au printemps période où les échanges d'air entre endo-karst et épi-karst sont les plus faibles. Cette grotte est décrite comme un habitat unique pour la croissance du biofilm microbien.

Bien que la grotte soit située à quelques mètres sous la surface, des communautés microbiennes largement indépendantes des apports de carbone et d'énergie de surface ont été découvertes. Contrairement à nos attentes initiales, le microbiote du biofilm était étonnamment diversifié, avec une foule de populations apparentées à des méthanotrophes, des méthylophiles bien connus et également des bactéries potentiellement méthylant l'iode.

Ces résultats fournissent des preuves pertinentes supplémentaires de l'intervention du microbisme des puits de méthane souterrains (McDonouah et al., 2016, Lennon et al., 2017).

---

<sup>bb</sup> **Disproportionation** : parfois appelé dismutation, c'est une réaction d'oxydo-réduction dans laquelle un composé de l'état d'oxydation intermédiaire convertit en deux composés oxydations différents, les uns plus élevés et les autres plus faibles. Bien que pas toujours acceptée, la dismutation est parfois utilisée pour décrire toute réaction de-symétrique du type suivant :  $2 A \rightarrow A' + A''$ , indépendamment de tout processus d'oxydo-réduction.

## CHAPITRE 5 / CONCLUSION DES AUTEURS ET NOTRE ANALYSE DES RÉSULTATS

**L**a production massive de substances extracellulaires polymériques observée peut servir de puits d'électrons pour les méthylophiles limités en nutriments et donc limités en croissance. Bien que ces premiers aperçus d'un système de biofilm souterrain apparemment unique soient très intrigants, de nombreuses questions de recherche restent ouvertes. L'application de substrats de méthane et de méthylophiles marqués au  $^{13}\text{C}$  en combinaison avec des sondes d'isotopes stables à base d'acide nucléique est actuellement en cours et aidera à mieux comprendre les schémas complexes de partage de carbone et d'énergie à prévoir dans les biofilms. Les recherches futures devraient également porter sur l'organisation spatiale et le répertoire métagénomique du microbiote du biofilm, ainsi que sur le rôle possible des archaea, des protozoaires, des phages et de la faune dans le réseau trophique de cet écosystème apparemment dominé par les procaryotes.

« Comment sont apparues les millions d'espèces peuplant notre planète ? Grâce à la sélection naturelle, répond Charles Darwin en 1859.

Selon lui, ce processus sélectionne au fil des générations les individus les plus adaptés aux changements de l'environnement, provoquant l'évolution des organismes. Or, à cette époque on n'avait pas encore découvert les gènes. Depuis, les mécanismes sous-tendant la sélection naturelle continuent de révéler de nouvelles interactions complexes entre gènes, hasard et environnement. L'évolution est donc encore loin d'avoir livré tous ses secrets<sup>6</sup> ». Emmanuel Douzery (biologiste)

### 5.1 Particularités de la répartition de la flore microbienne des sols

#### Flore tellurique généralité

Le sol constitue à la fois un matériau généralement poreux recouvrant les roches inaltérées à la surface de la terre et un milieu de vie abritant de très nombreux organismes, dont les bactéries.

Par sa structure complexe il est constitué de minéraux et de matières organiques végétales et animales, produisant un biotope naturel convenable à l'entretien et la protection d'une flore microbienne.

La rétention en eau du sol va apporter l'humidité nécessaire à cette vie, les charges ioniques des argiles (potentiel zêta) vont permettre aux bactéries d'être retenues et de pouvoir vivre en colonies. Les matières organiques vont permettre aux bactéries hétérotrophes de trouver une alimentation convenable à leurs croissances. Le pH du sol sera un facteur sélectif de cette flore permettant aux bactéries chimio-lithotrophes<sup>cc</sup> de pouvoir faire les échanges ioniques entrant dans leurs respirations. Cette diversité de constitution va être le facteur de la diversité de la flore microbienne du sol<sup>11</sup>.

#### Généralités de la diversité bactérienne des sols

Bactéries Non cultivables et non classées	Bactéries des sols	Bactéries des sols	Flore des lacs, des rivières Des zones humides du sol
OD1, OP11 OP1, TMG OP8, OSN OP5, XSI SPAM, BRC1 OP3, WS5 SR1, 1C1	<b>Proteobacteria</b> <u>Moraxellaceae</u> Nitrospirales Nitrospira, Acidobacteriales Acidobacter <u>Bacteroidetes</u>	Dictyoglomales Dictyoglomus Fusobacteriales Fusobacteria Deferribacteriales Deferribacter <u>Verrucomicrobia</u> ,	<i>Chlorobi</i> <u>Caulobacterales</u> <u>Rhodobacterales</u> <u>Rhodospirillales</u> <u>Sphingomonadales</u> <u>Saprospira</u> <u>Flavobacteriales</u>

<sup>cc</sup> **Chimio-lithotrophique** : dans ce terme « rophique », il faut comprendre la manière dont un organisme vivant constitue sa propre matière organique.

NKB 19	<u>Cytophaga</u> <i>Fibrobacteres</i> <i>Coprothermobacterota</i> <i>Coprothermobacter</i> <i>Firmicutes</i> <i>Actinobacter</i> (Syno. : <i>Clostridium</i> ) <i>Thermoanaerobacter</i>	<u>Chthoniobacteraceae</u> <u>Spartobacteria</u> <i>Lentisphaerae</i> , <i>Chlamydailes</i> <i>Chlamydia</i> <i>Gemmatimonadetes</i> <i>Chrysiogenetes</i>	<i>Cyanobacteria</i> <u>Planctomycetes</u> <i>Thermotogae</i> <i>Fervibacteriaceae</i> <i>Bacteries non sulfureuses</i> <i>vertes</i> <i>Kosmotogaceae</i> <i>Aqualificae</i> <i>Thermodesulfobacteriales</i> <i>Thermodesulfobacterium</i> <i>Chloroflexi</i> , <i>Thermus</i> <i>deinococcus</i> <i>Thermium</i> <i>Deinococcus</i> <sup>12</sup>
--------	---	--	---

Cette diversité nous montre que les sols est un lieu de vie instance, d'abord recensée à partir de la microflore cultivable, est aujourd'hui caractérisée par des approches de communautés microbiennes.

## 5.2 Les bactéries du sol ont plusieurs rôles environnementaux majeurs

- **Dans la formation des sols** : Les bactéries autotrophes et chimio-litho-autotrophes jouent un grand rôle dans la formation des sols, par l'altération des éléments minéraux, la fixation du gaz carbonique de l'air pour former leurs structures organiques, la fixation de l'azote de l'air pour faire leurs protéines. Certaine comme les *Planctomycetes* sont capables de modifier de l'azote ammoniacale en nitrites et en nitrates.
- **Dans les cycles nutritifs** : les bactéries du sol sont impliquées dans la décomposition de la matière organique, formant l'humus et libérant des nutriments disponibles pour les plantes. Certaines sont même capables comme *Cytophaga* de décomposer des biopolymères complexes comme la cellulose et la lignine ou la chitine. Elles permettent au sol d'entretenir les cycles de l'azote, du carbone, du phosphore, du soufre, du fer en rendant la biosphère vivable.
- **En association symbiotique avec les plantes** : certaines bactéries comme les *Rhizobium* forment des nodules fixateurs d'azote.
- **En produisant des antibiotiques** : les *Actinomycètes*, *Streptomyces* et *Nocardia* bactéries filamenteuses du sol (voir ci-contre), représentent une source prodigieuse d'antibiotiques. Ces antibiotiques vont permettre aux bactéries de vivre en semble en régularisant leur développement.
- **En utilisant pour le développement de procédés de bioremédiation** : exploitation des procédés de dégradation naturelle pour dépolluer. Les applications concernent en particulier la décomposition de polluants organiques (hydrocarbures, biphényles polychlorés, pesticides...) ou la dépollution en métaux toxiques (par volatilisation ou bioaccumulation).

## CHAPITRE 6 / FLORE INITIALE DE LA GROTTE DE SULZBRUNN

Résultats de l'analyse CPR ISME Journal

### Flore générale des bactéries de la cavité de Sulzbrunn

Classes bactériennes	Snottites	Biofilms « Subaerial »	Biofilms « Submersed »	Eau de source minérale	Eau de mélange
<i>Bacteroidetes</i>	11,6	11,7	1,2 ± 0,6	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,04
<i>Planctomycetes</i>	18,4	21,5	5,5	< 1	< 1
<i>Verrucomicrobia</i>	10,7	2,7 ± 0,5	< 1 ± 0,6	< 1	< 1
NC 10	Nd	Nd	4,7	Nd	Nd
<i>Alphaproteobacteria</i>	28,6	25,3	16,3	< 1	2,5 ± 1,2
<i>Betaproteobacteria</i>	2,4	2,9	34,5	63,8	43,6
<i>Proteobacteria</i>	21,4	25,3	38,0	12,6	40,4
<i>Proteobacteria</i>	1,4 ± 1	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,2	4,8	1,3 ± 0,5
Non identifié	5,5	8,8	4,4	14,4	9,0

Dans ce tableau il existe une scission de la diversité entre la flore microbienne des snottites et biofilms, comparativement à la diversité des eaux de la grotte.

La présence de bactéries de la classification comprise entre *Bacteroidetes* et *Betaproteobacteria* (domaine de classification retenu) est propre aux snottites et aux biofilms, mais elle est absente dans l'eau de la source et dans l'eau de mélange donc absente dans l'eau météoritique (l'eau de mélange contient une forte proportion d'eau météorique).

Cette différence porte à penser que cette flore microbienne soit une flore dont les origines sont relatives à la formation de la grotte.

Cette hypothèse est très importante, car elle nous permet de pouvoir remonter le temps et de faire la distinction entre la flore initiale et la flore d'acquisition.

**« L'absence de certaines bactéries dans les eaux de la grotte, mais présentes dans les parties sèches de cette cavité, nous permet de supposer que la contamination était présente à la formation de cette cavité ».**

#### Observation :

***N'ayant qu'un résultat quantitatif entre classes, ordres, familles, genres ou espèces. Les interprétations statistiques seront : une analyse quantitative des variations dans la diversité et non une analyse de la reproductivité analytique de la population de chaque groupe de cette diversité.***

### 6.1 Analyse partielle des germes telluriques non-apportés par l'eau de la cavité

Les eaux provenant de l'extérieur de la grotte ont été les seuls moyens de contamination et de renouvellement de la biomasse de cette cavité.

En considérant la flore tellurique constituée de bactéries ayant pour biotope le sol et ne se retrouvant pas ou peu dans les eaux, on peut établir le tableau suivant :

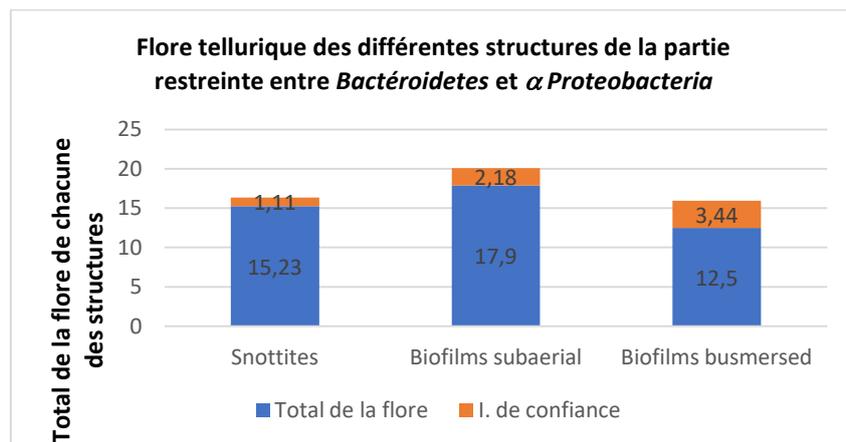
**Bactéries telluriques en pourcentage de la flore de chacune des structures**

Noms bactéries	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »
<i>Sphingobacteriaceae</i>	0,15	4,6	
<i>Chthoniobacteraceae</i>	2		
<i>Verrucomicrobium</i>	2,1		
DB1-14	3,9	0,6	1,5
Rhizobiales	0,9	3,5	0,4
<i>Beijerinckiaceae</i>	3,5	5,2	
<i>Rickettsiaceae</i>	2,3	3,9	9
<i>Sphingomonadales</i>	0,4	0,1	2
Total des lignes %	15,25	17,9	12,5
Diversité en nombre de familles ou genres	8	6	4

Ce tableau fait ressortir dans les résultats en nombre % de bactéries principalement telluriques. Il montre une similitude entre les snottites et les biofilms « subaerial », mais avec une forte différence pour les biofilms « submersed ».

La diversité en nombre de familles ou de genres (dans ce tableau) est plus marquée chez les snottites un peu moins chez les biofilms « subaerial » et plus faible chez les biofilms « submersed ».

Le caractère tellurique des bactéries comprises entre *Bacteroidetes* et les *Betaproteobacteria* nous laisser supposer que cette contamination tellurique viendrait des molasses alpines, ayant recouvert et fermé cette cavité.



Ce graphique montre, qu'il existe une différence significative entre les snottites et les biofilms « subaerial », pouvant laisser penser à une différenciation dans la formation de ces deux structures. Ceci fait ressortir que les snottites sont différents des biofilms « subaerial » aussi bien sur le plan de la diversité microbienne en nombre, qu'en % de bactéries dans les structures, avec un intervalle de confiance confirmant cette observation.

Par contre, le biofilm « submersed » a une différence forte et significative, comparativement aux structures sèches. Les biofilms « submersed » ont une concentration faible en germes et en biodiversité tellurique.

La présence en nombre % et en nombre de diversité dans les snottites de *Verrucomicrobium*, de *Sphingobacteriaceae*, *Chthoniobacteraceae*, *DB1-14*, bactéries typiques des sols, montre que les snottites et les biofilm « submersed » ont dû être issu des molasses alpines.

**« Il semble que les snottites ont dû être formés avant les biofilms. »**

## 6.2 Analyse partielle des bactéries aquatiques de ces biosystèmes

Le même examen fait sur les bactéries aquatiques d'eau douce entre les *Bacteroidetes* et les *Betaproteobacteria* nous donne la répartition suivante :

### Bactéries des lacs et des vases en pourcentage de la flore de chacune des structures

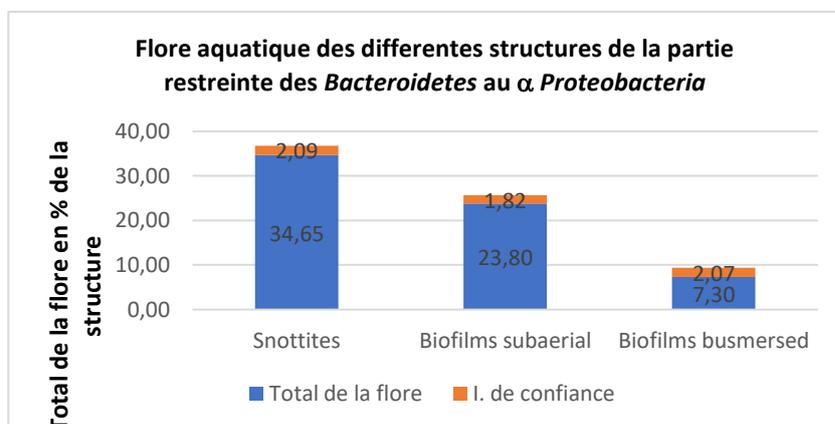
(La flore marine est exclue du comptage)

Noms	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »
<i>Cytophagales</i>	5,9	2,3	0,1
<i>Saprospiraceae</i>	0,15	4,4	
<i>Flavobacteriales</i>	0,1	0,1	0,1
<i>Planctomycetes</i>	0,5	2,6	
<i>Planctomyces</i>	3,5	2,7	0,9
<i>Fuku N 18</i>	6,8		
<i>Hyphomonadaceae</i>	1,3	0,2	0,6
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	8,1	0,1	
<i>Methylobacteriaceae</i>	4,7	8,4	
<i>Methylorosula</i>	0,2	0,2	0,2
<i>Rhodospirillaceae</i>	3,4	2,8	5,4
<b>Total lignes %</b>	<b>34,65</b>	<b>23,8</b>	<b>7,3</b>
<b>Diversité en nombre de familles et de genres</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>6</b>

Les snottites sont plus riches en flore aquatique d'eau douce, laissant supposer que les sédiments alpins apportés par les eaux météoriques lors de la formation de la cavité ont pu être un point de différenciation avec les biofilms.

Cette différence est aussi marquée par la diversité de la flore :

- Les *Planctomycetes* sont plus abondants dans les biofilms « subaerial » que dans les snottites.
- Les *Hyphomonadaceae* : sont plus abondants dans les snottites que dans les autres structures.
- Les *Saprospiraceae* : sont peu abondants dans les snottites, mais bien présents dans les biofilms « subaerial ».
- Les *Verrucomicrobia* : comprennent les bactéries *Fuku N°18*, présentes seulement dans les snottites et étant une flore typique de la flore tellurique et d'eau douce.  
« Ces bactéries sont représentées par une quinzaine de groupes de bactéries diversifiées d'eau douce typiques dans quinze lacs en Europe du Nord, elle a été étudiée à l'aide d'hybridation inverse. Elle donne des grappes bactériennes préjugées typiques ».  
Ce groupe présent dans les sources d'eau douce et dans les lacs de montagnes, pourraient provenir des molasses alpines.
- Les *Verrucomicrobia* semblent être beaucoup plus répandus dans les sols qu'on ne le pensait ; leur abondance moyenne dans le sol de 23 % est comparable à celui des autres phylums considérés comme phylums dominants du sol.



Ce graphique montre dans ce domaine de classification, une grosse différence en flore aquatique entre les structures snottites et les biofilms « subaerial » (différence significative). Cette observation montre que les snottites n'ont pas tout à fait la même origine que les biofilms « subaerial ».

Les biofilm « submersed » eux sont très faibles en nombre % de bactéries dans cette même partie, ils sont influencés par l'eau de mélange, dont la flore entre les *Bacteroidetes* et les *Betaproteobacteria* est pratiquement absente (les résultats en pourcentage font un biais sur le fait que les valeurs en % sont une forme fermée de définition).

#### Équilibre entre flore tellurique et flore aquatique.

Le rapport entre les germes telluriques en fonction des germes des rivières et des lacs de montagne va permettre de différencier la part des structures ayant été contaminées par les sédiments lors de la formation de la cavité.

**Rapport pourcentage bactéries telluriques / pourcentage bactéries d'eau douce**

Rapport	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »
Rapports sur les pourcentages des bactéries telluriques/bactéries d'eau douce	0,440	0,752	1,712
Même rapport sur la diversité bactérienne	0,72	0,6	0,66

Dans cette partie de la classification, les rapports sur la diversité restent relativement proches entre les différentes structures, plus marqués pour les snottites contenant une plus grande diversité en flore aquatique et tellurique.

En pourcentage de chacune des structures : les snottites sont plus riches en bactéries aquatiques comparativement aux bactéries telluriques. Cette différenciation peut venir d'un biotope mieux adapté pour ce type de bactéries ou du fait d'une origine différente. Voulant dire que les snottites ont dû avoir une formation antérieure au biofilm et qu'ils aient pu être formés par les molasses alpines.

De même dans cette partie, les biofilms « submersed » doivent être de formation plus récente ayant été faite au remplissage de la grotte par les eaux de la source et les eaux météoriques (c'est-à-dire des eaux profondes).

**« La flore d'eau douce dans les snottites appuie l'hypothèse d'une formation première de cette structure dans la cavité. »**

### 6.3 Analyse partielle des bactéries marines des mêmes biosystèmes

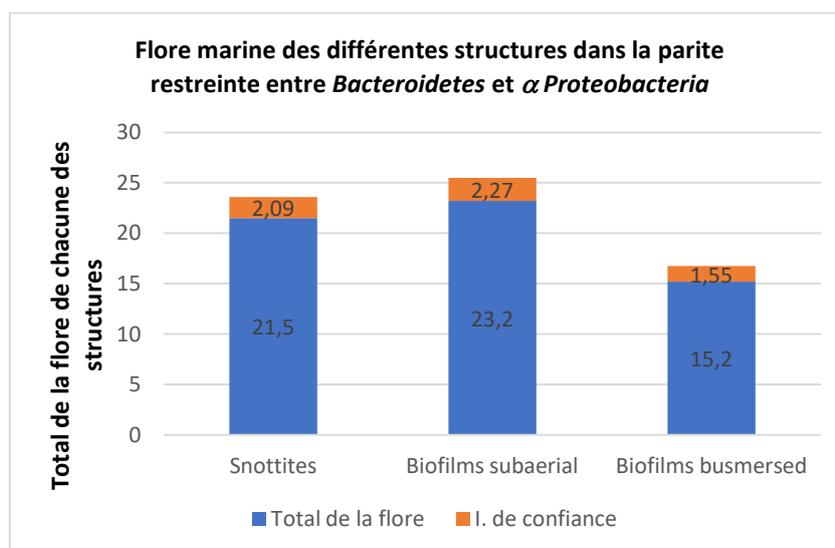
Dans cette même zone de la classification entre *Bacteroidetes* aux *Betaproteobacteria*, l'étude des bactéries marines nous informe sur l'implication de la présence maritime dans les bio-structures.

**Pourcentage des Bactéries marines par structures dans ce domaine de classification :  
de *Bacteroidetes* aux *Betaproteobacteria***

Noms	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »
<i>Arenibacter</i>	2,7	2,7	
<i>Pir 4</i>	7,7	7,2	1,9
<i>SM1-02</i>	4,4	6,5	1,8
<i>Phycisphaeraceae</i>	0,3	0,2	0,5
<i>Methylomirabilis</i>			4,7
<i>Rhodobacteraceae</i>	3,9	3,4	2,4
<i>Sphingomonadales</i>	0,4	0,1	2
<i>Erythrobacteraceae</i>	0,7	0,1	0,1
<i>Porphyrobacter</i>	1,4	3,0	1,8
<b>Total % des lignes</b>	21,5	23,2	15,2
<b>Diversité en nombre</b>	8	8	8

Ce tableau montre, une diversité identique quelque-soit la structure étudiée.

Par contre entre les snottites et les biofilms « subaerial » : ont une égalité de contamination en flore marine prise dans cette tranche dans ce domaine de classification, contrairement au biofilm « submersed ».

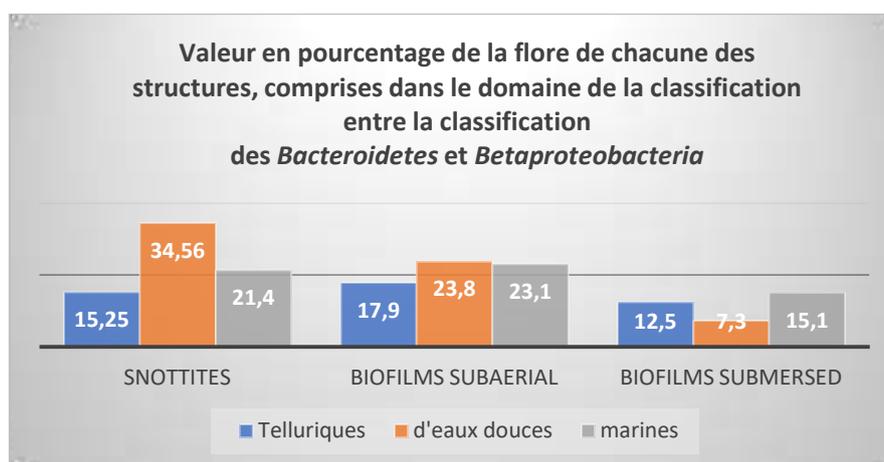


Le biofilm « submersed » est relativement pauvre en bactéries marines comparativement aux snottites et au biofilms « subaerial » ( $m = 7.15$  significative  $p > 0.99$ ).

Il y a une différence restant significative entre les snottites et les biofilm « subaerial ». Les biofilms « submersed » sont là encore très différents des autres structures par le fait de l'influence, de l'apport en flore bactérienne, provenant de l'eau de mélange (car nous sommes dans des valeurs en pourcentage créant un biais dans les calculs).

**« La présence des *Arenibacter* et des *Porphyrobacter*, bactéries marines benthiques absentes dans l'eau de mélange et l'eau de source, mais présentes dans les snottites et biofilm « subaerial », sont une preuve de leur présence à l'origine de la cavité. »**

**Graphique général de l'analyse partielle dans le domaine de la classification**



#### 6.4 Analyse partielle de l'activité méthylo trophique de ces biosystèmes

Seule la présence de *Methylomirabilis* (faisant partie de l'embranchement de CN 10) dans le biofilm « submersed » reste plus importante dans les méthylo trophes.

Dans les snottites et biofilms « subaerial » les méthanotrophes comme *Methylocella*, *Methylosula* et *Methylobacterium* des *Alphaproteobacteria* sont en faibles quantités soit < 1 %<sup>dd</sup>.

**Flore méthylo trophique des structures en pourcentage dans la partie *Bacteroidetes* aux *Betaproteobacteria***

Noms	Snottites %	Biofilms « subaerial » %	Biofilms « submersed » %
<i>Methylomirabilis</i>	0,0	0	4,7
<i>Methylobacteriaceae</i>	4,7	8,4	
<i>Methylocella</i>	0,2	0,2	0,2
<i>Methylosula</i>	0,2	0,2	0,2
<i>Methylobacterium</i>	0,2	0,2	0,2

Noms	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »
Méthylo trophes	5,3 %	9,0 %	5,3 %
Diversité en nombre	4	4	4

La diversité en nombre reste semblable quelque-soit la structure, mais elle n'est pas identique en familles -en genres.

Les *Methylobacteriaceae* sont présents seulement dans les snottites et les biofilms « subaerial » et absents dans les biofilms « submersed » ; ces derniers ont la présence exclusive du *Candidatus Methylomirabilis*.

- ***Methylobacteriaceae*** : bactérie aérobie ; en forme de bâtonnet. La couleur rose très caractéristique de ses colonies est due aux caroténoïdes qu'elle produit. Elle produit également de la bactériochlorophylle. Le seul genre ayant été actuellement défini dans cette famille est *Methylobacterium* étant divisé en deux groupes selon l'activité métabolique basse ou élevée des espèces.

***Methylobacterium radiotolerans*** appartient au groupe à l'activité métabolique élevée. Ils forment des tapis à l'interface entre l'eau et les hydrocarbures, ayant une forte cohésion brute. Ces chimio-films ayant pour origine, la formation de biofilms, étant généralement riches en azote. Lorsque l'on retire de ceux-ci la phase polaire (phase hydrophile) les biofilms sont également éliminés.

***Methylobacterium*** a dû jouer un rôle important dans la fixation des hydrocarbures de la grotte et dans la formation des snottites et des biofilms.

<sup>dd</sup> Ces observations ont été obtenues par la *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (Subvention du 377/1 : 1) et par le programme *Biotchnologie moléculaire* ; éd par l'académie russe des Sciences.

- Le phylum **NC 10** représente le **Candidatus Methyloirabilis oxyfera**, se trouvant uniquement dans les biofilms « submersed ».

Ce germe marin, étant capnophile et produisant de l'oxygène, sa présence dans le biofilm « submersed » peut être une explication de la présence de bactéries aérobies dans cette structure.

Le **Candidatus Methyloirabilis oxyfera** est un oxydant du méthane, ni aérobie, ni anaérobie mais grâce à la AMO en utilisant les nitrites et les nitrates comme donneurs d'oxygène pour l'oxydation et de O<sub>2</sub>, d'azote atmosphérique N<sub>2</sub> et de l'hydrogène H<sub>2</sub>. Il pourrait être rattaché au consortium de méthanotrophe *Archaea* et des bactéries sulfato-réductrices par sa spécificité. En 2006, une université néerlandaise a prélevé un échantillon de boue dans des marais des Pays-Bas. Dans un premier temps l'équipe de chercheurs découvre cette bactérie anaérobie dans ces prélèvements. Ils se sont rendus comptes en laboratoire que cette bactérie était capable d'oxyder le méthane, très présent dans l'atmosphère primitive, il y a 3,5 milliards d'années, sans utiliser l'oxygène de l'air.

Et c'est cela, faisant dire aux scientifiques - sous le sceau de l'hypothèse, que certaines bactéries, alors que l'atmosphère terrestre et la photosynthèse n'existaient pas, produisaient déjà de l'oxygène, il y a quelques 3,5 milliards d'années.

**«La présence des méthyloirabiles et méthanotrophes a dû apparaître après la formation des snottites et des biofilm « submersed », car cette activité vient de la méthanogenèse liée au catabolisme de la matière organique, elle a dû apparaître bien plus tardivement dans l'évolution de la cavité. »**

## 6.5 Analyse partielle de l'activité photosynthétique

La photosynthèse des bactéries a pour seule raison : l'utilisation du CO<sub>2</sub> atmosphérique par l'intermédiaire de la lumière (visible et UV), afin de fixer le carbone du gaz carbonique pour faire de la matière organique bactérienne.

Lorsque la cavité s'est fermée, cette photosynthèse a perdu son sens logique. La photosynthèse n'ayant plus de possibilité d'être utilisée par les bactéries, ce caractère devient donc un indicateur de la présence bactérienne photosynthétique avant le recouvrement par les molasses alpines.

L'analyse de l'activité photosynthétique de la grotte toutes familles confondues est d'environ 21.8 % du total bactérien.

L'apport extérieur des bactéries photosynthétiques par les eaux de la grotte est de 7.6% cette apport est très spécifique se portant sur deux familles les *Rhodocyclaceae* et les **Sideroxydans**. Il provient principalement de l'eau tellurique pour les *Rhodocyclaceae* et de l'eau de source ainsi que l'eau tellurique pour les **Sideroxydans**.

La liste des bactéries photosynthétiques présentes dans la grotte est répartie par embranchement dans le tableau suivant :

**Tableau des familles comportant des bactéries avec une photosynthèse dans les différentes embranchements (avec le pourcentage calculé sur le total de la cavité)**

		<b><i>α-proteobacteria</i></b>	<b><i>β-proteobacteria</i></b>	<b><i>γ-proteobacteria</i></b>
	<i>Planctomyces</i> 6.2%	<i>Rhodospirillaceae</i> 0.8 % <i>Rhodobacteraceae</i> 2.1% <i>Rhizobacteriales</i> 3.7% <i>Sphingomonadales</i> 0.6% <i>Erythrobacteraceae</i> 0.8%	<i>Rhodocyclaceae</i> 6.3% <i>Sideroxydans</i> 1.3%	RAS
<b>Total de la grotte</b>	6.2%	8.0%	7.6%	

Ce tableau fait ressortir que les *Alphaproteobacteria* représentent l'embranchement le plus riche en bactéries photosynthétiques. C'est dans les *Alphaproteobacteria* que les taux de bactéries photosynthétiques présentent leur plus grande diversité.

## Répartition des familles comportant une activité photosynthétique.

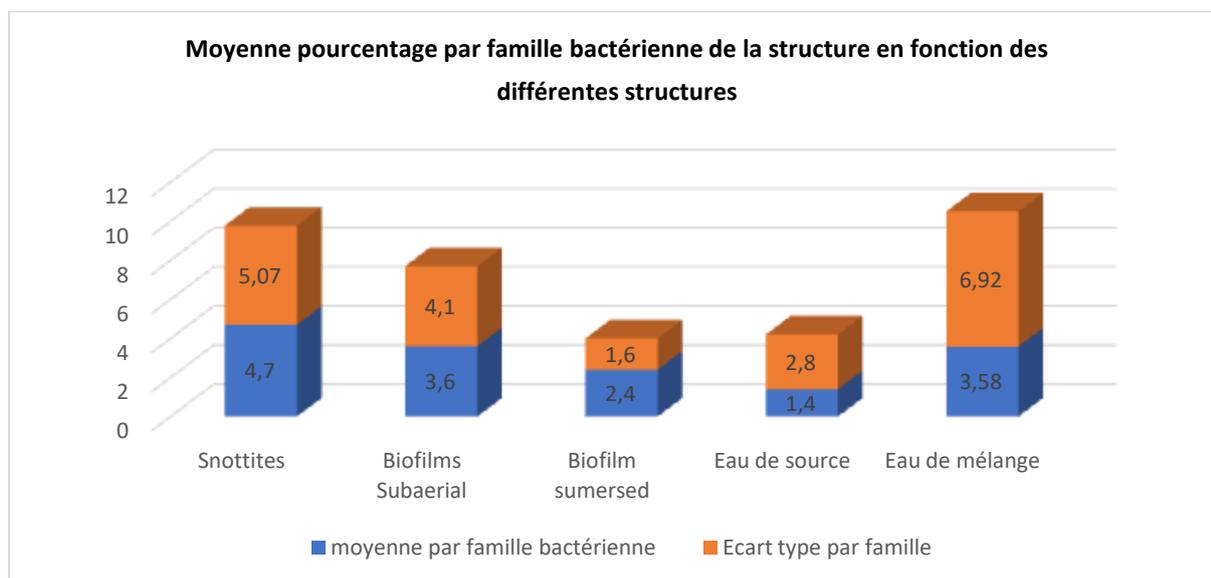
### Code du répertoire des familles

- |                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| 1. <i>Planctomycetes</i>    | 5. <i>Rhizobacteriales</i>   |
| 2. <i>Rhodocyclusaceae</i>  | 6. <i>Sphingomonadales</i>   |
| 3. <i>Rhodospirillaceae</i> | 7. <i>Erythrobacteraceae</i> |
| 4. <i>Rhodobacteraceae</i>  | 8. <i>Sideroxydans</i>       |

Pourcentage des bactéries photosynthétiques de chacune des structures

N° de code des Noms	Snottites	Biofilms Subaerial	Biofilms Submersed	Eau de source	Eau de mélange
1	15,6	12,5	2,8	< 1	< 1
2	< 0,2	< 0,2	3,2	8,3	20
3	2,3	1,4	0,3	< 1	< 1
4	5,6	2,8	2,1	< 1	< 1
5	7,2	6,6	4,8	< 1	< 1
6	1,8	2,4	3,8	< 1	< 1
7	2,7	1,4	Na	< 1	< 1
8	Nd	Nd	0.1	1,6	5
<b>Pourcentage total de chacune des structures</b>	<b>354</b>	<b>27,3</b>	<b>17,1</b>	<b>9,9</b>	<b>25</b>

Lorsque l'on analyse ces valeurs par structure sous forme de graphique :



Les snottites et les biofilms « subaerial » ont des valeurs très proches en bactéries photosynthétiques contrairement aux eaux de source et aux biofilms « submersed », ceux-ci ayant une composition en germes photosynthétiques influencées par les eaux de la grotte.

La diversité des familles comportant une activité photosynthétique est identiques pour les snottites et biofilms confondus c'est-à dire de la valeur de 7 familles, alors que pour les eaux de la grotte elles sont représenté que par deux familles, celle-ci étant absentes dans les snottites et dans les biofilms « subaerial ».

Cette observation montre qu'il y a une différence dans la genèse de ces snottites et des biofilms « subaerial » et que ces deux structures n'ont pas de lien avec les eaux de la grotte. Ceci confirme bien que la formation de ces deux structures est indépendante du reste de la cavité.

Les biofilms « Submersed » ont eu une contamination des eaux de la cavité due au fait qu'ils étaient immergés dans celle-ci. Dans les biofilms submersed le types telluriques comme ordre *Rhizobacteriales*, et *Sphingomonadales*, ou marine *Erythrobacteraceae* ne sont pas présentes. Ceci pouvant être un critère de différenciation dans la formation de ces biofilms comparativement aux biofilms « Subaerial ». Cette différenciation pouvant être aussi un critère de distinction dans l'historique de la formation de ces structures ou une inadaptation au biotope aquatique des bactéries citées.

### Genres phototrophes anoxygéniques identifiés dans la cavité

Noms	Snottites	Biofilms Subaerial	Biofilms Submersed	Eau de source	Eau de mélange
<i>Porphyrobacter</i>	1.7 %	2.9 %	1.2 %	< 1 %	< 2 %
<i>Erythrobacter</i>	2.9 %	1.3 %	Nd	< 1%	< 1 %

Cette présence de bactéries pouvant avoir une activité photosynthétique en anaérobiose montre que la photosynthèse peut se produire dans certain cas en milieu anoxique.

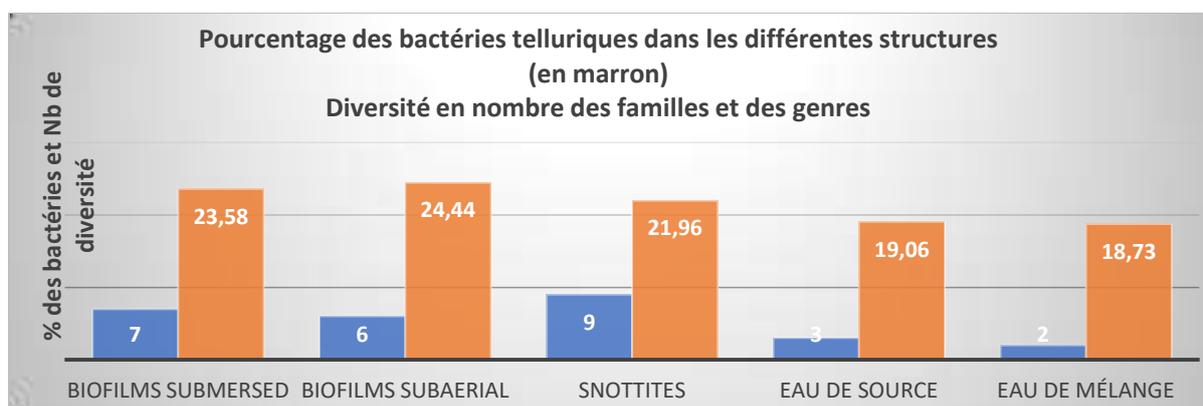
**« Ceci nous renforce dans le fait que les snottites et les biofilms « subaerial » ont dû apparaître à la suite du recouvrement de la côte marine bavaroise et que leur formation c'est différencier de l'ensemble de la cavité ».**

## CHAPITRE 7 / ANALYSES GÉNÉRALES DE LA FLORE DE LA GROTTÉ

L'analyse partielle nous a permis de remonter le temps et de faire des hypothèses sur la formation de ces structures. L'analyse globale va nous ouvrir sur les fonctionnements de ces écosystèmes

### 7.1 Analyse générale de la flore tellurique de l'ensemble des classes

Les bactéries telluriques sont dans notre cas, les bactéries se trouvant dans le sol, exceptées les bactéries du sol ayant la possibilité de vivre également dans les milieux aquatiques.



Les eaux de mélange et de source ont un apport identique en concentration % et avec des valeurs très faibles en diversité.

Il y a une forte variation de la diversité des bactéries telluriques en fonction des structures. La diversité est la plus faible dans les eaux de la grotte, par contre, elle est plus forte dans les biofilms « submersed ».

Cette différenciation est une preuve qu'il n'y a pas de transfert actif entre l'eau de la grotte et le biofilm « submersed ». Ceci étant remarquable dans ce graphique, c'est la teneur en bactérie tellurique du biofilm « submersed » alors qu'il est immergé dans l'eau de mélange.

Dans l'ensemble, les eaux de source et de mélange ont moins de diversification en bactéries telluriques que les biofilms.

Cette différence, dans les biosystèmes peut avoir pour raison des variations du biotope impliquant des modifications de la diversité :

- Le biofilm « submersed » est immergé en semi-aérobiose, les bactéries aérobies auront du mal à survivre dans de telle condition.
- L'eau entourant ce biofilm « submersed » est saumâtre donc les bactéries non-marines ont du mal à supporter les teneurs en sel trop importante.
- Les résultats donnés en pourcentage sont des résultats relatifs, l'occupation de la place va jouer un rôle important dans la distribution globale.

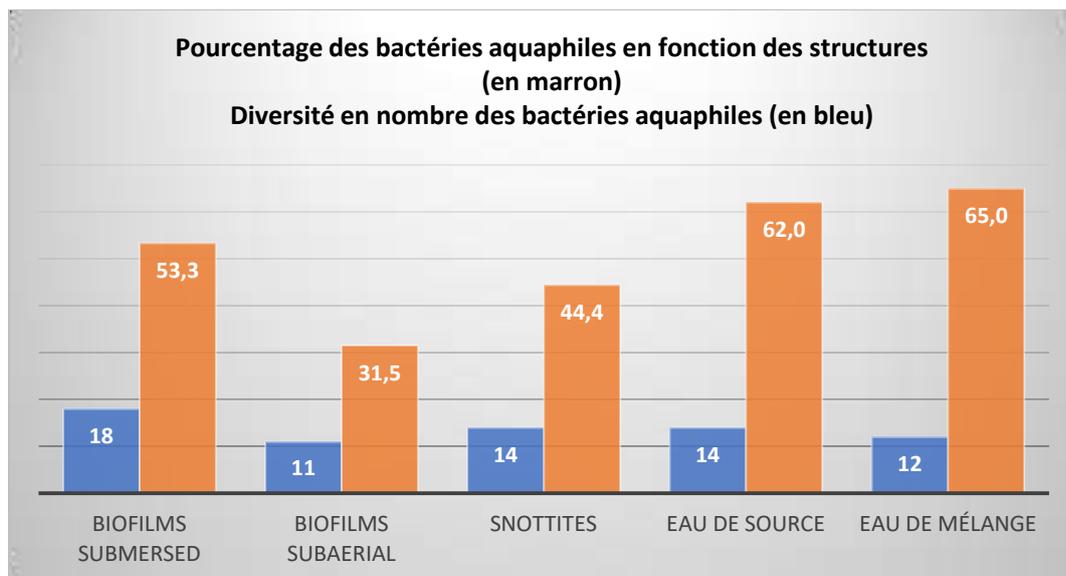
**« La flore tellurique a une diversification très variable en fonction des structures, elle est plus forte dans les biofilms « submersed », malgré sa faible présence dans l'eau de mélange. »**

### 7.2 Les eaux de la grotte de Sulzbrunn et analyse de la flore aquatique

Le profil hydraulique de la grotte de Sulzbrunn est apporté par deux réseaux :

- Soit par l'eau de source étant une eau minérale saumâtre.
- Soit par l'eau météorique suintement par les parois et les fissures de cette cavité.

L'eau de mélange est la résultante de ces deux apports.



La concentration microbienne de l'eau de mélange va donc être fonction des contaminations respectives des apports et du flux de renouvellement de cette eau. Le flux de renouvellement étant continu, il se produit un gradient de mélange continuellement variable, rendant le calcul de la dilution microbienne difficilement interprétable (seul l'analyse dynamique peut réduire ce biais).

Aux apports hydriques de la source et des suintements météoriques, vient s'ajouter la croissance bactérienne dépendante du temps que l'eau de mélange est restée dans la grotte (c'est-à-dire du flux).

Estimation des valeurs microbiennes en pourcentages apportées par l'eau météorique

**Valeurs pondérées sur les pourcentages de l'eau de mélange**

Noms des ordres	Eau de source	Différence entre l'eau de source et l'eau de mélange.	Eau de mélange
<b>Betaproteobacteria</b>	<b>60 %</b>	<b>23 %</b>	<b>46 %</b>
<i>Burkholderiales</i>	3,5 %	8 %	11,3 %
<i>Hydrogenophilales</i>	27 %		5,6 %
<i>Methylophilales</i>	4 %	4 %	7,5 %
<i>Nitrosomonadales</i>	16 %		5 %
<i>Rhodocyclales</i>	8,3 %	11 %	18,9 %
<b>Gammaproteobacteria</b>	<b>10,9 %</b>	<b>31 %</b>	<b>40 %</b>
<i>Methylococcales</i>	8,1 %	28 %	36 %
<i>Legionellales</i>	0,2 %	< 1 %	1,1 %
<i>Pseudomonadales</i>	1,4 %		0,0 %
<i>Xanthomonadales</i>	0,2 %	3 %	2,7 %
<b>Deltaproteobacteria</b>	<b>3,6 %</b>	<b>2 %</b>	<b>1,3 %</b>

La différence entre l'eau de source et l'eau de mélange est en grande partie de l'eau météorique soit 55,2 % en volume de l'eau. La flore de l'eau météorique en pourcentage est obtenue par déduction des flores de l'eau de source comparativement à l'eau de mélange (par pondération sur les volumes de ces deux eaux), en faisant abstraction aux possibilités de croissance bactérienne ou de mortalité de la flore dans l'eau de mélange donnant les résultats ci-dessus.

Il faut remarquer que le flux hydrique peut être un facteur de biais pour établir une croissance dans les eaux de mélange.

Les productions microbiennes provenant des biofilms « submersed » peut aussi être un facteur contaminant de l'eau de mélange.

La répartition bactérienne de l'eau de la grotte :

- Les *Alphaproteobacteria* sont présentes dans l'eau de source à une valeur inférieure à 1 % et l'eau de mélange en contient 2,5 %.
- Les *Betaproteobacteria* représentent 60 % de la flore de l'eau de source (43 % dans l'eau de mélange et 20 % des biofilms « submersed »), mais la présence dans les snottites et les biofilms « subaerial » étant de l'ordre de 1,8 %, montre que la contamination des biofilms « submersed » est bien d'origine de l'eau de source et de l'eau météorique.

Dans l'eau de source, la flore ferrobactérienne comme les *Gallionellaceae*, dans cette eau représentant en nombre 14 %, avec *Gallionella*, *Siderooxydans*, *Ferriphaselus*, soit environ 6,6 % de chaque bactérie sur la flore totale de l'eau de source).

Ces constatations ferrobactériennes montrent que l'eau de source vient d'une source de type thermal dont les origines sont profondes et peut expliquer la présence de sel marin dans l'eau de cette cavité.

#### Bactéries chimio-lithotrophes entrant dans l'oxydation du fer et du soufre

Valeurs et rapport en *Betaproteobacteria* entre le biofilm « submersed » et l'eau de mélange

Noms des Bactéries	Biofilms « submersed » en pourcentage	Eau de source en pourcentage	Eau de mélange en pourcentage	Rapport entre Biofilm submersed / Eau mélange
<i>Ferriphaselus</i>	≈0,2 %	≈1,6 %	≈ 0,8 %	0,25
<i>Gallionellaceae</i>	≈ 0,2 %	≈ 14 %	≈ 7 %	0,029
<i>Gallionella</i>	≈0,2 %	≈ 2,5 %	≈1,25%	0,16
<i>Siderooxydans</i>	≈ 0.2 %	≈ 2,5 %	≈1,25%	0,16
<i>Sulfuricella</i>	≈ 1,7 %	≈ 4,1 %	≈ 2 %	0,85
<i>Sulfuritalea</i>	Nd	Nd	Nd	Nd

- La bactérie *Gallionella* est une bactérie de Gram (-), avec des cellules en formes de haricot incurvées avec un flagellum polaire (plusieurs flagelles) ; elle pousse bien dans les eaux ferreuses, et peut produire une tige torsadée. Les cellules sont difficiles à observer, car elles sont généralement mélangées avec une grande quantité de fer précipité et de tiges (Kucera & Wolfe, 1957 ; Wolfe, 1964). C'est une bactérie pédonculée (à prosthecae) chimio-lithotrophe oxydant le fer. Elle vit dans des conditions de faible teneur en oxygène (micro-aérobie). Les bactéries oxydent et fixent le fer, mais afin d'obtenir l'énergie hors de ce processus, elles doivent vivre dans un environnement relativement spécifique contenant « du fer réduit, une bonne quantité d'oxygène et de carbone, du phosphore et de l'azote en quantité suffisante » (Halbach, Koschinsky et Halbach, 2001). Dans les émergences hydrothermales *deep sea* (mer profonde) actives, la plupart des minéralisations de fer, venant des fluides hydrothermaux étant émis, sont des sulfures. Elle est réputée être une bactérie de corrosion et elle pose des problèmes techniques par des dépôts ferriques dans les canalisations allant jusqu'à l'obstruction. Cette flore des ferrobactéries est aussi présente dans le biofilm « submersed » de la grotte en faible quantité. Les filaments étant attachés à la cellule bactérienne doivent empêcher le corps bactérien de pénétrer dans le biofilm « submersed », dans la partie aérienne des biofilms ces bactéries ne sont pas présentes (snottites et biofilms « subaerial »). Pour les bactéries oxydant le fer, l'apport de l'eau météorique semble nul. Il est à remarquer une légère augmentation dans l'eau de mélange de ces bactéries autotrophes comparativement à l'eau de source.
- Les bactéries des *Hydrogenophilaceae* représentent 27 % de la flore de l'eau de source comportant aussi des bactéries psychrotolérantes se trouvant dans les eaux thermales. Dans cette espèce *Hydrogenophilus thermoluteolus* est trouvée dans les sources d'eaux chaudes. C'est une bactérie chemo-litho-autotrophe facultative. En 2004 elle a été isolée des échantillons de carottes de glace à une profondeur de 3 km dans un forage fait au lac Vostok

en Antarctique. Cette famille étant thermotolérante peut aussi supporter des froids très intenses. Ceci pouvant expliquer la résistance de cette flore aux conditions que la grotte de Sulzbronn a dû subir pendant 15 millions d'années.

- *Sulfuricella* présent à 4,1 % de l'eau de source, est de la famille des *Hydrogenophilaceae* cette famille représentant 7,5 % dans cette même eau. Elle oxyde le soufre élémentaire et le sulfure d'hydrogène, en sulfates, les thiosulfates. Elle peut utiliser la réduction des nitrites en azote comme accepteur d'électrons et comme seule source d'énergie. Elle est chimio-lithotrophe, avec une activité oxydase (+), (voir « Oxydation enzymatique du soufre et des tétrathionates page 319, ainsi que les *Thiobacillus* » page 290 de la partie annexe).
- ***Sulfuricella denitrificans* souche skB26T** est une nouvelle bactérie anaérobie facultative oxydant le soufre, ayant été isolée de l'eau d'un lac anoxique d'eau douce au Japon.
- Les *Sulfuritalea* sont une composante majeure de la communauté bactérienne planctonique dans l'élaboration de l'appauvrissement de l'eau en nitrates hypoxiques où la respiration arséniate est l'un des métabolismes énergétiques possibles. Ils sont de la famille des *Hydrogenophilaceae* ; ces bactéries étant représentatives d'une flore en eaux profondes typique des eaux thermales, elle nous informe sur la provenance profonde des eaux de l'eau de source.
- Les *Burkholderiales* (*Comamonadaceae*) se retrouvent à 10,3 % dans l'eau de mélange et 3,9 % dans l'eau de source et 3,9 % dans le biofilm « submersed ». Elles font partie des bactéries des sols et sont actives dans la dépollution. Ces bactéries dans l'eau de mélange sont soit apportées par l'eau météorique ou par le développement dans les biofilms « submersed ».
- Les *Methylophilales* se retrouvent à 4 % dans les eaux de mélange et font partie des bactéries de dénitrification des eaux et des boues.
- Les *Rhodocycales* se retrouvent à 18,2 % dans les eaux de mélange, représentés par les *Ferribacterium* pour la valeur de 14,5 % dans ces eaux et donc à 8,3 % dans l'eau de source et à 1,6 % dans le biofilm « submersed ». C'est une bactérie réductrice du fer III en fer II. Elles résistent aux radiations nucléaires, a pour biotope les lacs profonds. Cette bactérie doit avoir pour origine les eaux météoriques venant de l'épi-karst. Son rôle serait de permettre les échanges d'électrons en rééquilibrant le fer III formé par les *Gallionellaceae*.
- Les *Gammaproteobacteria* représentent 10,9 % de la flore de l'eau de source et 40 % de la flore de l'eau de mélange de la grotte. Soit une estimation d'apport par pondération de 69.7 % de l'eau météorique (en négligeant la croissance dans l'eau de mélange). Répartition dans l'eau de mélange :
  - Les *Methylococcales* avec 36 % dans l'eau de mélange, sont des bactéries marines ; dans cet ordre, certains genres peuvent entrer en endosymbiose avec les espèces de la faune et de la flore marine. Les *Methylococcaceae* appartenant à cet ordre, représente 16,9% dans le biofilm « submersed » ; ils sont reconnus comme jouant un rôle essentiel dans l'écologie par leur activité méthanotrophe, interceptant une grande partie du méthane généré par les catabolismes naturels. Cette famille a donc une grande importance dans le cycle du carbone et dans les processus homéostatiques naturels de la terre.
  - Dans le même ordre les *Methylovulum*, avec 28% provenant de l'eau météorique, 1.4% de l'eau de source, avec 27,6% de l'eau de mélange et de 7,4% dans le biofilm « submersed ». Ils proviennent principalement de l'épi-karst. Ils utilisent de méthane et l'alcool méthylique. Mais très peu d'informations ont été recueillies sur le plan de l'écologie de ces microorganismes et son influence sur le plan climatique : le contrôle atmosphérique demande un long gradient de régulation (Artz et coll. 2007).
  - Les *Methylobacter* représentant 10 % dans le biofilm « submersed » et sont très peu présent dans l'eau de mélange.
  - Les *Xanthomonadales* 0.2 % de l'eau de mélange, avec 3.7% dans le biofilm « submersed ». Dans cet ordre on trouve le genre *Stenotrophomonas* est très répandu dans l'environnement (par exemple dans l'eau et le sol).

### Apport des méthanotrophes météoriques par pondération par les proportions des eaux de la grotte

Noms	Eau de source	Différences	Eau de mélange
<i>Methylomicrobium</i>	Nd	1,6 %	1,6 %
<i>Methylomonas</i>	Nd	3,2 %	3,2 %
<i>Methylosoma</i>	0,5 %	- 0,4 %	1 %
<i>Methylovulum</i>	Nd	30 %	30 %
<i>Crenothrix</i>	1,5 %	- 0,5 %	1 %

Ce tableau fait ressortir un faible apport de ces bactéries par l'eau de source sur les genres *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylosoma*, *Crenothrix*. Cette flore a été apportés soit par une contamination du biofilm « submersed » (par croissance interne), soit par l'eau météorique, mais seul les *Crenothrix* et les *Methylosoma* ont été apportés par l'eau de source.

Par contre le *Methylovulum* a une différence entre les eaux et représente à lui seul la différence de la totalité des *Gammaproteobacteria* entre les eaux de la grotte. Il a été apporté principalement par l'eau météorique.

### Équilibre entre les bactéries telluriques et les bactéries du sol pouvant être aussi aquaphiles

Définition	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilm « submersed »
Bac. Telluriques %	21,96	24,44	23,58
Bac. Aquaphile %	44,4	31,5	53,3
<b>Rapport tell. / aqua.</b>	<b>0,494</b>	<b>0,775</b>	<b>0,442</b>

Les snottites se différencient des biofilms « subaerial », mais pas des biofilms « submersed », ces derniers ont une flore aquaphile plus importante, par le fait qu'ils sont immergés. Par contre ce n'est pas le cas des snottites leur donnant une différenciation sur les biofilms « subaerial ».

**« Les eaux de source sont d'origine profonde et elles contiennent une flore proche des eaux thermales, avec les bactéries litho-chimiotrophe identifiant cette origine. »**

## 7.3 Caractéristiques bactériennes des eaux de la grotte

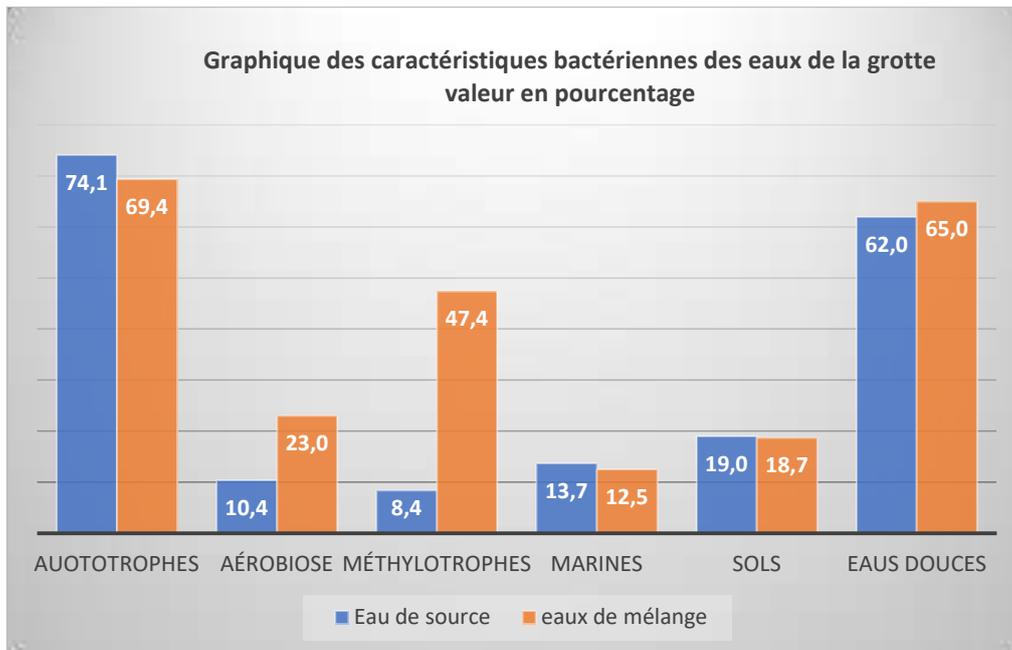
Les caractéristiques autotrophes, aérobies, méthylophiles, marines, du sol, de l'eau douce, sont les facteurs les plus étudiés dans les écosystèmes.

Les caractéristiques de bactéries en pourcentage des eaux de la grotte sont données dans le tableau suivant et permettent de mieux comprendre le rôle bactérien de l'écosystème.

Eaux	Autotrophes	Aérobioses	Méthylotrophes	Marines	Sols	Eaux douces
Source	74,1	10,4	8,4	13,7	19	62
Mélange	69,4	23	47,4	12,5	18,7	65

Ce tableau montre des valeurs semblables, seul les méthylophiles s'écartent de cette affirmation par le fait que le *Methylovulum* est très présent dans l'eau de mélange et plus rare dans l'eau de source.

Cette provenance peut venir de l'eau météorique ou d'une production de cette bactérie par le biofilm « submersed ».



Les bactéries autotrophes proviennent principalement de la source minérale, ceci dû au fait que cette source doit être relativement profonde.

Les bactéries aérobies sont plus faiblement représentées dans l'eau de source, ceci est dû à son origine souterraine.

Les méthylophiles sont eux plus abondants dans l'eau de mélange, ce sont les *Methylovulum* apportés par l'eau météorique, devant faire cette forte différence entre l'eau de source et l'eau de mélange.

Les bactéries telluriques, marines et d'eau douce sont relativement équivalentes dans l'eau de source et l'eau de mélange.

**« Une partie importante, des bactéries méthylophiles, a été apportée par l'eau météorique. Cette constatation nous fait dire qu'une l'activité méthylophile de la cavité a dû être postérieure à la formation de la grotte. Elle a dû s'amplifier avec la dégradation des végétaux marins et avec la formation des hydrocarbures. »**

### 8.1 Particularités bactériennes dans les biofilms « submersed »

- Les *Planctomycetes* sont déficitaires dans le biofilm « submersed » comparativement aux autres structures, ce déficit est sûrement dû au fait que les *Planctomyces* sont aérobies, ils utilisent la photosynthèse microbienne pour fixer le gaz carbonique atmosphérique. Le biofilm « submersed » étant en partie anoxique n'est donc pas le biotope normal. Il faut un milieu oxygéné en présence de lumière pour cette classe bactérienne, pouvant expliquer le faible taux observé dans ce biofilm.
- Les *Flavobacteriaceae* étant une flore, aérobie, aquatique, sont souvent présents dans les grottes froides et ont un caractère capnophile (tolérant la présence de CO<sub>2</sub>), correspondant à l'atmosphère de la grotte de Sulzbrunn. Les *Flavobacterium* se trouvent fréquemment dans le karst, sous forme de colonies jaune-vif, pouvant parfois recouvrir une surface non négligeable. Elles sont présentes dans les grottes froides, humides et dans les régions polaires. Mais le milieu anoxique du biofilm « submersed » a dû être un facteur limitant dans leur développement.
- Le *Methylovulum*, étant présent à 30 % dans l'eau de mélange et à 7 % dans le biofilm « submersed » doit provenir en grande partie :
  - D'un apport des eaux météoriques ;
  - D'un développement de 30 % dans l'eau de mélange (signifiant que le flux de l'eau de mélange est très faible et que l'activité métabolique de la bactérie est élevée) ;
  - Ou il provient d'un développement interne au biofilm « submersed », mais dans ce cas la concentration dans ce biofilm « submersed » devrait être plus importante.

Cette bactérie psychrotolérante, a dû être l'objet d'une sélection dans les molasses alpines, pendant 15 millions d'années jusqu'à nos jours. Nous pouvons signaler les **glaciations de Donau** (du Danube), phase de glaciation du début du Quaternaire entre -2,1 à -1,8 millions d'années dans les Alpes. Cette glaciation a été suivie par la **glaciation de Würm**, à la dernière période glaciaire globale du Pléistocène ayant commencé à - 100 000 ans pour finir à -10 000 ans dans les Alpes. De plus les Alpes ont de nombreux glaciers apportant de l'eau, par leurs fontes ils réaniment des bactéries pris dans les glaces lors de leurs formations.

Toutes ces glaciations ont pu jouer un rôle dans la présence de cette bactérie méthylophile dans cette cavité.

### 8.2 Caractéristiques de l'aérobiose dans les biofilms

La grotte de Sulzbrunn étant une grotte restée très longtemps fermée, l'écosystème aurait dû se déplacer vers l'anaérobiose. Mais ce n'est pas tout à fait le cas.

L'analyse des différentes caractéristiques bactériennes pour l'utilisation de l'oxygène présent dans la cavité devient un problème vital pour la flore existante.

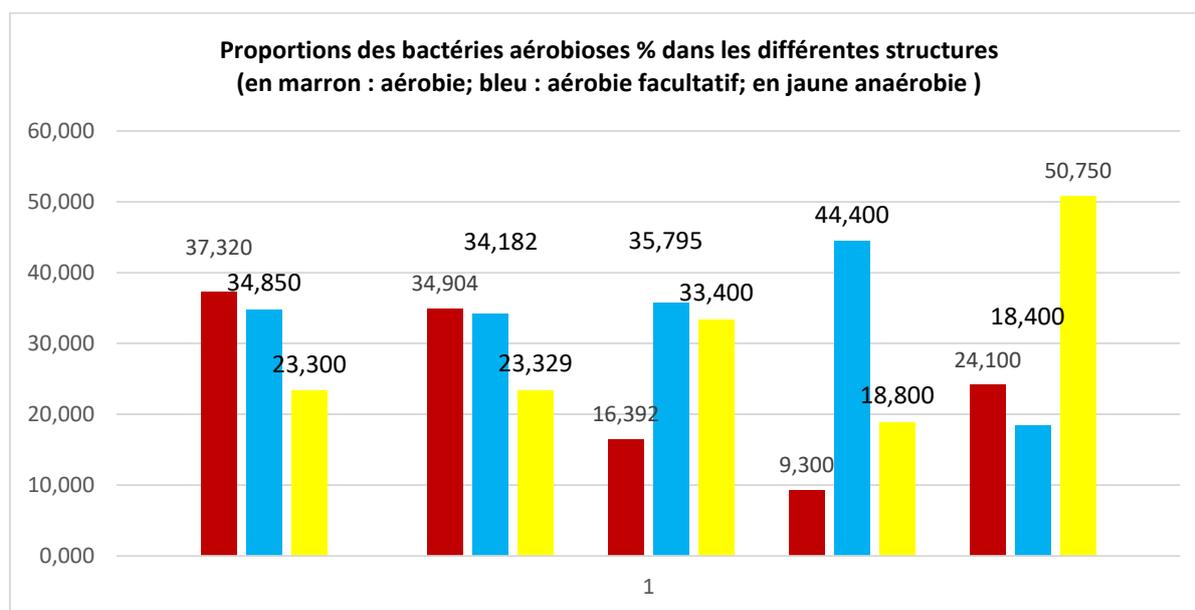
T

**Tableau du nombre % de bactéries en fonction de leur aérobiose dans la grotte**

Définition	Snottites	Biofilm « Subaerial »	Biofilms « Submersed »	Eau de source	Eau de mélange
<b>Aérobie</b> Diversité Nombre bactéries % Moyenne/diversité	21 37,32 ± 0,89 1,78	18 34,90 ± 1,19 1,94	16 16,39 ± 0,54 1,025	6 9,30 ± 0,91 1,55	10 24,10 ± 1,34 2,41
<b>Aérobie facultatif</b> Diversité Nombre bactéries % Moyenne/diversité	15 34,85 ± 1,39 2,32	13 34,18 ± 1,30 2,63	17 35,80 ± 1,92 2,11	14 44,40 ± 2,35 3,17	15 18,40 ± 0,99 1,23
<b>Anaérobie</b> Diversité Nombre bactéries % Moyenne/diversité	10 23,30 ± 1,12 2,33	10 23,33 ± 1,39 2,33	17 33,40 ± 1,24 1,97	8 18,80 ± 1,59 2,35	9 50,75 ± 5,16 5,164

Dans les snottites et les biofilms « subaerial » on trouve une majorité de bactéries aérobies. Dans les biofilms « submersed » cette quantité est en forte diminution ; malgré cela, on ne peut pas dire qu'il y ait une anoxie du biofilm.

L'eau de source apporte à la grotte une majorité de bactéries anaérobies.



L'équilibre entre aérobiose et anaérobiose peut être analysé par le rapport entre les bactéries anaérobies stricts /les bactéries aérobies stricts, cela afin de ne pas tenir compte de l'ambiguïté que représente les bactéries aérobies et anaérobies facultatives.

**Rapport entre les bactéries anaérobies stricts/ aérobies stricts**

Définition	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »	Eau de source	Eau de mélange
<b>Rapport Aérobie/anaérobies</b>	1,602	1,495	0,490	0,490	0,475

Cette forme d'analyse nous donne deux classes comprenant :

- Les snottites, les biofilms « subaerial » (dans les snottites : l'équilibre tend vers l'aérobiose comparativement aux biofilms « Subaerial », pouvant donner aux snottites une antériorité de ces structures). Les bactéries anaérobies des snottites et des biofilms « subaerial » sont sûrement d'origine plus ancienne. Bien qu'il existe une différence de diversité microbienne, entre les snottites et les biofilms « subaerial », l'équilibre anaérobies / aérobie strict est relativement semblable. Ce n'est donc pas la diversité des familles ou des genres, définissant l'équilibre, mais les caractéristiques bactériennes de chacune faisant cette diversité.
- Les biofilms « submersed », les eaux de sources, eaux de mélanges  
L'apport des bactéries anaérobies du biofilm « submersed » vient bien de l'eau de source, mais c'est dans l'eau de mélange où l'on trouve le plus de bactéries anaérobies. Il y a peut-être un développement plus important dans l'eau de mélange.

Ces résultats font ressortir que les biofilms « submersed » ne sont pas des biofilms totalement anoxiques et qu'ils contiennent une partie non négligeable de bactéries aérobie (soit 16 %). Cette teneur bactérienne est entretenue par le *Methylomirabilis oxifera* producteur d'oxygène pour les bactéries aérobie dans cette structure.

**« L'analyse de l'anaérobiose de la cavité, montre qu'il existe un équilibre relativement constant dans les différentes structures, soit aériennes, soit aquatiques. Que cet équilibre n'est pas régi par la diversité de genre, mais par les fonctions de cette diversité dans la composante de l'écosystème. »**

### 8.3 Contaminations atmosphériques des biofilms dans la grotte

Les *Gammaproteobacteria*, représentées par les *Pseudomonas* sont de :

- ≈ 8 % dans les snottites
- ≈ 5,9 % dans les biofilms « subaerial »
- ≈ 0,5 % dans les biofilms « submersed »
- ≈ 0,7 % dans l'eau de source avec une absence dans l'eau de mélange

L'observation d'une différence entre la contamination des snottites et des biofilms « subaerial » comparativement au biofilms « submersed » nous fait penser qu'il y a dû avoir une contamination atmosphérique par les *Pseudomonas* et les *Legionella* pour les snottites et les biofilms « subaerial » (ces bactéries sont souvent présentes dans les aérosols et les nébulisations).

Les *Pseudomonas*, ayant un comportement psychrotrophe, sont des germes connus pour leur possibilité d'être véhiculés par des voies atmosphériques :

Une étude faite sur les nuages par l'équipe de Bruce Moffett, université d'East London, a montré que la vapeur d'eau se condense ou se cristallise à la surface des aérosols ; des particules diverses s'agglomèrent parmi lesquelles figurent des micro-organismes et les molécules qu'ils synthétisent. L'efficacité de ces processus dépend des conditions aérologiques et des propriétés de ces aérosols. Il a été montré que des bactéries du genre *Pseudomonas* produisent des biosurfactants, sorte de détergent naturels diminuant la tension de surface des gouttelettes et accélèrent ainsi leur croissance, donc la survenue de la pluie. Dans ces gouttelettes une souche de *Pseudomonas syringae* a été isolée<sup>229</sup>.

Les *Legionellales* sont aussi connus pour leur contamination atmosphérique provoquant des maladies nosocomiales, ils se répartissent dans la grotte de la façon suivante :

- Les snottites ont 0,2 % du total de la flore
- Les biofilms « subaerial » ont 7,8 % du total de la flore
- Les biofilms « submersed » ont 1 % du total de la flore
- L'eau de source à 0,2 % du total de la flore
- L'eau de mélange à 1 % du total de la flore

Dans le cas des *Legionellales*, les snottites ont été moins contaminés que les biofilms « subaerial ».

La contamination atmosphérique existe dans la grotte, elle n'est pas répartie dans toutes les structures de la même façon. Elle doit avoir une origine plus récente.

**« La présence importante de *Pseudomonas* et de *Legionella* dans les snottites et les biofilms « subaerial », fait penser à une contamination aérienne en raison de leur présence dans ces structures et de leur absence dans les eaux et dans le biofilm « submersed ».**

#### **8.4 Formation des hydrocarbures dans la grotte de Sulzbrunn**

La présence de la famille des *Rhodocyclaceae* peut expliquer la formation d'hydrocarbure dans cette cavité. Toutefois il a été montré les hydrocarbures étaient souvent contaminés par des bactéries de l'embranchement de *Euryarchaeota* de la famille des *Methanococcaceae* dans le règne des *Archaea*, se rencontrant dans les sédiments marins et font partie de la flore intestinale humaine.

La recherche sur ce règne bactérien dans cette cavité pourrait nous fournir de plus amples informations sur ce sujet :

La dégradation des hydrocarbures par les *Campylobacter*, les *Arenibacter*, les *Flavobacterium* bactéries capables d'utiliser ces composés organiques, ayant pu se former aux cours de leurs nombreuses années dans cette cavité a permis de réduire leur développement (ce catabolisme des hydrocarbures va éviter les surproductions).

Les *Campylobacter* sont des germes souvent hôtes des oiseaux, ils ont dû être présents dès la formation de la grotte, car il n'a pas été mis en évidence un apport de ces bactéries par voie hydraulique.

**« Le milieu anoxique ayant subsisté pendant de nombreuses années a dû jouer un rôle sélectif dans la flore générale de la cavité. Cette sélection a dû être alimentée par la source d'origine profonde, en apportant de ce fait des bactéries anaérobies, des *Archaea*, étant produit le méthane et les hydrocarbures étant actuellement dans l'eau et l'atmosphère de cette grotte. »**

#### **Remarque :**

Une étude de la flore *Archaea* permettrait de mieux comprendre l'évolution de la formation des hydrocarbures et du méthane dans ce milieu naturel.

Toutes ces remarques montrent que la formation de snottites, de biofilms « subaerial » ou « submersed » joue un rôle protecteur pour les milieux bactériens étant leurs hôtes.

#### **8.5. Présence de bactéries typiques au parasitisme animal dans la grotte**

- La famille des *Chthoniobacteraceae* comporte des germes étant en symbiose dans le tube digestif des nématodes. Leur présence de cette famille bactérienne dans les snottites et les biofilms « subaerial » pourrait être une indication de la présence de ces nématodes dans la grotte.

Les *Xiphinema*<sup>ee</sup> sont les hôtes des ***Candidatus Xiphinematobacter phi***, la présence de ces derniers seraient une preuve dans l'entourage de némathelminthes.

- Les *Rickettsiales* sont représentées par les familles *Rickettsiaceae*, *Ehrlichieae*, *Holosporaceae* avec comme valeurs 2,4 % dans les snottites et 1,9 % dans les biofilms « subaerial » et 9 % dans les biofilms « submersed » de la flore totale de chacune des structures.

Ces bactéries vivent en endosymbiose (parasites intracellulaires) chez les arthropodes hématophages : comme les tiques, les poux, et les acariens et peuvent aussi infecter certains *Diptera* comme les mouches, les poux et les *Arachnides*, en provoquant la rickettsiose.

---

<sup>ee</sup> ***Xiphinema*** : genre de nématodes (les nématodes sont un embranchement de vers non segmentés, recouverts d'une épaisse cuticule et menant une vie libre ou parasitaire).

Ce comportement d'endosymbiose a étayé l'hypothèse que des membres de ce groupe seraient à l'origine des mitochondries. Il a été aussi spéculé sur le fait que les virus pourraient s'être développés à partir d'eux ou d'organismes apparentés. La présence de l'ordre des *Rickettsiales* dans la grotte de Sulzbrunn, laisse à penser qu'une faune parasite hématophage est présente dans cette cavité. Mais pour la subsistance de ces bactéries, il faudrait des animaux pouvant fournir les hématies étant leurs nourritures. La présence de cet ordre dans la grotte vient sûrement d'une contamination récente, datant de l'ouverture de la cavité.

La présence de *Legionella*, dans les biofilms « subaerial » et les snottites, étant des bactéries vivant en symbiose dans les amibes et certains protozoaires, peut être un indicateur de la présence de ces protistes dans cette cavité.

C'est toutes ces observations, faites sur des bactéries ayant pour hôtes des métazoaires, des protozoaires et protistes que les investigations faites sur cette cavité doivent faire l'objet d'analyses plus approfondies.

**« Le plus difficile à comprendre ? C'est comment une telle faune a-t-elle pu s'introduire dans cette cavité dont le biotope n'est pas adapté à ces parasites vivant en endosymbiose. »**

### 9.1 Fixation des biofilms

Pour qu'il y ait une fixation du biofilm à la roche on doit avoir un développement microbien intensif sur une petite surface, afin de faire un socle tenant le biofilm.

### 9.2 Adhérence des biofilms et des snottites

Les *Verrucomicrobia*, famille des *Hyphomicrobiaceae*, des *Rhodospirillaceae*, des *Caulobacteraceae*, sont des bactéries à prosthecae, elles ont la particularité de comporter une ou plusieurs adhérences appelées pédoncules (prostheccates). Ces pédoncules ont pu jouer un rôle initial dans la fixation des snottites et des biofilms à la roche. Elles doivent donc être des éléments ayant défini la formation des snottites et des biofilms.

Les *Pseudomonas* peuvent par des fonctions fimbriales monopolaires (Les **fimbriaes** sont des appendices protéiques, constituées de sous-unités une piline ou un pili, présent chez de nombreuses bactéries Gram-négatives) permettre une absorption sur les hématies. La fonction des pilis est l'adhésion à la surface des cellules eucaryotes. Ces bactéries à appendices sont souvent une condition essentielle de la virulence bactérienne.

### 9.3 Fixation de l'azote dans le biofilm

La présence des *Alphaproteobacteria* dans les snottites et les biofilms « subaerial » explique que la fixation de l'azote soit plus abondante dans ces deux dernières structures.

- Les *Saprosiraceae* contribuent à la dénitrification et la déphosphoration des eaux, des boues et des sols. Ces bactéries ont la capacité de cataboliser les bactéries mortes, ceci va permettre le recyclage des éléments pour les bactéries vivantes (réutilisation de l'énergie).
- Les *Sphingobacterium* vivent dans le sol, l'eau et sur les plantes, ils peuvent provenir des molasses alpines.
- Les *Rhizobiales* vivent en symbiose avec les plantes dans des nodules fixés aux racines des légumineuses et fournissent l'azote atmosphérique sous forme d'azote assimilable par la plante.
- Les *Hyphomicrobiaceae* comme l'*Hyphomicrobium* : est capable de dénitrification, il est chimio-organo-hétérotrophe avec une respiration aérobie.
- Les *Beijerinckiaceae* : Ce sont des bactéries aérobies fixatrices de l'azote atmosphérique, acido-résistantes. Elles sont les principales bactéries transformant le méthanol produit dans les sols des forêts à feuilles caduques.
- Les *Methylobacteriaceae* comme le *Methylobacterium extorquens* : il est impliqué dans la fixation de l'azote<sup>ff</sup> atmosphérique pour le développement des plantes légumineuses.
- ...

Ce sont toutes des bactéries vivant dans le sol et pouvant fixer l'azote atmosphérique sous forme assimilable par les plantes.

### 9.4 Constitution des biofilms

Les *Rhodocyclaceae* ont dû jouer un rôle important dans la formation des biofilms, car ils ont la propriété de fixer l'azote atmosphérique pour produire leurs propres protéines. Cette fixation peut dans certains cas utiliser la photosynthèse. Les *Rhodocyclaceae* sont photohétérotrophes et photoautotrophes (provenant sûrement de l'épi-karst), ils utilisent l'hydrogène formé par la fixation de l'azote pour subvenir à leurs besoins énergétiques.

<sup>ff</sup> Fixation de l'azote par intermédiaire de la Nitrogénase et par réduction de la ferrédoxine (Voir page 234)

Cette caractéristique peut être prise comme hypothèse dans la formation et la fixation de la matière azotée dans les biofilms de la grotte de Sulzbrunn. D'autant plus que cette famille est présente dans tous les biofilms de la grotte.

Cette famille peut être en association symbiotique avec les bryophytes (mousses) ou les ptéridophytes (fougères) : *Rhodocyclus gelatinosus* et *Rhodocyclus tenuis*. Information laissant supposer que les *Rhodocyclusaceae* ont dû provenir d'une contamination à l'origine de cette cavité.

## 9.5 Diffusion des bactéries entre le biofilm « submersed » et l'eau de mélange

Le fonctionnement de la diffusion, des bactéries au travers des biofilms, est un point important pour connaître les mécanismes de défense bactérienne que présentent ces structures.

Pour étudier la diffusion nous émettrons l'hypothèse que de l'eau de mélange entre dans les biofilms « submersed » (les bactéries sont venues de l'eau du mélange pour entrer dans le biofilm).

Théoriquement la diffusion peut se faire de deux façons :

- Soit par un **passage passif** où seules les lois de la physique répondent à cette diffusion (système des vases communicants).
- Soit par un **passage actif**, ce passage implique que les bactéries du biofilm aient le contrôle et de ce fait choisissent les bactéries entrantes dans la structure.

### Action pouvant faire varier l'équilibre entre l'eau de mélange et le biofilm.

- Soit une **croissance interne dans le biofilm** : cette croissance demande une énergie de production, cela implique qu'il y ait un turnover bactérien dans la structure afin d'entretenir l'activité vitale.
- Soit la **mortalité** interne au biofilm et à l'eau de mélange, pouvant changer l'équilibre et aussi servir d'apport énergétique pour bactéries hétérotrophes. Ex : La présence de la famille des *Saprospiraceae* sont des germes catabolisant les bactéries mortes pour donner des composants de base servant de nutriment pour les autres bactéries.

### Cas du passage passif

Dans le cas d'un passage passif, les bactéries de l'eau de mélange entrant dans le biofilm doivent pénétrer dans un rapport constant quelque-soit le genre ou l'espèce bactérienne. Les seules contraintes discriminantes sont les critères de forme (longueur, largeur, mobilité, morphologique).

S'il y a une différence importante de pénétration des bactéries dans le biofilm « submersed », on peut dire que le passage est actif.

### Taux de passage :

Pour définir ce passage on établit un taux de passage entre le nombre % de bactéries dans l'eau et le nombre de bactéries dans le biofilm « submersed ». Le taux de passage sera défini de la façon suivante :

**Taux de passage =** 
$$\frac{\text{Le nombre \% d'une souche (i) dans le biofilm}}{(\text{Nombre \% de souche (i) dans l'eau de mélange} + \text{Nombre \% de (i) dans le biofilm})}$$

**« Le taux de pénétration des bactéries dans le biofilm "submersed" est exprimé sur la somme des bactéries des deux structures (biofilm "submersed" et eau). Ce mode d'expression est utilisé par manque d'information pour compenser l'absence d'analyse dynamique de la population microbienne dans cette cavité. »**

## 9.6. Analyse du transfert bactérien de l'eau de mélange vers le biofilm « submersed »

### La pénétration passive

Dans le cas le transfert passif des bactéries entre l'eau de mélange et les biofilm « submersed », ce déplacement va se faire par les lois de la physique, c'est-à-dire par le principe des vases communicants.

- Il y a une relation entre la quantité de bactéries dans l'eau de mélange et la quantité de bactéries dans le biofilm « submersed ».
- Le passage entre les deux états est plus ou moins régulé par la difficulté de passer au travers des mailles de la paroi du biofilm (largeur de mailles, épaisseur de la membrane du biofilm, charges polaires du biofilm « potentiel zêta », forces hydrophiles,...). Des facteurs morphologiques seront plus ou moins restrictifs ; les éléments, comme la taille ou de forme des bactéries pouvant être incompatibles avec les mailles du biofilm (structure des membranes du biofilm).
- La saturation du biofilm peut être un facteur limitant (le biofilm étant une structure fermée il peut y avoir saturation).

### La pénétration active

Elle est régulée par les bactéries présentes dans le biofilm, de ce fait elle devient sélective. Il peut y avoir une destruction des bactéries étant considérées comme nuisibles ou comme inutiles à la biocœnose de l'écosystème interne au biofilm.

Cette sélection va être l'une des raisons principales de la formation du biofilm dans la recherche de l'isolement pour une défense contre les agressions extérieures.

Le passage actif dans le biofilm « submersed » va être :

- Il dépend de la compatibilité entre les bactéries internes au biofilm « submersed » et celles de l'eau de mélange.
- Il peut être limité par saturation interne au biofilm (occupation de l'espace disponible).
- Il peut être limité par l'incompatibilité au biotope pour la bactérie entrante (éventuellement mortalité interne dans le biofilm).
- Il peut être limité par manque de source énergétique : le développement microbien dans le biofilm « submersed » demande une source d'énergie. Toutes les bactéries entrantes vont être une consommation supplémentaire d'énergie (limitation de nutriment).
- Il peut y avoir aussi mortalité par la production d'antibactérien par les bactéries interne au biofilm contre les bactéries entrantes.

## 9.7 Analyse du taux de pénétration des bactéries dans le biofilm en fonction de la teneur bactérienne de l'eau de mélange.

### Relation microbienne entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed »

Dans le biofilm « submersed » les pourcentages de bactéries par famille ou genre sont les suivants :

- Biofilm « submersed » 2,44 %  $\pm$  0,89
- Eau de mélange 4,50 %  $\pm$  1,78

(L'intervalle de confiance est pris pour  $p = 0,975$ ).

### Diversité des familles ou des genres

- Biofilm « submersed », 38 familles ou genres
- Eau de mélange, 23 familles ou genres

Ceci montre que le biofilm « submersed » a une flore interne plus diversifiée comparativement à l'eau de mélange.

Les rapports, entre les intervalles de confiances sur la moyenne, sont :

- Biofilm = 0,365
- Eau de mélange = 0,396

Les flores entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed » sont relativement proches l'une de l'autre. Ceci doit être le fait que la majorité, des bactéries, est apportée par l'eau de mélange et que les paramètres du biotope de l'eau et du biofilm « submersed » sont très proches.

**« Ces différences significatives entre le % et le nombre de groupes de bactéries dans le biofilm « submersed » et l'eau de mélange nous informe, qu'il existe un d'équilibre bactérien entre intérieur du biofilm "submersed" et l'eau de mélange, tendant vers un passage actif (entre ces deux structures) ».**

#### **Corrélations entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed »**

Coefficient de corrélation entre le nombre % de bactéries du même genre dans l'eau de mélange et dans le biofilm « submersed »

- $R = + 0,322$  soit  $R^2 = 0,103$  on peut dire qu'il y a 10,3 % de bactéries étant liées entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed ».

(Test de validité du coefficient de corrélation linéaire :  $t = 2.040$ ,

=> significatif pour  $p = 0,975$ )

Cette corrélation est relativement faible, mais reste exploitable dans le cadre d'une analyse faite sur un écosystème. Elle montre que 10 % des bactéries du biofilm « submersed » sont en liaison avec 10% des bactéries de l'eau de mélange.

**« Le coefficient de corrélation montre que les bactéries dans le biofilm "submersed" et l'eau de mélange ont 10 % de leur flore étant liés. Cette constatation peut nous indiquer qu'au minimum 10 % de la population microbienne de l'eau de mélange a un transfert passif. »**

### **9.8. Graphique du taux de pénétration en fonction du pourcentage bactérien dans l'eau de mélange**

Afin de standardiser des valeurs (le nombre % de bactéries de l'eau de mélange et le nombre % de bactéries ayant pénétrées dans le biofilm « submersed ») il va être utilisé « l'écart réduit » (ECR) comme valeurs de comparaisons :

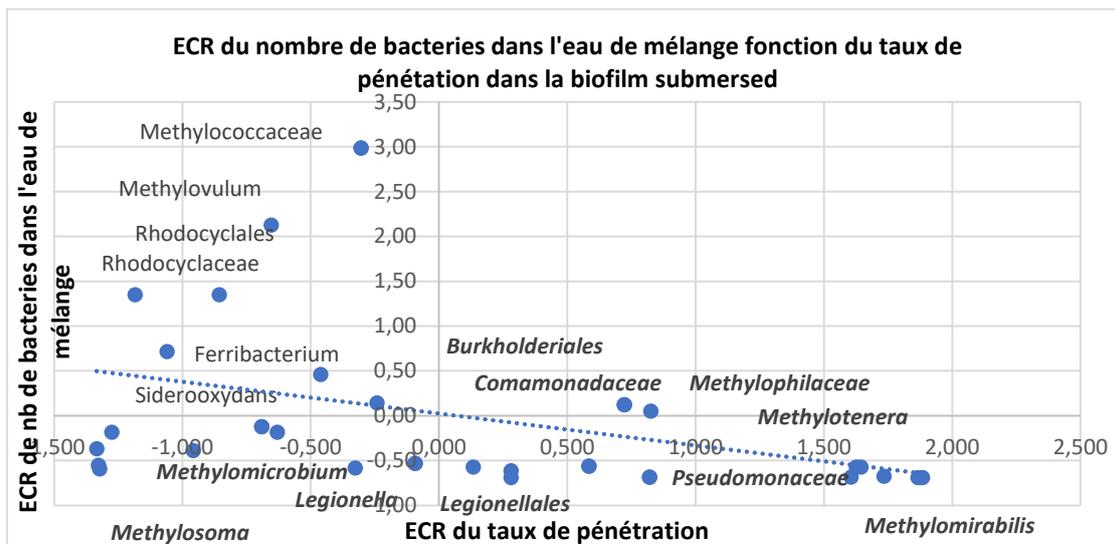
**L'écart réduit (ECR) :** il permet de recentrer les valeurs en gardant leurs importances de variations et de mieux pouvoir comparer les résultats de valeurs hétérogènes en alignant les valeurs.

**L'écart réduit de (i) =  $\frac{\text{Valeur \% des bactéries de (i)} - (\text{moyenne \% globale des mêmes bactéries (i)})}{(\text{Écart type global de la moyenne bactérienne (i)})}$**

Dans le cas de ECR nous sommes dans un système centré, ceci veut dire que la valeur nulle n'est pas égale à 0, elle est égale à la moyenne des valeurs.

La représentation graphique de cette répartition entre l'écart réduit du nombre % de bactéries (du genre ou famille bactérienne) dans l'eau de mélange et de l'écart réduit (du mêmes genres ou familles bactérienne) pour leur taux de passage dans le biofilm, nous donne le graphique suivant :

## Graphique des pourcentages de bactéries de l'eau de mélange en fonction du pénétration en ECR



Ce graphique fait ressortir des populations de points (bactéries ou familles) formant deux droites presque perpendiculaires :

- La partie « I » représente les valeurs de ECR taux de pénétration pour  $(x) < 0$  ( $x$  : taux ECR de pénétration) et de l'eau de mélange  $(y) > 0$  ( $y$  : ECR de l'eau de mélange). Valeurs dites résiduelles comparativement à la droite de régression de l'ensemble bactérien (droite en ...). Elles sont fortement présentes dans l'eau de mélange et peu de pénétration dans le biofilm « submersed », mais l'augmentation de la concentration dans l'eau de mélange donne une augmentation du taux de pénétration dans le biofilm. Elles peuvent être considérées comme des bactéries à passage passif sélectif (par les difficultés de pénétration dues à la morphologie bactérienne).
- Dans la partie « II » des  $(x) > 0$  et des  $(y) > 0$ . Le nombre % de bactéries de l'eau de mélange est fort avec un nombre % de bactéries dans le biofilm « submersed » fort. La variation des  $(y)$  impliquant la variation des  $(x)$ . On peut donc penser à un passage passif sans trop de difficulté de passage ou à un développement bactérien dans l'eau de mélange.
- Dans la partie « III » des  $(x) > 0$  et des  $(y) < 0$ , on a le nombre % de bactéries dans l'eau de mélange étant plus faible que le nombre % de bactéries dans le biofilm « submersed ». Dans ce cas il y a une rétention dans le biofilm : soit due au développement interne, soit due à une sélection à l'entrée dans le biofilm par les bactéries du biofilm. Il est à remarquer que la valeur  $(y)$  a peu d'influence sur la valeur de  $(x)$  dans cette partie, on peut donc supposer un passage actif.
- Dans la partie « IV » des  $(x) < 0$  et des  $(y) < 0$  nous avons les bactéries peu abondantes dans l'eau et peu abondantes dans le biofilm « submersed » avec une faible variation des valeurs de  $(y)$  n'étant pas fonction des valeurs de  $(x)$ . On peut mettre cette catégorie de bactérie dans un passage actif ou un passage passif faible avec insuffisance de concentration bactérienne dans l'eau de mélange.

## 9.9 Répartitions des groupes bactériens en fonction de leur taux de pénétration dans le biofilm

Moyenne des taux de pénétration des bactéries du biofilm par famille ou genre en valeurs de pourcentage :

Taux de pénétration moyen =  $0,451 \pm 0,095$  moyenne par famille ou genre (I C pour  $p = 0,975$ ).

### Coefficient de corrélation en valeurs de pourcentage

La corrélation entre le taux de pénétration et le nombre % de bactérie dans l'eau de mélange est :

- $R = -0,361$  avec une valeur de  $R^2 = 0,130$  soit 13 % des valeurs étant liées  
(Tests du modèle linéaire de validité du coefficient de corrélation :  $t = 2,21$ ,  
=> significatif pour  $p > 0,975$ )

### **Même analyse de l'ECR de l'eau de mélange et l'ECR du taux de pénétration dans le biofilm « submersed »**

Coefficient de corrélation entre l'ECR du taux de pénétration fonction de l'ECR du nombre % de bactéries dans l'eau de mélange :

- $R = -0,367$  soit  $R^2 = 0,134$  soit 13,4 % de lien ( $t = 2,49$  =>  $p = 0,995$ )

Ce résultat nous montre un coefficient négatif signifiant, que lorsque le taux de bactéries dans l'eau de mélange augmente le taux de pénétration dans le biofilm « submersed » diminue. Ceci signifie que l'on peut supposer un passage actif dans le biofilm « submersed ».

### **Valeur de la droite de régression en ECR de l'ensemble des populations**

La droite de régression globale est inscrite dans le graphique par une droite en forme de (- - -).

La valeur angulaire de la droite de régression ( $y = a_g * x + b_g$ ) a pour valeur ( $a_g = -0,361$ ) et cette droite passe par le point de jonction entre les axes (x) et (y), dont sa valeur de ( $b_g = 0$ ) valeur correspondant aux valeurs des moyennes de l'eau de mélange et du coefficient de pénétration.

- Taux de pénétration théorique en ECR =  $-0,361 * (\text{eau de mélange en ECR}) + 0$

Donc la droite passe par l'origine  $b_g = 0$

Pénétration théorique en ECR tenant compte des écarts de valeurs obtenues

- Taux de pénétration théorique en ECR =  $-0,361 * (\text{eau de mélange en ECR}) \pm 0,32$   
(Pour une valeur de  $p = 0,975$ ).

La valeur de l'intervalle de confiance d'un taux de pénétration de  $\pm 0,32$  signifie que beaucoup de points ne sont pas alignés avec la droite de régressions.

Ce graphique fait ressortir des valeurs alignées sur la courbe de régression et des points étant en dehors de cette droite, points étant appelés « valeurs résiduelles ».

## **9.10 Analyse des valeurs résiduelles de la droite de régression, entre l'eau de mélange et le biofilm**

Dans l'ensemble de points donnés dans le graphique, il est à remarquer qu'une droite peut être établie entre les points des bactéries suivantes :

- *Methylococcaceae*
- *Methylovulum*
- *Rhodocyclaceae*
- *Rhodocyclales*
- *Ferribacterium*
- *Siderooxydans* (il fait partie de l'ensemble général peut être aussi de passage actif ?)

Ces points forment une droite résiduelle de l'ECR de l'eau résiduelle en fonction de l'ECR du taux de pénétration dans le biofilm submersed.

**« Dans l'analyse graphique résiduelle, il ressort un alignement de point se différenciant de l'ensemble de la droite de régression globale. Cette observation peut avoir une signification sur la nature biologique ou morphologique bactérienne. »**

### **Coefficient de corrélation des valeurs résiduelles**

Le coefficient de corrélation de cette droite partielle entre la partie négative de l'ECR du taux de pénétration et la partie positive en ECR du nombre % de bactéries dans l'eau de mélange :

- $R = 0,922$  avec test  $t = 10,6$  avec  $p = 0,99$

$R^2 = 0,85$  soit un lien de 85 % pour une corrélation positive c'est-à-dire que l'augmentation des bactéries dans l'eau de mélange entraîne une augmentation dans le biofilm « submersed » (passage passif).

#### Droite de régression des valeurs résiduelles

ECR du taux de pénétration =  $a_r \cdot (\text{ECR de l'eau de mélange}) + b_r$

- **ECR du taux** =  $0.289 \cdot (\text{ECR de l'eau de mélange}) - 1,281$

ECR du taux avec Intervalle de confiance =  $0.289 \cdot (\text{ECR eau de mélange}) - 1,281 \pm 0,645$

La valeur  $b_r = -1,281$  correspond à la valeur de la pénétration en ECR lorsque l'eau de mélange est à sa valeur moyenne en bactéries.

Des deux corrélations entre l'analyse globale et l'analyse résiduelle, les valeurs  $a_g \cdot a_r + b_g \cdot b_r = 0.104$  montrent que ces deux droites ne sont pas perpendiculaires.

- **ECR de l'eau de mélange** =  $3.018 \cdot (\text{ECR taux de pénétration}) + 4.01413$

$a_e = 3.018$

$b_e = 4.014$

Lorsque le taux de pénétration ECR est nul (donc à sa valeur moyenne) => on obtient : 46 % de la flore résiduelle, ayant dû passer dans le biofilm par passage passif au lieu de 50 % (ECR est une valeur centrée), soit 4 % des germes de l'eau de mélange ne peuvent pas passer si le taux est trop bas.

Ces 4 centièmes de la flore observés, représentent, en nombre de bactéries pour 1 gramme d'eau, une population bactérienne minimum pour avoir un passage passif dans le biofilm de :

Le nombre de bactérie minimum pour un passage passif =  $6 \cdot 10^4$  bactéries par ml.

Cela signifie que dans le passage passif, il existe un équilibre du système, entre la teneur en bactéries de l'eau de mélange et la teneur en bactéries dans le biofilm « submersed », soit une relation entre les bactéries entrantes et les bactéries de l'eau de mélange.

**« Il n'y a un passage passif dans la biofilm "submersed" que si le taux de bactéries de l'eau de mélange est suffisant. »**

### 9.11 Valeurs résiduelles et le passage passif, entre l'eau de mélange et le biofilm

Ces valeurs résiduelles ont une importance principale, car elles peuvent apporter des informations particulières sur les bactéries et les raisons de leur position dans ce graphique.

**Valeurs en pourcentage des bactéries résiduelles**

Description	Biofilms « submersed »	Eau de mélange Pourcentages valeurs résiduelles	Taux de pénétration
<i>Methylococcaceae</i>	9.5 %	8.4 %	0.319
<i>Methylovulum</i>	4,8 %	27.6 %	0.211
<i>Rhodocyclaceae</i>	1,0 %	20,0 %	0.048
<i>Ferribacterium</i>	1,3 %	13.6%	0.084
<i>Siderooxydans</i>	0.1 %	5,0 %	0.019
<i>Total</i>	16.7	74.6	0.68
<i>Moyenne</i>	$3.34 \pm 3.98$	$14.92 \pm 9.33$	$0.136 \pm 0.128$

On observe une différence significative entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed » dans cette partie résiduelle du graphique. Cette différence est due principalement à la présence dans l'eau de mélange des *Methylovulum*, des *Rhodocyclaceae*, et des *Ferribacterium*. Si les *Rhodocyclaceae* et les *Ferribacterium* peuvent s'expliquer par le faible taux de pénétration, pour le *Methylovulum* le taux de pénétration semble proche de la moyenne générale.

**Le coefficient de corrélation** entre l'eau de mélange et le taux de pénétration est :

$R = 0.785$  soit  $R^2 = 0.616$ , il y a donc 61.6 % de lien pouvant être considéré comme un passage passif.

Sur le total de la flore de l'eau de mélange, cette sélection bactérienne représente 42 % des bactéries de l'eau de mélange.

**« Si 61.6 % de l'eau de mélange de ces bactéries ont eu un passage passif ramenant le taux de passage passif à la valeur de 45.9 % des bactéries de l'eau de mélange ayant pu utiliser un passage passif pour pénétrer dans le biofilm "submersed". »**

## 9.12 Caractéristiques des valeurs résiduelles du graphique

Pour définir les raisons de ce comportement du passage de l'eau de mélange au biofilm « submersed », il faut analyser les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'ensemble des bactéries formant ces valeurs résiduelles.

**Index des bactéries enregistrées dans le graphique.**

- *Methylococcaceae*
- *Methylovulum*
- *Rhodocyclusaceae*
- *Ferribacterium*
- *Sideroxydans*

**Caractéristiques des bactéries résiduelles ayant été retenues**

Références des bactéries					
Caractéristiques	1	2	3	4	5
<b>Flagelles</b>	Sans flagelle	Sans flagelle	Monotriche ou sans flagelle	Sans flagelle	Monotriche Filamenteux
<b>Morphologie</b>	Coques	Coques	Incurvé ou coques ou spiralé	Coque	Coque en forme de rien
<b>Dimensions</b>	L 1 à 2 µm 1 à 2 µm	L 1 à 2 µm 1 à 2 µm	L 3 à 5 µm 0.4 à 0.6 µm	L 3 à 5 µm	L 6 µm 0.65
<b>Métabolisme</b>	Méthanotrophe	Méthanotrophe	Photo-hétérotrophe	Autotrophe Mixotrophe	Autotrophe Pouvant être Hétérotrophe Ou mixotrophe
<b>Source d'énergie</b>	Méthane	Méthane	Molécules d'hydrogène	Ammonium Nitrates Hydrogène	Fer (II) Hydrogène Réduction des Sulfures
<b>Source de carbone</b>	Méthane méthanol les amines méthylées Fixe le CO <sub>2</sub>	Méthane méthanol les amines méthylées Fixe le CO <sub>2</sub>	Graisses	Graisses	Sucres cycle de Krebs et les intermédiaires aromatiques
<b>Accepteur d'électron</b>	Nd	Nd	Oxygène fermentation	Oxygène Nitrates	Oxygène et nitrates
<b>Oxydase</b>	Nd	Nd	(-)	(+)	+
<b>Catalase</b>	Nd	Nd	(-)	(+)	-
<b>Quinones Respiratoires</b>	Nd	Nd	UQ-8 ; MK-8	UQ-8	Nd
<b>Marine</b>	(±)	(-)	(±)	(+)	(-)
<b>Aérobiose</b>	(±) anaérobie	Anaérobie	Anaérobie	Anaérobie	Anaérobiose

Ce tableau fait ressortir que les points communs aux bactéries composant ce résidu sont :

- Le caractère anaérobie dans 5 cas
- La morphologie en forme de coques dans 5 cas

- Il y a une tendance à l'augmentation de la pénétration avec la diminution du diamètre bactérien (à vérifier).

« Les valeurs résiduelles ayant été retenues sont des bactéries avec une morphologie en forme de coques et une caractéristique anaérobie qui de ce fait se différencient de l'ensemble de l'écosystème. Elles ont un comportement permettant de penser que leur pénétration dans le biofilm "submersed" est de la forme passive. »

### 9.13 Autres comportements dans le transfert bactérien entre biofilm « submersed » et eau de mélange

Dans les valeurs résiduelles se trouvant dans la partie positive (partie II ;  $x > 0$  et  $y > 0$ ) du graphique entre les ECR de l'eau de mélange et les ECR du biofilm « submersed » : on trouve les *Methylophilaceae* (9.90 % dans le biofilm et 3.21 % dans l'eau de mélange). Le taux de pénétration est de 0,755.

#### Caractéristiques des *Methylophilaceae*

Sans flagelle ; petits bâtonnets ou coques ; métabolisme : méthylotrophe facultatif ; oxydase ( $\pm$ ) ; catalase (+) ; source de carbone : C1 et sucres ; accepteur d'électron : oxygène ; respiration UQ-8 ; Cette bactérie a un taux de pénétration allant dans le même sens que la variation des bactéries dans l'eau de mélange.

Cette famille comprend un genre, dans cette étude :

- *Methylophilaceae* pour seul genre le *Methylotenera* :
  - À 3.2 % dans l'eau de mélange.
  - À 9 % dans le biofilm « submersed »

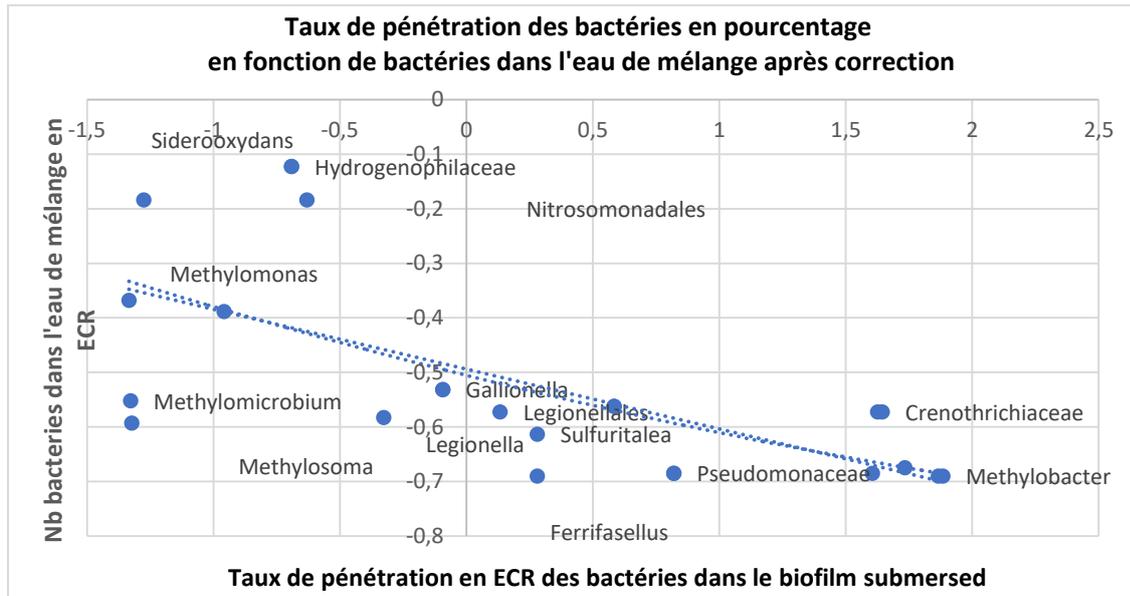
Sur le plan morphologique ces deux groupes de bactéries sont :

Noms	<i>Methylotenera</i>	<i>Methylophilaceae</i>
Flagelles	Mono-flagelle	Sans flagelles ou mono-flagelle
Morphologie	Petits bâtonnets proches des coques	Petits bâtonnets proches des coques
Métabolisme	méthylotrophe	Facultatif méthylotrophe
Oxydase		
Catalase	+	+
Source de carbone	C1 et méthylamine	C1 et sucres avec leurs complexes
Accepteur d'électrons	Oxygène	Oxygène
Respiration	UQ_8	UQ_8

Ces caractéristiques morphologiques sont proches de la flore en forme de bâtonnets ou de coques comme observée précédemment. Cette famille peut être considérée comme ayant un **passage actif** par la présence importante dans le biofilm « submersed » et beaucoup plus faible dans l'eau de mélange. Il peut y avoir un passage actif ou un passage passif avec développement important dans le biofilm « submersed ».

Ce passage actif représente 3 % de l'eau de mélange.

## 9.14 Correction graphique des valeurs résiduelles dans la droite de régression



### Analyse après correction

Lorsque l'on retire la partie résiduelle que l'on a étudiée plus haut le coefficient de corrélation de ECR du taux de pénétration fonction ECR de l'eau de mélange donne :

- $R = -0,23$  avec  $R^2 = 0.053$  soit un lien de **5.3 %** ( $t = 1,23$  soit non significatif)

**« Ce coefficient de corrélation montre, qu'il y a peu de lien entre la variation de l'eau de mélange et le taux de pénétration, ceci confirme que ces points sont sûrement des passages actifs. »**

La droite de régression corrigée :

$$\text{ECR du taux} = -0.338 * (\text{ECR de l'eau de mélange}) + 0.166$$

$$\text{ECR de l'eau de mélange} = -0.169 (\text{ECR Taux de pénétration}) - 0.243$$

- $a_g * a_r + b_g * b_r = -0.310$  (cette droite n'est pas perpendiculaire aux valeurs résiduelles)

**« Cette droite de régression est négative, elle montre une tendance à l'augmentation de la pénétration, lorsque la teneur des bactéries de l'eau de mélange diminue. »**

**Dans cette partie du graphique la variation en bactéries de l'eau de mélange est faible, alors que la variation du taux de pénétration varie fortement d'une famille à l'autre. Cela nous permet de supposer qu'il y a un passage actif entre l'eau de mélange et le biofilm "submersed". »**

### Biais à cette analyse :

- Une croissance interne au biofilm « submersed » (valeur faible pour l'eau et forte pour le biofilm).
- Mortalité à l'intérieur du biofilm ou dans l'eau de mélange.
- Teneur des bactéries trop faible dans l'eau de mélange pour pénétrer dans le biofilm.

On observe que lorsque l'eau de mélange contient beaucoup de bactéries, le taux de pénétration ne suit pas toujours cette augmentation.

## 9.15 Bactéries sédentaires dans le biofilm « submersed »

Les bactéries présentes dans le biofilm « submersed » et étant absentes dans l'eau de mélange :

- *Alphaproteobacteria* 14,5 %
- *Bacteroidetes* 1,2 %
- *Planctomycetes* 7,2 %
- *Methylomirabilis* 4,7 %

- *Methylobacter* 10,5 %

Ces bactéries représentent **38,1 %** de la flore du biofilm « submersed », elles ont un développement dans le biofilm sans sortir de cette structure. Leur présence a dû être mise en place à l'origine du biofilm « submersed ». Elles sont donc considérées comme **un passage actif**.

## **9.16 Bactéries de l'eau de mélange ne pénétrant pas dans le biofilm « submersed »**

Du côté de l'eau de mélange, il y a des bactéries présentes n'étant pas dans le biofilm « submersed » :

- *Methylomicrobium* 1,6 %
- *Methylomonas* 3,5 %
- *Methylosoma* 1 %

Cette flore représente 6,1 % de l'eau de mélange. Cette sélection à l'entrée du biofilm pour éviter leur présence à l'intérieur du biofilm, est **une forme de passage actif**.

**« Le passage passif, entraîne une équivalence entre la flore de l'eau de mélange et le biofilm "submersed". Ce passage se fait sur les principes de la physique (principe de vases communicants). Cette forme de pénétration dans le biofilm "submersed" est estimée aux environs de 45 % de la flore de l'eau de mélange.**

**La forme en coque des bactéries et anaérobiose semble être des critères favorisant le passage passif.**

**Pour qu'il y ait un tel passage dans le biofilm l'eau de mélange doit avoir une flore suffisamment chargée, l'estimation de cette charge microbienne est évaluée  $10^4$  bactéries par ml.**

**Dans le cas du passage actif, on peut l'estimer ce type de transfert sur le complément du passage passif (toutefois il y aura une source d'erreur due au développement interne des bactéries dans le biofilm).**

**On peut donc apprécier pour une valeur d'environ 55 % de la flore de l'eau de mélange ayant subi un passage actif par déduction.**

**Dans ces 55 % nous avons :**

- **Bactéries restant dans le biofilm submersed sans en sortir  $\approx$  38 %**
- **Les bactéries présentes dans l'eau de mélange et absentes dans le biofilm "submersed" représentent  $\approx$  6 %**
- **Les bactéries de la famille des Methylophilaceae représentant 3% de l'eau de mélange.**

**Soit un total d'environ  $\approx$  47 % de passage actif de l'eau de mélange vers le biofilm « submersed ».**

**Sur les 55 % il resterait  $\approx$  8 % pouvant être dû :**

- **Soit au développement de la flore dans le biofilm "submersed" ou l'eau de mélange faisant la différence ;**
- **Soit la mortalité dans le biofilm « submersed" ou l'eau de mélange pouvant aussi être un facteur de biais. »**

**L'absence d'analyse dynamique de la flore des biofilms "submersed", ne nous permet pas de pouvoir affirmer en toute sécurité les valeurs analysées, mais elles restent quand même une base d'estimation. »**

**Remarque :**

*Il a été fait une analyse statique, pour définir un état dynamique. Cette étude n'a donc pas l'ambition de faire une analyse quantitative, mais une analyse qualitative.*

*Le passage actif doit faire l'objet d'autre recherche plus approfondie pour le quantifier.*

### 9.17 Morphologique bactérienne en fonction du taux de pénétration dans le biofilm

Dans le **passage passif**, l'entrée des bactéries dans le biofilm « submersed » va être conditionnée par les caractéristiques morphologiques et bio topiques des bactéries entrantes dans le biofilm.

**Caractères analysés des bactéries entrantes dans le biofilm submersed :**

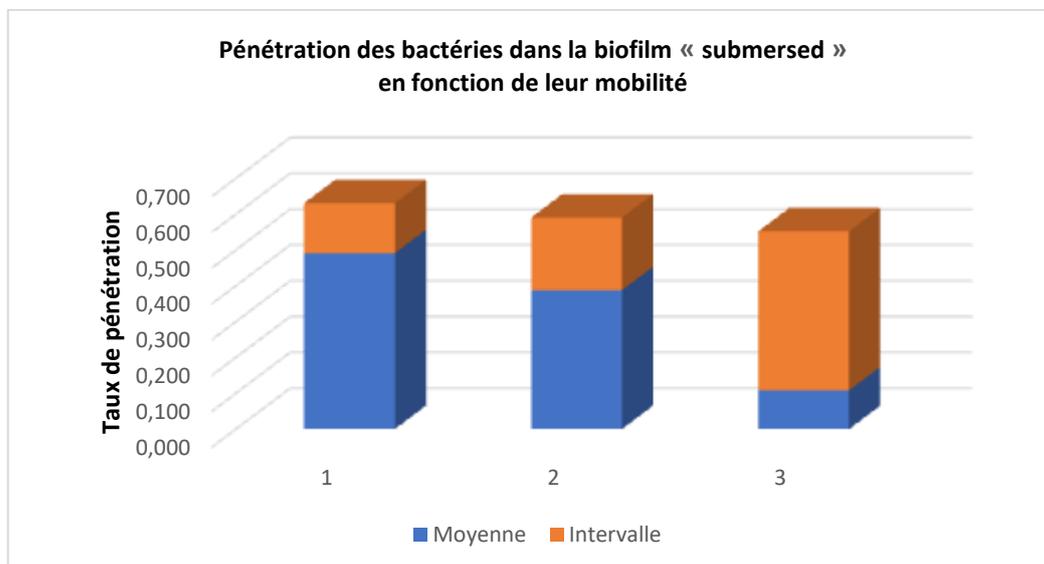
- Mobilité
- Aérobiose
- Caractère marin (halophile)
- Caractéristiques de la taille bactérienne (longueur et largeur).

### 9.18 Taux de pénétration dans le biofilm en fonction de la mobilité bactérienne

La mobilité des bactéries peut être un facteur de passage des bactéries entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed ». Pour analyser ce paramètre sans valeur numérique, il a été pratiqué une classification en trois points.

- 1 pour les bactéries mobiles ;
- 2 pour les bactéries plus ou moins mobiles ;
- 3 pour les bactéries immobiles.

**Graphique du taux de pénétration en fonction de la mobilité théorique**



Le graphique du taux de pénétration en fonction de la mobilité bactérienne est le suivant :

Les valeurs du taux de pénétration par classe analysées sont calculées sur la base :

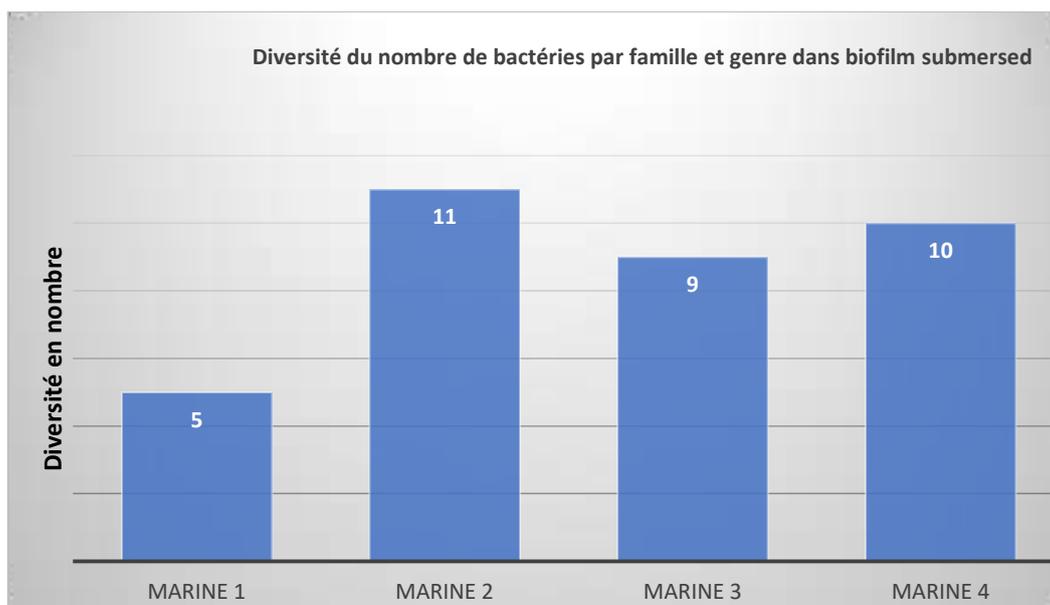
Moyenne partielle = (somme des bactéries à la classe (n) / Nombre de bactéries à la classe (n))

Moyenne du taux de pénétration pour la classe 1 =  $0,491 \pm 0,139$

Moyenne du taux de pénétration pour la classe 2 =  $0,384 \pm 0,203$

Moyenne du taux de pénétration pour la classe 3 =  $0,108 \pm 0,444$

## Diversité dans les classes bactériennes entrantes dans le biofilm submersed



### Test d'égalité des moyennes de Student (sur ces résultats)

Entre la classe 1 et la classe 2  $t = 0.93$  ( $p = 0.85$  non significatif)

Entre la classe 1 et la classe 3  $t = 3.11$  Significatif pour  $p = 0,99$

Entre la classe 2 et la classe 3  $t = 2,00$  Significatif pour  $p = 0.975$

Ce graphique montre que dans le cas d'un passage passif les bactéries mobiles sont plus aptes à entrer dans le biofilm « submersed ».

Le coefficient de corrélation linéaire (coefficient de corrélation biserial de point) pour les valeurs par groupe obtenue par ce classement est :

- $R = -0.226$  soit un lien de  $R^2 =$  soit **5,1 % de liaison** entre la mobilité et la pénétration. ( $t = 1,298$  soit  $p = 0,90$ )

Plus le classement du groupe est faible et plus le taux de pénétration est fort (cf. graphique).

Mais cette valeur de corrélation est très basse pour être prise sans vérification supplémentaire.

### Analyse de variance de SNEDECOR : Comparaison de la mobilité bactérienne et son taux de pénétration dans le biofilm « submersed »

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
<b>Entre population</b> (facteur contrôlé)	$p - 3$ classes = 2	SCE a = 3,288	CM a = 1,94	Fob = 21,31
<b>Entre les observations</b> dans les populations (erreur résiduelle)	n = 35 n. - p = 33	SCE r = 2,998	CMr = 0,091	
<b>Totaux</b>	<b>35</b>	<b>SCEt = 3,064</b>		

Le test d'analyse de variance d'après la valeur  $F_{ob}$  permet le rejet de l'hypothèse nulle avec une probabilité de  $p > 0.99$  %

On peut confirmer que la mobilité bactérienne joue un rôle le transfert entre le biofilm « submersed » et l'eau de mélange, mais que cette activité ne concerne que 8 % des souches examinées.

**« Ce sont les bactéries les plus mobiles qui semblent pénétrer le mieux en passage passif dans le biofilm "submersed". »**

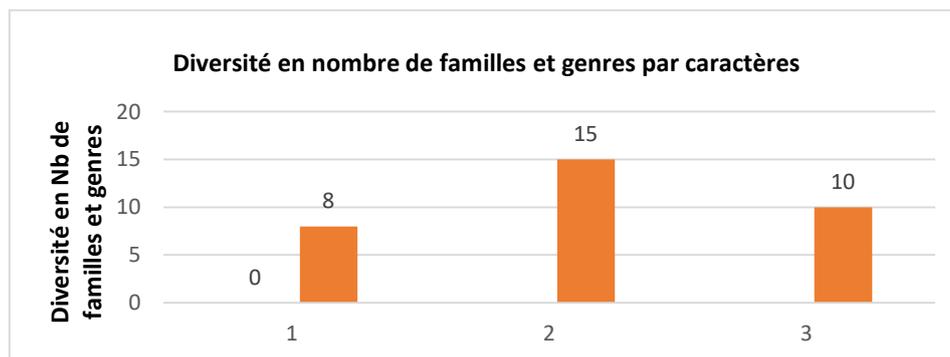
## 9.19 Influence de l'aérobiose sur la pénétration des bactéries dans le biofilm « submersed »

L'aérobiose est un facteur limitant pour les bactéries soit dans le sens de la disette (pour les aérobies), soit de la pléthore (pour les anaérobies).

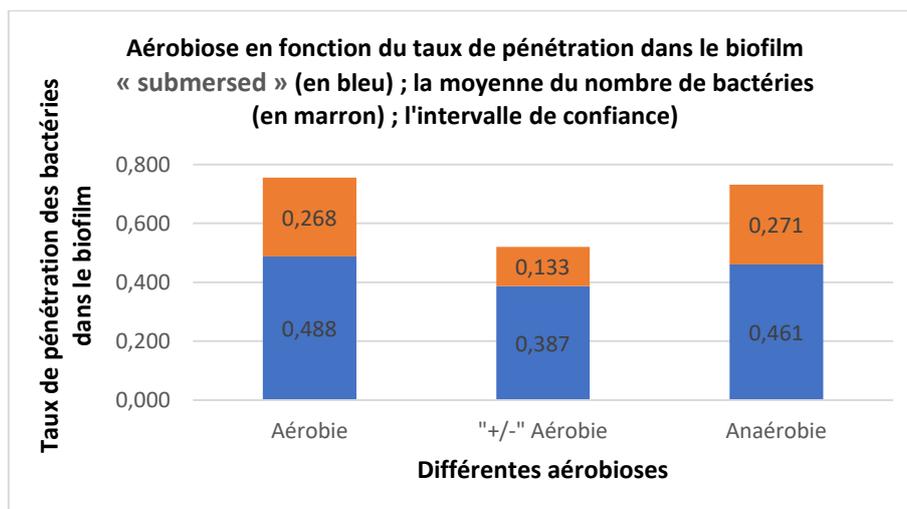
Il est donc important de pouvoir mesurer l'impact de ce caractère dans le transfert bactérien entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed ».

Valeurs moyenne du taux de pénétration des différentes caractéristiques bactériennes

Définition	Aérobies stricts	Aérobies facultatifs	Anaérobies stricts
Moyenne	0,483 ± 0,268	0,387 ± 0,133	0,461 ± 0,271



Valeur du taux de pénétration en fonction de l'aérobiose

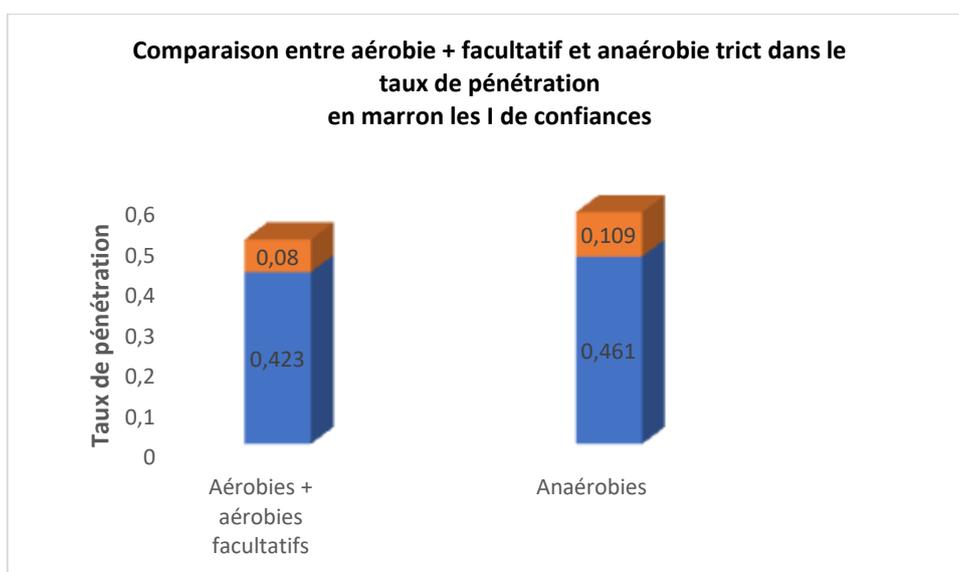


Les anaérobies facultatifs posent un problème de détermination, car ils peuvent être aérobies ou anaérobies

Ceci impliquant la combinaison comparative des taux de pénétration suivants :

- Aérobies + aérobies facultatifs comparativement aux bactéries anaérobies

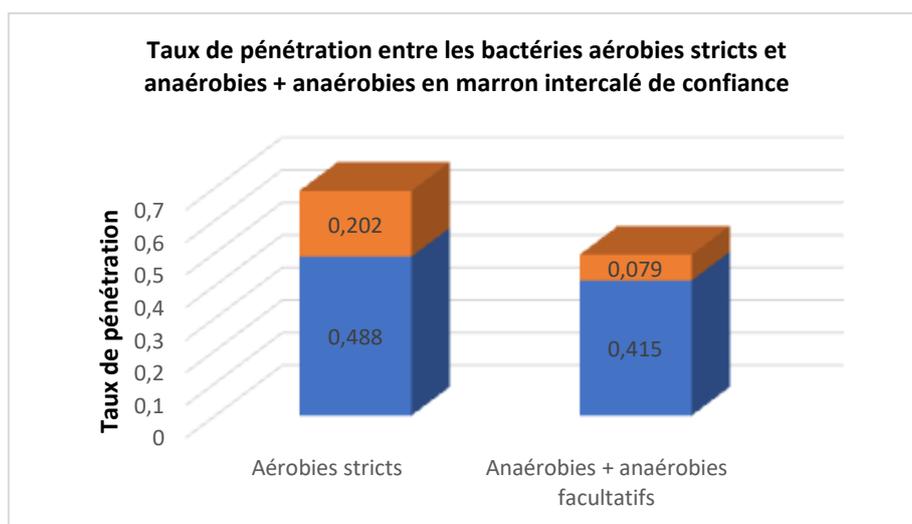
Définition	Aérobies + aérobies facultatifs	Anaérobies
Moyenne + I.C.	0,423 ± 0,080	0,461 ± 0,109



Il y a une différence entre les taux de pénétration des deux groupes de 0,038. Valeur non-significative.

- Anaérobies + anaérobies facultatifs : La même analyse faite en inversant les classes.

Définition	Aérobies stricts	Anaérobies + anaérobies facultatifs
Moyenne + I. C.	0,488 ±0,202	0,415 ± 0,079



Il y a une différence entre les taux de pénétration dans les deux groupes de 0.072, valeur non-significative.

Quelque-soit le système de calcul : il n'a pas été possible de mettre en évidence le caractère aérobie ou anaérobie sur la pénétration des bactéries dans le biofilm « submersed ».

**Analyse des coefficients de corrélation biserial entre aérobose et le taux de pénétration.**

Aérobies + Aérobies facultatifs R = - 0,027 (non significatif)

Anaérobies + Anaérobies facultatifs R = - 0,017 (non significatif)

Résultats non-significatifs et non interprétables.

**Analyse de la diversité entre biofilm « submersed » et l'eau de mélange.**

La diversité entre le biofilm « submersed » et l'eau de mélange peut-être un caractère de différenciation de ces deux écosystèmes.

Bien que la flore de l'eau de mélange ne soit pas totalement comparable en diversité bactérienne à celle du biofilm « submersed », il n'a pas été possible de faire une différence entre ces écosystèmes dans les classes d'aérobioses.

**« Le taux de pénétration des bactéries dans le biofilm "submersed" n'est pas influencé par le caractère de l'aérobiose.**

**On peut dire que le biofilm "submersed" ne peut pas être considéré comme biofilm strictement anoxique. »**

## 9.20 Analyse du caractère « bactérie marine » dans la diffusion dans le biofilm

Le comportement marin est important vu que l'eau de source est légèrement saumâtre. Il est intéressant de savoir si au niveau du biofilm « submersed », il y a une sélection sur ce critère bactérien.

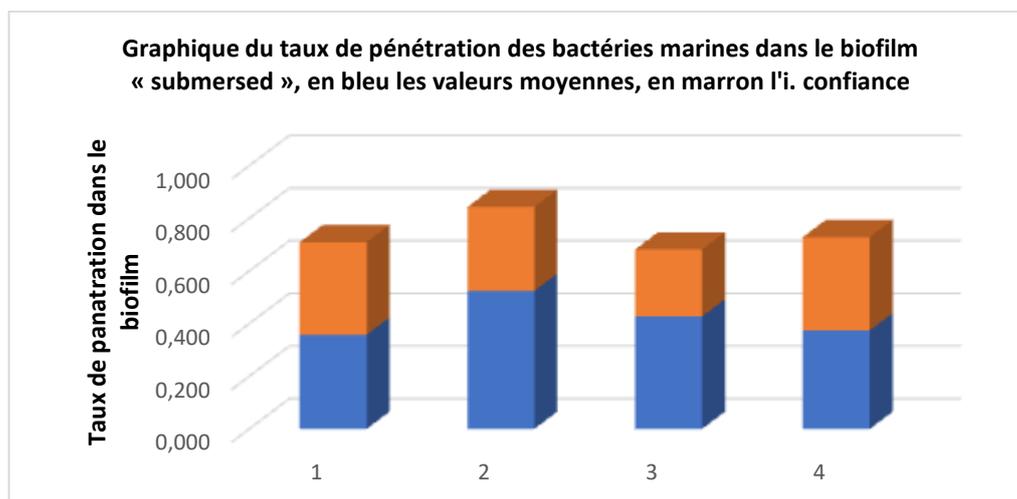
Pour définir le caractère marin il a été pris quatre critères de définition : Les bactéries vivant uniquement dans les sols.

1. Les bactéries vivant uniquement dans le sol.
2. Les bactéries aquatiques capables de vivre dans le sol et dans l'eau (bactéries aquatiques).
3. Les bactéries capables de vivre dans l'eau douce et l'eau de mer.
4. Les bactéries purement marines, elles ne vivent que dans l'eau de mer.

De ces quatre critères de spécification il en a résulté des valeurs du taux de pénétration suivantes :

Définition	Critère 1	Critère 2	Critère 3	Critère 4
Moyenne	0,358 ± 0,320	0,524 ± 0,157	0,427 ± 0,152	0,374 ± 0,263
Diversité	7	18	13	10

De ce tableau il ressort que les critères aquatiques 2 et 3 semblent être les critères retenus dans ce biofilm « » submersed » ».



Toutes fois les écarts sont relativement faibles il faut donc revoir l'exactitude de ces résultats :

### Test d'égalité des moyennes de Student

	Marine 4	Marine 3	Marine 2	Marine 1
Marine 4		= 0,053 t = 1,61 Significatif p=0,95	<u>= 0,150</u> t = 3,99 Significatif p = 0,99	= 0,016 t = 0,75 Non-significatif
Marine 3			<u>= 0,097</u> t = 3,01 Significatif p = 0,99	= 0,069 t = 2,11 Significatif p= 0,975
Marine 2				<u>= 0,166</u> t = 4,77 Significatif p= 0,99
Marine 1				

Seules les bactéries capables de vivre dans les sols et les eaux se différencient des autres bactéries. Ce sont les bactéries aquatiques étant le mieux tolérées, il existe une différence très faible entre les bactéries telluriques et les bactéries purement marines.

Mais cette différenciation étant relativement faible, le test de Snedecor s'impose entre les bactéries purement telluriques et les bactéries aquatiques.

L'analyse de variance donne :

### Test de variance de Snedecor sur le taux de pénétration dans le biofilm « submersed » des bactéries marines entre la classe 1 (bactéries du sol) et la classe 2 (bactéries aquatiques)

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrées des écarts	Carrés moyens	F
• Entre population (facteur contrôlé)	p – (2 classes) = 1	SCE a = 2,648	CM a = 2,648	Fob = 8,92
• Entre les observations dans les populations (erreur résiduelle)	n. – p = 14	SCE r = 4,156	CMr = 0,296	
<b>Totaux</b>	<b>35</b>	<b>SCEt = 4,156</b>		

Ces deux résultats sont significatifs pour  $p = 0,99$

Il y a bien une différence entre les bactéries telluriques et les bactéries aquatiques dans la pénétration dans le biofilm « submersed ».

Cette différence peut être due à la teneur en sel de l'eau de mélange. L'analyse chimique de l'eau de mélange a fait ressortir que cette eau contenait une teneur théorique en eau de mer de 0,7 % étant faible pour des bactéries ayant l'habitude d'un biotope marin. Il y a donc peu de lien entre la diffusion de bactéries dans le biofilm « submersed » et le nombre % de bactéries marines dans l'eau de mélange.

### La diversité dans les classes bactériennes entrantes dans le biofilm submersed

Seules les bactéries des sols se différencient des autres par la faible diversité des bactéries entrantes dans le biofilm « submersed ».

**« Le biofilm "submersed" semble un biotope adapté aux bactéries aquatiques, mais moins adapté aux bactéries purement marines, sûrement par manque de salinité du liquide interstitiel du biofilm "submersed".**

**Il y a une contrainte sur les bactéries marines dans le passage entre l'eau de mélange et le biofilm "submersed" mais cette contrainte est très faible. »**

## 9.21 Influence de la taille des bactéries dans leur diffusion dans le biofilm « submersed »

Les dimensions morphologiques peuvent être un facteur limitant le passage des bactéries de l'eau de mélange vers le biofilm « submersed ». Ces caractéristiques morphologiques de taille et de forme peuvent être un frein dans le passage de la paroi du biofilm faite de fibres glyco-conjuguées.

Les caractéristiques de ces fibres vont produire plusieurs contraintes :

- La taille des espaces inter-fibres dans le biofilm (les fibres font des espaces irréguliers entre eux, limitant le passage des bactéries en fonction de leur taille).
- La polarité des fibres du biofilm (les liaisons hydrogène des fibres hydrophiles vont être un facteur d'adhérence pour les bactéries). Cela réduit fortement le passage des bactéries dans les fibres glycoconjugués.
- La forme bactérienne peut être un facteur limitant ou favorisant le passage.

## 9.22 Analyse de la longueur bactérienne dans la diffusion dans le biofilm « submersed »

La structure du biofilm constituée de polymères extracellulaires glycoconjugués contenant des lectines, lui donne un comportement de gel, c'est-à-dire, formée de mailles de polymères hydratées, chargés d'un potentiel électrique (potentiel zêta), pouvant retenir certaines bactéries ayant des charges opposées sur leurs membranes cellulaires.

C'est pour cela qu'il est difficile de pouvoir prévoir la façon dont les bactéries vont pouvoir passer ces types de structures.

Le comportement de passage bactérien au travers des biofilms « submersed » est un point important pour connaître le mécanisme des transferts bactériens entre le liquide externe et le biofilm.

Cette connaissance peut permettre de comprendre l'écosystème que représente cette structure afin lutter contre les adhérences bactériennes pouvant être comparées à des forteresses microbiennes, permettant aux bactéries de résister aux antibactériens et aux modifications du biotope.

Chez l'Homme ces adhérences sont souvent le fait de maladies chroniques périodiques dans le domaine médical, c'est-à-dire que les bactéries vont pouvoir migrer dans ces biofilms (ou adhérences) lorsque les conditions externes ne seront pas confortables, puis sortir lorsqu'elles se seront améliorées.

### Taux de pénétration dans le biofilm « submersed » et longueur microbienne.

N'ayant pas les dimensions réelles des tailles et des formes bactériennes trouvées dans la grotte de Sulzbrunn (Les dimensions auraient demandé une analyse en microscopie électronique sur toutes les bactéries présentes), cette étude s'est limitée à utilisation des valeurs données par la littérature. Valeurs donnant une fourchette maxi et mini pour chacune des familles ou genres étudiés :

- Soit la longueur maxi et longueur mini ;
- Soit largeur maxi et largeur mini.

Les valeurs des longueurs microbiennes sur le nombre % de diversités bactériennes dans le biofilm « submersed » et dans l'eau de mélange sont :

m = moyenne sur le % de bactéries par genre, intervalle de confiance (pour p = 0,975).

**Tableau des longueurs bactériennes moyennes pondérées dans le biofilm « submersed » et l'eau de mélange**

Définition	Biofilms « submersed »	Eau de mélange
Longueur maxi	m = 3,972 ± 2,348 µm	m = 4,047 ± 1,879µm
Longueur mini	m = 1,151 ± 0,204 µm	m = 1,577 ± 0,324 µm

Dans le biofilm « submersed » les dimensions bactériennes semblent plus faibles que dans l'eau de mélange :

Test de Student sur les différences entre les longueurs mini et maxi des bactéries :

$m L_{\text{mni}} \text{ ou } L_{\text{max}} = (\text{longueur moyenne des bactéries du biofilm}) - (\text{longueur moyenne des bactéries dans l'eau de mélange})$

## Écart entre Biofilms et eau de mélange (biofilm – eau de mélange)

### Pour les maximums

$m L_{\text{maxi}} = -0.075 \mu\text{m}$  soit une valeur de  $t = 0,050$  soit une valeur « non significative ».

### Pour les minimums.

$m L_{\text{min}} = -0.425 \mu\text{m}$  soit une valeur de  $t = 2,236$  soit une valeur de  $p > 0,975$

Il y a une différence de longueur, donnant une proportion de genres bactériens plus longs dans l'eau de mélange que dans le biofilm « submersed ». Cette observation peut montrer, qu'il y a eu une restriction sur la longueur dans le passage des bactéries. Cela reste toutefois faiblement significatif

### La longueur minimale bactérienne en fonction du taux de pénétration dans le biofilm « submersed ».

### Coefficient de corrélation sur les longueurs minimales des bactéries et la pénétration dans le biofilm.

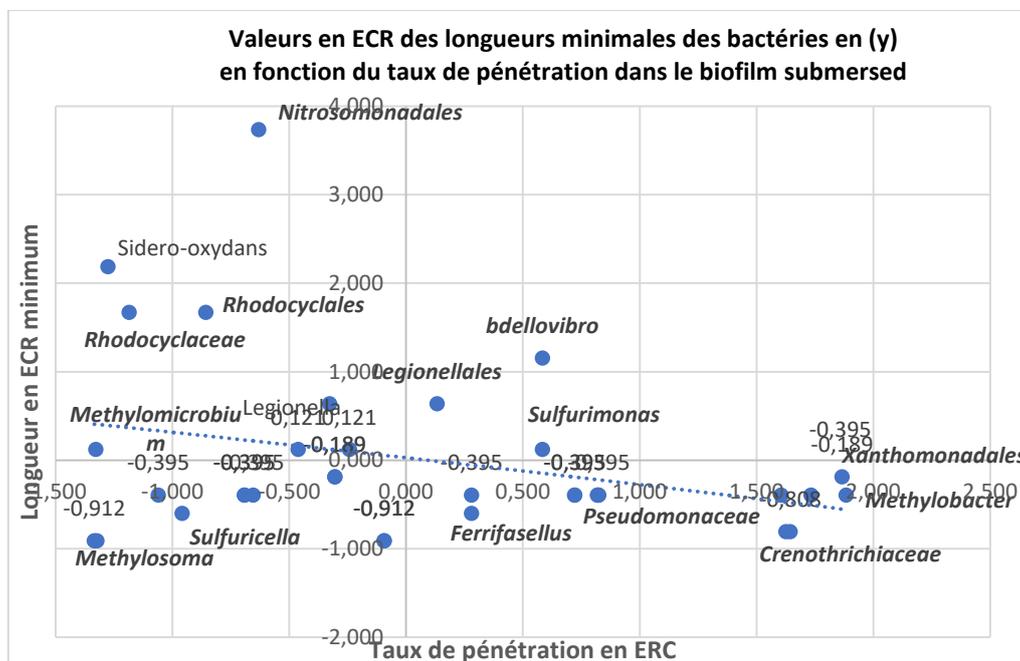
$R = -0,219$  soit  $R^2 = 0,047$  soit **4,7 % de lien** ( $t = 2,02$  avec  $p = 0,975$  peu significatif).

Le coefficient de corrélation inversé veut dire que les bactéries plus courtes semblent montrer un meilleur taux de pénétration dans le biofilm « submersed ».

### Longueur minimum des bactéries exprimées en ECR en fonction du taux de pénétration en ECR dans le biofilm

Pour pouvoir comparer la longueur minimum des bactéries en fonction du taux de pénétration dans le biofilm « submersed », les valeurs analysées sont mises sous la forme écart réduit (ECR) afin que l'on puisse faire un graphique comparatif.

**Graphique entre le taux de pénétration en ECR et les longueurs minimales en ECR**



Cette forme graphique a une ressemblance forte avec le graphique obtenu sur le % de bactéries dans l'eau de mélange et le taux de pénétration dans le biofilm « submersed ». Mais ce graphique n'est pas totalement identique.

**Analyse des valeurs résiduelles du graphique comparativement à la droite de régression de l'ECR des longueurs mini bactériennes en fonction de la pénétration dans le biofilm « submersed »**

Cela nous montre que le taux de pénétration est lié aux faibles longueurs des bactéries.

**Valeur résiduelle graphique hors de la droite de régression globale**

La partie (I) du graphique ou on a : les taux de pénétration ECR <0 et les longueurs ECR >0

Les bactéries dans cette partie sont :

	Biofilms « submersed »	Eau de mélange	Taux de pénétration
<i>Nitrosomonadales</i>	1,4 %	5 %	0,592
<i>Sideroxydans</i>	0,20 %	5 %	0,020
<i>Rhodocyclales</i>	3,5 %	20 %	0,048
<i>Rhodocyclaceae</i>	3.5%	20 %	
<i>Legionella</i>	0,5 %	1,1 %	0,455
<i>Methylomicrobium</i>	0,05 %	1,4 %	0,004

Le taux de pénétration de ces bactéries est influencé par la longueur bactérienne, donc nous avons un passage passif selon ce paramètre.

**Caractéristiques morphologiques**

Définition	Nitrosomonadales	Sideroxydans	Rhodocyclales	Methylomicrobium
<b>Formes</b>	Spiralées	En coque des réseaux de fibres (longues flagelles)	Incurvée, coque, en spirale Monotriche	Forme bâtonnet elliptique avec une ou plusieurs flagelles
<b>Longueur</b>	5 à 23 µm	3,5 à 8,5 µm	3 à 5 µm	0.5 à 1.5 µm
<b>Diamètre</b>	0,25 à 0,5 µm	0,5 à 0,8 µm	0,4 à 0,6 µm	1.5 à 3 µm
<b>Flagelles</b>	Sans	Avec filament	Sans flagelle	Avec flagelles
<b>Trophismes</b>	Autotrophe et mixotrophe	Autotrophe et Mixotrophe	Photo hétérotrophe ou photo autotrophe	Aérobie, méthylotrophe
<b>Taux Pénétration</b>	0,219	0,024	0,149	0.004

La **morphologie « forme spiralée ou en forme coque »** semble être un point commun à ce groupe. Ces bactéries peuvent être considérées dans un système de transfert passif entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed ».

Les bactéries *Sideroxydans* sont des bactéries contenant des fibres de 1 à 2 cm, elles formeront les tiges d'oxyde de fer. Ces fibres vont être un facteur modifiant fortement le passage à travers la membrane du biofilm « submersed ».

Cet ensemble de petites bactéries représente :

- **6.1 %** de la flore des biofilms « submersed »
- **32.5 %** de l'eau de mélange.

**Dans la partie (II)**

Bactéries avec un taux de pénétration ECR dans le biofilm « submersed » > 0 avec une longueur bactérienne ECR >0, soit supérieure à la moyenne du minimum bactérien

Ces bactéries ont une meilleure pénétration dans le biofilm « submersed » avec une longueur plus forte que la moyenne des valeurs minimum.

Leurs définitions et leurs caractéristiques :

	Biofilms « submersed »	Eau de mélange
<i>Bdellovibrio</i>	1,9 %	1,3 %
<i>Legionellales</i>	1 %	1,1 %
<i>Sulfurimonas</i>	0,4 %	1,3 %

Les *Bdellovibrio* et les *Sulfurimonas* sont des bactéries de morphologies spiralées, pouvant expliquer leur différenciation avec les autres bactéries du graphique.

Elles représentent **3,3 % du biofilm « submersed »** et **3.7%** de l'eau de mélange.

Dans ce groupe le taux de passage est indépendant de la longueur des bactéries, (pas de logiques de la physique entre petite taille/meilleure diffusion). C'est la morphologie spiralée et fortement flagellé permettant le passage plus facile dans le biofilm « submersed ».

Définition	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Legionellales</i>	<i>Sulfurimonas</i>
Formes	Spiralée (vibron)	Bâtonnet	Bâtonnet en spirale
Longueur	2,5 à 3 µm	2 à 2,5 µm	2,5 à 62 µm
Flagelles	Monotriche	Monotriche	Monotriche
Aérobiose	Aérobie strict	Aérobiose	Aérobie
Trophismes	Hétérotrophe	Autotrophe	Chimio-autotrophe
Taux Pénétration	0,504	0,455	0,594

Les caractéristiques communes sont : de forme bâtonnet, vivent en aérobiose, flagellés « monotriche ».

#### Bilan de pénétration pour les longueurs minimales

Les bactéries sélectionnées dans les longueurs minimales, ayant pu pénétrer dans le biofilm « submersed » ont une longueur maximale de 5 à 23 µm, comme les *Nitrosomonadales*. Dans cette même sélection, les bactéries les plus petites, ayant pu pénétrer dans ce biofilm « submersed » sont :

	Longueurs Mini	Longueurs Maxi	Taux de pénétration
<i>Methylomonas</i>	0,5 µm	1 µm	0,020
<i>Methylosoma</i>	0,5 µm	1 µm	0,050
<i>Gallionellaceae</i>	0,5 µm	0,6 µm	0,385
<i>Gallionella</i>	0,5 µm	0,6 µm	0,385
<i>Ferribacterium</i>	0,6 µm	5 µm	0,085
<i>Ferribacterium</i>	0,6 µm	5 µm	0,085

**« Les Gallionellaceae sont des bactéries à filaments, cette structure flagellaire leur permet de pouvoir pénétrer dans le biofilm "submersed" quelque-soit la taille bactérienne.**

**Les bactéries de morphologie cocci (les coques) sont mieux acceptées dans le transfert bactérien passif entre l'eau et le biofilm (ceci explique la longueur bactérienne plus faible dans le biofilm).**

**Toutefois ce lien reste relativement faible avec un coefficient de corrélation d'une valeur  $R^2 = 0,047$  soit un lien d'environ 5 %.** »

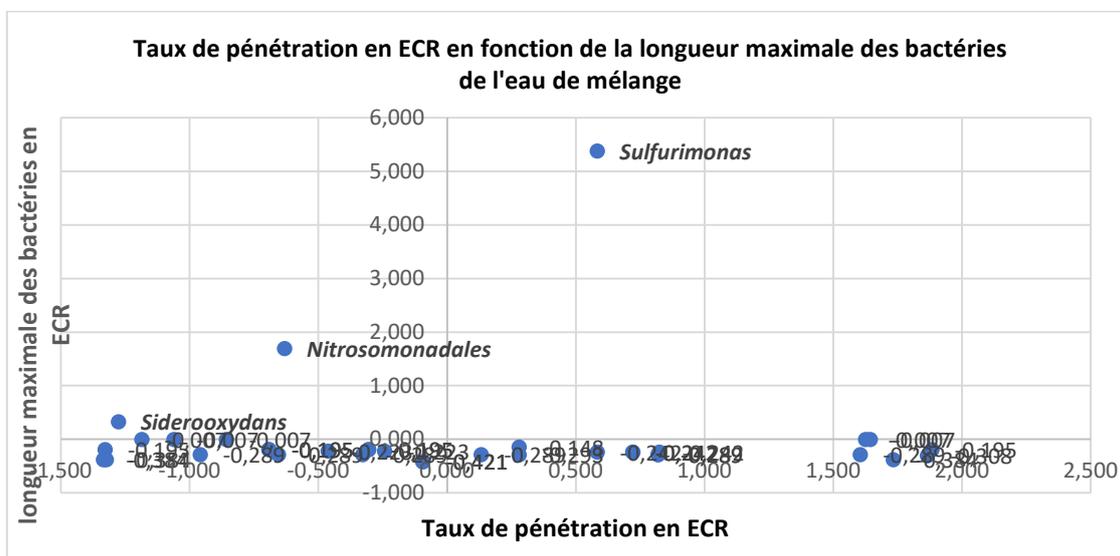
### 9.23 Longueurs bactériennes maximales sur la pénétration des bactéries dans le biofilm

- Coefficient de corrélation entre la longueur maximale bactérienne et la présence dans le biofilm « submersed » :
  - $R = -0.0848$  avec  $R^2 = 0.007$  soit 0.7 % de lien (non-significatif)  
Valeur très faible montrant l'absence de lien.

- Coefficient de corrélation entre la longueur maximale et le taux de pénétration des bactéries dans le biofilm « submersed » :
  - $R = 0,02$  avec  $R^2 = 0,004$  ce coefficient de corrélation est non-significatif.

Les bactéries les plus longues présentent un passage plus aléatoire au travers de la paroi du biofilm « submersed », donc un coefficient de corrélation très faible.

**Le graphique sous la forme d'écart réduit (ECR)  
entre les longueurs bactériennes et le taux de pénétration**



Ce graphique confirme la présence en valeurs résiduelles des *Nitrosomonadales* et *Siderooxydans*, dans la zone du faible taux de pénétration à travers le biofilm « submersed » avec une longueur plus élevée que la moyenne générale des longueurs (semblable au graphique de valeurs minimales).

Si l'on trace la droite de régression entre le taux de pénétration et la longueur maxi des valeurs résiduelles on a :

- *Siderooxydans*
- *Nitrosomonadales*
- *Sulfurimonas* (qui ont un taux de pénétration fort avec une longueur maxi forte).

Les caractéristiques des *Nitrosomonadales* et des *Sulfurimonas* sont d'être de morphologies spiralées cette forme leur permet le passage dans les mailles de la membrane du biofilm « submersed ».

La bactérie *Siderooxydans* n'est pas de forme spiralée mais a des flagelles très importante lui permettant un avancement dans la membrane du biofilm « submersed ».

Entre ces différentes valeurs on obtient la droite de régression suivante :

$$\text{ECR Taux de pénétration} = (0,360 * \text{ECR longueur maxi}) - 1,328$$

Nous pouvons constater que dans cette partie du graphique l'augmentation de la longueur entraîne une augmentation du taux de pénétration.

La forme spiralée du *Sulfurimonas* et les filaments du *Siderooxydans* inversent la logique selon laquelle la longueur serait un paramètre obstructif à la pénétration dans le biofilm « submersed ».

- M<sup>me</sup> le D<sup>r</sup> Fontaine de Maison Alfort a fait remarquer que les *Leptospira* (bactéries spiralées) pouvaient passer au travers des filtres de 0.5 µm sans problème de restriction.

**« Dans le cas des bactéries spiralées la longueur maximale ne semble pas un facteur limitant de la pénétration bactérienne du biofilm "submersed". »**

**Graphique parties (III et IV).**

On peut constater que dans ces deux parties les bactéries se trouvent regroupées de façon linéaire dans des longueurs maximums inférieures à la moyenne de cette sélection, c'est-à-dire pour une valeur inférieure à  $5 \mu\text{m} \pm 3,48$ .

## Les bactéries les plus longues de la sélection et leur taux de pénétration

Noms	Longueur minimum	Longueur maximum	Taux de pénétration
<i>Nitrosomonadales</i>	5 µm	23 µm	0,219
<i>Sulfurimonas</i>	1,5 µm	62,1 µm	0,594
<i>Siderooxydans</i>	3,5 µm	8,5 µm	0,020

« La forme maximum, des longueurs, semble plus difficilement interprétable que les parties minimums, ceci peut être dû à ce que les valeurs maximales sont des cas particuliers de la flore bactérienne.

Le passage passif de l'eau de mélange au biofilm "submersed" demande une longueur bactérienne d'environ de  $5 \mu\text{m} \pm 3.48 \mu\text{m}$  pour les bactéries en forme de bâtonnet.

Seules les bactéries spiralées peuvent passer dans le biofilm "submersed" avec une taille de  $62 \mu\text{m}$  (cas particulier des *Sulfurimonas*). »

**Observation :** Ces résultats restent à être confirmés par des mesures en microscopie électronique.

### 9.24 Le diamètre bactérien sur la diffusion dans le biofilm

La largeur peut faire l'objet de la même analyse que les longueurs. La logique voudrait que les gros diamètres des particules diffusent moins vite que les petits diamètres.

Mais dans un gel de molécules glycoconjugués avec des lectines, il y a une grosseur de maille, étant souvent biaisée par les charges électriques, les charges électromagnétiques des résidus polaires, par l'hydratation de structure, par les vibrations des chaînes moléculaires formant la structure.

C'est pour cela qu'il ne faut pas toujours voir, seulement la grosseur des mailles, mais étudier l'ensemble de la structure en état d'hydratation.

#### Valeurs trouvées sur les diamètres théoriques bactériens pondérés

Dans les écarts obtenus entre les formes bactériennes.

Comme pour la mesure de la longueur, les valeurs des largeurs microbiennes sur le nombre de genres bactériens dans le biofilm « submersed » et sur les mêmes valeurs bactériennes de l'eau de mélange.

**Tableau des diamètres bactériennes moyennes pondérées dans le biofilm « submersed » et l'eau de mélange**

Définition	Biofilms « submersed »	Eau de mélange
Largeur maxi	$m = 1,755 \pm 0,531 \mu\text{m}$	$m = 1,120 \pm 0,231 \mu\text{m}$
Largeur mini	$m = 0,648 \pm 0,083 \mu\text{m}$	$m = 0,627 \pm 0,096 \mu\text{m}$

Dans le biofilm « submersed » les diamètres maxi bactériens semblent plus élevés que dans l'eau de mélange.

L'analyse du rejet de l'hypothèse nulle par le test de Student sur les différences donne :

#### Test des différences de la largeur bactérienne entre le biofilm « submersed » et l'eau de mélange

- Pour les largeurs maximums :  
 $I_{\text{maxi}} = 0,635 \mu\text{m}$ , soit une valeur de  $t = 2,215$  soit une signification (nous permet le rejet de l'hypothèse nulle pour  $p = 0,975$ ).
- Pour les largeurs minimums :  
 $I_{\text{mini}} = 0,021 \mu\text{m}$ , soit une valeur de  $t = 0,33$  ( $p = 0.6$ ) soit non significatif.

Il y a une différence donnant une proportion de diamètres bactériens plus grande dans le biofilm « submersed » que dans l'eau de mélange.

Cette observation, faite sur les maximums des diamètres des bactéries, montre le fait qu'il existe un passage actif dans le biofilm « submersed » ayant pu permettre cette observation contraire aux logiques de la physique.

## 9.25 Les diamètres bactériens minimums pénétrant le biofilm

### Coefficient de corrélation sur les taux de pénétration en fonction des largeurs minimales

- $R = 0,114$  avec  $t = 0,65$  ( $p = 0,70$  non significatif), avec de  $R^2 = 0,012$  soit un lien de 1,2 %

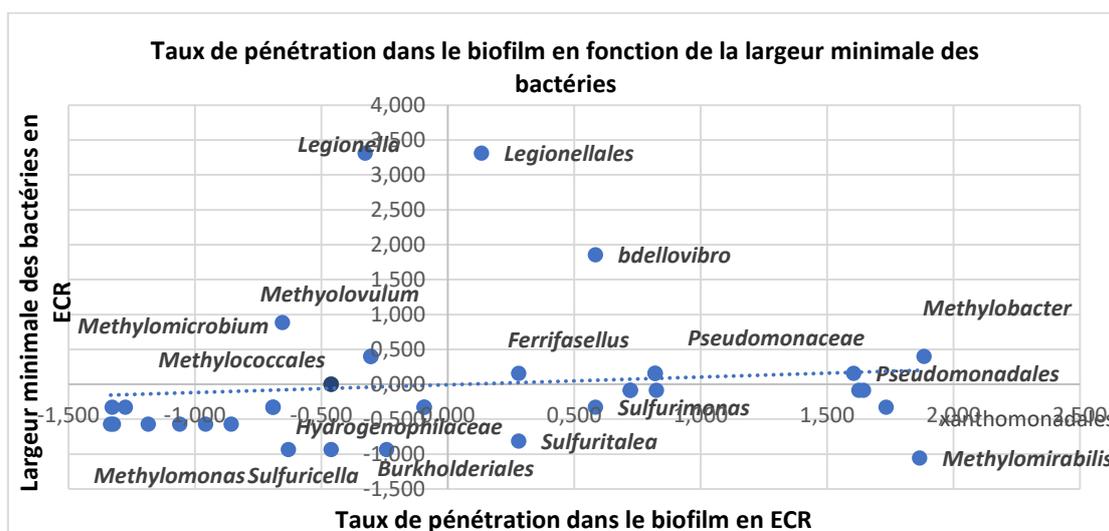
Ce coefficient de corrélation positif (très faiblement significatif) montre que le taux de pénétration est en conformité avec l'observation sur les moyennes, les bactéries ont une Largeur théorique plus forte dans le biofilm que dans l'eau de mélange.

Droite de régression de l'ensemble bactérien entre le taux de pénétration en ECR et les diamètres minimums en ECR des bactéries :

$$\text{Taux de pénétration en ECR} = 0.281 (\text{diamètre mini}) + 0.321$$

Cette droite de régression, nous informe que le taux de pénétration est peu variable en fonction du diamètre minimum pour la majorité des bactéries observées.

**Graphique entre le taux de pénétration en ECR et les diamètres minimums bactériens en ECR**



### Valeurs résiduelles des parties (I et II)

Ce graphique de la partie (I) donne les valeurs résiduelles des diamètres minimums bactériens.

Dans les diamètres minimums : les valeurs plus élevées et ayant un taux de pénétration plus faible que les moyennes sont :

	Biofilms « submersed »	Eau de mélange	Taux de passage
<b>Legionella</b>	1 %	1,2 %	0,455
<b>Methylovulum</b>	7,4 %	27,6 %	0,211
<b>Methylococcales</b>	16,9 %	36 %	0,319

Dans cette partie (I) les *Methylovulum* et les *Methylococcales* sont des bactéries en forme de coque, ayant été définies pour avoir un transfert passif. Les *Legionella* ont eu une morphologie en bâtonnet fortement flagellée.

Ces bactéries représentent : 64,8 % de l'eau de mélange et 25 % du biofilm « submersed ».

Leurs variations de diamètre minima à peu d'influence sur le taux de pénétration.

Le maximum de **diamètre mini observé est de 2 µm**.

Dans la partie (II) du graph ou les diamètres minimums :

	Biofilms « submersed »	Eau de mélange	Taux de pénétration
<b>Legionellales</b>	1,5 %	1,2 %	0,455
<b>Bdellovibrio</b>	1,9 %	1,3 %	0,594
<b>Methylobacter</b>	10,5 %	0,05 %	0,995
<b>Ferriphaseelus</b>	0,2 %	0,5 %	0,500
<b>Pseudomonadales</b>	1,4 %	0,1 %	0,909
<b>Pseudomonas</b>	0,2 %	0,1 %	0,665

Dans l'ensemble ces bactéries ont une forme bâtonnet, représentant un total de 15,7 % du biofilm « submersed » et 3,25 % de l'eau de mélange.

### Les morphologies bactériennes :

L'examen morphologique bactérien permet de définir les raisons de la position dans le graphique.

<i>Legionellales</i>	Bâtonnets avec des flagelles latéraux et deux flagelles polaires
<i>Bdellovibrio</i>	vibrions
<i>Methylobacter</i>	soit sphérique, soit en bâtonnet ellipsoïde
<i>Ferriphaselus</i>	des très petits bâtonnets courts légèrement incurvé (L 0,8-1.96 $\mu$ et 0.7- 0,9 $\mu$ m)
<i>Pseudomonadales</i>	en forme de bâtonnets avec de longues flagelles.
<i>Pseudomonas</i>	en forme de bâtonnets avec de longues flagelles.

Cette sélection présente des morphologies particulières permettant aux bactéries de passer la membrane du biofilm « submersed »

Le *Bdellovibrio* a la forme vibrion avec un diamètre important avec un taux de pénétration supérieur à la moyenne des taux. Cette observation rejoint celle faite dans les longueurs bactériennes (la forme vibrions est favorable à la pénétration dans le biofilm « submersed »).

Les *Legionellales* : la présence de flagelles latéraux et polaires peut expliquer la présence de cette bactérie dans la partie (II) du graphique. Cette abondance flagellaire va permettre à cette bactérie de pénétrer plus facilement dans le biofilm « submersed ».

Les *Ferriphaselus* et Les *Methylobacter* sont de très petites bactéries proches des coques, ceci favorisant le passage dans le biofilm « submersed »

Les *Pseudomonas*, ces bactéries portent des flagelles (biflagellés) leur permettant le passage du biofilm.

Elles peuvent être considérées aussi pour un passage actif, car il y a une grande variation de diamètre bactérien avec une faible variation de passage. Mais il peut y avoir un passage passif avec un développement microbien dans le biofilm « submersed ».

Ces deux considérations diminuent la fiabilité du classement actif ou passif.

## 9.26 Les diamètres maximums capables de pénétrer dans le biofilm

Les coefficients de corrélations entre la largeur bactérienne et le taux de pénétration sont :

- $R = 0,368$  avec ( $t = 2,273$  pour  $p = 0,975$ ), soit  $R^2 = 0,135$  soit un lien de **13,5 %**.

Ce coefficient de corrélation positif montre que 13,5 % des bactéries ont un taux de pénétration fonction de leur diamètre bactérien.

Cette observation donne pour 13.5 % de la population microbienne, que plus le diamètre bactérien est fort plus il y a eu de pénétration (cette observation étant contraire à la logique physique nous pouvons dire que ces 13,5 % sont des passages actifs).

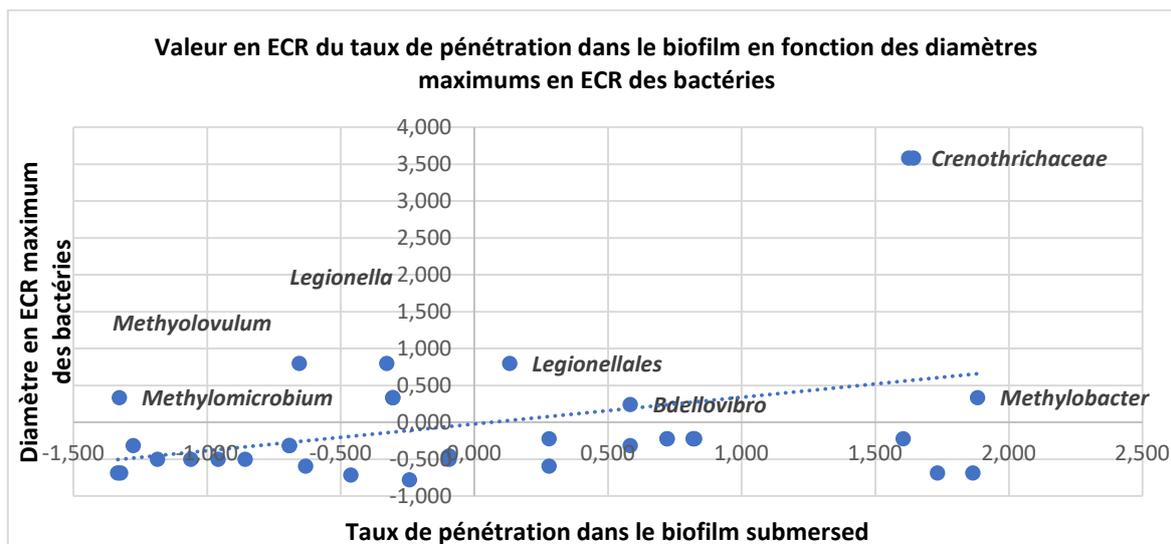
Cela est en accord avec les observations précédentes à ce sujet.

**Droite de régression des valeurs bactériennes globales de diamètre maximum dans le biofilm en fonction du taux de pénétration dans le biofilm**

$$\text{Taux de pénétration dans le biofilm} = 0,374 * (\text{diamètre bactérien minimum}) - (0,00 \pm 0,214)$$

Cette droite de régression étant centrée n'est pas exploitable pour définir les paramètres, soit de taux de pénétration, soit le diamètre maxi des bactéries.

### Graphique du taux de pénétration en ECR et le diamètre maximum en ECR



#### Analyse résiduelle pour la partie (I) du graphique.

Dans ce tableau les bactéries avec un diamètre supérieur à la moyenne, avec un taux de pénétration dans le biofilm « submersed » inférieur à la moyenne, sont :

	Biofilms « submersed »	Eau de mélange	Taux de passage
<i>Legionella</i>	0,5 %	1,2 %	0,455
<i>Methylovulum</i>	7,4 %	20,6 %	0,211
<i>Methylococcum</i>	0,5 %	1,4 %	0,040

#### Morphologie de la partie (I) du graphique :

*Methylovulum* en forme de coques

*Methylococcum* en forme de coques

Seul les *Legionella* sont en forme de bâtonnet avec présence de nombreux flagelles.

Ces bactéries sont des passages passifs.

Définition	<i>Legionella</i>	<i>Methylobacter</i>	<i>Methylovulum</i>
<b>Formes</b>	Bâtonnet	Bâtonnet ellipsoïde	Coque
<b>Largeur</b>	Diamètre >2 µm ;	0,8 à 1,5 µm	2 µm
<b>Longueur</b>		1,2 à 3 µm	2 µm
<b>Flagelles</b>	Flagelle polaire ainsi que des flagelles latéraux	Monotriche	Non flagellé
<b>Mobilité</b>	Mobilité (+)	Mobilité (+)	Immobile
<b>Aérobiose</b>	Aérobie facultatif	Aérobie strict	Aérobie strict
<b>Trophismes</b>	RAS	Méthanotrophe Type I	Méthylotrophe Type II
<b>Taux Pénétration</b>	0.455	0,995	0,211

## Analyse résiduelle du taux de pénétration pour la partie (II)

Cette partie se compose de :

	Biofilms « submersed »	Eau de mélange	Taux de pénétration
<i>Crenothrichaceae</i>	13 %	1,2 %	0,921
<i>Legionellales</i>	1,5 %	1,2 %	0,455
<i>Methylobacter</i>	10,5 %	0,05%	0,995
<i>Bdellovibrio</i>	1,9 %	1,5 %	0,594

### Caractéristiques différentielles entre les résidus (partie II du graphique)

Définition	<i>Crenothrichaceae</i>	<i>Legionellales</i>	<i>Bdellovibrio</i>
<b>Formes</b>	Bâtonnet avec des filaments fixateurs du fer III pouvant avoir de 1 à 2 cm	Bâtonnet	Petits bâtonnets Gram (-);
<b>Largeur</b>	0,6 à 5 µm	Diamètre >2 µm ;	1.4 µm
<b>Longueur</b>	1 à 2 µm		Longueur 2.5 µm
<b>Flagelles</b>	Sans flagelle	Flagelle polaire ainsi que des flagelles latéraux	Flagellés, engainés, monotraces.
<b>Aérobiose</b>	Aérobie		
<b>Trophismes</b>	Chimio- hétérotrophe Méthylo-trophe	Aérobie facultatif	Aérobies stricts.
<b>Mobilité</b>	Mobile	Mobilité (±)	
<b>Taux Pénétration</b>	0,921	0.455	Très mobiles 0.594

### Caractéristiques de ces deux bactéries n'ayant pas été précédemment citées

Les deux premières *Crenothrichaceae* et *Legionella* ont des taux de pénétration élevés et un diamètre supérieur à la moyenne, elles sont de forme bâtonnet avec des flagelles péritriches et sont aérobies. Les *Crenothrichaceae* ont de très longs flagelles leurs permettant une meilleure pénétration.

Le *Methylovulum* appartenant à la famille des *Methylococcaceae* rejoint les observations faites sur la longueur des minimums bactériens c'est-à-dire que cette bactérie fait partie des coques, elle a un passage passif.

### Valeurs résiduelles des diamètres maximums des bactéries passées dans le biofilm « submersed » Droite de régression englobant les résidus de type (I) et type (II) du précédant graphique

Les valeurs résiduelles de la droite comprennent *Methylomicrobium*, *Methylovulum*, *Legionella*, *Legionellales*, *Bdellovibrio*, *Crenothrichaceae*.

Coefficient de corrélation de la droite résiduelle :  $R = 0,723$  soit  $R^2 = 0,522$  soit **un lien de 52,2 % entre le diamètre des bactéries et le taux de pénétration.**

### Droite de régression des résidus

**Taux de pénétration dans le biofilm = 0,588 \* (largeur maxi des bactéries) – 0,574**

**Diamètre maxi = 0,9044 \* Taux de pénétration + 1,0186**

**Le diamètre théorique obtenu pour un taux de pénétration de 0,995 est 1,92 µm**

Les bactéries de gros diamètre passées dans le biofilm ont un diamètre **de 2 µm.**

### Recherche sur les diamètres maximums permettant la pénétration dans le biofilm

Les coefficients de corrélation sont insuffisants pour définir une analyse linéaire d'optimisation, nous pouvons simplement comparer les valeurs des longueurs ayant donné les résultats les plus probants :

Pour les longueurs maximums la bactérie la plus longue ayant donné un taux de pénétration supérieur à la moyenne, est :

- *Sulfurimonas* avec un taux de pénétration de 0,594 et une longueur maximum de 62  $\mu\text{m}$  et un diamètre de 1.5  $\mu\text{m}$  (la moyenne des diamètres étant de 1,138  $\mu\text{m}$ ). Ce genre appartient bien à une valeur maximum de la flore examinée.
- Pour le diamètre la valeur de 2  $\mu\text{m}$  semble être encore possible c'est le cas de *Methylococcaceae* étant des coques de cette dimension avec un taux de pénétration de 0,319 pour une moyenne générale du taux de pénétration de 0,413.

On peut donc se fixer sur ces valeurs pour définir les longueurs et les largeurs étant possibles dans le transfert bactérien dans de tels biofilms « submersed ».

**« Bien que le rejet de l'hypothèse nulle ne soit pas très évident, cette concordance est un facteur supplémentaire de solidité de cette observation que les bactéries du biofilm ont un diamètre plus fort que dans l'eau de mélange. »**

**« Conclusion partielle sur l'étude de la taille bactérienne :**

**Dans cette étude nous pouvons constater que la tailles des bactéries n'est pas le facteur le plus réprimant dans le passage au travers du biofilm « submersed ».**

**Les facteurs les plus importants dans la pénétration des bactéries de l'eau de mélange dans le biofilm « submersed » sont :**

- **La morphologie : forme spiralée, cocci (coques), flagelles et filaments.**
- **Le diamètre bactérien.**
- **La longueur bactérienne peut être acceptée par une morphologie adaptée. »**

*Observation : « Ce critère a été analysé sur des bases théoriques bibliographiques, méritant d'être confirmées sur des mesures faites par microscopie électronique.*

*Ces résultats ne sont donc qu'une indication de tendance et non une véritable information.*

*Afin de palier au fait des écarts donnés par la littérature sur les dimensions microbiennes, il est apparu plus faisable de prendre les dimensions microbiennes en traitant les maximum et minimum séparément au lieu de faire une moyenne des valeurs. »*

## **9.27 Croissance interne des bactéries dans les biofilms<sup>13</sup>**

La croissance de la biomasse observée dans l'eau de mélange et dans les biofilms « submersed » peut être mesurée par deux analyses prises dans les temps  $t_1$  et  $t_2$ . Cette interprétation dynamique doit prendre en compte la mortalité des individus pendant cette période.

Les paramètres permettant l'étude de la croissance microbienne sont :

- L'intervalle de temps court (dt).
- La variation de la biomasse (dN) (variation du nombre d'individu).
- La variation de la masse moyenne microbienne que l'on nomme (dW).

Dans un écosystème hétérotrophe où la biomasse est en disette de nourriture (cela étant le cas de la grotte de Sulzbrunn), les turnovers de naissance et de mortalité ont un rôle important dans l'équilibre de la croissance microbienne.

Le calcul se fait alors :

Pendant un intervalle de temps court (dt), l'effectif de la biomasse diminue de (dN) et la masse microbienne individuelle morte est de (dW).

La production instantanée dans le temps (dt) est la somme de deux termes :

- $(N - dN) \Rightarrow$  individus survivants au temps  $(t + dt)$  on a accru la biomasse de la quantité  $[dW \cdot (N - dN)]$ .
- Pendant l'intervalle de temps dt, chacune des bactéries disparus a produit une quantité d'énergie (pour les hétérotrophes), avant d'être consommés (cause de mortalité principales) une biomasse comprise entre 0 (si elle a été consommée aussitôt après l'instant t) et dW (si elle a été consommée immédiatement avant l'intervalle).

En admettant qu'en moyenne l'augmentation de poids de l'ensemble des individus avant d'être consommés a été de  $dW/2$  (moyenne létale ou  $DL_{50}$ ). La production nette de la biomasse pendant le temps  $dt$  vaut :

$$dP = N \cdot dW - ((dN \cdot dW)/2)$$

On peut calculer la production secondaire de la biomasse durant sa vie entière :

Dans la pratique, il est important de déterminer  $N$  et  $W$  à chaque instant de la vie de la biomasse : il est indispensable de discrétiser la loi et d'observer les deux variables à des intervalles de temps (régulièrement ou irrégulièrement) espacés.

La production de la biomasse est estimée :

$$P_{t_0}^{max} = [ N \cdot W + ( N \cdot W) / 2 ]$$

### Étude de la croissance interne aux structures dans la grotte de Sulzbrunn

Dans l'étude de cette grotte nous n'avons pas d'information sur l'évolution dynamique (dans le temps) de la flore des eaux, des biofilms et des snottites pour avoir une notion sur la croissance microbienne.

Cette analyse n'étant pas portée à notre connaissance, les seules valeurs nous informant sur le développement microbien dans le biofilm « submersed » sont les écarts entre le nombre de bactéries d'un genre donné dans l'eau de mélange et le même dénombrement fait dans le biofilm « submersed ».

Il est difficile de pouvoir donner une affirmation sur la croissance sans faire une analyse différentielle dans le temps, mais on peut toujours faire une hypothèse de croissance sur les bactéries ayant un taux de présence plus important dans le biofilm « submersed » que dans l'eau de mélange.

Dans un premier temps nous pouvons dire que les bactéries non présentes dans l'eau et présentes dans le biofilm « submersed » sont des bactéries ayant eu une croissance interne aux biofilms :

	Pourcentage du biofilm « submersed »
<i>Bacteroidetes</i>	1,2 % ± 0.6
<i>Planctomycetes</i>	18.4 %
<i>Verrucomicrobia</i>	1 % ± 0.6
<i>NC 10 Methyloirabilis</i>	4,7 %
<i>Alphaproteobacteria</i>	16,8 %

Soit une biomasse en nombre de bactéries de 42,1 % du biofilm « submersed ». Cette biomasse ayant contact très réduit avec les eaux de la grotte (Elle est absente dans l'eau de la grotte).

Leur développement dans le biofilm submersed est un développement interne.

L'observation de la différence existante entre la concentration bactérienne de l'eau de mélange et la concentration bactérienne dans le biofilm « submersed » peut aussi être un indicateur de développement.

S'il est considéré que les bactéries de l'eau de mélange ne peuvent pas entrer dans le biofilm submersed avec une concentration supérieure à celle-ci, le taux maximum entrant dans le biofilm « submersed » devrait être égal au taux de bactéries de l'eau de mélange « vases communicants ».

En partant de ce principe, la différence bactérienne entre l'eau de mélange et le pourcentage des mêmes bactéries dans le biofilm « submersed » peut nous donner une indication sur le développement bactérien.

Moyenne des écarts entre l'eau de mélange et le biofilm submersed pour les bactéries présentes dans l'eau de mélange et le biofilm « submersed » :

$$\Delta_{\text{eau de mélange}}^{\text{biofilm submersed}} = 5.487 \% \pm 2.815$$

**Tableau des bactéries ayant une teneur plus forte dans le biofilm « submersed » que dans l'eau de mélange**

Nom	Taux de pénétration dans le biofilm « submersed »	Valeur en % de la flore totale Dans biofilm « submersed »	Différence entre le biofilm « submersed » et l'eau de mélange % biofilm
<i>Bdellovibrio</i>	0,594	1,9 %	0,6 %
<i>Crenothrichaceae</i>	0,921	14 %	12,8 %
<i>Crenothrix</i>	id	id	id
<i>Methylobacter</i>	0,995	10 %	9,95 %
<i>Methylomirabilis</i>	0,990	4,7	4,7 %
<i>Methylophilaceae</i>	0,636	14,7 %	6 %
<i>Methylotenera</i>	id	id	id
<i>Pseudomonas</i>	0,667	0,2	0,1
<i>Sulfurimonas</i>	0,594	1,9	0,1
<i>Xanthomonadales</i>	0,949	3,7 %	3,5 %
Moyennes / genres	0,747 + 0.130	6,30 % + 4.23	4,71 % + 3.58

*Crenothrix* est déjà présent dans *Crenothrichaceae* (***Crenothrix Crenothrichaceae***)

*Methylotenera* est déjà dans *Methylophilaceae* (***Methylotenera Methylophilaceae***)

Ces deux familles ont des bactéries vivant principalement à l'intérieur du biofilm « submersed »

Les pourcentages de bactéries genre *Crenothrix* et genre *Methylotenera* du biofilm ne sont pas pris en compte dans les calculs.

Total de la sélection des germes, ayant une valeur positive pour la différence entre l'eau de mélange et le biofilm « submersed » :

$$(\Delta > 0) = 37,75 \%$$

Valeur moyenne par famille ou genre = 4,71 % ± 3,58

En pourcentage d'augmentation = 76 % d'augmentation microbienne dans le biofilm submersed sans tenir compte des bactéries sédentaires

Cette augmentation peut être expliquée par la croissance. Mais n'ayant pas la valeur du temps que représente cette évolution, nous avons là qu'une valeur statique.

La différence entre les bactéries à l'intérieur du biofilm « submersed » et les bactéries de l'eau de mélange peut provenir des hypothèses suivantes :

- Le passage actif permettant à certaines bactéries d'accéder aux biofilms, mais pas à d'autres donne un écart bactérien entre l'eau de mélange et le biofilm dans la condition qu'il y ait un non-retour dans l'eau de mélange.
- Le développement interne des bactéries entrantes par passage passif, créant une différence entre le biofilm « submersed » avec l'eau de mélange (croissance dynamique interne).
- Les bactéries vivant à l'intérieur du biofilm sans avoir aucun contact avec l'extérieur (croissance interne).
- Les occupations de la place pouvant être aussi un facteur limitant dans le biofilm.

On retrouve cette flore dans la partie haute du tableau sur les écarts réduits du taux de pénétration en fonction du pourcentage de l'eau de mélange.

**« Toutes ces observations confirment, qu'il existe bien une barrière immunitaire entre le biofilm "submersed" et l'eau de mélange.**

**Il existe un développement interne au biofilm "submersed" nous étant donné par la différence entre l'eau de mélange et ce biofilm. Cet écart est bien dû à la croissance interne bactérienne, mais sans une étude dynamique il est difficile de donner des valeurs quantitatives. »**

## 9.28 Activité autotrophe de l'écosystème bactérien

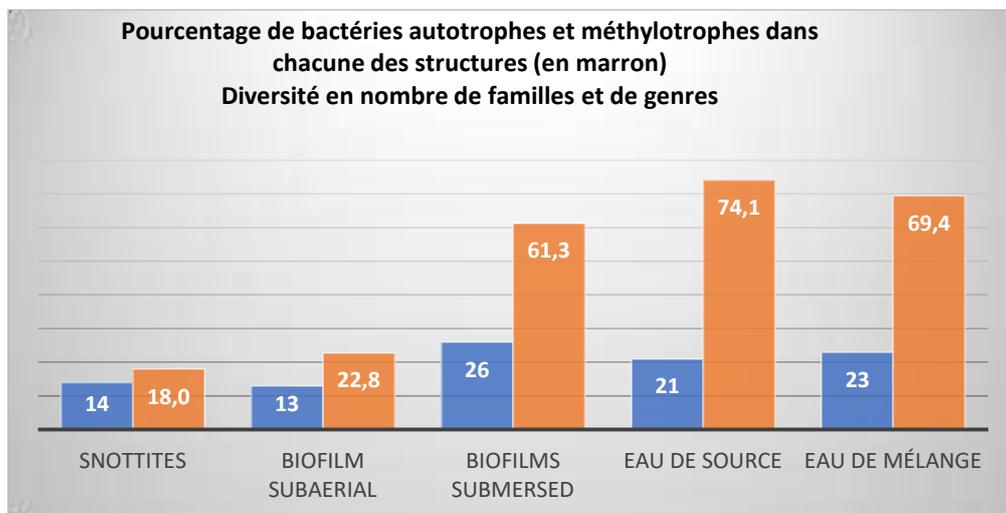
L'activité autotrophe dans la grotte de Sulzbrunn a une importance primordiale sur l'écosystème général de cette cavité. Ce sont les bactéries autotrophes permettant une continuité et une stabilité dans le cycle énergétique de la cavité.

La grotte de Sulzbrunn étant une cavité fermée le renouvellement énergétique est de ce fait restreint.

Ce sont les bactéries autotrophes transformant les matières minérales et purifier l'air ambiant par l'absorption et la transformation du gaz carbonique, du méthane, de l'azote, pour élaborer leurs matières organiques.

Cette transformation va permettre la production d'une matière organique (par la production de bactéries servant de constituant organiques), devenant une matière énergétique pour les bactéries hétérotrophes.

**Graphique entre les pourcentages autotrophes et méthylophiles dans chaque structure**



La diversité bactérienne reste relativement constante, mais les caractéristiques métaboliques sont très variables, cela montre que cette diversité de genres ou d'espèces n'est pas conservée d'une structure à l'autre (entre snottites, biofilms, eaux). Seuls comptent les caractéristiques de cette diversité.

Les bactéries autotrophes et méthylophiles se trouvent en plus grosse quantité dans l'eau de source et dans l'eau de mélange, cette observation vient du fait que les eaux souterraines sont riches en *Ferrobacteria* et en bactéries sulfureuse (bactéries chimio-litho-autotrophes).

Le biofilm « submersed » chargé en bactéries autotrophes et méthylophiles par l'intermédiaire de l'eau de mélange n'aura pas de déficit énergétique.

Par contre les biofilms « subaerial » et les snottites vont être moins chargés en ce type de bactéries cela pose un problème d'apport énergétique dans ces structures.

Le rôle des bactéries autotrophes dans le biofilm et les snottites est primordial, pour la pérennité de ces structures dans des temps aussi longs, sans perte d'énergie (par la récupération des gaz carbonés et azotés de l'atmosphère).

Les bactéries autotrophes se nourrissent de CO<sub>2</sub> et d'azote atmosphérique pour élaborer leur constituant organique ; il en est de même pour les bactéries méthanotrophes ou méthylophiles utilisant le méthane atmosphérique, et produisant de la matière organique et devenir un nutriment pour les bactéries hétérotrophes.

Ce cycle vital peut être une hypothèse expliquant la survie de ces écosystèmes.

**Rapport entre les (bactéries autotrophes + bactéries méthylophiles) /bactéries Hétérotrophes**

Définition	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « Submersed »	Eau de source	Eau de mélange
Hétérotrophes	82	76,7	38,7	25,9	30,6
Total (autotrophes + méthylophiles)	18	23,3	61,3	74,1	69,4
Rapport (autotrophes + méthylophiles) / Hétérotrophes	0,22	0,30	0,631	2,86	2,26

*Autotrophe / hétérotrophes => rapport consommation sur production (=> indice de consommation)*

Ce tableau fait ressortir que les snottites et les biofilms « subaerial » ont un rapport inférieur au biofilm « submersed » (différence d'environ 50 %). Cette constatation pose la question de savoir quels sont les sources d'énergie autre que les bactéries autotrophes pour subvenir aux besoins des snottites et biofilms « subaerial » ?

- Dans les biofilms « subaerial » et les snottites : l'apport énergétique des bactéries autotrophes pour combler les besoins des bactéries hétérotrophes est insuffisant. Cette observation nous fait dire que le turnover microbien doit être fortement ralenti ou il doit y avoir une source énergétique externe permettant de compenser ce déficit.

Ce déficit peut être comblé par l'absorption du CO<sub>2</sub> (comme source de carbone) et du méthane atmosphérique comme le précise l'étude analysée indiquant : une teneur en carbone isotope C<sup>13</sup> de 30,7 ± 1,1 pour mille étant entre les signatures de CH<sub>4</sub> et de CO<sub>2</sub> de l'atmosphère de la grotte.

Ces deux structures ont la particularité de contenir des bactéries de la famille des *Saprosiraceae* (soit 0,5 % de la flore dans les snottites et 4,5 % dans le biofilm « submersed ») Les *Saprosiraceae* sont des germes de catabolisme de la flore morte (recyclage des nutriments), elles forment des tiges épiphytes, bactéries filamenteuses dans les boues activées.

Dans cette famille il y a trois groupes bactériens spécialisés dans l'hydrolyse des protéines et acides aminés servant de sources de carbone et d'énergie.

Ce comportement peut être une raison d'une meilleure utilisation par les bactéries hétérotrophes de l'énergie et du carbone fournis par les composés organiques dus au métabolisme ou au catabolisme des bactéries autotrophes ou au recyclage des bactéries mortes hétérotrophes.

- Dans les biofilms « submersed », l'apport énergétique par le développement de bactéries autotrophes doit être plus équilibré (valeur de 0,631 de rapport). Malgré cela l'apport en isotopes C<sup>13</sup> est fourni par le « carbone analysé dans les biofilms ont une signature isotopique de C<sup>13</sup> de 44,4 pour mille, correspondant à la valeur observée dans le méthane ». On peut penser qu'il y a un équilibre pouvant répondre à la pérennité de ce biofilm.
- L'eau de source est un apport non-négligeable en bactéries autotrophes et l'eau météorique d'après les calculs n'apporte pas ou peu de bactéries autotrophes aux biofilm « subaerial » et aux snottites. L'équilibre autotrophes /hétérotrophes de l'eau se retrouve seulement dans le biofilm « submersed ».

Dans de telles conditions, l'équilibre bactérien va être le facteur important dans la survie de la flore microbienne.

### Rapport entre les bactéries méthylothropes sur les bactéries autotrophes

Définition	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « Submersed »	Eau de source	Eau de mélange
Méthylotrophes %	10,5	12,6	46,3	8,4	47,4
Autotrophes %	7,5	10,2	15	65,7	22
Rapport Méthyl/Auto	1,4	1,2	3,1	0,12	2,2

- Dans les biofilms « subaerial » et les snottites le rapport entre les bactéries méthylothropes et les bactéries autotrophes est relativement proche comparativement au biofilm « submersed », avec une proportion de méthylothropes plus importante que d'autotrophe.
- Dans les biofilms « submersed » ce rapport se trouve fortement augmenté et devient supérieur à l'eau de mélange. Cela peut montrer une activité méthylothropes plus importante dans ce biofilm « submersed » ou une consommation de germes autotrophes plus importantes dans ce biofilm que dans l'eau de mélange (soit 32% de moins d'autotrophes que dans l'eau de mélange).
- Dans l'eau de source ce rapport est fortement diminué par une faible teneur en bactéries méthylothropes. L'écart existant entre l'eau de source et les eaux de mélange, montre que l'apport, des germes autotrophes par l'eau tellurique est très faible, par opposition : l'apport des germes méthylothropes, devant être relativement important (la teneur en *Methylococcales* dans l'eau tellurique est estimée à 28 %).

Le biofilm « submersed » semble plus équilibré que les autres structures par la présence d'eau, permettant d'avoir un Aw plus propice au développement microbien. L'activité méthylothropes de cette structure est plus importante, il faut donc un apport énergétique plus grand.

L'eau de source a un rapport faible car l'activité autotrophe vient principalement des bactéries litho-chimio-autotrophes oxydant et réduisant les métaux comme le fer, le manganèse et le soufre. Son apport en bactéries méthylothropes est relativement faible comparativement à l'eau de mélange et au biofilm « submersed ».

*Methylotenera* (ordre des *Methylophilales*, famille des *Methylophilaceae*) présents :

Biofilms « submersed »	14,3 % de la flore de cette structure
Eau de source	2,6 % de la flore de cette structure
Eau de mélange	7,3 % de l'eau de mélange

C'est une bactérie aérobie, sa présence dans la partie des biofilms « submersed » est sûrement due à son aérobiose facultative. Elle utilise le méthane ambiant pour la formation de son carbone et de son énergie, s'est-elle, devant être l'apport principal du biofilm « submersed ».

**« La flore de la grotte est en grande partie composée de bactéries méthanotrophes et autotrophes expliquant que les structures (des biofilms et des snottites) de la grotte ont pu survivre à 15 millions d'années sans un apport d'énergie organique extérieur.**

**Tout se passe donc comme si les bactéries hétérotrophes cultivaient les bactéries autotrophes pour produire leur nourriture. »**

### 9.29 Le caractère autotrophe et les indices de croissance

En considérant la croissance interne à partir de la différence existante entre le biofilm « submersed » et l'eau de mélange, chez les bactéries autotrophes (méthylothropes inclus) on obtient :

Tableau des bactéries ayant un delta positif (biofilm « submersed » - l'eau de mélange) en pourcentage

Définition	Autotrophes	Hétérotrophes
Nombre enregistré des valeurs (+)	52,7	10.
Total des bactéries %	9	3
Moyenne	5,8	3,3

Les bactéries autotrophes semblent être plus abondantes dans le biofilm « submersed » que dans l'eau de mélange. Cette observation peut être liée au fait que les bactéries autotrophes sont en plus grande quantité lorsque la croissance est plus forte.

Rapport Autotrophes / Hétérotrophes = 1.75 (valeur souvent constatée dans les rendements alimentaires)

#### Familles ou genres ayant donné un résultat positif

Autotrophes	Hétérotrophes
<i>Sulfuricella</i>	<i>Comamonadaceae</i>
<i>Gallionella</i>	<i>Burkholderiales</i>
<i>Ferribacterium</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>
<i>Methylosoma</i>	
<i>Methylomicrobium</i>	
<i>Methylomonas</i>	
<i>Methylobacter</i>	
<i>Methylophilaceae</i>	

Les genres ayant eu la différence la plus forte sont :

#### Dans les autotrophes :

- *Ferribacterium* => 13.1 %
- *Methylovulum* => 22.9 %

#### Dans les hétérotrophes :

- *Comamonadaceae* => 4.7 %

**« Ces observations semblent être liée au fait que les besoins énergétiques de la croissance entraînent une augmentation de la flore autotrophe. »**

### 9.30 La flore marine de la grotte de Sulzbrunn

À notre époque la flore marine n'ayant pas de raison d'être en Bavière, elle a de ce fait une valeur dans l'historique de cette cavité. L'origine de cette flore définit l'époque où la Bavière était une région côtière et en partie recouverte par la mer (c'est-à-dire 35 millions d'années, ère du « Rupélien »).

Selon le Bureau bavarois de géologie, la Bavière était recouverte par la mer il y a 35 millions d'années, les rivières provenant des Alpes apportaient leur limon et la côte maritime était une zone avec une végétation aquatique très florissante.

L'eau saumâtre de la grotte et les valeurs élevées en iode suggèrent que cette activité marine reste toujours présente.

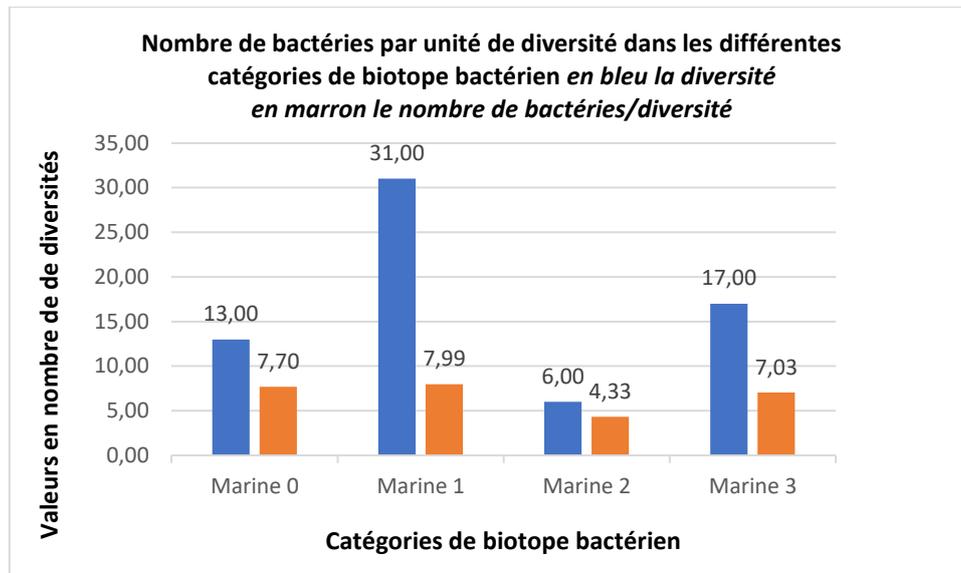
Au Miocène, il y a 17 à 15 millions d'années (ère « Langhien »), la mer s'est retirée et les mollasses limoneuses alpines ont recouvert les zones maritimes côtières. Les bactéries marines se sont trouvées alors piégées dans les molasses et les sédiments marins. La cavité est devenue une enceinte fermée restée isolée du monde extérieur jusqu'à nos jours.

Les analyses microbiologiques faites sur l'eau, les biofilms et les snottites, démontrent que la majorité des bactéries identifiées par PCR (analyse de l'ARNr 16s) sont des bactéries d'origine marine.

#### Bactéries marines trouvées dans la cavité

##### Catégories

- Marine 0 – bactéries du sol
- Marine 1 – bactéries d'eau douce
- Marine 2 – bactéries marines et d'eau douce
- Marine 4 – bactéries marines pur



Les bactéries typiques des sols et des eaux douces se trouvent dans une proportion quasiment identique en pourcentage par famille ou par genre avec une diversité fortement différenciée. Les bactéries marines dans leur ensemble (facultatives), en fonction de leur diversité, sont légèrement inférieures dans cette forme de calcul, leur diversité est faible mais les bactéries purement marines sont proches des deux premières valeurs.

#### **Comportement marin dans la grotte de Sulzbrunn**

Cette grotte a gardé une flore microbienne marine correspondant à la période où la mer était présente en Bavière. Une telle trace d'un passé aussi lointain nous permet de refaire l'histoire de sa formation et de voir comment ce peuple bactérien a pu venir jusqu'à nous sans problème majeur.

Une majorité de la flore correspond à une flore marine représentant 30,5 % de la flore totale avec une diversité de 40 % genres et familles de l'ensemble des structures.

- Flore marine exclusive = 24,27 % de la flore totale toutes structures confondues
- Flore marine stricte et marine facultative = 30,5 % de la flore totale toutes structures confondues.

Diversité des familles ou des genres analysés :

- Flore marine exclusive = 49 genres ou familles soit 30 % de l'ensemble.
- Flore marine exclusive et flore marine facultative = 63 genres ou famille soit 40 % de l'ensemble.

Le terme de bactéries exclusivement marines correspond aux bactéries retrouvées seulement en milieu marin.

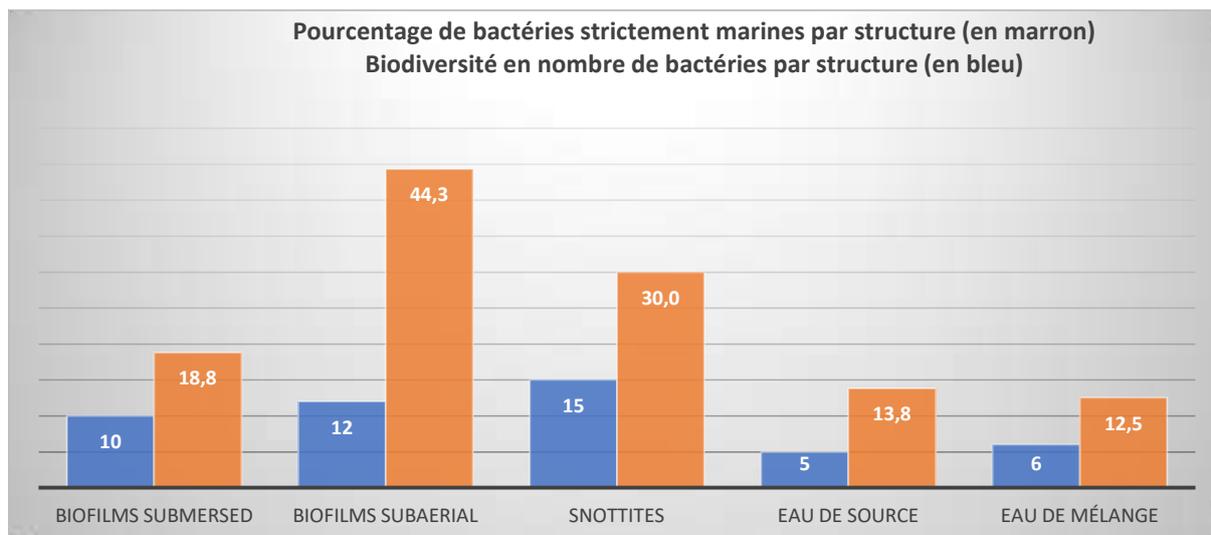
- Les biofilms « subaerial » comportent plus de bactéries marines que les autres structures.
- Les snottites viennent en second.
- Les biofilms « submersed » ont une différence significativement plus faible comparativement aux autres structures.
- Les eaux de la cavité sont proches des biofilms « submersed ».

Bien que proches des biofilms « subaerial » en pourcentage de flore les snottites ont une plus grande diversité microbienne par rapport aux autres structures leur donnant une différenciation.

Ces observations montrent que les biofilms « subaerial » et les snottites, présentent les caractéristiques marines de l'origine de cette cavité.

Le fait de leur isolation aérienne, par rapport aux eaux de la grotte, ayant coupé ces structures de l'influence extérieure donne à ces deux structures la potentialité de nous informer sur la flore marine l'initiale de cette cavité.

### Graphique de l'analyse globale des bactéries marines exclusives et bactéries marines



Les différences sur les pourcentages entre les différentes structures (biofilms et snottites) nous permettent le rejet des égalités des moyennes pour une probabilité de  $p > 0,99$ .

Il n'en est pas de même pour l'écart entre l'eau de source et l'eau de mélange permettant le rejet de l'hypothèse nulle avec une probabilité de  $p = 0,85$  (probabilité faible).

#### Caractérisation des bactéries marines

Pour plus de clarté, des étoiles ont été ajoutées afin de définir l'importance marine des familles ou bactéries classées dans le tableau suivant :

- \*) familles ou genres vivant dans les eaux douces.
- \*\*) familles ou genres vivant à la fois dans les eaux douces et dans la mer.
- \*\*\*) bactéries vivant exclusivement dans la mer.

#### Bactéries marines non-protéobactéries

Bacteroidetes	Planctomycetes	NC10	Verrucomicrobia
<i>Flavobacterium</i> * <i>Arenibacter</i> ***	<i>Phycisphaeraceae</i> ** <i>Phycisphaera</i> *** <i>Souche SM1A02</i> **	<i>Methylomirabilis</i> ***	<i>Verrucomicrobia</i> * <i>FukuN18</i> *
<i>Cytophagaceae</i> * <i>Cytophaga</i> *			
<i>Saprospiraceae</i> * <i>Saprospira</i> ***	<i>Planctomycetes</i> ** <i>Planctomyces Pir4</i> **		

- Les *Arenibacter*, bactéries marines et d'eau douce de la famille des *Flavobacteriaceae*, sont présentes dans les snottites et les biofilms « subaerial » avec une présence de 1,2 % de la flore totale dans chacune de ces deux structures.
- Les bactéries *NC10*, que l'on ne trouve que dans les biofilms « submersed », ne doivent leur présence ni à l'eau, ni à l'air, car elles sont très peu représentées dans l'eau et absentes dans les structures aériennes :  
Le *Methylomirabilis oxifera*, (environ 4,7 % de la flore des biofilms « submersed »). Cette bactérie fait partie des bactéries marines, elle a participé à la formation de l'oxygène sur notre planète.
- Les *Porphyrobacter*, bactéries marines sont présentes à 0,7 % dans les snottites, à 1,2 % dans les biofilms « subaerial » et à 2 % dans les biofilms « submersed » de la flore totale des structures. Ce sont des bactéries isolées dans l'eau de la mer orientale de Corée (en 2005). Il y a de fortes chances pour que les *Porphyrobacter* aient déjà été là à l'origine de cette cavité.

### Protéobactéries marines

$\alpha$ Proteobacteria	$\beta$ Proteobacteria	$\gamma$ Proteobacteria	$\delta$ Proteobacteria
<i>Hyphomonadaceae</i> ** <i>Hyphomonas</i> ***		<i>Pseudomonas</i> ** <i>P. iodooxidans</i> **	<i>Helicobacteraceae</i> * <i>Sulfurimonas</i> ***
<i>Porphyrobacter</i> ***	<i>Nitrosomonadales</i> ** <i>Gallionella</i> ** <i>Ferriphaselus</i> ** <i>Sulfuricella</i> **	<i>Alteromonadaceae</i> *** <i>Marinobacter</i> ***	<i>Campylobacteraceae</i> **
<i>Rhodobacteraceae</i> ***		<i>Methylococcaceae</i> ** <i>Methylomicrobium</i> *** <i>Methylomonas</i> ***	
<i>Rhodospirillaceae</i> **	<i>Rhodocyclaceae</i> ** <i>Rhodocyclus</i> **		
		<i>Crenothrichaceae</i> * <i>Crenothrix</i> *	

**Index :** \* bactéries d'eau douce ; \*\* bactéries marines et d'eau douce ; \*\*\* bactéries strictes marines  
Sur ces observations on remarque que beaucoup de familles, de genres et de souches sont issus de germes symbiotiques marins, vivant habituellement en symbiose sur des algues ou sur la faune invertébrée et crustacée aquatique.

Les *Gammaproteobacteria* vivent aussi bien dans l'eau de source (soit 10 % de la flore totale de l'eau de source) que dans l'eau de mélange (40 % de la flore de l'eau de mélange). Soit une proportion eau de source/eau de mélange de 0,25. Cette observation peut venir du fait que la contamination en *Gammaproteobacteria* aurait pour origine les eaux météorites venant de l'épi-karst.

#### Crenothrix : valeurs et rapport entre le biofilm « submersed » et l'eau de mélange

Biofilms	Eau de source	Eau de mélange	Rapport Biofilm/Eau m.
≈ 6,8 %	≈ 3,0 %	≈ 0.93%	≈ 7,3

Ce tableau montre que le biofilm « submersed » contient plus de *Crenothrix* que l'eau de mélange et que le passage entre le biofilm et l'eau est relativement réduit. Le *Crenothrix*, par son caractère hétérotrophe, peut s'adapter aux différents milieux et conditions climatiques méthanotrophes.

Concernant la purification méthanique de l'atmosphère, le *Crenothrix* présente donc un intérêt pour ses propriétés méthanotrophes moins dépendantes des conditions du biotope que les autres. Sa présence doit provenir de la formation de la grotte bien que cette bactérie, soit anaérobie facultatif. De ce fait, elle aurait pu résister au recouvrement de la cavité.

Les *Archaea* n'ayant pas fait l'objet de l'étude, ont sûrement été ou sont présentes dans l'eau de source minérale, car elles sont productrices de méthane par la méthanogenèse du gaz carbonique. Cette analyse nous permet de remonter le temps dans la formation de la grotte de Sulzbrunn. Une analyse plus détaillée pourrait nous permettre de définir la véracité de nos hypothèses et de nous permettre de suivre l'évolution de cette cavité.

### Bactéries du parasitisme marin, observées dans la grotte

Nom	Algues	Faune marine
<i>Spartobacteria</i>		+
<i>Cytophaga</i>	+	
<i>Pla46</i>	+	
<i>Phycisphaeraceae</i>	+	
<i>Rhodobacteraceae</i>	+	
<i>Rhodospirillaceae</i>	+	
<i>Methylomonas s</i>	+	
<i>Methylococcaceae</i>	+	
<i>Arenibacter et Marinobacter</i>	+	
<i>Methylomonas</i>	+	
<i>Epsilonproteobacteria</i>	+	+
<i>Sulfurimonas</i>	+	+

*Saprospiraceae* : cette famille bactérienne représente dans les snottites environ 0,3 % de la flore de cette structure, et dans les biofilms « subaerial » environ 2 %. On la retrouve dans une communauté de biofilms bactériens épiphytes colonisant les surfaces des algues marines

Ces bactéries s'attaquent aux diatomées et aux *Cyanobacteria*, cela peut expliquer l'absence de *Cyanobacteria* dans les biofilms « subaerial » et les snottites. Les molasses alpines auraient pu apporter ces bactéries en recouvrant le milieu marin à la formation de la grotte (*Cyanobacteria* sont présentes dans les lacs de montagne).

### Flore microbienne marine symbiotique des algues trouvées dans la grotte de Sulzbrunn

Familles Symbioses avec des algues	Familles Symbioses avec des invertébrés et animaux marins
<i>Saprospiraceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> (genre <i>Arenibacter</i> ) <i>Phycisphaeraceae</i> <i>Beijerinckiaceae</i> (genre <i>Methylocella</i> ) <i>Pir 46</i> <i>SM1 A02</i>	<i>Chthoniobacteraceae</i> <i>Helicobacteraceae</i> (genre <i>Sulfurimonas</i> )

La présence d'une symbiose bactérienne dans la grotte de Sulzbrunn est la preuve que la flore microbienne marine observée est bien une flore présente depuis l'origine de cette cavité.

### Flore microbienne ayant pu donner des endosymbiontes

Familles Endosymbiontes	Biotopes
<i>Candidatus CN (Methylomirabilis oxyfera)</i> <i>Chthoniobacteraceae (Xiphinematobacter)</i> <i>Methylobacteriaceae (Methylobacterium)</i> Ordre <i>Rickettsiales (Ehrlichia, Rickettsia)</i> <i>Methylococcaceae (Methylomicrobium)</i> <i>Epsilonproteobacter (Sulfurimonas)</i>	Océans et boues Invertébré ( <i>Xiphinema</i> ) Pin sylvestre Dans le sang animal et humain Dans les moules (faune et flore marine) Branchies d'un escargot de mer en eau profonde

L'existence d'une symbiose ou endosymbiose bactérienne entre une flore d'algues et une faune marine côtière, telles qu'elles ont pu exister il y a 33 millions d'années, signifie que ces algues, ces invertébrés, ces végétaux, sont bien présents dès l'origine de la grotte il y a 15 millions d'années. Malgré une période aussi longue on peut reconstituer cette biodiversité au travers de la flore microbienne.

### L'iode dans la grotte

La présence d'iode signalée dans cette cavité est aussi un facteur important : cela prouve que cette grotte a été avant tout un littoral recouvert d'algues marines, ces algues étant le support symbiotique de la flore observée.

**« La flore marine de la grotte de Sulzbrunn, représente  $\approx 30,5$  % de la flore totale toutes structures confondues, a pour origine la formation de la cavité.**

**Les données sur les bactéries marines montrent une relation entre la formation de la grotte sur le littoral marin, il y a 15 millions d'années, avec les bactéries actuellement présentes dans la cavité.**

**Les seuls points restants difficilement compréhensibles sont les questions :**

- **Comment cette flore a pu subsister pendant une période aussi longue ?**
- **À cette longue période d'existence, la spéciation a-t-elle eu une place dans l'évolution de la cavité ? ».**

## CHAPITRE 10 / SPÉCIATION ET ÉVOLUTION MICROBIENNE

La grotte de Sulzbrunn a donc été isolée du monde extérieur pendant 15 millions d'années ; durant cette période, à l'extérieur, les êtres vivants évoluaient par le biais des mutations génétiques et de nouvelles familles bactériennes, de nouveaux genres, de nouvelles espèces apparaissaient. La séparation entre l'enceinte de la cavité (endo karst) et l'extérieur (épi-karst) laisse au hasard le libre choix se modifier selon l'adaptation au niveau du biotope karstique afin que la biomasse présente vive dans les meilleures conditions.

### 10.1 Apparition de nouvelles espèces

Carole Smadja<sup>14,gg</sup> précise dans son étude : « Des espèces apparaissent même sans isolement géographique. Le dogme d'une séparation stricte entre espèces, prévalant depuis soixante ans, ne tient plus. Aujourd'hui la preuve est établie : deux espèces peuvent diverger tout en échangeant des gènes »

Ernst Mayr en 1940 précise l'isolement dans la spéciation : « Le concept sous-jacent est les suivant : pour que deux populations constituées d'individus appartenant à une même espèce divergente en deux nouvelles espèces, il faut que les deux populations soient séparées par une barrière physique infranchissable... Ces deux populations sont alors en situation d'allopatrie<sup>hh</sup>. De facto isolées l'une de l'autre sur le plan reproducteur, elles n'échangent aucun gène – on dit qu'il n'y pas de flux de gènes. Cette théorie étant en parfait accord avec le savoir naturaliste de Ernst Mayr : en tant qu'ornithologue, il était confronté à de nombreux exemples témoignant du rôle de l'isolement dans la spéciation.

Theodosius Dobzhansky s'interrogeait sur l'éventualité d'une spéciation avec flux gène des deux situations. Soit les deux futures espèces vivent sur le même territoire - on dit qu'elles sont en sympatrie<sup>ii</sup> et alors le flux de gènes est important. Soit les deux futures espèces divergent d'abord en allopatrie puis après avoir commencé à diverger, entrent en contact...

Il n'a pas été suivi dans sa réflexion, car les modèles théoriques d'alors prédisaient tous que la séparation avec flux de gènes était impossible. »

« Pour qu'un isolement reproducteur complet entre deux futures espèces ait lieu, il faut généralement une accumulation de nombreux d'effets barrières réduisant le flux de gènes entre les deux espèces. En revanche l'absence de barrière physique, rien n'empêche les individus de populations en cours de divergence de se croiser entre eux. Le flux de gènes inhérent à la reproduction sexuée ralentit l'évolution des effets barrières et rompt leur association, aboutissant à une homogénéisation des génomes. »<sup>10</sup>

Suivant le principe « d'isolement dans la séparation des espèces » d'Ernst Mayr notre grotte de Sulzbrunn possédait deux effets barrière :

- L'un entre l'endo-karst et l'épi-karst (cet effet barrière était infranchissable et il a subsisté pendant 15 millions d'années).
- L'autre est la barrière entre les parois des snottites et des biofilms permettant d'avoir une vie interne intense et une faible vie externe.

Ces deux effets de barrière auraient dû favoriser les mutations par le fait que les conditions du biotope étaient non-conformes à la majorité des germes d'origines marines. Germes s'étant retrouvés il y a 15 millions d'années dans des conditions de vie terrestre.

Les biofilms sont sûrement une façon de réagir à l'inconfort du biotope endo-karstique et pour résister aux agressions du milieu.

<sup>gg</sup> SMADJA Carole : chargée de recherche CNRS, à l'Institut des sciences de l'évolution de Montpellier, a récemment organisé avec Isabelle OLIVIERI et Fadela TAMOUNE, le colloque *Spéciation 2013* du programme européen *Frontiers of Speciation Research*.

<sup>hh</sup> Allopatrie : désigne le fait pour deux espèces divergentes d'avoir des aires de répartition différentes

<sup>ii</sup> Sympatrie : signifie que deux espèces divergentes occupent la même aire géographique.

Malgré cela les bactéries marines ont gardé pendant toute cette période de 15 millions d'années leurs caractères d'espèces et n'ont pas créé de nouveaux genres ou de nouvelles espèces bactériennes.

D'après le principe de Dobzhansky : les biofilms et les snottites par leurs diversités microbiennes dans un espace réduit créent une mini-biocénose interne, pouvant être considéré comme une absence de barrière.

La diversité des biofilms « submersed » est remarquable. Cela est sûrement dû à l'augmentation de l'Aw du milieu, lui-même étant fortement augmenté par l'eau osmotique apportée par les parois du biofilm. Cette diversité sans barrière physique pourrait expliquer l'absence de spéciation.

Mais Carole Smadja<sup>jj</sup> précise dans son étude : « *En revanche, en l'absence de barrière physique, rien n'empêche les individus de populations en cours de divergence de se croiser entre eux. Le flux de gènes inhérent à la reproduction sexuée ralentit l'évolution des traits "barrières" et rompt leur association, aboutissant à une homogénéisation des génomes. Dans les premiers modèles, cet effet apparaissait comme prépondérant, il dominait le phénomène de divergence à l'échelle des deux populations considérées. D'où la conviction que la spéciation était impossible en situation de flux de gènes. Il a fallu attendre les années 2000 pour cette façon de voir évoluer.*

*Mark Kirkpatrick de l'université du Texas (États-Unis d'Amérique) a développé de nouveaux modèles de spéciation plus complexes prenant en compte davantage de paramètres concernant les bases génétiques, a montré qu'il était possible, dans des conditions assez réalistes, de voir émerger un processus de spéciation en situation de flux de gènes. En particulier lors d'un contact secondaire entre populations en voie de différenciation, par un phénomène dit de renforcement. »*

## 10.2 Spéciation « par renforcement »

*« Deux populations issues de l'espèce d'origine divergent d'abord séparément, puis se rencontrent. Des hybrides sont produits au niveau de la zone de contact. S'ils sont moins performants que leurs parents, l'hybridation diminue et la spéciation s'achève. Dans la spéciation sympatrique, la divergence est déclenchée par adaptation à l'environnement, en dépit de contacts constants. La production d'hybrides est initialement importante. »*

Dans notre cas les bactéries sont asexuées, mais ont la possibilité d'échanger une partie de leurs codes génétiques par le transfert dû au pilis.

## 10.3. Les vecteurs de spéciation chez les bactéries

La spéciation aurait pu se produire lors :

- **Des échanges sexuels<sup>kk</sup>** : contrairement à une opinion courante, les bactéries, ont bel et bien une vie sexuelle. Elle fut décrite voici une cinquantaine d'années par Joshua Lederberg, Elie Wollmann et François Jacob. Les bactéries n'ont pas besoin de sexualité pour se reproduire, puisqu'elles les font par simple division cellulaire. Mais elles peuvent échanger des gènes à l'occasion. Les échanges de chromatine se font par le pilis ou les prosthecae. Mais il existe dans ce cas des bactéries donneuses d'ADN (plasmides) par l'intermédiaire du pilis<sup>ll</sup> et des bactéries accepteuses de plasmides. C'est une forme que l'on peut assimiler à une sexualité, car il y a une concordance entre donneur et récepteur.

---

<sup>kk</sup> **Sexualité bactérienne : le processus sexuel strict** qui nécessite un **contact préalable** et un appariement entre bactéries de sexe différent (hétérothaliques) avec la formation d'un pont cytoplasmique permettant les échanges bactériens dont celui du chromosome. Le **facteur de sexualité ou de fertilité (F)** permet la synthèse de **pilis sexuels** chez la bactérie donatrice ou mâle et donne la polarité au chromosome. Le transfert d'ADN chromosomique est à sens unique, orienté, progressif et quelquefois total (2 h).

Ces transferts par les plasmides de l'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien **doivent être suivis de recombinaison génétique** dite légitime (s'il provient d'une même espèce ou d'une espèce voisine). Dans d'autres circonstances, l'ADN peut ne pas se recombiner (cf plasmide). Ces transferts sont unidirectionnels, le plus souvent partiels (1 à 2 % du génome transféré) et d'efficacité faible (fréquence de recombinaison de l'ordre de 10<sup>-6</sup>). D'une part, il doit y avoir de l'ADN libéré d'une bactérie (exogénote). D'autre part celui-ci doit être fixé sur une bactérie réceptrice en phase de compétence.

<sup>ll</sup> **Pilis** : organes d'échange de plasmide entre les bactéries, ce sont des formes tubulaires qui permettent de relier deux bactéries, ces pilis sont les organes qui vont jouer un rôle dans la résistance aux antibiotiques par l'échange de plasmide qui contient les facteurs chromosomiques de résistances.

Les bactéries de la grotte de Sulzbrunn étant capables d'échanger des gènes par la voie prosthécales sont les *Hyphomicrobiaceae*, *Caulobacterales*, *Rhodospirillaceae*.

- **Les modifications transcriptionnelles** comme dans l'épigénétique ; cette modification des ARN est une étape importante du contrôle de l'expression des gènes, on considère généralement que les différentes modifications sont les éléments de régulation post-transcriptionnelle<sup>mm</sup> de l'expression des gènes. Elle peut aussi avoir un rôle important dans la spéciation par la formation de mutation.

Il a été montré que chez les bactéries le temps nécessaire pour passer d'une génération à une autre varie beaucoup selon l'environnement : de dizaines de minutes à 210 jours<sup>15</sup> Le taux de mutation dans la nature n'est pas constant.

On connaît le taux de base de mutation chez les bactéries étant de l'ordre d'une mutation pour 300 générations, Mais c'est un taux mesuré quand tout va bien, quand le nombre de bactéries croît de manière exponentielle. Ce taux varie avec l'environnement. Le taux de mutation augmente sensiblement lors de carences alimentaires... Ainsi, il augmente lors du vieillissement d'une colonie bactérienne dont les ressources viennent à manquer<sup>16</sup>. On sait que le taux de mutation varie d'un gène à l'autre. Qu'une mutation dans un gène essentiel a un effet négatif. Mais certains gènes même importants peuvent avoir « intérêt » à muter de temps en temps.

*Petit groupe de gènes bactériens réparateur de l'ADN<sup>17</sup>*

*Pendant la division cellulaire, le chromosome est soumis à des contraintes importantes, éventuellement accrues par les agressions dues à l'environnement. Il existe plusieurs systèmes de réparation destinés à raccommoquer différents types d'altération.*

- *Lésions chimiques et erreurs de copie. Une erreur courante est le mésappariement. C'est se produisant lorsque deux bases d'ADN sont mal appariées (décrit par Crick et Watson), nous avons là une déformation de l'hélicité. Elles sont identifiées dans ce système par un groupe de protéines chargé de les corriger (c'est le système SRM).*

*Le système dit SOS s'enclenche quand l'intégrité du génome est en danger ou, tout ou moins, quand le mécanisme de réplication est entravé ou freiné (Ultra-violets, température, agents chimiques, carences naturels...).*

*La réplication de l'ADN se fait mal et l'on voit apparaître de l'ADN inter-brin. De même que le système SRM repère aussitôt une base mal appariée, le système SOS repère l'ADN simple-brin. Le premier rôle revient à une protéine de choc, la RecA, produite par l'un des gènes du régulon SOS ; RecA est aussi la molécule jouant le rôle phare dans toutes les opérations de recombinaison, du mariage entre fragment de l'ADN identiques ou semblables. Son existence a été postulée dès le début des années 1970 pour rendre compte d'une multiplicité de phénomènes jusqu'alors non reliés entre eux. On parvient à une connaissance plus fine de ces mécanismes au niveau moléculaire. Il est constitué d'une vingtaine de gènes au moins, étant coordonnés pour jouer un rôle régulateur.*

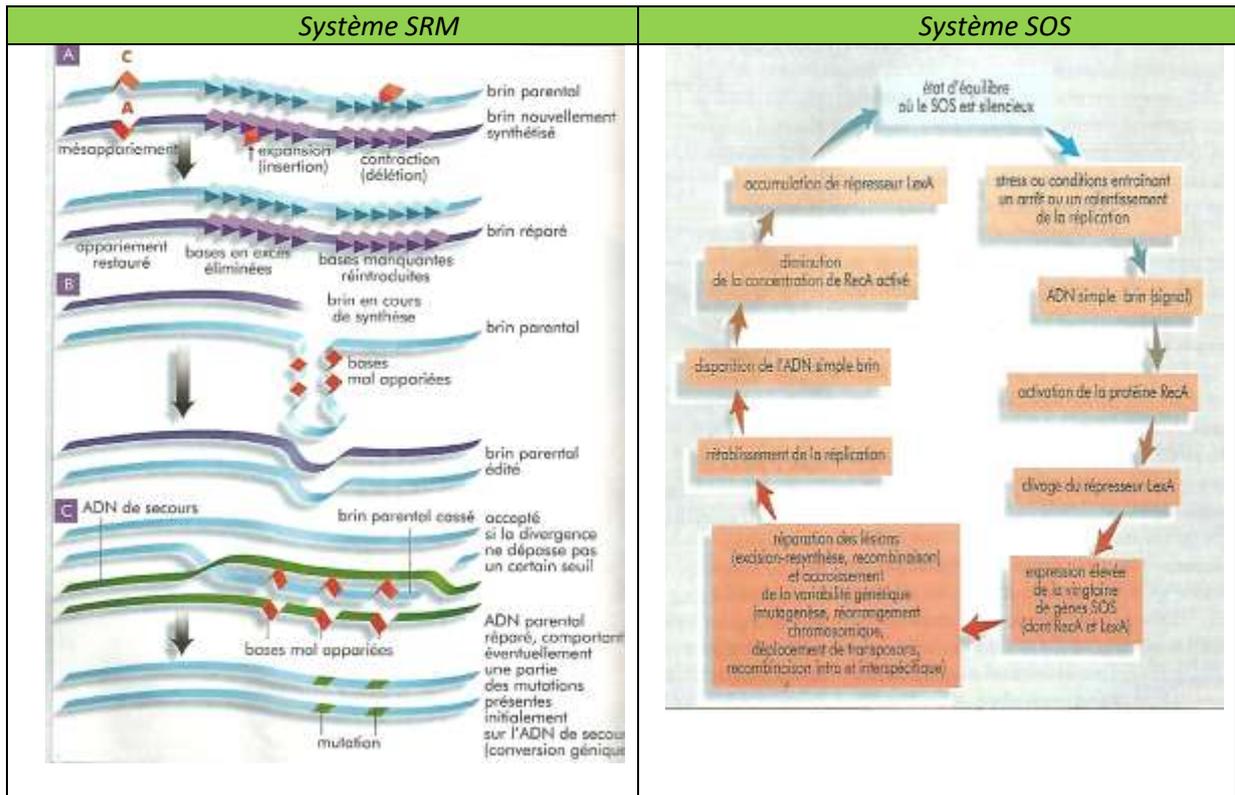
---

<sup>mm</sup> **Modifications transcriptionnelles** : la modification post-transcriptionnelle des ARN est une étape importante du contrôle de l'expression des gènes, on considère généralement que les différentes modifications sont les éléments de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Ces différentes modifications peuvent influencer sur différentes caractéristiques de l'ARN, telle que sa stabilité, sa capacité à être traduit ou bien même modifier la séquence à traduire. La plupart des ARN sont modifiés post-transcriptionnellement, mais la nature des ARN modifiés varie entre procaryote et eucaryote, et entre le noyau et les organites chez les eucaryotes.

- Segmentation
- Modification des extrémités.
- Ajout de la coiffe en 5'
- Formation d'une coiffe.

Chez les eucaryotes, certains ARN, et en particulier les ARN messagers, subissent une modification de leur extrémité 5', qui la protège contre la dégradation par des exonucléases. Cette modification, appelée coiffe, consiste en l'addition d'une 7-méthylguanosine sur le premier nucléotide de l'ARN, par une liaison 5'-5' triphosphate[1]. Les deux premiers riboses de l'ARN transcrit peuvent aussi subir une méthylation de leur position 2'.

## Réparation des erreurs de transcription



### Système SRM<sup>18</sup>

Ce système répare aussitôt une base mal appariée. Le premier rôle revient à la protéine RecA, produite par l'un des régulateurs SOS.

Dans la duplication cellulaire, divers incidents peuvent se produire sur les brins ADN, entraînant des anomalies. Il existe plusieurs systèmes de réparation. Le système SRM agit à la fois pour réparer les erreurs ponctuelles de l'ADN et pour contrôler ce que l'on appelle la recombinaison<sup>nn</sup>.

- Le système SRM agit par l'action d'enzymes intervenant quand un brin d'ADN erroné vient d'être synthétisé. Le brin parental sert de référence pour éliminer ces anomalies sur le nouveau brin : base erronée (mutation ponctuelle), base en excès (expansion), base manquante (contraction). Les signaux déclenchant l'intervention du SRM sont des signaux biochimiques bien localisés de l'ADN, étant loin de l'endroit du mésappariement des bases et servent à discriminer l'original copie.
- Le SRM intervient aussi en amont de la synthèse sur le brin parental, pour prévenir l'apparition de délétions là où existent des structures secondaires contenant des mésappariements de bases (transposons...) Le SRM agit en déroulant le brin parental. Il agit à la préservation intégrité de l'espèce.
- La recombinaison homologue est un autre système de réparation, intervenant lorsque les deux brins sont simultanément endommagés ou quand des erreurs subsistent après la réplication. Dans ce cas une protéine spécialisée (RecA) va aller chercher sur une molécule d'ADN synthétisée au cours de la réplication d'une région présentant une identité de séquences suffisante avec le ou les brins lésés et va nouer une sorte d'épissure permettant de restaurer l'information manquante. Le SRM assure que lors de la recombinaison entre ces séquences d'ADN partiellement différentes (dites divergentes), la différence n'excède pas un certain seuil risquant de provoquer un réarrangement chromosomique ou d'autoriser la recombinaison avec une séquence provenant d'une espèce différente. Si le SRM est inactivé l'ADN lésé peut se

<sup>nn</sup> Cette absorption d'ADN polymérisé est suivie d'une recombinaison génétique légitime avec acquisition de nouveaux caractères génétiques stables, donc transmissibles à la descendance dénommée recombinants ou transformants.

marier avec de l'ADN venu d'une autre espèce. Rappelons que la recombinaison homologe est la seule manière de réparer l'ADN quand les deux brins sont cassés. La protéine RecA va restaurer la séquence manquante en allant chercher l'original du texte génétique sur une autre molécule d'ADN, acquiesçant à la polymérase de resynthétiser les deux brins manquants. La recombinaison n'introduit que secondairement une variabilité génétique accrue. Son but premier, immédiat, est de réparer. Dans le système SRM il a été observé une mutation de sexualité interspécifique entre deux souches : les recombinaisons produisent aussi bien par l'intermédiaire de plasmides que par celui des virus. Il suffit en réalité de provoquer une mutation sur l'un ou l'autre des deux principaux gènes du SRM appelés mutS et mutL, pour l'inhiber et autoriser cette sexualité interspécifique. En temps normal, la protéine codée par le gène mutS est spécialement chargée de réparer l'erreur de mésappariement. Le rôle du gène mutL est moins clair.

### Système dit SOS<sup>19</sup>

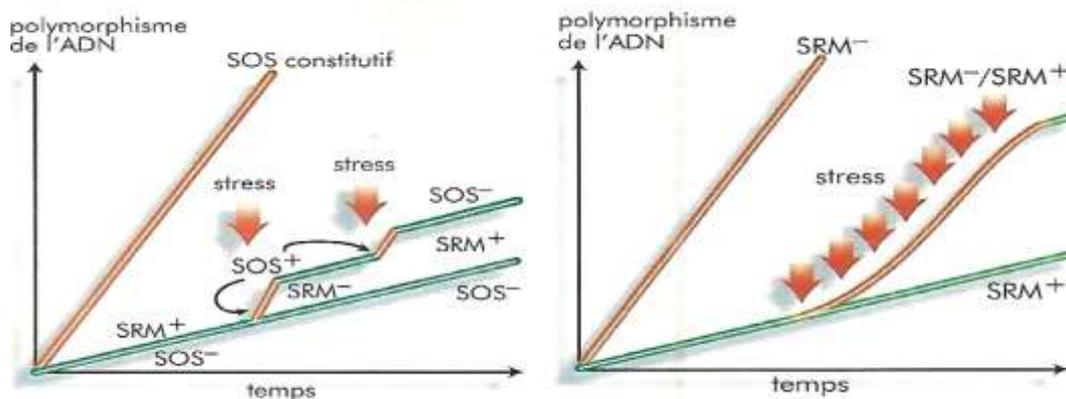
Ce système utilise une vingtaine de gènes au moins, se coordonnant pour jouer un rôle régulateur (régulons) d'une protéine

Le système SOS est toujours activé lorsqu'une situation de stress entraîne une altération de la réplication de l'ADN et la production d'ADN simple brin, servant de signal déclencheur. Le système SOS peut même être activé en absence de source exogène de lésions de l'ADN. Il est induit au bout de 48 h dans des colonies bactériennes vieillissantes dont le taux de croissance est ralenti, situation courante dans la nature. Il faut noter que le Système SOS peut aussi intervenir sur des morceaux d'ADN étrangers découpés par les enzymes de restriction. Le système SRM n'entrave pas le système SOS, mais continue de freiner la recombinaison interspécifique même en cas d'activation du système SOS. Le système SOS exerce de multiples fonctions dont certaines sont en action avec une intensité variable.

Les deux systèmes (SRM et SOS) agissent sur la variabilité génétique de manière opposée : le SRM réprime ce que le SOS active.

Quand l'environnement est favorable, le système SRM est pleinement activé et contrôle rigoureusement la barrière d'espèce.

Dans ce cas le système SOS n'est pas activé. Quand survient un stress environnemental susceptible de porter atteinte au bon fonctionnement de la réplication et donc à l'intégrité du génome, le système SRM est inhibé et le système SOS est activé. Les deux systèmes expriment l'idée qu'entre un taux de mutation trop important entraînant la mort immédiate et un taux insuffisant se traduisant par une incapacité à s'adapter, il existe un taux de mutation optimal, maximisant la valeur adaptative.



À droite : Système SRM coupant les gènes étant mal appareillés

À gauche : Système SOS réparant les gènes abîmés avant ou pendant la transcription

### **Stress et système SOS :**

Un stress environnemental induit une réponse du système SOS augmentant la mutagenèse de manière transitoire. L'opération, peut se répéter. Après la période de stress, le système SOS est désactivé et le système SRM reprend sa fonction de gardien. Le polymorphisme de l'ADN s'est davantage accru comme si les épisodes de stress n'avaient pas eu lieu.

### **Stress prolongé et système SRM :**

Dans le cas où le système SRM se prolonge, le système SRM est susceptible de muter. Les allèles mutation sélectionnés favorisent un taux de mutation environ cent fois plus élevé. La droite du système SRM indique la vitesse à laquelle le polymorphisme s'accumulerait si le système SRM était complètement inactivé. Il existe une synergie entre les effets du SRM et ceux du SOS (effet aditif, voir multiplicateur).

**« Suite à ces constatations, les bactéries marines de la grotte de Sulzbrunn ont dû s'adapter au milieu terrestre, provoquant de ce fait un stress relativement long.**

**Dans ce cas, elles auraient dû subir des mutations pour leurs adaptations. »**

### **10.3.1 Facteurs de spéciation**

- **Les bactériophages peuvent être un facteur de spéciation :**

Ils auraient pu réaliser les transferts l'ADN de bactérie à bactérie, afin d'obtenir les modifications génétiques pour aboutir à de nouvelles espèces. Les bactériophages sont des outils fondamentaux de recherche et d'étude en génétique moléculaire. Les bactériophages servent entre autres de vecteur de clonage et de transfert de gènes. Ils sont présents dans l'ensemble de la biosphère en quantité plus importante dans les excréments, le sol et les eaux d'égout. La découverte de l'activité des bactériophages par Frederick W. Twort date de 1915 remarquant alors que des colonies de microcoques prennent parfois un aspect vitreux, dû à une destruction des cellules bactériennes, et que cette caractéristique est transmissible à des colonies normales par simple contact. Les bactériophages auraient pu dans notre cas effectuer des mutations par transfert de gènes.

- **La présence de virus :**

Tels que les *Retroviridae* étant une famille de virus regroupant les sous-familles suivantes : *Orthoretrovirinae* et *Spumaretrovirinae*<sup>oo20</sup>. Ce sont des virus à ARN monocaténaire de polarité positive, infectant les vertébrés. Ils se distinguent notamment par la présence d'une enzyme virale : la transcriptase inverse (TI, ou encore RT pour *reverse transcriptase*) rétro-transcrivant leur génome d'ARN en ADN pour être intégré par la suite dans le génome de la cellule hôte. Assemblage et maturation de virions grâce aux protéases virales, puis bourgeonnement et libération des nouvelles particules virales dans le milieu extracellulaire (seul problème dans ce cas, la présence de cellules de vertébrés est indispensable pour qu'un tel processus se produise).

- **Le système génétique CRISPR\_Cas9 :**

C'est un système immunitaire bactérien contre les attaques virales sur des bactéries. Le système appelée CRISPR a pour effet de mettre en mémoire dans une chaîne chromosomique les copies des chaînes d'ADN ou ARN virales. Lors d'une attaque virale, l'enzyme Cas-9 pourra couper les parties de l'ADN microbien seraient occupées par la chaîne de séquence virale.

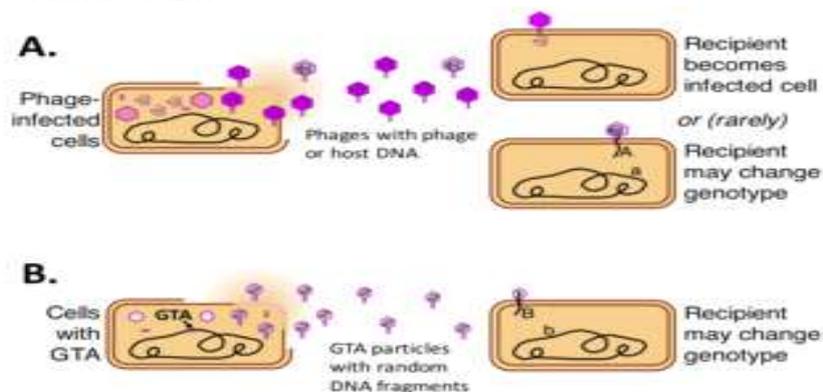
Cette coupure protégeant la bactérie peut aussi être une source d'erreur de transcription, il y aura donc possibilité de mutation.

---

<sup>oo</sup> *Spumaretrovirinae* (sous classe de virus)

Classe : *incertae sedis* ; Ordre : *Ortervirales* ; Famille : *Retroviridae* ; Genres : *Brovispumavirus*, *Equispumavirus*, *Felispumavirus*, *Prosimiispumavirus*, *Simiispumavirus*.

## Procédure de transfert d'ADN :



La bactérie (A) contient un agent de transfert (GTA) :

Le virus ou bactériophage introduit dans la bactérie (A) son ADN viral, sera décodé par la bactérie et transformé en virus.

Dans cette transcription, il se crée des virus dont une partie contient l'agent de transfert de la bactérie (A), agent étant emporté par les virus.

De cette bactérie (A), il va sortir des virus dont certains contiennent l'agent de transfert.

Ces virus vont à leur tour infecter d'autres bactéries (B) et une bactérie (C), sera à leur tour traduire l'ADN viral et dans le cas où cet ADN est en présence de l'agent de transfert, ces bactéries vont fixer à l'ADN viral l'agent de transfert (production d'un ADN hybride), cas de la bactérie (C).

De cette opération, il va sortir de la bactérie C (avec agent) des virus dont certains seront porteurs de l'ADN viral, ayant fixé l'agent de transfert.

De cette bactérie (C), il va sortir des virus hybrides dont leur ADN contiendra l'ADN de l'agent de transfert (l'ADN du virus lié à l'ADN agent de transfert).

Ces virus hybrides vont infecter une bactérie (D), chassant décodé l'ADN hybride (l'ADN virus+ l'ADN agent de transfert) mais cette bactérie (D) va mettre en place un système de défense type **CRISPR-Cas9<sup>PP</sup>**, consistant en l'élimination de l'ADN viral, mais laissera en place l'ADN de l'agent de transfert et reconstruira l'ADN de la cellule.

Dans ce cas nous avons une fixation de l'ADN de l'agent sur l'ADN de la bactérie (D) on aura ainsi une mutation de cette bactérie et la destruction de l'ADN viral par l'enzyme Cas9.

L'ADN peut alors devenir partie du génome des cellules réceptrices (mutation et hybridation).

Cette technique est utilisée en génie génétique.

**« Les Rhodobacterales présents dans la grotte de Sulzbrunn sont des bactéries capables d'avoir ce système de défense virale CRISPR-Cas9, de ce fait elles peuvent produire des mutations et des nouvelles variétés microbiennes. »**

### Système CRISPR\_Cas9

Trois CRISPR\_Cas9 intercalaires dans les régions du génome du *Saprospira grandis* ont été identifiés et mis en évidence sur un total de 429 séquences. Ce nombre est le plus important parmi tous les *Bacteroidetes* séquencés à ce jour.

<sup>PP</sup> **CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)** : groupe de séquences d'ADN trouvés dans les génomes des procaryotes.

<sup>PP</sup> **Cas9** (ou « associée à CRISPR 9 ») : enzyme qui utilise les séquences CRISPR comme un guide pour reconnaître et s'attacher des brins d'ADN qui sont complémentaires à la séquence CRISPR (hybridation en vue de la destruction de l'ADN viral).

Cas9 enzymes ainsi que de séquences CRISPR forment la base d'une technologie appelée **CRISPR/Cas9** qui peut être utilisé pour modifier des gènes au sein d'organismes (ciseau génétique).

Ce type de processus d'édition de gène a une grande variété d'applications dont l'utilisation comme un outil de recherche de biologie fondamentale, le développement des produits biotechnologiques et potentiellement pour traiter les maladies.

Ces séquences sont tirées de fragments d'ADN de virus, ayant précédemment infecté le procaryote et servent à détecter et détruire les ADN des virus semblables au cours des infections ultérieures (immunité bactérienne).

C'est pourquoi ces séquences jouent un rôle clé dans le système de défense antivirale des procaryotes.

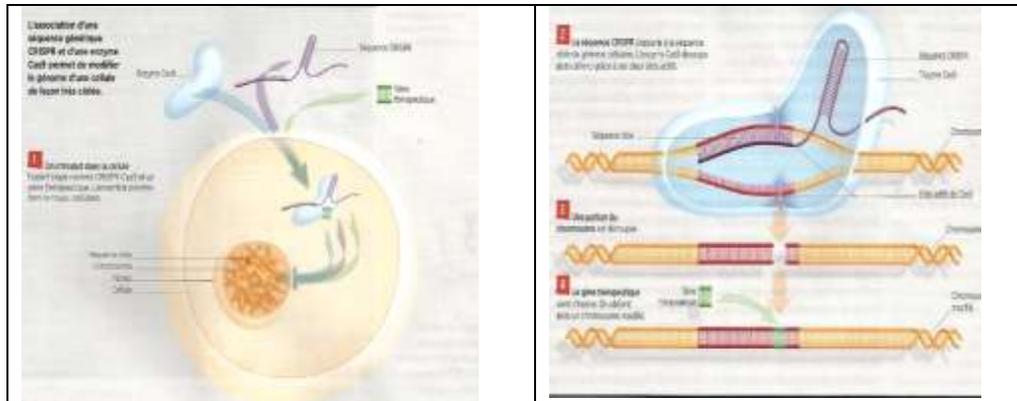


Schéma de La Recherche N° 21 – Mars -Avril 2017

- **La formation d'« indel<sup>99</sup> »**

« l'indel » est un mot valise utilisé en génétique et en bio-informatique pour désigner une insertion ou une délétion dans une séquence biologique (acide nucléique ou protéine) par rapport à une séquence de référence. On peut en particulier mettre en évidence des « indels » lorsqu'on effectue des comparaisons au moyen de programmes d'alignement des séquences. Le terme « indel » a été introduit parce que la notion d'insertion ou de délétion est relative suivant le choix de la séquence utilisée comme référence : à une insertion dans une séquence correspondant à une délétion dans la séquence lui étant comparée. « Indel », permet ainsi de désigner globalement la variation biologique, sans préjuger de quelle séquence constitue la référence. Le mot « indel » a été inventé par le mathématicien Josep Kruskal.

Les indels sont des mutations génétiques donnant lieu à des variations de séquence, soit au sein de la même espèce (c'est un exemple de la variation allélique), soit entre espèces au cours de l'évolution. Chez l'homme il y a eu 500 000 sites polymorphiques correspondant à des indels.

Il existe aussi un « micro-indel » étant défini comme un « indel » se traduisant par une variation nette de 1 à 50 nucléotides.

**« "Indel" peut être comparé à une mutation ponctuelle. Un indel insertion et suspension remplaçant un ou des nucléotides d'une séquence, alors qu'une mutation ponctuelle est une forme de substitution remplaçant un ou des nucléotides sans modifier l'ADN. »**

- **L'épigénétique bactérien**

L'épigénétique peut être aussi une raison de produire des mutations : elle consiste en une méthylation de l'ADN bactérien permettant la protection de l'intégrité du génome microbien par une absence de lecture. Il s'agit d'un mécanisme très ancien, inhibant l'activation d'éléments mobiles (viraux ou bactériens) ayant pénétré dans la cellule<sup>21</sup>. Les ADN étrangers introduits dans la cellule possèdent une méthylation différente par rapport à l'ADN de la cellule bactérienne réceptrice. Ces ADN étrangers sont donc dégradés par des enzymes de restriction sensibles à la méthylation et spécifique d'une séquence, tandis que l'ADN bactérien

<sup>99</sup> **Indel** : Exemple : Les séquences génétiques ci-dessous montre un indel de trois nucléotides dans la séquence du chromosome humain n°7. Il correspond à la mutation ΔF508 dans le gène CFTR. C'est l'une des mutations les plus fréquentes induisant la mucoviscidose.

\_ATCATCTTTGGTGTT\_  
\_ATCAT - - -TGGTGTT\_

n'est pas reconnu par cet enzyme<sup>22</sup>. Par conséquent, la méthylation de l'ADN agit comme un système immunitaire primitif permettant aux bactéries de se protéger contre l'infection par un bactériophage.

Les bactéries possèdent la faculté de métyler la position N6 des adénines situées dans les séquences GATC par l'action des N-adénine méthyltransférases ou méthylases *Dam* ou les cytosines en première position des séquences CCAGG et CCTGG par l'action des *Méthylases Dcm*<sup>23</sup>. Il existe une troisième classe de méthylases bactériennes les méthylases EcoK1 métylant l'adénine en position 4 et 5 respectivement dans les séquences suivantes : AACAGTC et GCACAGTT. Cette observation nous montre que l'épigénétique bactérien existe et peut soit protéger l'ADN bactérien des risques d'altération, soit modifier la lecture de cet ADN pour s'adapter au milieu. Ces adaptations reproduites sur plusieurs générations finissent par devenir une mutation.

### Les bactéries de la grotte de Sulzbrunn peuvent utiliser l'épigénétique

Exemples :

- *Sapropira* utilisant le système CRISPR\_Cas9 pour se défendre des virus bactériophages par un système immunitaire bactérien mémorisant le passage du virus en créant une enzyme (CRISPR\_Cas9) pour le détruire.
- Les *Caulobacter* utilisent aussi la méthylation afin de modifier la transcription de l'ADN grâce à une enzyme CcrMADN méthyltransférase pour modifier la transcription de l'ADN.
- Les *Sulfurimonas* ont une spéciation dépendante plus de la position géographique, que du milieu hydrothermal dans laquelle se trouve la bactérie.

### 10.3.2 Recherche des nouvelles espèces

Afin d'identifier les bactéries ayant mutées, nous avons examiné les bactéries n'ayant pas pu être reconnues par PCR, elles sont cultivées (OTU), mais non connue :

Snottites :	5,5 %
Biofilms « subaerial » :	8,1 %
Biofilms « submersed » :	4,5 %
Eau minérale provenant de l'extérieur :	14,5 %
Eau de mélange :	9 %

Les valeurs non- identifiées en CPR sont un peu plus faibles chez les snottites et les biofilms « submersed », comparativement à l'eau de la grotte venant de l'extérieur. Bien que ces résultats ne soient pas significatifs, ils montrent une tendance à une plus grande stabilité pour les bactéries restées dans la grotte (biofilms, snottites) comparativement aux bactéries de l'extérieur.

L'évolution génétique microbienne dans cette grotte a été relativement pauvre durant cette période de 15 millions d'années. Il n'y a pas été mis en évidence de mutations microbiennes spécifiques.

### 10.4 Absence de spéciation observée

Une absence de spéciation, suite aux observations précédentes est difficile à admettre après 15 millions d'années de vie dans un milieu défavorable.

En prenant pour base une anomalie tous les 210 jours, étant les cas les plus favorables, cela donne après 15 millions d'années d'isolement bactérien, une valeur d'erreurs de transcription génétique possible de plus de 26 millions par lignée de bactérie, par exemple : dans le cas de l'eau de mélange de la grotte ayant en flore bactérienne  $1,6 * 10^5$  g/g, on a eu en 15 millions d'années il y a  $4,16 * 10^{13}$  erreurs de transcription, soit 7 600 erreurs par jour et par ml.

Il est donc difficilement imaginable que dans une telle quantité d'erreurs génétiques, il ne soit pas apparu de genres, d'espèces ou de souches nouvelles différenciables des souches bactériennes extérieures à cette cavité (souche de l'épi-kart).

Quelques soient les principes de spéciation, par l'effet barrière ou par renforcement, il n'a pas été possible de mettre en évidence par une analyse PCR, une variation de classe, de famille, de genre ou

d'espèce dans la flore examinée, ainsi qu'il n'a pas pu être établi qu'il y ait eu un échange de caractère génétique entre les bactéries.

Peut-être y a-t-il eu des variations plus fines n'ayant pas pu être vérifiées (modification de sérotype ?), cela reste à vérifier.

## 10.5 Dans le cas d'une non-spéciation

Les raisons de cette non-évolution et cette absence de mutations microbiennes seraient un sujet d'étude intéressant à approfondir. Les bactéries ont une durée de vie relativement courte et se multiplient plus rapidement que la faune ou la flore métazoaire. Il devrait donc y avoir eu davantage de mutations ou de modification du génome.

Question que nous pouvons poser sur cette non évolution, pouvant se définir en trois hypothèses :

- **Y a-t-il eu un arrêt de croissance ou une dormance dans la flore des structures (snottites, biofilms « subaerial », biofilms « submersed ») :** Cela ne semble pas être le cas. Les mesures du métabolisme du méthane, faite par le carbone <sup>13</sup>C nous montraient qu'il existe une activité oxydante dans ces structures.

- **Y-a-t-il une action des rayonnements solaires sur les mutations observées dans épi-karst, ne se produisant pas dans le karst ?**

Il a été remarqué qu'il existe un concept d'horloge moléculaire : Elle permettrait de dater l'évolution et les divergences des différentes espèces du vivant. Chacun voit son génome subir des mutations étant soit avantageuses, soit délétères, soit neutres. Les variations de la vitesse d'évolution moléculaire, sont parfois spectaculaires, parfois inexistantes.

Cette diversité de la spéciation reste inexplicée. Dans notre cas la diversité microbienne doit donner une diversité de vitesse de spéciation donc une augmentation de la probabilité de mutation dans le temps.

- **Y-a-t-il eu la même évolution dans la grotte (dans le karst) et dans l'épi-karst (spéciation parallèle au travers de barrières phylogénétiques), ne permettant pas de différencier la spéciation ?**

Dans cette hypothèse, la théorie du hasard de Charles Darwin sur la sélection naturelle, doit être modifiée. Car il y a bien là une barrière entre karst et épi-karst, avec un milieu hostile à une population microbienne mal adaptée à ce milieu (population d'origine marine). L'adaptation au milieu a provoqué chez les bactéries une formation de snottites et de biofilms montrant que les bactéries étaient mal adaptées à ce milieu.

Une diversité de la flore microbienne permettrait de trouver une espèce ayant une vitesse d'évolution plus rapide que les autres. Malgré cela il n'y a pas eu de modifications génétiques importantes entre les bactéries de l'intérieur de la grotte et les bactéries vivant dans épi-karst.

## 10.6 Le karst garde ses mystères

« Observations faites par Eigennam :

*La fréquence moyenne des battements des opercules du poisson troglobie américain **Amblyopsis spelaeus** est d'une vingtaine par minute, alors que celle de **Chologaster papiliferus** épi-karstien est de 80 battements*

*Observations de René Ginet et Vasile Decou<sup>24</sup> :*

*Il y a une plus grande longévité des animaux troglodites<sup>rr</sup> lorsqu'ils séjournent continuellement dans une grotte, comparativement à ceux de la même espèce vivant exclusivement à l'extérieur. Cette observation peut signifier qu'il y aurait une action plus mutagène dans les conditions de l'épi-karst que dans l'endo-karst ».*

La distorsion du temps dans l'espace karstique est souvent invoquée : il semble que nous avons dans la grotte de Sulzbrunn un rythme de vie au ralenti, mais une distorsion du temps ayant duré 15 millions d'années cela semble impossible.

---

<sup>rr</sup> **Troglodites** : animaux d'origines diverses, hôtes accidentels des cavernes, ils pénètrent dans les grottes soit volontairement soit accidentellement.

## 10.7 Conclusion de la spéciation

Laurent Loison nous dit : « *Comme le formulait à l'extrême le Britannique Richard Dawkin dans les années 1970, l'organisme n'est finalement qu'un véhicule portant et transmettant les gènes : peu importe la manière dont l'individu se construit et réagit avec son environnement, cela n'a pas d'importance.*

**« Mais depuis une trentaine d'années, avec notamment la découverte des gènes du développement et des processus épigénétiques, l'organisme redevient un point important. »**

Nous voyons dans cette étude bibliographique, qu'il faut étudier les possibilités de spéciation de cette cavité étant dues à l'action du temps.

Il serait donc important d'avoir une analyse plus précise dans la définition des espèces rencontrées dans la grotte de Sulzbrunn, afin que l'on puisse mieux identifier les espèces et les éventuelles mutations, ayant pu se produire pour mettre en évidence la diversité microbienne après un isolement de 15 millions d'années.

## CHAPITRE 11 / LA BIOCCÉNOSE BACTÉRIENNE

**E**lle a permis de révéler une biocénose intéressante, ayant survécu en autarcie pendant 15 millions d'années en semi-anaérobiose.

Au cours des 33 millions d'années où la mer était en Bavière, la faune et la flore s'est transformée au cours du temps grâce aux bactéries marines et autres ont mis en place une biocénose équilibrée, leur permettant de vivre pendant 15 millions d'années dans une cavité réduite contenant du méthane, du gaz carbonique, et de l'air.

L'étude faite par cette équipe allemande, (analyse PCR de l'ARNr 16S), a mis en évidence une diversité microbienne équilibrée en biocénose anaérobie stable ; leurs a permettant une pérennité aussi importante.

Les résultats bactériologiques montrent que 30 % des bactéries de cette cavité sont d'origine marine, un grand nombre étant anaérobies, autotrophes, méthanotrophes et méthylotrophes.

L'apparition du méthane et du gaz carbonique a rendu le milieu plus ou moins anoxique. Ce manque d'oxygène a sûrement dû être un point important dans la sélection microbienne.

*« L'idée d'écosystème s'impose suite à la constatation que les espèces coexistant dans le milieu naturel montrent des dynamiques interactives et, par ailleurs, qu'elles interagissent collectivement avec le milieu physique ambiant, les conditionnant et qu'en même temps elles modifient.*

*L'évidence s'est d'abord imposée que les espèces d'un peuplement naturel ne se sont pas associées au hasard de leurs rencontres. Des nombreux assemblages réguliers ont été peu à peu décrits, dénommés associations d'espèces ou communautés ou biocénose (appellations que nous considérons comme équivalentes), parfois promus au rang d'unités biologiques naturelles, presque de "super-espèces" »*

### 11.1 Biocénose et association d'espèces

*« Les biologistes et microbiologistes dans leurs recherches de classement de l'inventaire et de leurs observations faites sur les espèces constatent que leur travail est rendu plus facile par l'existence d'associations récurrentes d'espèces, susceptibles d'être reconnues et comparées. De ce fait, un spécialiste éprouvé d'une catégorie de peuplements peut déterminer, au vu d'une liste d'espèces :*

- *Si la présence de telle ou telle espèce est "normale" ou "aberrante" pour le site et les conditions ambiantes.*
- *Si telle association, constatée, de plusieurs espèces indique un état transitoire ou (sub) définitif du peuplement ou encore s'il dénonce un caractère particulier de l'environnement (par exemple un état de pollution, ou la déficience d'un certain facteur important, etc.). Les associations d'espèces sont, en effet, souvent caractéristiques d'une association de caractères du biotope ; la notion d'"association indicatrice" complète alors celle d'"espèce indicatrice".*

*Il est possible de décomposer cette association de la façon suivante :*

- *En liste limitée d'espèces caractéristiques étant les groupements d'espèces les régulièrement représentées.*
- *En cortège d'espèces accompagnantes, souvent inventorisées en même temps, mais dont la présence n'est pas obligatoire pour définir l'association.*
- *En liste d'espèces occasionnelles voir accidentelles.*

*Cette classification des groupes les travaux de Braun-Blanquet de l'école européenne dite "de Montpellier-Zurich" ayant travaillé sur les végétaux a fait un inventaire exhaustif des associations dans les zones de climat tempérées.*

*On peut dire les mêmes choses des communautés marines benthiques, dont la description a été poussée très loin en Europe à la suite des travaux de Petersen en Mer du Nord et en Baltique, puis de Pérès & Picard en Méditerranée...*

*Les méthodes numériques donnent pour conclusions que l'hypothèse biocénique et l'hypothèse*

continuum semble aujourd'hui dépassée, car les résultats de ces nouvelles techniques informatiques montrent, qu'il n'y a pas de séparation entre ces deux hypothèses.

On est conduit ainsi à définir des communautés d'interface ou écotones (concept, par ailleurs, ancien), quelquefois plus importants pour le fonctionnement de l'écosystème global que les peuplements réguliers implantés de part et d'autre.

Il reste que, même mathématisée, la recherche des associations et leur classification ne constituent qu'une première étape. Il faut rechercher les raisons de groupements récurrents d'espèces et en évaluer les conséquences sur le fonctionnement de l'écosystème »<sup>25</sup>.

#### Biocénose dans la grotte de Sulzbrunn Analyse de la flore microbienne

Classes bactériennes	Snottites Biofilms	Eau Minérale	Eau de mélange
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Cytophagales</i> <i>Cytophagaceae</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Sphingobacteriales</i> <i>Saprospiraceae</i> ( <i>Arenibacter</i> )	≈ 1	≈ 1
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetales</i> <i>Planctomycetaceae</i> <i>Phycisphaerales</i> <i>Phycisphaeraceae</i>	≈ 1	≈ 1
NC10	<i>Methylomirabilis</i>	≈ 1	≈ 1
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Chthoniobacteriales</i> <i>Chthoniobacteraceae</i> <i>Fuku N18</i>	≈ 1	≈ 1
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i> <i>Hyphomonadaceae</i> <i>DB1-14</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Beijerinckiaceae</i> <i>Hyphomicrobiaceae</i> <i>Rhodobacterales</i> <i>Rhodobacteraceae</i> <i>Rhodospirillales</i> <i>Rhodospirillaceae</i> <i>Rickettsiales</i> <i>Sphingomonadales</i> <i>Erythrobacteraceae</i>	≈ 1	≈ 1
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i> <i>Comamonadaceae</i> <i>Hydrogenophilales</i> <i>Hydrogenophilaceae</i> <i>Methylophilales</i> <i>Methylophilaceae</i> <i>Nitrosomonadales</i> <i>Gallionellaceae</i> <i>Rhodocyclales</i> <i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Burkholderiales</i> <i>Comamonadaceae</i> <i>Hydrogenophilales</i> <i>Hydrogenophilaceae</i> <i>Methylophilales</i> <i>Methylophilaceae</i> <i>Nitrosomonadales</i> <i>Gallionellaceae</i> <i>Rhodocyclales</i> <i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Burkholderiales</i> <i>Comamonadaceae</i> <i>Hydrogenophilales</i> <i>Hydrogenophilaceae</i> <i>Methylophilales</i> <i>Methylophilaceae</i> <i>Nitrosomonadales</i> <i>Gallionellaceae</i> <i>Rhodocyclales</i> <i>Rhodocyclaceae</i>
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Methylococcales</i> <i>Methylococcaceae</i> <i>Crenothrichaceae</i> <i>Legionellales</i> <i>Legionellaceae</i> <i>Pseudomonadales</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Xanthomonadales</i>	<i>Methylococcales</i> <i>Methylococcaceae</i> <i>Crenothrichaceae</i> <i>Legionellales</i> <i>Legionellaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Xanthomonadales</i>	<i>Methylococcales</i> <i>Methylococcaceae</i> <i>Crenothrichaceae</i> <i>Legionellales</i> <i>Legionellaceae</i> <i>Xanthomonadales</i>
<i>Deltaproteobacteria</i>	≈ 1	≈ 1	≈ 1
<i>Epsilonproteobacteria</i>		<i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas</i>

« Chacune, de ces associations, occupe un milieu physico-chimique particulier, qualifié de biotope, conditionnant son existence et en même temps transformé par elle.

Ainsi Tansley définit en 1935 l'écosystème par l'addition symbolique :

Écosystème = biocénose + biotope

Formule devant devenir un produit tensoriel symbolique, ou ensemble des interactions entre tous les éléments de la biocénose et tous les éléments de son environnement, en posant la formule symbolique :

Écosystème = biocénose biotope

(Dans ce cas, à chacun des composants de la biocénose, on a une incidence biotopique particulière)

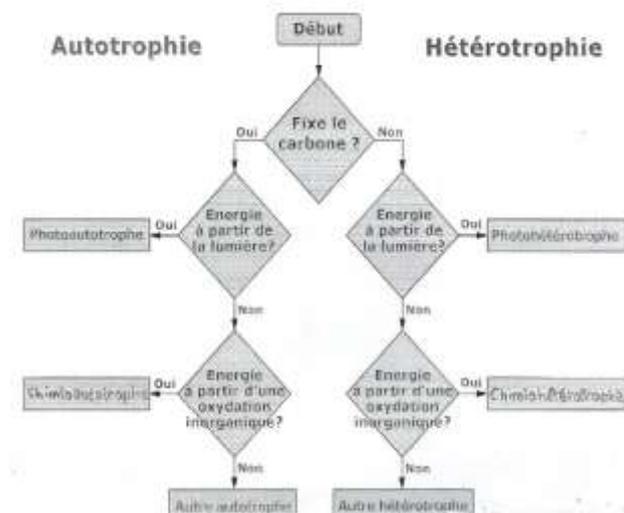
Comparant entre elles les assemblages, ou encore les états transitoires tendant vers l'un des assemblages répertoriés, il est apparu qu'au-delà des simples listes d'espèces, ils pouvaient être caractérisés et interclassés au moyen de descripteurs quantitatifs de la diversité taxinomique.

Ils se rangeront alors, indépendamment de leur composition particulière, le long d'un gradient joignant les peuplements les plus simples, comprenant une seule espèce abondante et un petit nombre d'espèces accompagnants rares ("la diversité spécifique" est alors très faible), et les associations complexes comprennent de nombreuses espèces d'abondances non pas égales, mais comparables, toujours accompagnées d'espèces rare, parfois en grand nombre ("diversité spécifique" élevée) ».

## 11.2 Formation de la biocénose dans la grotte de Sulzbrunn

Les bactéries, recouvertes par les molasses alpines, ont été complètement isolées du monde extérieur.

### Évolution de l'écosystème



L'apparition du méthane et du gaz carbonique a rendu le milieu plus ou moins anoxique.

Ce manque d'oxygène a sûrement dû être un point important dans la sélection microbienne initiale.

La synergie microbienne ayant créé la biocénose, en partant de bactéries autotrophes pour atteindre les bactéries hétérotrophes.

Les bactéries hétérotrophes vont se servir des bactéries autotrophes pour combler leurs besoins en énergie et en matière organique. Elles produiront ainsi du gaz carbonique pour alimenter les bactéries autotrophes en carbone, ainsi la boucle sera fermée.

Les bactéries autotrophes ont été le départ d'un enchaînement microbien dans lequel toutes les bactéries ont pu trouver leurs subsistances, jusqu'à asservir les besoins complexes des bactéries hétérotrophes.

Cette biocénose demande que toutes les bactéries représentées dans l'écosystème puissent jouer un rôle pour que la chaîne alimentaire soit une fonction continue du système. Cet écosystème aussi bien conçu a dû être le fruit d'une longue sélection.

### 11.3 La complémentarité entre bactéries

- Les bactéries autotrophes ont dû apparaître avant la formation du méthane, on trouve : *Gemmata*, *Methylomirabilis*, *Hydrogenophilus*, *Rhodocyclus*, ***Stenotrophomonas Sulfuritalea***, *Nitrosomonadales*, *Siderooxydans*, *Ferriphaselus*, *Sulfurimonas*. Elles ont utilisé le gaz carbonique de la décomposition des plantes, de la faune marine pour faire leur matière organique.
- L'oxydation du méthane par les germes méthanotrophes va donner des formiates (*Methylomirabilis*, *Methylocella*, *Methylobacterium*, *Methylorosula*, *Verrucomicrobia*, *Crenothrix*), ces formiates peuvent être réutilisés pour alimenter les méthylotrophes
- Les formiates vont être absorbés par les méthylotrophes, seront transformés en composés plus complexes comme des pyruvates, des acétates... (*Methylorosula*, *Methylovulum*).
- Le *Crenothrix* et le *Methylococcaceae*, bactéries productrices de polysaccharides ont pu entrer dans la formation des membranes de la structure des snottites, des biofilms « subaerial » et « submersed ».
- Les germes hétérotrophes vont consommer les acides et les sels formés par les bactéries autotrophes et vont dégager du gaz carbonique (*Arenibacter*, *Planctomycetes*, *FukuN18*, *Spartobacteria*, *Chthoniobacter*, *Methylorosula*, *Porphyrobacter*, *Gallionella*, *Pseudomonas*, *Methylobacter*, *Methylobacterium*).
- Les bactéries autotrophes vont transformer ce gaz carbonique en énergie pour se nourrir et vont utiliser l'azote de l'air pour former leurs protéines comme pour : *Methylocella*, *Porphyrobacter*, *Ferriphaselus*, *Siderooxydans*, *Sulfuricella*, *Rhodocyclus*.
- Les bactéries fixant l'azote, *Rhizobiales*, *Methylocella*, *Methylorosula*, *Methylobacterium*, *Rhodospirillaceae*, *Rhodocyclus*, *Methylobacter*, *Methylosoma* produisent de l'hydrogène. L'hydrogène formé par ces bactéries chimiotrophes et thermophiles va être absorbé par les *Hydrogenophilaceae* pour leur production d'énergie par oxydation de l'hydrogène en formant de l'eau. Genres de cette famille : *Thiobacillus*, *Hydrogenophilus*.
- Les ferrobactéries vont se servir du fer comme donneur d'électrons (passage du fer II en fer III ; avec un échange d'un électron) comme : *Gallionella*, *Ferriphaselus*, *Siderooxydans* permettant l'oxydation et la régénération enzymatique.
- Les *Deltaproteobacteria* ne sont présentes que dans l'eau de source, aux environs de 3% de la flore totale de cette eau. Cet embranchement comporte les *Geobacter*, *Bdellovibrio* et les germes utilisant le fer oxydé pour leur respiration par réduction.
- Cette oxydation va être réduite par les *Ferrimicrobium* étant des bactéries transformant le fer <sup>+3</sup> en fer <sup>+2</sup>. Il en est de même pour les *Sulfuritalea* et les *Geobacter* allant réduire le fer oxydé. Ayant pour effet de pouvoir rétablir l'équilibre :  
Fer II / Fer III.
- Le *Methylomirabilis* va donner de l'oxygène par les réductions des nitrites en O<sub>2</sub> et en N<sub>2</sub> pour alimenter en O<sub>2</sub> les bactéries aérobies hétérotrophes.
- Les sources d'azote et de phosphore seront apportées par les cadavres microbiens étant repris par les bactéries hétérotrophes. Les *Saprospira* ont un fort pouvoir hydrolysant et peuvent servir de régulateur en minéralisant les bactéries mortes, cela redonnera des éléments vitaux à la biocénose.
- Les *Bdellovibrio* faisant partie de *Deltaproteobacteria* ont la capacité de parasiter et de tuer les autres bactéries Gram (-), telles que *Alcaligenes*, *Campylobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Legionella* et *Shigella*. *Bdellovibrio* ont ce que l'on appelle un mode de vie diphasique avec une phase de « chasse », où ils sont motiles, libres, et une croissance intracellulaire en phase de parasitisme. Leur action est semblable aux bactériophages. Ils se rencontrent dans l'environnement aquatique (eaux douces, eaux de mer, eaux des égouts) et dans le sol. Ce comportement de défense peut être un des facteurs ayant permis aux bactéries une pérennité pour de si-longues années.

- Les *Planctomycetes* vont transformer l'ammonium en nitrates et nitrites puis en azote pour les bactéries autotrophes. Étant repris par les bactéries fixant l'azote et produisant de l'hydrogène.
- Les *Marinobacter* et *Arenibacter* vont utiliser les hydrocarbures provenant de la putréfaction anoxique des matières organiques (reste des organismes marins animaux et végétaux et matières organiques produites par la flore microbienne existante). Cette putréfaction de la molasse marine apportée par l'eau pour donner des résidus carbonés tels que le méthane (CH<sub>4</sub>) et des hydrocarbures. Cela permettra de nourrir l'ensemble de la biomasse.
- Les *Caulobacterales* fixent le phosphore soluble sous forme de tiges, étant une réserve minérale, éventuellement récupérable pour entretenir la vie. Cela peut expliquer le déficit en phosphore soluble dans cette biocénose. Ils doivent avoir un rôle dans la fixation des snottites et biofilms par la présence de leur prosthecae. Ils devraient être issus des molasses alpines et des lacs de montagne.
- La présence de *Sulfurimonas*, cette bactérie est neutrophile, mésophile, aérobie et chimio-litho-autotrophe dénitrifiante. Elle tire son énergie de l'oxydation des composés de soufre réduit, lorsque la dénitrification est survenue (passage d'oxygène de la dénitrification à l'oxydation du soufre en sulfites et sulfates). Elle joue un rôle dans l'élimination de l'acide sulfhydrique étant présentes dans les sources thermales.
- La présence de *Pseudomonas lodooxidans* oxyde l'iode (présence marine et contenue dans les algues). Cette oxydation rend l'iode moins antibactérien et permet à la flore microbienne de subsister en sa présence.
- Les *Archaea* (germes de méthanogénèse) vont produire du méthane. Ces *Archaea* sont :
  - Soit dans la cavité ;
  - Soit dans les sources alimentant cette cavité (étant plus probable car les *Archaea* méthanogènes sont très sensibles à l'air).

Dans cet « écosystème complexe » le cycle se trouve ainsi fermé et la biocénose trouve son équilibre dans la diversité des activités microbiennes.

Nous avons là une biocénose complète et complexe, par son équilibre peut vivre en autarcie des millénaires, voire des millions d'années.

**« La biocénose bactérienne pourrait permettre de résoudre les problèmes de pollution environnementale ! »**

#### 11.4 Biocénose des biofilms et des snottites

Dans les biofilms et les snottites, nous avons aussi une organisation de la flore va être fonction d'une coexistence possible entre les germes. Cette synusie s'est prolongée pendant des temps très longs doit avoir une diversité équilibrée pour éviter la dégénérescence précoce.

Dans les structures fermées que sont les biofilms et les snottites, il faut prendre en considération, que la coexistence devient vite difficile s'il y a une vie active.

Or, il est peu probable que la somnolence bactérienne dans les biofilms et les snottites se soit prolongée sur 15 millions d'années. De plus, la multiplication microbienne nécessite un apport énergétique relativement élevé pour le renouvellement de la flore.

La limitation de l'espace dans ces structures rend donc la biodiversité plus complexe (biotope restreint). L'analyse a été faite sur la biomasse de ces structures (biofilms et snottites) est résumée dans les tableaux ci-dessous :

### Flore non-méthylotrophe

Embranchements	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »
<i>Bacteroidetes</i>	11,6 %	11,7 %	1,2 ± 0,6%
<i>Planctomycetes</i>	18,4 %	21,5 %	6,4 %
NC 10	Nd	Nd	0 %
<i>Verrucomicrobia</i>	10,7 %	2,7 ± 0,5 %	< 1 ± 0,6 %
<i>Alphaproteobacteria</i>	28,6 %	22,0 %	12,3 %
<i>Betaproteobacteria</i>	2,4 %	2,9 %	11,4 %
<i>Gammaproteobacteria</i>	11,1 %	12,9 %	12 %
<i>Deltaproteobacteria</i>	1,4 ± 1%	2,2 ± 0,2 %	1,9 ± 0,2 %
<i>Epsilonproteobacteria</i>	Nd	Nd	Nd
OTU non définie	5,5 %	9,0 %	5,0 %
<b>Total lignes</b>	<b>87,3 %</b>	<b>84,9 %</b>	<b>50.2 %</b>

### Flore méthylotrophe

Elle est présente à 69 % de la flore des structures (biofilms et snottites).

Embranchements		Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »
NC 10	<i>Methylomirabilis</i>	Nd	Nd	4.2 %
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylocella</i>	Nd	< 1 %	< 1 %
	<i>Methylorosula</i>	Nd	< 1%	< 1%
	<i>Methylobacterium</i>	Nd	< 1%	< 1%
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Methylotenera</i>	Nd	Nd	14 %
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Methylosoma</i>	2,1 %	1.6 %	Nd
	<i>Methylomicrobium</i>	4.7 %	8.4 %	Nd
	<i>Methylovulum</i>	Nd	Nd	7.4 %
	<i>Methylobacter</i>	Nd	Nd	10.5
	<i>Crenothrix</i>	1.5 %	0.5 %	8.4 %
	<i>Methylomonas</i>	0.5 %	Nd	Nd.
<b>Flore méthylotrophe</b>		<b>8,8 ± 4,2 %</b>	<b>12.6 ± 7,5 %</b>	<b>46,3 ± 10 %</b>

ISME Journal

Le rapport entre méthylotrophes / non-méthylotrophes montre un équilibre entre les germes autotrophes étant très présents dans la flore des méthylotrophes. Ces germes autotrophes utilisent le méthane pour former leur carbone de structure.

### Rapport méthylotrophe / non-méthylotrophe

Définition	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »
Rapports	0,100	0,140	0,922

Un fort déficit en méthylotrophes dans les structures aériennes est observé comparativement au biofilm « submersed ». Cette carence peut être vue comme un manque d'énergie, peut-être compensée par la présence de *Saprospiraceae*.

Les *Saprospiraceae* sont des germes minéralisant la flore excédentaire. Ils vont jouer un rôle régulateur de la flore dans ces structures.

La présence de *Saprospiraceae* est plus importante dans les snottites (≈1.5 % de cette structure) et le biofilm « subaerial » (≈4 % de cette structure) que dans les biofilms « submersed » (<1,2 % de cette structure)

**« Nous voyons là, un recyclage parfait de la matière organique. L'équilibre de la flore microbienne est proche entre les snottites et les biofilms "subaerial", mais très éloignée des biofilms "submersed" ».**

### Différenciation dans les structures :

- Les snottites et les biofilms « subaerial » possèdent une biomasse riche en germes *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Alphaproteobacteria*. Ces germes proviennent de la flore tellurique (flore n'étant pas présente dans les eaux de la grotte).
- Les snottites ont en plus des *Verrucomicrobia* étant sûrement dues à une présence plus ancienne de snottites antérieures à la formation des biofilms (les *Verrucomicrobia* sont une flore abondante dans les sols, cette flore n'est pas présente dans les eaux de la grotte).
- Les biofilms « submersed » contiennent surtout des germes *Betaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*. Ces biofilms ont bénéficié des infiltrations de l'eau de mélange entre les sources, ayant augmenté l'Aw (l'eau libre), et de ce fait en a modifié fortement la flore interne du biofilm. Ce biofilm, est dans un état d'anoxique il devrait ne contenir qu'une flore anaérobie, mais la présence particulière dans cette flore du ***Condidatus MethyloMirabilis oxyfera*** ayant dans son métabolisme la production d'oxygène peut être l'élément permettant à ce biofilm d'accepter une flore aérobie.

La différence entre les biofilms « subaerial » et « submersed » montre l'influence de l'eau de mélange sur le biofilm « submersed ». La biomasse de ces biofilms « submersed » a la possibilité de traverser les parois externes du biofilm pour avoir des contacts avec l'eau de mélange, ceci étant impossible aux biofilms « subaerial ».

Malgré, cela il semble que les *Methylomonas*, présents dans la biomasse de l'eau de mélange, ne passent pas à travers la paroi du biofilm « submersed », ainsi que les *Methylomirabilis*, *Crenothrix*, ont qu'une diffusion très partielle dans l'eau de mélange. Dans cette biocénose il a bien un passage sélectif entre le biofilm et l'eau de mélange.

Par contre, dans snottites et les biofilms « subaerial », nous n'avons pas de lien avec l'eau de mélange. La flore méthylotrophe est composée principalement de *Methylomicrobium*, les autres méthylotrophes ayant des concentrations très faibles.

Le pourcentage d'azote dans ces biofilms est plus faible comparativement aux biofilms « submersed ». Cette diminution peut être due à la présence des *Planctomycetes* car ils sont dans des proportions supérieures dans les biofilms « submersed », les *Planctomycetes* transformant le  $\text{NO}^2$  en  $\text{N}_2$  pour la respiration et la formation des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique.

Dans les biofilms, « submersed » se différencie des autres biofilms par une flore plus méthylotrophe, plus abondante que la flore hétérotrophe. Cela va lui donner un meilleur équilibre de ses ressources vitales.

### 11.5 Bilan énergétique dans les biocénoses internes aux biofilms

L'étude du bilan énergétique est d'une grande importance pour expliquer les raisons de la conservation des bactéries sur une aussi longue période.

Si nous observons pour chacune des structures la composition de la flore la plus importante c'est-à-dire avec des valeurs >5 %) dans la structure nous arrivons au tableau suivant :

Snottites		Biofilms « subaerial »		Biofilms « submersed »	
<i>Cytophagales</i> =>	5.9 %	<i>Methylomicrobium</i> =>	8.4%	<i>Rhodospirillaceae</i> =>	5 %
<i>Pir 14</i> =>	7.7 %	<i>Pseudomonas</i> =>	5.6%	<i>Rickettsia</i> =>	9 %
<i>Fuku N18</i> =>	6.8 %	<i>SM1 A02</i> =>	6.5%	<i>Methylotenera</i> =>	14 %
<i>Hyphomicrobiaceae</i> =>	8.1 %	<i>Beijerinckiaceae</i> =>	5,2%	<i>Crenothrix</i> =>	13%
<i>Pseudomonas</i> =>	7 %	<i>Legionella</i> =>	5.6 %	<i>Methylomirabilis</i> =>	4,7 %

Les bactéries majoritaires dans les structures sont très hétérogènes d'une structure à l'autre.

#### Équilibre des méthylothropes dans les différentes structures

Structures	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »
<i>Methylosoma</i>	31,6 %	1,6 %	Nd
<i>Methylomicrobium</i>	4,7 %	8,4 %	Nd
<i>Methylovulum</i>	Nd	Nd	7,4 %
<i>Methylobacter</i>	Nd	Nd	10,5 %
<i>Crenothrix</i>	1,5 %	0,5 %	8,4 %
<i>Methylotenera</i>	1 %	1,6 %	14,7 %
<i>Methylomirabilis</i>	Nd	Nd	4,7 %
<i>Methylomonas</i>	0,5 %	Nd	Nd
<b>Total ligne</b>	<b>9,8 %</b>	<b>12,1%</b>	<b>45,7 %</b>

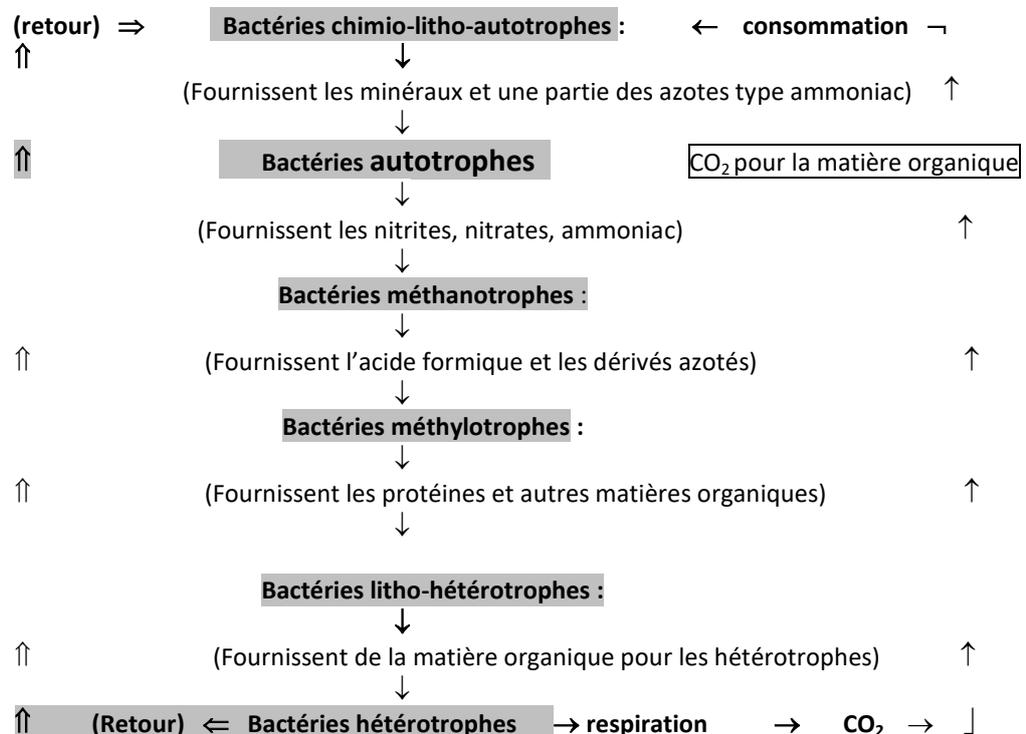
Dans les biofilms « submersed » l'activité méthylotrrophe est très forte. Ce biofilm a une répartition entre ces bactéries méthylothropes bien réparties entre *Methylovulum*, *Methylobacter*, *Crenothrix*, *Methylotenera*, *Methylomirabilis*, lui permettant d'avoir une biocœnose bien équilibrée.

Cet équilibre des méthylothropes permet une meilleure utilisation du méthane dissous et de ce fait entraîne une stabilité dans le catabolisme méthanotrophe.

Cette observation n'est pas valable dans le cas de biofilm « subaerial » et snottites.

**« Ce n'est donc pas l'activité ni méthanotrophe, ni méthylotrrophe ayant été le facteur favorisant la formation des biofilms et des snottites, mais bien le fait d'une adaptation à un biotope nouveau par une protection par l'isolation dans un écosystème permettant une défense sur les agressions extérieures. »**

#### Schéma simplifié du cycle hypothétique de la biocœnose dans les structures



**« Les bactéries hétérotrophes consomment les bactéries mortes, comme les bactéries autotrophes, lithotrophes ou méthylotrrophe pour former leurs énergies, leurs protéines... et l'écosystème devient de ce fait un cycle fermé et équilibré. »**

On voit, que dans les snottites le phosphore est trop faible pour entretenir une biomasse avec un rapport N/C de 80 au lieu de 16 (qui est le rapport normal des biomasses connues). Mais le recyclage des bactéries mortes est une source de phosphore. De plus la masse bactérienne doit être vue sur le fait que la structure des biofilms et des snottites est une structure carbonée, inerte et qu'elle intervient dans les résultats d'analyse du carbone et de l'azote donc fausse le rapport N/C.

C'est pour éclaircir cette question qu'il faudrait travailler sur le bilan énergétique interne aux biofilms « subaerial », « submersed » et aux snottites.

Nous avons au niveau de ces structures une biocœnose relativement complexe demandant une organisation bien définie pour avoir un développement interne aux structures (biofilms et snottites) dû au fait que le biotope est à la fois aérobie et anaérobie (mélange d'air, méthane, gaz carbonique et d'eau). Cette condition particulière a été un facteur limitant à la diversité microbienne.

***« La diversité microbienne est un des facteurs principaux de l'équilibre d'une biocœnose. Cette diversité est basée sur le fait que les caractéristiques de chacune des familles ou des genres doivent apporter une activité servant à l'ensemble de l'écosystème.***

***Pour qu'il y ait biocœnose il faut qu'il y ait diversité quelque-soit les genres de bactéries la composant, c'est l'activité propre de ces bactéries ayant une importance dans l'écosystème.***

## CHAPITRE 12/ CARACTÉRISTIQUES DES SNOTTITES ET BIOFILMS

L'analyse des caractéristiques se résume dans les tableaux suivants :

### Les snottites

Caractéristiques générales des snottites en pourcentage de bactéries dans la structure

Autotrophes Méthylotrophes	Aérobioses	Méthylotrophes	Marines	Telluriques	D'eau douce
18 %	36,5 %	10,5 %	30 %	21,9 %	44,4 %

### Les biofilms « subaerial »

Caractéristiques générales des biofilms « subaerial » en pourcentage de bactéries dans la

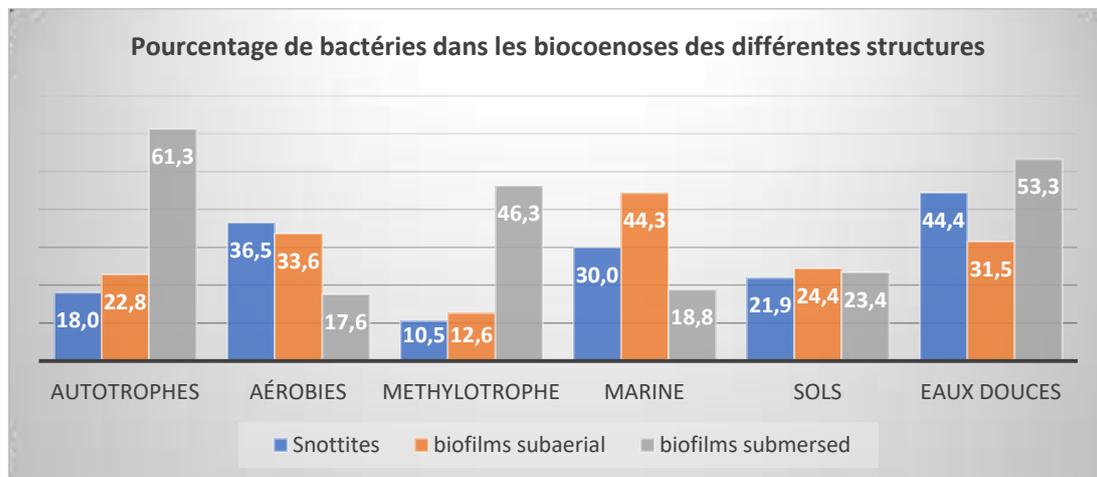
Autotrophes Méthylotrophes	Aérobioses	Méthylotrophes	Marines	Telluriques	D'eau douce
22,8 %	33,6 %	12,6 %	44,3 %	24,4 %	21,9%

### Les biofilms « submersed »

Caractéristiques générales des biofilms « submersed » en pourcentage de bactéries dans la structure

Autotrophes Méthylotrophes	Aérobioses	Méthylotrophes	Marines	Telluriques	D'eau douce
61,3 %	17,6 %	46,3 %	18,8 %	23,6 %	53,3 %

Graphique comparatif des différentes structures



- **Biofilms « subaerial » et snottites**

La diversité des familles et genres entre snottites et les biofilms « subaerial » est différente, mais malgré cela les caractéristiques en bactéries autotrophes, bactéries aérobies, bactéries méthylotrophes, bactéries telluriques, sont relativement semblables dans ces deux structures. Il y a donc un équilibre dans les caractéristiques, étant sûrement la clef de cette biocoenose.

**« L'équilibre de l'écosystème pris dans ce biotope subaérien, demande des caractéristiques particulières pour garder la pérennité sur un aussi grand nombre d'années. C'est donc bien sur les caractéristiques que l'équilibre c'est fait et non les considérations taxonomiques. »**

Si l'on considère que les germes autotrophes n'ont pas besoin des autres bactéries pour vivre et pour fournir leur source d'énergie. Par contre les bactéries hétérotrophes ont besoin de la matière organique pour la même couverture énergétique et leur apport en carbone.

C'est donc la matière organique fournie par les bactéries autotrophes, servant de couverture énergétique pour les bactéries hétérotrophes.

De ce fait, on comprend que pour qu'il y ait une population constante, il faut la présence d'un minimum de bactéries autotrophes, allant servir de réserves énergétiques et carbonées aux bactéries hétérotrophes.

Pour l'aérobiose les choses sont identiques : les bactéries autotrophes et méthylophiles sont souvent des bactéries anaérobies donc il est normal qu'il existe une constante entre les germes autotrophes et les germes hétérotrophes aérobies. Les germes autotrophes non pas ou peu besoin d'oxygène.

Présence des bactéries du sol : semblable que quelque-soit la structure analysée, elle reste constante car elles sont issues de la formation de la grotte par les molasses alpines.

La seule différence marquée dans ces deux structures snottites et biofilm « subaerial » est la flore des bactéries aquatiques ; dans les snottites cette flore a un biotope d'origine d'eau douce, alors que les biofilms « subaerial » sont des bactéries marines. Cette observation peut venir du fait que les snottites ont une antériorité plus forte que les biofilms « subaerial ».

- **Biofilms « submersed »**

Ils se différencient fortement des autres structures, leur immersion est la résultante de cette différenciation.

L'activité hydrique ayant pour résultante l'augmentation de l' $A_w$  entraîne une différence de flore et une augmentation de l'activité microbienne.

Elle augmente la part des germes anaérobies due à l'immersion (baisse de l'aérobiose). Mais cette augmentation n'élimine pas l'aérobiose, restant d'une valeur de 17,6 % des bactéries présentes. Cette constatation s'explique par la présence de *C. Methylophilis oxifera* pour une valeur de 4,7 % devant fournir l'oxygène aux bactéries aérobies. Donc on ne peut pas dire que le biofilm « submersed » soit un biofilm vraiment anoxique.

L'augmentation des bactéries autotrophes, environ 60 % contre 20 % des autres structures, indiquerait que ces biofilms « submersed » ont une activité plus forte demandant plus de matières organiques et de mortalité que les autres structures.

Il en est de même pour les méthylophiles ; le méthane semble venir de la source venant des profondeurs terrestres.

On peut aussi soupçonner la présence des *Archaea*, germes étant principalement méthanogènes, et venant alimenter en énergie nécessaire aux germes méthanotrophes et méthylophiles, eux vont servir de nourriture aux germes hétérotrophes (biocœnose).

Là aussi il y a une stabilité dans les rapports entre activités et germes autotrophes vont être la clef de la pérennité aussi grande dans un lieu aussi fermé.

Dans les biofilms « submersed » la part de bactéries marines (pur) est faible, car le milieu hydrique interne à ce biofilm doit être pauvre en sodium pouvant produire une pression osmotique faible.

Les teneurs en sodium pour les eaux de la grotte vont aussi être un facteur influençant la biodiversité du biofilm.

- L'eau de mélange contient 94 mg/l.
- L'eau de la source contient 649 mg/l.

Il est regrettable que les teneurs en sodium ou la conductibilité n'aient pas été mesurées sur les biofilms et snottites. Cela aurait pu expliquer les différences observées dans toutes ces structures.

## CHAPITRE 13 / ÉVOLUTION ET RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE DE CETTE BIODIVERSITÉ MICROBIENNE

### 13.1 Évolution de cette biodiversité microbienne

Il y a 15 millions d'années, les molasses alpines recouvraient la partie côtière de la mer de Bavière, ce recouvrement a pu être une cause de sélection des germes favorisant la flore anaérobie actuellement représentant environ 50 % de la flore totale.

Nous pouvons imaginer que, dans un premier temps, une sélection a dû se produire pour arriver à obtenir un système microbien aussi équilibré. Dans cet écosystème, nous pouvons observer la faible présence de flore non-indispensable ou occasionnelle montrant qu'il y a bien eu une sélection pour pérenniser une telle biocénose.

Puis petit à petit, l'eau a apporté d'autres germes aérobies ayant pu repeupler la cavité grâce à la présence notamment des *Methylomirabilis*, ayant permis de fournir l'oxygène nécessaire à la vie des hétérotrophes aérobies. La respiration aérobie a servi à produire du gaz carbonique. Cela a facilité le développement de la flore bactérienne fixatrice de CO<sub>2</sub>.

Les *Archaea* de la source minérale ont dû fournir le méthane par méthanogenèse pour la vie des méthanotrophes et des méthylotrophes. Les bactéries autotrophes du sol ont permis de fixer l'azote de l'air et ont entraîné la dégradation des protéines d'origine marine. Grâce aux *Planctomycetes*, de l'azote gaz a été produit pour alimenter les bactéries fixatrices de l'azote...

Les eaux de suintante ont apporté une flore hétérotrophe et les eaux de la source minérale ont favorisé une flore ferro-oxydante, apportant ainsi une possibilité de transfert d'électrons pour les souches autotrophes.

**« Il y a 3 milliards d'années avant nous, les bactéries avaient déjà inventé la démocratie participative. »**

### 13.2 Répartition géographique de cette biodiversité microbienne

- ***Cytophagales***

Le groupe se développe dans la rhizosphère, étant directement associée à des plantes racines (Lignes-Kelly, 2005), dans des agrégats du sol, intervenant dans le cycle du carbone par la dégradation des composés organiques (Mayrberger 2011). Le groupe *Cytophaga-Flavobacterium* prospère aussi dans les eaux côtières, les sédiments aquatiques, les cheminées hydrothermales et les régions polaires (Alonso et al., 2007).

- ***Sporocytophaga***

Bactéries filamenteuses<sup>26</sup> présentes dans les boues activées de station d'épuration. Le genre le plus connu : Le *Spirosoma* cette bactérie a été isolée du sol de la plage sur l'île de Jeju en Corée du sud et trouvée dans un échantillon d'eau de mer prélevé dans la région de Shizuoka, au Japon, a été cultivé en eau de mer enrichie en nutriment.

- ***Pir 14***

Le *Planctomycetes Pir* a été isolé d'une éponge méditerranéenne et des Caraïbes et de l'eau de mer des Caraïbes.

- ***Fuku N18***

La répartition des quinze groupes de bactéries diversifiées d'eau douce typiques dans quinze lacs en Europe du Nord a été étudiée à l'aide d'hybridation inverse ligne. L'évaluation statistique des données en fonction des caractéristiques des lacs a montré que les pH, la température et le temps de rétention hydrologique théorique (THRT) des lacs ont été plus fortement liés aux variations de la distribution des taxons bactériens. Ce *Verrucomicrobia* groupe CL0-14 a été détecté dans quatorze lacs et a été associée à un pH faible et une haute THRT et température. L'autre groupe de *Verrucomicrobia* projeté pour (FukuN18) a été détecté dans seulement trois lacs.

Pour l'identification *Fuku N° 18 difficile* on a des méthodes mal adaptées.

- Le ***Arenibacter latericus*** est une bactérie isolée d'échantillons de sédiments marins et ont été aussi collectées en Chine et en Inde, comme bactérie commensale de l'*Holothurie* (animal marin de l'embranchement des échinodermes) dans les mers du Japon et elle vie en symbiose sur une algue brune, ***Chorda filum***, dans la mer d'Okhotsk, dans l'océan Pacifique.
- Les ***Gemmata*** ont été isolées pour la première fois dans un barrage d'eau douce du **Queensland** en **Australie**. Ces bactéries sont intéressantes car elles présentent plusieurs des structures et des processus cellulaires sont généralement réservés aux cellules eucaryotes (ex. la forme nucléique), mais elle reste classée dans les procaryotes.
- Le ***Planctomycetes Pirellula*** a été isolé d'une éponge méditerranéenne et un isolat d'une éponge des Caraïbes et un de l'eau de mer des Caraïbes.
- Les ***Phycisphaeraceae*** sont des bactéries isolées d'une algue marine (*Porphyra* SP) recueillie sur île de Mikura, au Japon.
- Les ***Hyphomicrobiaceae***, l'***Hyphomonas neptunium*** est une bactérie marine, les huit espèces du genre *Hyphomonas* ont été isolé de la mer de Barcelone en Espagne. Elle a été initialement nommée ***Hyphomicrobium neptium***, mais plus tard a été renommée sur les bases de son indentification sur l'homologie de l'ADN.
- Les ***Methylocella*** sont des bactéries des tourbières humides ou dans les sols inondés et les zones humides à l'interface (eau et air) :
  - ***Methylocella silvestris***<sup>27</sup>, bactérie méthanotrophe isolée des forêts à cambio-sol (Dunfield, P. F., V. N. Khmelenina and all.).  
***Methylocella tundrae***, ayant été isolée de la tourbe acide des forêts et dans la toundra (Dedysh, S. N., Y. Y. Berestovskaya and all.) ; l'ADN du ***M. tundrae*** à un C + G de 63,3 mol %.
  - ***Methylocella acidiphila***, espèce formant un groupe taxonomique acidophile de bactéries méthanotrophiques<sup>28</sup>.
- Les ***Methylosorus*** ont été isolées des sols humides et acides de la toundra près de la ville de Vorkouta et du Chukotka et dans la péninsule Lougorski en Russie où ont étaient mises en évidence les souches désignées par V-022(T), Ch-022 et Ju-022.
- Les ***Methylomicrobium*** ont été isolés de la surface des sédiments du lac salé de Shara-Nur, Tuva, Fédération de Russie<sup>29</sup>.
- Les ***Porphyrobacter***, souches bactériennes, SW-132 t et SW-158 de ***Porphyrobacter*** ont été isolées dans l'eau de mer de la mer orientale de Corée.
- Le ***Sulfuricella denitrificans souche skB26T*** est une nouvelle bactérie anaérobie facultative oxydant le soufre, ayant été isolée de l'eau d'un lac anoxique d'eau douce au Japon. Les ***Sulfuritalea*** sont une composante majeure de la communauté bactérienne planctonique dans l'élaboration de l'appauvrissement de l'eau en nitrates hypoxiques où la respiration arséniate est l'un des métabolismes énergétiques possibles.
- Les ***Gallionella ferruginea*** ont été isolées des eaux et des sédiments du sud-ouest de la France.

**« Cette liste non-exhaustive des genres ou espèces de la grotte de Sulzbrunn, contient une flore microbienne, dont la géolocalisation bactérienne actuelle a été mise en évidence pour la première fois dans des régions très éloignées de cette cavité. Cette constatation peut faire ressortir deux hypothèses :**

- **que dans les prémisses de la formation de cette cavité, il existait une flore microbienne très homogènes sur terre quelque-soit la localisation géographique (cela est synonyme d'une homogénéité des climats).**
- **qu'il y ait eu une évolution microbienne parallèle entre le karst c'est-à-dire (la grotte de Bavière) et l'épigé c'est-à-dire (les mers et les sols de la planète). Cette homogénéité géographique d'évolution bactérienne est d'autant plus surprenante que cette grotte est restée durant une longue période coupée de l'extérieur. »**

***Cette dernière constatation est en désaccord avec les principes darwiniens basés sur la théorie de l'évolution due au hasard. Mais peuvent rejoindre les principes épigénétiques de la formation des introns (parties de l'ADN non lu).***

***« Beaucoup de gènes semblent présenter, à côté de séquences actives qualifiées d'exons, des séquences muettes : les introns ». —Jacques Ruffié***

### Utilité du monde microbien dans l'écologie

« L'atmosphère terrestre primitive est composée essentiellement de vapeur d'eau, d'azote et de méthane, mais non d'oxygène. Vers 4,4 milliards d'années, un dégazage massif des volcans rejette dans l'atmosphère du sulfure de carbone et du dioxyde de carbone.

Des molécules organiques se forment alors dans l'atmosphère et se déposent dans les océans. Dans cette "soupe primitive", des molécules s'assemblent à l'aide de l'énergie du soleil et des éclairs pour former au fil des réactions chimiques des acides aminés et des bases azotées comme des acides nucléiques»<sup>30</sup>.

**« Encore beaucoup de choses concernant la vie sur terre restent un mystère. Cette vie naissante a engendré des bactéries et des Archaea, ayant transformé l'atmosphère pour créer la vie aérobie, nous a permis d'être ce que nous sommes aujourd'hui. »**

Beaucoup de scénarii ont été proposés pour faire la liaison entre cette période et la vie :

- Soit la vie serait parvenue d'une autre planète, comme cela a été observée sur la météorite de Murchison ; elle se serait formée dans le système solaire il y a 4,6 milliards d'années. La météorite avait des bases nucléiques et de l'ARN et de l'ADN, et d'autres composés biologiques azotés.
- Soit la vie est due à une polymérisation des acides aminés et des bases nucléiques par le pouvoir électrostatique des argiles du sol.
- Autres scénarii...

On estime que la genèse bactérienne sur terre a pu apparaître avant le Paléoprotérozoïque ou le Mésoarchéen (3,6 à 3,2 milliards d'années). On en a les traces : les stromatolithes de la formation de Siyeh, datées du début Précambrien soit 3,5 milliards d'années (les stromatolithes sont des amas, microbiens calcifiés). À cette époque, la forme bactérienne était principalement en anaérobiose, étant un caractère des germes telluriques. La rudesse des conditions de vie laisse suggérer un comportement extrêmophile, autotrophe, méthanotrophe, thermophile...

Actuellement les fossiles bactériens de cette période ayant pu être observés ont été datés de 1,9 milliards d'années (présence du germe *Gunflintia*)<sup>31</sup>

Les bactéries ont donc existé avant toute vie végétale ou animale organisée (métazoaires). Nous voyons donc qu'une grande partie de la diversité microbienne a une origine tellurique.

Il a été mis en évidence que les germes telluriques comme les *Archaea*, les *Eubacteria* se sont individualisés progressivement vers -1,5 milliards d'années, lorsque la terre est passée de l'anaérobiose à l'aérobiose avec une adaptation d'une partie de la flore bactérienne à l'aérobiose.

Cette augmentation de l'oxygénation de l'atmosphère a eu deux origines : la formation d'oxygène par réaction chimique d'oxydoréduction due au volcanisme, et la formation d'oxygène par absorption, métabolisme, et photosynthèse bactérienne du gaz carbonique.

#### 14.1 Oxygénation terrestre due aux bactéries

Des bactéries vertes (*Chlorobacteria*) et des bactéries pourpres (*Rhodobacteria*) sont sulfito-réductrices, anoxygéniques et absorbent une partie du gaz carbonique.

Des bactéries vertes et pourpres non sulfito-réductrices (chlorophylliennes) et *Cyanobacteria* sont productrices d'oxygène.

Des bactéries méthanotrophes (consommant du méthane pour créer sa matière organique) et méthylotrophes (consommant des dérivés de carbone à 1 et plus d'atomes de carbone), comme la bactérie *Methylomirabilis* pouvant sans rayonnement solaire absorber le CO<sub>2</sub>, et produire de l'oxygène et de l'hydrogène.

« On constate le rôle très important de la présence bactérienne pour la purification de l'atmosphère (réduction du méthane et du gaz carbonique atmosphérique) et la mise en place d'une vie aérobie nous permettant d'exister dans les conditions actuelles.

La purification de l'atmosphère actuelle ne peut-elle pas être faite par ce même procédé, c'est-à-dire par l'utilisation de la flore microbienne pour purifier l'atmosphère de notre planète ? ».

## 14.2 La lutte contre le réchauffement climatique

**Gaz à effet de serre :** dans leur étude, Jean Jouzel et Olivier Nouaillas rapportent :

« Quoi qu'il en soit, le message des glaces polaires est sans appel. Depuis 1750, la concentration en dioxyde de carbone a augmenté de plus de 40 %, celle du protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O) d'environ 20 % tandis que celle du méthane a plus que doublé (+160 %).

Ces trois composés sont des gaz à effet de serre, car ils retiennent de la chaleur dans la troposphère et dans les autres composants du système climatique (océan, surfaces continentales et cryosphère).

La contribution la plus importante à l'effet de serre, environ 60 %, est la vapeur d'eau dont la quantité présente dans l'atmosphère augmente légèrement mais en réponse au réchauffement climatique, synonyme de plus d'évaporation, et non pas à cause des émissions directes par les activités humaines étant négligeables. »<sup>32</sup>.

**Les émissions naturelles de méthane dans l'atmosphère :** la décomposition des masses anoxiques des lacs, des fonds marins, des tourbières, des dépôts d'ordures ménagères, de la vie anthropique et animale sont des sources de production naturelle de méthane et de gaz carbonique.

Le méthane est un gaz altérant la couche d'ozone, le gaz carbonique est incriminé dans l'effet de serre. Leur augmentation est un des facteurs influençant le réchauffement climatique.

**Diminution des sources de production naturelle de méthane par l'ensemencement :** dans l'étude de la cavité de Sulzbrunn, il est identifié de nombreuses bactéries méthanotrophes ou méthylotrophes pouvant dans certains cas être régulatrices et consommatrices des rejets naturels de méthane.

Par la biotechnologie, on peut, dans certains cas, mettre en culture cette flore et permettre l'ensemencement de zones de production naturelle de méthane, dans le but d'en maîtriser les rejets. Les critères demandés aux germes méthylotrophes pour pouvoir être utilisés en biotechnologie dans les traitements des sources environnementales productrices de méthane naturel sont :

- Être facilement cultivable.
- Être si possible hétérotrophe.
- Être si possible aérobie ou anaérobie facultatif.
- Avoir une température de croissance correspondant aux conditions du biotope naturel à traiter.
- Se développer aux conditions de pH, et de taux de NaCl du biotope.
- Ne pas être pathogène pour l'Homme et la faune ambiante.

Dans la diversité des méthylotrophes étudiés, nous avons de nombreuses possibilités de répondre à ces conditions.

### Liste des méthylotrophes de la grotte de Sulzbrunn pouvant être utilisés en biotechnologie pour la protection de l'environnement :

- **Methylocella** : culture possible, bactérie méthylotrophe, présente dans les tourbes et les forêts
- **Methylosula** : culture possible, méthylotrophe, présente dans les eaux de lac et tourbes
- **Methylobacterium** : culture possible, méthylotrophe, résistant aux teneurs en NaCl de 0,1 à 0,5 % max. 1,5 %
- **Methylosoma** : culture anaérobie, méthanotrophes.
- **Methylomicrobium** : culture possible (sous méthane + air) avec présence de NO<sup>3-</sup>, halophile, méthanotrophe, présent dans les lacs salés.
- **Methylovulum** : culture possible en présence de méthane (énergie), méthanotrophe, présent dans les sols humides.

- **Methylobacter** : culture possible, méthanotrophe et méthylotrophe, résiste à 36 % NaCl, présent dans des lacs et l'eau de mer.
- **Methylothera** : culture anaérobie, méthanotrophe, présent dans les eaux de sources minérales
- **Methylomonas** : culture, méthanotrophe, halotolérante.
- **Methylomirabilis** : culture sur milieu minéral difficile, ni anaérobie, ni aérobie, méthanotrophe, dégage de l'azote, de l'oxygène et de l'hydrogène, présent dans les lacs.
- **Crenothrix** : culture aérobie facultative, oxyde le méthane, il se trouve dans les eaux douces des puits.

#### Paramètres de la possibilité de culture et d'utilisation dans l'environnement

Noms	Anaérobie	Pathogène	Hétérotrophe	pH	Températures
<i>Methylocella</i>	(-)	(-)	(+)	4,2 à 7,5	5 à 28°C
<i>Methylobacterium</i>	(-)	(+)	(+)	Nd	+ 45 °C
<i>Methylorosula</i>	(-)	(-)	(+)	4,0 à 6,0	4 à 30°C
<i>Methylomicrobium</i>	(-)	(-)	(-)	6,0 à 10	25 à 30°C
<i>Methylobacter</i>	(-)	(-)	(+)	6,0 à 7,5	23 à 30 °C
<i>Methylovulum</i>	(-)	(-)	(-)	6,5	25 à 30°C
<i>Methylothera</i>	(+)	(-)	(-)	5,0 à 8,0	Psychrotrophe
<i>Methylomirabilis</i>	(+)	(-)	(-)	Nd	Nd
<i>Methylomonas</i>	(+)	(-)	(-)	Nd	5 à 30°C
<i>Methylosoma</i>	(+)	(-)	(-)	7,0	10 à 30°C
<i>Crenothrix</i>	(-) facultatif	(-)	(+) chimio-hétérotrophe	5,0 à 10,0	Nd

Ce tableau résume les possibilités de culture des méthanotrophes et méthylotrophes dans le but d'une amélioration des zones de production naturelle de méthane.

**« L'ensemencement pourrait se faire par un apport de biomasses liquides pulvérisées ou sous la forme lyophilisée ».**

### 14.3. Action du méthane sur la diversité animale

La production de gaz naturel comme le méthane peut intervenir dans les comportements des animaux et être à l'origine d'une perte de la diversité animale.

Ole Seehausen<sup>33</sup> de l'université de Berne (Suisse) a démontré un processus de « spéciation à l'envers » :

*« À la fin des années 90, le biologiste suisse s'était aperçu que dans certaines zones du lac Victoria, l'isolement reproductif entre des espèces auparavant séparées avait été rompu, et que ces espèces avaient commencé à s'hybrider. Ce changement aurait été déclenché par l'augmentation, [...], de la turbidité des eaux. Un processus analogue s'était déroulé dans les lacs suisses. En recensant les différentes espèces de corégones dans dix-sept de ces lacs, il s'est aperçu qu'au moins huit d'entre elles avaient disparu au cours des soixante dernières années, sur la trentaine d'espèces initialement présentes. La perte de diversité était plus marquée dans les lacs ayant subi une forte eutrophisation méthanique. L'hypothèse en vigueur est qu'en diminuant la concentration en oxygène dans les profondeurs des lacs, l'eutrophisation aurait forcé les espèces vivant dans ces zones profondes à remonter vers la surface. Elles s'y seraient alors reproduites avec celles vivant à cet endroit. De ces croisements, seraient issus des hybrides capables eux, de survivre dans ces nouvelles conditions. Cela dit, on peut se demander si ces espèces hybrides vont perdurer ?*

*Cette inversion des comportements animaux par l'action de production de gaz (comme le méthane) peut être rectifiée par l'ensemencement de flore adaptée (dans ce cas la flore méthanotrophe) pour corriger les conditions naturelles d'un milieu.*

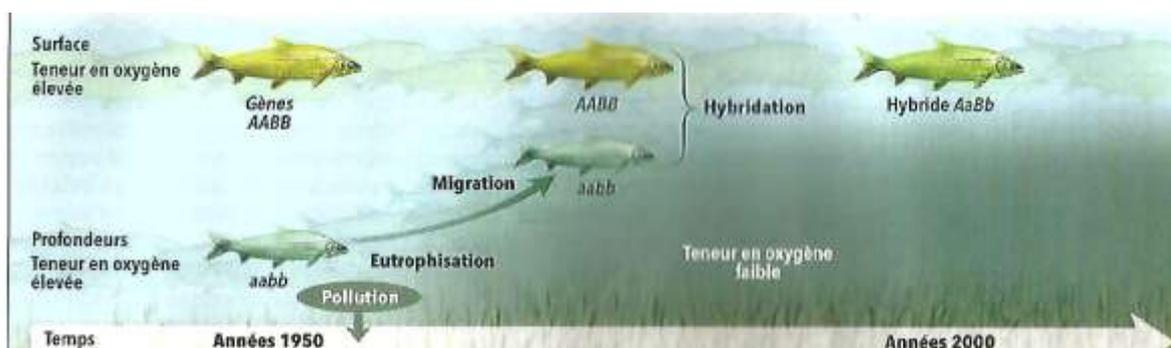


Schéma : Sylvie Dessert « Un seul lac pour des centaines d'espèce » ; éd. La Recherche N°480, 2013, page 43.

La séparation entre des espèces de corégones de surface et de profondeur, s'est rompue dans les lacs suisses, à la fin des années 1950. En effet, la pollution des lacs a provoqué un phénomène d'eutrophisation et une diminution de la teneur en oxygène au fond des lacs. Les espèces vivant-là ont migré vers la surface, où elles se sont croisées avec les espèces locales. On observe aujourd'hui des espèces hybrides, adaptées à ce milieu perturbé »<sup>34</sup>.

« Ole Seehausen<sup>29</sup> a montré qu'un processus analogue s'était déroulé dans les lacs Suisse. En recensant les différentes espèces de corégones dans 17 de ces lacs, il s'est aperçu qu'au moins huit d'entre elles avaient disparu au cours des soixante dernières années sur une trentaine d'espèce initialement présentes. La perte de diversité était plus marquée dans les lacs ayant subi une forte eutrophisation »

« Depuis les années 1980, le degré d'eutrophisation des lacs Suisses et de certains lacs d'africains a diminué. Du coup, certaines espèces disparues ne pourraient pas réapparaître ?<sup>35,36</sup> ».

**« L'apport d'une flore méthanotrophe et méthylotrophe dans l'eau des lacs ne peut-elle pas, être un moyen de pouvoir lutter contre cette disparition des espèces aquatiques des lacs sujet à la méthanisation "eutrophisation". D'autant plus que les bactéries méthanogènes sont en parties autotrophes de ce fait non pathogène pour l'Homme et les animaux »**

#### 14.4 Utilisation des bactéries pour la diminution de rejet de gaz à effet de serre dans l'atmosphère

L'identification bactérienne de la cavité de Sulzbrunn nous montre que beaucoup de bactéries présentes sont fixatrices de gaz carbonique atmosphérique (CO<sub>2</sub>).

<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Beijerinckiaceae</i> *
<i>Sulfurimonas</i>	<i>Rhodopseudomonas (phot.)*</i>
<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylobacterium*</i>
<i>Azospira</i>	<i>Methylocella*</i>
<i>Gallionella</i>	<i>Methylovulum</i>
<i>Methanolacinia*</i>	<i>Methylomirabilis**</i>
<i>Rhodospirillaceae (phot.)**</i>	<i>Methylosoma*</i>
<i>Rhodobacteraceae (phot.)*</i>	<i>Methylococcaceae**</i>
<i>Hydrogenophilus*</i>	<i>Epsilonproteobacteria**</i>
	<i>Porphyrobacter**</i>
	<i>Phycisphaeraceae*</i>

- Phot. : Photosynthèse chlorophyllienne

- \* : aérobie

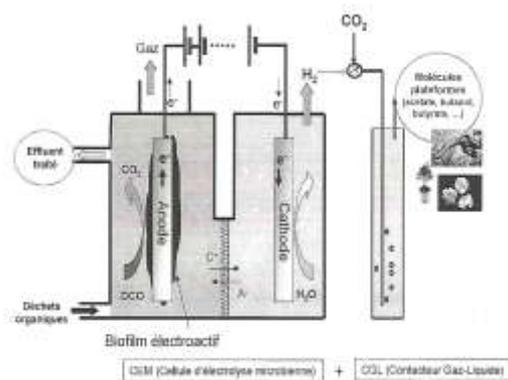
- \*\* : aérobie facultatif

La présence de *Sulfurimonas* a soulevé la possibilité d'un traitement des rejets industriels de CO<sub>2</sub> par une technique d'électrosynthèse microbienne.

## 14.5 Conception d'un procédé d'électrosynthèse microbienne<sup>37</sup>

La conception d'un procédé d'électrosynthèse microbienne permettant de se servir des bactéries pour transformer des constituants en donnant à ces bactéries les ions hydrogènes leur permettant d'activer leurs systèmes enzymatiques, afin d'absorber le gaz carbonique résultant de la putréfaction des débris organiques anthropiques, a été présenté par M<sup>me</sup> Élise Blanchet.

Ce procédé consiste à mettre le flux bactérien dans un champ électrique, afin de lui permettre d'avoir des ions disponibles pour nourrir ces bactéries étant autotrophes et leur permettant d'utiliser le CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S et NH<sub>3</sub> produits par les fermentations et éventuellement de produire de l'hydrogène excédentaire de leurs besoins vitaux.



### Procédé d'électrosynthèse microbienne

Ce concept peut être aussi le moyen d'éliminer le CO<sub>2</sub> des rejets industriels.

Ce concept original est peut-être d'un avenir prometteur, car il permet, en réduisant les sources des déchets organiques, de produire de l'hydrogène à des prix convenables. Ceci pouvant dans l'avenir être le carburant idéal (non polluant) comme énergie embarquée.

*« Récemment, il a été montré que certains microorganismes, dit électro-actifs, sont capables d'utiliser une cathode comme donneur d'électrons pour assurer la réduction du dioxyde de carbone en molécules organiques. Cette découverte ouvre la porte à un rêve technologique que l'on pensait inaccessible : la production directe de carburants et de molécules organiques à partir seulement de CO<sub>2</sub> et d'électricité d'origine renouvelable.*

*L'électrosynthèse microbienne offre la possibilité de réguler le potentiel de la cathode, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour orienter les processus métaboliques microbiens.*

*Le projet BIORARE propose de développer un procédé associant l'électrosynthèse microbienne côté cathode à l'oxydation de la matière organique contenue dans les déchets côté anode. L'oxydation et la réduction sont possibles grâce au développement de biofilms électro-actifs recouvrant la surface des électrodes et jouant le rôle de catalyseur des réactions électrochimiques. Le schéma du procédé "Biorare" initialement envisagé pour l'électrosynthèse microbienne.*

*Ce procédé constitue une technologie extrêmement prometteuse pour la bioraffinerie de déchets organiques car l'oxydation des flux contaminés de déchets à l'anode peut être physiquement dissociée de la synthèse des produits biosourcés à la cathode, facilitant grandement la récupération, la purification des molécules synthétisées, et permet de répondre à certaines contraintes élémentaires.*

*Le concept de l'électrosynthèse microbienne n'a que quelques années. En s'appuyant sur des recherches scientifiques, techniques, environnementales et économiques, l'objectif du projet "Biorare" est d'identifier les composants clés ainsi que les spécifications associées pour l'élaboration d'une stratégie de développement industriel ultérieure. Le but est ainsi d'établir un cahier des charges détaillé pour l'application de l'électrosynthèse microbienne à la bioraffinerie des déchets organiques ».*

Les *Sulfurimonas* se prêtent bien à ce type de traitement, vu qu'ils sont à la fois autotrophes, dénitrifiants, qu'ils fixent le CO<sub>2</sub> et oxydent les sulfures.

**« Cette technologie peut rendre de grands services pour le traitement des rejets atmosphériques des usines d'incinération de ordures ménagères et d'autres usines comme le chauffage urbain, les usines chimiques, les raffineries de pétrole et les usines de transformation de produits organiques ou chimiques... »**

## 14.6 Utilisation d'une biocœnose dans le traitement des ordures ménagères

Le problème des ordures ménagères devient un problème des sociétés évoluées. L'incinération est source de pollution atmosphérique et peut générer des rejets allergènes et cancérigènes, susceptibles d'altérer la santé publique. Bien que les filtres actuels permettent de réduire fortement les résidus de combustion, le gaz carbonique dégagé reste un élément de pollution.

L'enfouissement reste le procédé de choix permettant à la fois l'élimination et la production de fertilisant des sols. Mais l'expérience nous montre que l'enfouissement sans apport d'une flore microbienne adaptée, rend les sols asphyxiés et incultivables. L'asphyxie ne permet pas d'avoir un manteau végétal pouvant utiliser la matière organique et permettre la photosynthèse.

Il faut traiter les déchets organiques comme on traite les eaux résiduelles et les eaux d'égout. C'est-à-dire, traiter l'enfouissement avec un ensemencement microbiologique, afin de transformer les déchets en biomasse, comme le fait notre tube digestif.

L'étude allemande sur la grotte de Sulzbrunn démontre qu'il existe une possibilité d'avoir une flore bactérienne anaérobie pouvant vivre en biocœnose.

**« La biotechnologie actuelle, doit être capable de mettre au point une biocœnose adaptée à l'enfouissement ! »**

## 14.7 Biocœnose anoxique de la grotte de Sulzbrunn

Dans la grotte de Sulzbrunn la flore anaérobie est très importante malgré, cela il y a pu y avoir une biocœnose ayant permis à la majorité de la flore de vivre des millions d'années en toute synusie.

**Flore anaérobie observée dans la grotte de Sulzbrunn**

Anaérobies stricts	Anaérobies facultatifs
<i>Methyloirabilis</i>	<i>Porphyrobacterium</i>
<i>Verrucomicrobium</i>	<i>Gallionella</i>
<i>Methylotenera</i>	<i>Sulfuricella</i>
<i>Ferriphaseus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Siderooxydans</i>	<i>Geobacter</i>
<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Archaea</i>
<i>Propionivibrio</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>
<i>Sulfuritalea</i>	

Ce tableau fait ressortir qu'un grand nombre de bactéries anaérobies sont présentes dans la biocœnose de la grotte Sulzbrunn, ceci prouve que la biocœnose est possible en milieu anoxique.

Dans cette étude il existe probablement une clé, nous permettant de résoudre certains problèmes de l'environnement. L'équilibre et la diversité de la flore microbienne peuvent se produire dans un système anoxique et cet équilibre peut perdurer de très nombreuses années (dans ce cas 15 millions d'années).

L'enfouissementensemencé d'une flore microbienne choisie, équilibrée pour que les détrituss soient dégradés et que les gaz dégagés soient recyclés en biomasse (par les méthanotrophes et les méthylotrophes) pourrait rendre au sol sa vie de terre cultivable. Sans cela l'enfouissement risque de rendre la vie terrestre impossible par l'asphyxie des sols.

Des analyses microbiologiques réalisées par PCR sur l'ARNr 16s, dans le milieu karstique, montrent qu'il existe des bactéries capables de digérer les produits synthétisés de notre industrie pétrolière, pharmaceutique et cosmétique.

**« La biotechnologie peut rendre de grands services à l'enfouissement des ordures ménagères, en axant ces recherches sur la flore tellurique aérobie et la flore anaérobie en créant des mix microbiens, pouvant entrer en biocœnose pour transformer la diversité des produits enfouis en donnant un compost directement assimilable par les plantes. »**

## 14.8 La production de méthane par fermentation anaérobie des déchets anthropiques organiques

La méthanisation des fumiers est connue depuis les années 50 et peut-être bien avant. Elle a été reprise dans les usines de traitement des ordures ménagères et semble avoir un bon succès.

Mais elle laisse un résidu en fin de fermentation semblant difficilement utilisable. Des problèmes sont apparus lors des épandages des résidus de fermentation, problème de pollution des sols, des nappes souterraines et des grottes avec une influence sur la microfaune cavernicole.

C'est pour cela, que l'utilisation d'une biomasse microbienne adaptée à ces composants pourrait rendre ce substrat utilisable sans risque de pollution.

Il a été montré que les *Archaea* étaient des germes méthanogènes. Ils sont présents dans les mers, les sols et font partie du biotope animal et humain. Malgré cela ils sont anaérobies stricts ceci étant une difficulté pour leur production industrielle et le mode d'ensemencement en anaérobiose.

La culture des *Archaea* pourrait trouver son utilité dans les traitements des polluants, le traitement des déchets ménagers, dans l'industrie chimique et pharmaceutique, cette voie restant à étudier afin d'obtenir une meilleure maîtrise de la méthanisation.

L'apport d'*Archaea* dans les usines de méthanisation des ordures ménagères aurait pour effet d'accroître la production de méthane et de ce fait d'augmenter la minéralisation du résidu et la réduction de leur volume. Les *Arenibacter*, *Marinobacter*, ainsi que certaines *Flavobacteria* sont des bactéries capables d'utiliser les hydrocarbures, pouvant se former au cours de méthanisation, il y a là une possibilité biotechnologique de résoudre ce problème.

## 14.9 L'épandage des résidus de méthanisation

Pour l'épandage il faut : après une neutralisation du substrat (les *Archaea* sont des germes acidophiles et extrémophiles), pratiquer un ensemencement par une flore adaptée en fonction des résidus présents dans la biomasse. Puis, avant l'épandage, il sera effectué une étude des capacités de rétention du terrain, devant recevoir ce substrat et un calcul de la masse que le sol peut absorber.

Les résidus de méthanisation sont proches des composés pétroliers, ils sont présents dans la grotte de Sulzbrunn dus à l'activité méthanogène de cette cavité. Dans cette grotte, il a été identifié une bactérie genre *Propionivibrio* (*Rhodobacteraceae*). Cette bactérie se développe en anaérobiose et utilise comme nourriture les hydrocarbures en produisant des acides gras et plus précisément les propionates. Elle devrait pouvoir réduire les composés d'hydrocarbures formés par la méthanisation. Une telle procédure devrait rendre cette technique de production méthanique réalisable sans problème de pollution dans l'épandage de résidus de fermentation.

Les *Marinobacter* et les *Arenibacter* sont des bactéries détruisant les hydrocarbures marins et terrestres en produisant du CO<sub>2</sub>.

**« Les biomasses, ayant été utilisées pour produire du méthane à partir des ordures ménagères, peuvent être traitées quelques jours avant l'épandage par l'ensemencement d'une culture bactériennes contenant des *Marinobacter* ou des *Arenibacter*. Ce traitement devrait pouvoir améliorer les biomasses de méthanisation en éliminant les hydrocarbures résiduels. C'est à la recherche biotechnologique de répondre sur la faisabilité de cette application. »**

## 14.10 Dégradation spécifique microbiologique des polluants

La flore de l'épige (en surface) ayant une action sur le catabolisme organique et la dépollution peut se définir (sans être exhaustive) par les germes du cycle de l'azote tel que *Nitrobacter*, *Azotobacter*, *Citrobacter* permettant d'augmenter le taux d'azote du sol et de rétablir le rapport C/N du sol.

Dans la grotte de Sulzbrunn, il y a une flore de dépollution comme *Actinobacters*, les méthanotrophes, les méthylotrophes, *Hydrogenomonas*, *Ferriphaselus*, *Gallionella*, *Sulfurimonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*... étant capables de transformer une grande partie des produits organiques biodégradables en produits métabolisables et des métaux oxydables en poudres métalliques.

Dans la partie plus endogée du sol, on va trouver des germes dits telluriques anaérobies tels que *Clostridium*, *Plectridium*... ont une forte activité enzymatique permettant de transformer de nombreux produits.

À cela vient s'ajouter la dépollution des résidus organiques toxiques.

Il existe une flore provenant des grands fonds marins, présente dans certaines grottes karstiques détoxifiantes, telles que :

- *Comamonas* dégradant des produits chimiques polluants, des déchets organiques, des pesticides.
- *Alcalogenes*, *Myxococcus* dégradant la matière organique.
- *Chloriflexies* attaquant les composés organochlorés, poly-chlorophényles.
- *Verrucomicrobia* utilisant les méthanes de provenance des produits pétroliers.
- *Geobacters* oxydant les métaux, attaquent les produits pétroliers et modifient les produits radioactifs.
- ***Methylobacterium buryatens*** dégradant le trichloréthylène<sup>38,39</sup>.
- *Actinomycetaceae* et *Actinomycetes (Actinobacter)* dégradant la cellulose et la chitine.
- *Methylobacter* utilisant les hydrocarbures.
- *Nitrospira* transformant l'ammoniac en nitrite.
- *Dehalococcoïdes* utilisant les chloréthylènes, chloro-phénols, polychloro-phényles et dioxines.
- *Arenibacter*, *Marinabacter* et les *Pseudomonas* dégradent les hydrocarbures (voir page 172).
- ...

## Biodégradation

### Des pesticides

(Extrait du *Mémento de Biotechnologie*, de Jean Paul LARPENT , Tec-Doc)

« Les pesticides peuvent servir de source de carbone pour les bactéries. Par cométabolisme, les micro-organismes ne se procurent pas leur énergie à partir des pesticides mais exigent un autre substrat pour leur croissance. Les pesticides modifiés peuvent devenir des molécules moins toxiques ou éventuellement même plus toxiques. Une dégradation complète peut mettre en jeu plusieurs organismes.

Substrats	Produits	Bactéries
DDT	p.p-dichlorodiphényl-méthane	<i>Enterobacter</i>
p.p-dichlorodiphényl-méthane	p-chlorophényl-acétate	<i>Pseudomonas</i>
2-4-5-trichloro-phénoxyacétate	3-5-dichloro ou 2-hydroxy	<i>Brevibacterium</i>
3-5-dichloro-catéchol	muconique acide semi-aldéhyde	<i>Acinetobacter</i>

Les dégradations sont des réactions de cométabolismes, pouvant faire d'un pesticide une molécule accessible à une dégradation ultérieure. La formation des conjugués entre les pesticides et certaines molécules biologiques (glucides, acides aminés) entraînés une détoxification temporaire »

Organismes	Substrats
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	2,4-dichlorobenzoate
<i>Burkholderia cepacia</i>	2,4,5-trichlorobenzoate
<i>Burkholderia cepacia</i>	2-6-dichlorotoluène
<i>Alcaligenes sp</i> <sup>39</sup>	1,3-dichlorobenzène atrazine
<i>Pseudomonas sp</i>	3-chlorobenzoate
<i>Ps. Putida</i>	5-chlorobenzoate et 3-4-dichloroaniline
<i>Bacillus brevis</i>	5-chlorosalicylate
<i>Alcaligenes entropilus</i>	2,4-dichlorophénoxyacétate
<i>Flavobacterium sp</i>	Pentachlorophénol
<i>Arthrobacter sp</i>	Acide 4-chlorobenzoïque
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Dicamba
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1-4-dichlorobiphényl
<i>Aspergillus niger</i>	PCB

## Épuration anaérobie

« La méthanisation ou épuration anaérobie des effluents est utilisée industriellement pour le traitement des boues de stations d'épuration urbaines ou pour le traitement des effluents industriels riches en matière organique (sucreries, féculeries,...). Par comparaison avec les traitements biologiques aérobies, la fermentation méthanique offre de réels avantages car elle permet de traiter des effluents concentrés avec de bons rendements et elle réduit ainsi les coûts énergétiques, en produisant très peu de boues excédentaires.

L'épuration anaérobie des effluents met en jeu trois types de populations bactériennes : les anaérobies réalisant l'hydrolyse des polymères (Clostridium) produisant des acides organiques, du CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> : les populations de bactéries acétogènes (Clostridium aceticum, Syntrophomonas de l'ordre Clostridiales, Syntrophobacter ou Synthrophobacter embranchement de δ-Proteobacteria, Acetobacterium, Acetogenium, Pelobacter,...) synthétisant l'acide acétique et les archaea (Methanosarcina, Methanothrix, Methanobacterium,...) produisant le méthane à partir du CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> ou de l'acétate. Plusieurs techniques sont possibles : soit la cultures fixes sur matériaux plastiques ou supports mobiles, soit en cultures libres » (Jean Paul Larpent, 1990).

Nous pouvons ajouter à cela la présence d'Archaea méthanogènes et nitro-modificateurs, ainsi que certains protistes (protozoaires et algues) retrouvés dans le milieu karstique. Cette flore microbienne aérobie et anaérobie, sera insérée en même temps que les déchets. Cette ensevelissement ce fera après un broyage et une homogénéisation avec une terre arable pour permettre le drainage hydrique. On utilisera des germes telluriques anaérobies en profondeur et aérobies en surface. L'arrosage permettra une humidification de l'ensemble pour faciliter une bonne fermentation (conservation d'un Aw favorable aux fermentations).

**« La biotechnologie peut mettre en culture cette flore (liste non exhaustive), afin d'être utilisée comme facteur de détoxification des sols, des eaux, ou les rejets des usines chimiques. »**

### 14.11 Élimination des carburants fossiles

Pour Jean Jouzel et Olivier Nouaillas dans leur conférence sur le réchauffement climatique de la planète, en 2017 au parc Galea en Corse, la pérennité des énergies fossiles du futur sera :

« Même si certains économistes se sont trompés sur la date d'un éventuel "pic pétrolier", les spécialistes de l'énergie considèrent qu'au rythme actuel de leur exploitation, l'humanité aura épuisé dans moins de 200 ans les réserves d'énergies fossiles (gaz, pétrole, charbon). Accumulées dans le sol pendant plusieurs centaines de millions d'années. Avec des disparités importantes puisque, par exemple, l'OPEP évalue à 1 481 milliards de barils les réserves mondiales prouvées de pétrole, équivalant à seulement 40 ans de consommation au rythme actuel. »

Ces propos fort inquiétants sur le devenir de l'utilisation des énergies fossiles, nous montre qu'une action dans la recherche des produits de substitution s'impose. Les moyens qu'ils nous proposent pour y remédier à cela sont les suivants :

« La création de d'organismes de plus en plus complexes, dont les finalités des débats sont souvent connues à l'avance, permettent la pérennité de l'énergie fossile et la sérénité du citoyen en faisant croire que les États vont prendre l'affaire du réchauffement climatique en main...

Pour le protocole de Kyoto en 1997 mise en pratique en 2005, c'est à ce jour le seul accord juridique international signé pour diminuer les gaz à effet de serre. Il a engagé les 37 pays industrialisés et seuls à réduire de 5,2 % l'émission de gaz à effet de serre entre 2008 et 2012. L'accord fut d'ailleurs respecté par les pays de l'Union Européenne et la Russie, à moitié par le Japon, mais pas du tout par les États-Unis et l'Australie, et même dénoncé en 2012 par le Canada.

Cette façon de faire tourner en rond un débat et de faire croire que l'on va tuer la bête, faisant le réchauffement climatique, mais cela est une hypocrisie ! »

Dans leur livre, comme par hasard..., on a oublié de nous parler de l'utilisation de l'hydrogène comme carburant ?

## 14.12 Utilisation de l'hydrogène comme source d'énergie

Une grande partie des bactéries de la grotte de Sulzbrunn sont fixatrices de l'azote atmosphérique, par cette action elles produisent de l'hydrogène.

### L'hydrogène peut produire de l'énergie :

- Pour la production d'électricité dans les batteries à combustible (voiture, bateau, électrique avec une batterie à hydrogène (batteries à combustibles) ;



- Sous forme de carburant thermique (voitures, bateaux à moteur thermique, comme les voitures à GPL avec un chemisage des cylindres anticorrosifs) ;
- Sous forme de plasma, pour les réacteurs des avions à réaction et des fusées ;
- Sous forme de fusion nucléaire, pour produire de l'énergie électrique....

**Utilisation en remplacement des centrales de fission nucléaire :** pour la production électrique dans le système de pile à fusion thermonucléaire, la recherche avance à petits pas. Les études sur les systèmes d'amorçage sont encore très théoriques. Pour autant, il s'agit là d'une production nucléaire plus propre que la fission que nous utilisons aujourd'hui. Les orages naturels sont bien une formation de plasma fait par la nature sans intervention de l'Homme.

### Voies habituelles de production de l'hydrogène :

- Par voie d'électrolyse de l'eau : l'eau est décomposée par le passage d'un courant continu en hydrogène en anode et oxygène en cathode. L'électricité peut être produite par :
  - Les panneaux solaires,
  - Les éoliennes,
  - L'électricité hydraulique,
  - Les centrales thermiques,
  - Les centrales atomiques.

Elle peut être produite pendant les heures creuses des productions électriques des énergies renouvelables (éolienne, panneau solaire, centrale électrique hydraulique, électricité par les marées ou les courants marins...).

- Par voie thermolyse de l'eau : l'eau chauffée à haute température produit de l'hydrogène et de l'oxygène.
- Par voie chimique : ex. l'action de l'acide chlorhydrique sur du zinc. La réduction du monoxyde de carbone ( $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} = 130^\circ\text{C} \Rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ ).
- Par voie de gazéification : du dihydrogène supplémentaire peut être récupéré par ajout d'eau par le biais de la réduction de l'eau réalisée à environ  $130^\circ\text{C}$  :  $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$   
L'énergie libérée par cette réaction vaut 40,4 kJ/mol. Essentiellement, l'atome d'oxygène (O) est extrait de l'eau (vapeur) ajoutée pour oxyder le CO en  $\text{CO}_2$ . Cette oxydation fournit également de l'énergie pour entretenir la réaction en cours.
- Production de l'hydrogène par voie biologique : elle correspond à la production d'hydrogène par des algues au sein de bioréacteurs. Les algues peuvent produire de l'hydrogène sous certaines conditions. On a découvert à la fin des années 1990 que les algues privées de soufre passent de la production d'oxygène (photosynthèse classique) à la production d'hydrogène<sup>40</sup>.  
*« En 2006, des chercheurs de l'université de Bielfeld et de l'université du Queensland ont modifié génétiquement l'algue verte monocellulaire **Chlamydomonas reinhardtii** afin qu'elle puisse produire une grande quantité d'hydrogène. *Stm6* peut à long terme produire cinq fois le volume produit par la forme naturelle de l'algue, correspondant à une efficacité énergétique de 1,6 à 2 %.*

*Dans un laboratoire de Suède, une chercheuse a décrypté le fonctionnement d'une bactérie prometteuse pour la production d'hydrogène à base de biomasse. Cette bactérie, ayant évolué dans les sources thermales, produit en effet deux fois plus d'hydrogène que les bactéries employées actuellement pour produire ce gaz pouvant être l'énergie du futur »<sup>30</sup>.*

Dans le détail, les bactéries fixatrices d'azote, intéressant les chercheurs, sont bien connues dans l'agriculture. Ce sont elles qui, dans le sol, transforment l'azote en le rendant disponible, c'est-à-dire assimilable pour les racines des végétaux. Trois processus de base sont impliqués dans le recyclage de l'azote : la fixation de l'azote diatomique  $N_2$ , la nitrification et la dénitrification. C'est lors de la réaction de nitrification qu'il y a production d'hydrogène. À partir de là, les chercheurs ont développé un agent de sélection, dont le rôle est d'identifier les souches de bactéries productrices d'hydrogène.

- Production de l'hydrogène par voie bactériologique : les *Clostridium* et beaucoup de bactéries autotrophes sont capables de produire de l'hydrogène à partir de l'eau par réaction d'oxydoréduction avec les minéraux (fer, magnésium, manganèse, cobalt...).

### 14.13 Bactéries de la grotte de Sulzbrunn fixant de l'azote de l'air

De l'étude de la grotte de Sulzbrunn, il est à remarquer qu'un grand nombre de bactéries analysées sont des bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique, donc productrices d'hydrogène.

Bactéries de la grotte de Sulzbrunn pouvant produire de l'hydrogène

#### Bactéries provenant du milieu marin

- *Methylocella* : est aérobie, fixe l'azote atmosphérique et le gaz carbonique (qui est méthanotrophe).
- *Methylovulum* : est anaérobie, fixe l'azote atmosphérique et utilise le méthane pour sa source d'énergie.
- *Methylotenera* : est anaérobie, fixe l'azote atmosphérique et fixe le gaz carbonique (qui est méthanotrophe), il produit du méthanol.
- *Methylomirabilis* : est anaérobie, produit de l'azote ( $N_2$ ), l'oxygène ( $O_2$ ), l'hydrogène ( $H_2$ ) et fixe le gaz carbonique  $CO_2$  (elle est méthanotrophe en fixant le méthane comme énergie).
- *Methylosoma* : est anaérobie, fixe l'azote atmosphérique, fixe le gaz carbonique (il est méthanotrophe en fixant le méthane comme énergie).
- *Methylobacterium* : il fixe l'azote atmosphérique, mais pas le  $CO_2$ .
- *Methylorosula* : il fixe l'azote mais pas le gaz carbonique.
- *Methylobacter* : il fixe l'azote mais pas le gaz carbonique

#### Bactéries provenant du milieu tellurique

- *Capnocytophaga* : il fixe l'azote mais pas le gaz carbonique
- *Rhodocyclus* : fixe l'azote mais pas le gaz carbonique.
- *Rhodospirillaceae* : fixe l'azote et fixe le gaz carbonique (par photosynthèse).
- *Rhodopseudomonas* : fixe l'azote et le gaz carbonique par photosynthèse.
- *Azospira* : fixe l'azote mais pas le gaz carbonique.
- *Rhizobiales* : cette famille comprend beaucoup de germes capables de fixer l'azote.

#### Bactéries provenant de sources minérales chaudes

- |                        |                       |
|------------------------|-----------------------|
| • <i>Gallionella</i>   | • <i>Sufuricella</i>  |
| • <i>Ferriphaselus</i> | • <i>Rhodocyclus</i>  |
| • <i>Siderooxydans</i> | • <i>Sulfuritalea</i> |

### 14.14 Autres bactéries fixant l'azote de l'air pour produire de l'hydrogène

Les bactéries fixant l'azote et produisant de l'hydrogène sont :

- Bactéries aérobies : *Nostoc*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*
- Bactéries anaérobies : *Clostridium*, *Citrobacter*...

D'autres bactéries vivent en symbiose avec le système racinaire des plantes :

- *Rhizobium* : vit en symbiose avec les légumineuses (fabacées) et est fixatrice d'azote.
- L'*Actinomycetes*, *Frankia* : vivant en symbiose avec diverses espèces d'angiospermes, essentiellement arbres et arbustes, notamment les aulnes, l'argousier, les *Casuarinaceae* et le *Myrica gale*.

Dans les océans se sont les *Cyanobacteria* fixant le diazote. Il en existe deux types :

- Les *Cyanobactéries* dites « filamenteuses », telles que *Trichodesmium sp.*, vivant en colonie.
- Les *Cyanobactéries* unicellulaires, appelées UCYN, pouvant vivre libres ou en symbiose avec certaines espèces du phytoplancton.

Dans les sols et les océans les *Verrucomicrobia* comme :

- Les *Methylomirabilis*, ayant produit de l'oxygène sur terre il y a environ 2 milliards d'années, sont fixatrices de l'azote atmosphérique.

### 14.15 Voie biotechnologie dans la production d'hydrogène

Ces organismes bactériens produisent une enzyme, la nitrogénase permettant de réaliser la synthèse de l'ammoniac par une réaction de réduction fortement endothermique :



Dans le système biologique fixateur de  $\text{N}_2$ , les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de  $\text{N}_2$  et une température de 30–35 °C. L'ammoniac est ensuite transformé en acides aminés utilisables par les plantes. La nitrogénase est en réalité un complexe enzymatique formé de sous-unités, dont le fonctionnement est *in vitro* inhibée par l'oxygène. Mais dans le processus de symbiose son fonctionnement est rendu possible en zone de microaérobiose (dans les nodules racinaires) voire en condition aérobie à l'intérieur des racines de plantes non-légumineuses (avec l'aide de microorganismes dits « endophytes » selon Santi & al en 2013<sup>41</sup>. D'après l'équilibre stœchiométrique, une molécule d'azote fixée correspond à une molécule d'hydrogène produite<sup>42,43</sup>. Pour ce faire, la nitrogénase s'accompagne d'une hydrogénation. La nitrogénase est irréversiblement dénaturée par le dioxygène ( $\text{O}_2$ ).

Ces principaux substrats sont<sup>55</sup> :

- $\text{N}_2$
- $\text{H-N=N-H}$
- $\text{H-N=N-OH}$
- $\text{H-N=N-NH}_2$

Ces trois derniers sont utilisés en quantités moins abondantes. La nitrogénase est un complexe de 200 k Da et de 25 sous-unités regroupées en des composants (composant 1 et composant 2). Le composant 1 est composé de 4 grosses sous-unités et 2 molybdènes, noyaux sur lesquels s'accroche l'azote. Le composant 2 est activé lorsqu'il est lié à l'ATP. Une fois activé, il pourra transférer ses électrons au composant 1.

### 14.16 Production de la nitrogénase

Il est possible d'aller plus loin dans notre raisonnement, au-lieu d'utiliser des bactéries nous pouvons utiliser leur système enzymatique, en produisant pas le génie génétique les enzymes nécessaires (Ex : la Nitrogénase) à la production de l'hydrogène et de fixer ces enzymes sur un support solide (que l'on appelle « réacteur »). Dans cette condition, il suffit de faire passer de l'eau sur ce support pour avoir de l'hydrogène gaz.

- Soit par génie génétique.
- Soit par extraction de culture microbienne. Ceci ayant l'avantage de produire des réacteurs enzymatiques. Cela permettrait de transformer directement l'eau en hydrogène.

### 14.17 Production d'électricité par des piles à combustibles microbiennes

La présence de *Sulfuritalea* dans la cavité de Sulzbrunn, donne un exemple de production électrique par l'activité microbienne d'oxydo-rédox et permet par cela d'obtenir une utilisation d'électricité produite par les déchets toxiques comme dans le cas suivant dans l'utilisation des thiocyanates produits par l'exploitation minière.

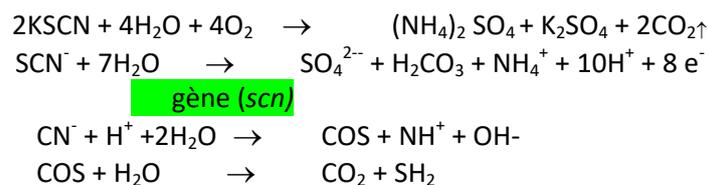
Les *Geobacter* étant des bactéries réductrices du fer<sup>(III)</sup> et du manganèse<sup>(IV)</sup> peuvent produire du courant électrique, lorsque ont récupère les électrons produit par cette réduction à l'aide d'électrodes de graphite entre une partie réductrice d'oxydation (réduction métallique) et une partie accepteuse d'oxydation (hydrogène ou composés organiques comme les acétates ou les produits organiques dégradables anthropiques).

**Exemple d'électricité produite par la biotechnologie :** le *Sulfuritalea hydrogenivorans* est capable d'être utilisé pour obtenir des piles microbiologiques. Les thiocyanates sont des composés toxiques produits par les industries minières et métallurgiques devant être neutralisés avant leurs rejets dans l'environnement<sup>44</sup>.

Dans les études de dégradation des thiocyanates générant du courant électrique<sup>45</sup>, il a été démontré le transfert d'électrons par la captation anodique d'une population de bactérie telle que le *Thiobacillus*.

Le soufre généré par les bactéries est métabolisé par l'intermédiaire des sulfites et finalement devenant des sulfates par l'inversion de la sulfite réductase d'APS et les sulfates transformés par d'adenylyltransferase (nicotinate mononucléotide adénylyl-transférase appartenant NadD enzyme, elle est présente dans toutes les bactéries) et les électrons libérés étaient potentiellement transférés à l'anode *via* une solution navette des électrons. Enfin l'ammonium dû à la dégradation des thiocyanates a été assimilé au glutamate comme source d'azote et de dioxyde de carbone. Il a été fixé comme du carbone organique. Cette étude montre que le soufre inorganique à basse température, utilisé dans une pile à combustible microbienne, est une voie d'utilisation du transfert d'électrons pour produire de l'électricité par une source microbienne.

#### Métabolisme du Sulfo-thiocyanate



De tels cas de production électrique, par des rejets de produits chimiques, doivent exister dans la diversité des productions mondiales et il serait intéressant d'étudier leurs possibilités de production électrique.

### 14.18 Utilisation des bactéries méthanotrophes pour lutter contre les émissions méthanogènes animales.

Jean Jouzel et Olivier Nouaillas dans le livre<sup>27</sup> « *Quel-climat pour demain ?* » nous informe que l'agriculture et l'élevage représente 14% des émissions de méthane.

« *Tout d'abord parce qu'aujourd'hui l'élevage industriel représente 18% des émissions mondiales de gaz à effet de serre selon une étude de la FAO (Organisation des Nation Unies pour l'alimentation et l'agriculture) soit plus que le secteur mondial des transports* ».

Certes les animaux comme les ruminants : les bovins, les caprins, les ovins... ont un système digestif consistant à faire fermenter des composés végétaux (les herbes, le foin) pour s'alimenter. Cette fermentation produit des bactéries, des archaées, des amibes, des protozoaires, elle se réalise dans le rumen. Ces corps microbiens sont en suites consommés sous forme de jus ruminal, apportant à l'animal les protéines et sucre lui servant de nutriment (les ruminants ne sont pas des végétariens, ils consomment des corps microbiens).

Cette fermentation faite dans le rumen produit selon la flore présente, une quantité de méthane plus ou moins importante. Dans une plus faible proportion l'Homme, les chevaux, les porcs, le chien,... eux aussi produisent leur part de méthane par les fermentations intestinales et les fermentations du colon.

Pour les ruminants, il serait donc possible de pouvoir introduire une flore autotrophe, méthanotrophe et méthylotrophe dans le rumen par un apport alimentaire de type probiotique.

Afin d'éviter le contact avec l'air (cette flore étant souvent anaérobie strict), ces bactéries méthanotrophes ou méthylotrophes pourraient être enrobée dans un film cellulosique ou protéique (flore méthanotrophe enrobée).

Les flores autotrophes, méthylotrophes et méthanotrophes n'ont pas besoin de la matière organique pour vivre. Cette flore n'est donc pas pathogène, la matière organique animale et humaine ne les intéresse pas.

Dans le rumen beaucoup de germes viennent de l'herbe souillée par la terre, donc beaucoup de germes autotrophes telluriques sont déjà présents. Les germes méthanotrophes et méthylotrophes sont fréquemment anaérobies, la présence de gaz carbonique produit par la fermentation des végétaux naturelle du rumen sera pour eux un nutriment complémentaire. Cette complémentarité peut augmenter la croissance de la flore ruminale donc diminuer l'indice de consommation animale (consommation/production animale poids vif). C'est-à-dire augmenter la croissance animale avec les mêmes quantités de nutriment.

Les gaz de fermentation naturelle du rumen comme (CO<sub>2</sub>, Méthane, Hydrogène, ...) seront transformés en bactéries et seront digérées par l'animal comme un apport de matière organique, de protéine, la digestion des bactéries étant le mode alimentaire des ruminants.

Un probiotique comportant une flore, autotrophe, méthanotrophe ou méthylotrophe enrobée dans un film de kératine ou autres protéines ou de carboxyles-méthyl-cellulose (CMC) ou autres enrobant naturel, afin d'éviter le contact avec l'air, dans les manipulations avant ensemencement, peut devenir un complément alimentaire pour les ruminants.

De ce fait les écologistes ayant dans leur discours de vouloir éliminer tous les ruminants de la planète et les êtres méthanogènes dont nous sommes. Il serait bon de leur faire comprendre qu'il faut respecter les équilibres nécessaires à la vie. Le rapport protéines animales /protéines végétales, doit être aussi respecté par notre constitution d'omnivore.

Les positions de certains écologistes de détruire les ruminants, est un déséquilibre de notre planète. Sans savoir que la vie sur terre est un perpétuel équilibre, que celui-ci doit être honoré. Que l'excès d'un bien quel qu'il soit, devient vite un mal (rien dans ce monde nous entourant n'est linéaire).

#### Bactéries du rumen

Bactéries non cellulolytiques	Bactéries cellulolytiques
<b>Embranchements</b>	<b>Genres</b>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Cytophaga</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Cellulomonas</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Clostridium</i>
<b>Genres :</b>	<i>Ruminococcus</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>Fibrobacter</i>
<i>Fibrobacter</i>	<i>Butyrivobrio</i>
<i>Prevotella</i>	<i>Spirochaetae</i>
<i>Butyrivibrio</i>	
<i>Eubacterium</i>	

Les bactéries du rumen sont proches des bactéries du sol (*Actinobacteria*, *Clostridium*, *Cytophaga*). Le rumen a un pH de 8, ceci permettant le développement des bactéries, dans une atmosphère en microaérobiose contenant du gaz carbonique, de l'azote, du méthane, de l'oxygène, de l'eau et de la vapeur d'eau. Cette ambiance proche de l'atmosphère de la cavité de Sulzbrunn est propice au développement des bactéries autotrophes, méthanotrophes et méthylotrophes (la présence de *Cytophaga* en est la preuve). La vache secrète 100l de salive par jour pour la rumination, ce liquide sera recyclé dans l'organisme par le liquide ruminal.

Les bactéries méthylotrophes et méthanotrophes présentes dans la grotte de Sulzbrunn pouvant être utilisées.

En examinant la flore de Sulzbrunn, dans les bactéries pouvant être utilisées comme probiotique afin de réduire les dégagements de méthane produits par les fermentations ruminales font l'objet du tableau suivant :

Noms	pH maxi de croissance	Aérobies	Cultivables	Pathogènes
<i>Methylocella</i>	7.5	(+)	(+)	(-)
<i>Methylomicrobium</i>	9.5	(+)	(+)	(-)
<i>Methylobacter</i>	7.5	(+)	(+)	(-)
<i>Methylomonas</i>	7.3	(+)	(+)	(-)
<i>Methylorosula</i>	6	(+)	(+)	(-)
<i>Crenothrix</i>	10	(+)	(+)	(-)
<i>Methylotenera</i>	8.5	(-)	(+)	(-)

Les points les plus importants dans le développement et la croissance des bactéries méthanotrophes et méthylotrophes dans le rumen sont :

- Avoir un pH de croissance pouvant supporter le pH du rumen proche de pH 8.
- L'aérobiose elle est un point important dans la biotechnologie, car il est plus facile de cultiver des bactéries aérobies. Mais l'anaérobiose ayant un intérêt dans le fait que le rumen est un organe en demi-aérobiose due à la présence de NH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> et de Méthane dans l'atmosphère ruminal.
- La mise en culture et la non pathogénicité sont des points primordiaux.

Il existe donc bien des possibilités de produire des probiotiques permettant de réduire les émissions méthanogènes sans réduire la flore ruminale, elle étant indispensable à l'alimentation des ruminants.

#### 14.19 Les bactéries dans les voyages interstellaires

Le *Methylomirabilis*, étant capable de produire de l'oxygène par l'utilisation des nitrates, cette opportunité peut nous laisser penser, qu'il serait possible de produire de l'oxygène dans l'espace comme, cela a été le cas sur notre planète, il y a environ 2 milliards d'années.

#### 14.20 Conclusion sur l'utilisation de la biotechnologie pour la protection de l'environnement

La biotechnologie appliquée à la protection de l'environnement est peut-être l'industrie de l'avenir. Cette étude nous a révélé que les bactéries méthanotrophes peuvent être les garants de notre climat par des ensemencements de lacs, de sols, tourbières ou des apports dans les industries polluantes. C'est pour cela qu'il est important que la biotechnologie se développe en Europe afin de lutter contre le réchauffement climatique. Que l'on puisse produire des bactéries nous servant à éliminer nos polluants.

**« La biotechnologie peut être une clef importante dans la maîtrise du réchauffement climatique. Les bactéries ont rectifié le climat il y a 3 milliards d'années. Il y a 1,5 milliards d'année, elles nous ont permis de pouvoir vivre dans un milieu nous convenant en oxygène, elles ont rendu notre planète vivable. Elles peuvent donc rectifier notre climat actuel, étant loin de la pollution de ces périodes géologiques. »**

### 15.1 Les études de la microbiologie cavernicole

La bactériologie cavernicole est peu connue. Cette étude nous permet d'approfondir nos faibles connaissances dans ce milieu spécifique de la microbiologie. Nous ne connaissons que peu de choses sur la faune et la flore microbienne ; tous les jours, de nouvelles bactéries sont découvertes sous terre dans les mers, dans les sources profondes. L'étude de la microbiologie cavernicole, nous fait découvrir un monde, relatant une vie de plusieurs millions d'années en arrière. Ces bactéries ayant subsisté après toutes sortes de bouleversements géologiques, ont en elles un potentiel d'adaptation ayant résisté à de nombreuses épreuves.

Comparativement à la cavité de Sulzbrunn : la grotte de *Four windows cave* et le gouffre de la Sambuy comportant des bactéries proches des bactéries telluriques comme les *Actinobacteria*, les *Acidobacteria*, alors que ces groupes bactériens sont absents dans la grotte de Sulzbrunn.

Les *Chlorobacteriae* sont absentes dans la cavité de Sulzbrunn et dans la grotte de Magura, mais présentes dans la grotte de la Sambuy et dans la cavité de *Four windows cave*.

Les *Bacteroidetes* ne se trouvent que dans la cavité de Sulzbrunn et la grotte de Magura.

Les *Furmicutes* ne sont présentes que dans la grotte de Magura.

La grotte de *Four window cave* n'a pas d'*Alpha-* et de *Gamma-proteobacteria* ; ni de *Planctomycetes*, ni de *NC10*.

À ce tableau on peut ajouter que la grotte italienne de gypse, *Grotte di Frasassi*, contient la famille des *Acidithiobacteria* appartenant au groupe des *Betaproteobacteria* et la famille des *Acidimicrobiaceae* appartenant à l'embranchement des *Acidobacteria*.

Le gypse étant un sulfate de calcium cristallisé, on comprend la présence de bactéries thiobactéries acidophiles réduisant les sulfates et les thiosulfates. Ainsi que la grotte naturelle sur l'île de Jeju, République de Corée, qui est une cavité plutonique<sup>tt</sup> constituée d'un couloir de lave. Dans cette cavité il a été isolé un *Nocardia*, bactérie de l'embranchement des *Actinomycetes* ou *Actinobacteria* aérobie, ainsi qu'une bactérie de la famille des *Nitrospiraceae*, le *Spirosoma*.

De ces résultats, il semble que la formation géologique des grottes (karstique, tectonique, magmatique, plutonique ou grotte de Gypse...) influe sur la flore microbienne, créant une diversité dans les résultats des analyses bactériennes.

Cette diversité montre l'intérêt de poursuivre les investigations dans les cavités de l'analyse CPR de l'ARNr 16S, afin de pouvoir améliorer nos connaissances dans les prémisses de la vie sur Terre.

**« La spéléologie loisir peut avoir aussi un but scientifique, il suffit pour cela de lui donner les moyens d'analyser les espèces vivant dans ce biotope pour connaître le monde existant des millions d'années en arrière. Comme nous l'a montré l'équipe allemande ayant fait l'étude de Sulzbrunn en Bavière. »**

---

<sup>tt</sup> **Plutonique** : Ayant été formée à de grandes profondeurs par l'action des forces internes de la terre.

En examinant les résultats plus ou moins partiels des grottes étant actuellement analysées par CPR comparativement à leurs constitutions géologiques nous obtenons le tableau suivant :

**Impacts géologiques sur la flore microbienne :**

Sulzbrunn	Gouffre de la Sambuy	Four Windows Cave	Magura	Embranchements
Bavière	France	États-Unis d'Amérique	Bulgarie	
Molasse alpine	Karstique	Magmatique	Calcaire	
molasses et poudingues <sup>uu</sup> sur une côte marine	Sédimentaire karstique	Cheminée volcanique océaniques Grotte basaltique	Sédimentaires	
Bactériologie CPR	Bactériologie CPR	Bactériologie CPR	Bactériologie non définit	
Familles	Embranchement	Familles	Embranchement	
	<i>Actinobacteria</i> 12%	<i>Pseudonocardineae</i> <i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Frankiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Streptomycetaceae</i>	<i>Actinobacteria</i> 11%	<i>Actinobacteria</i>
	<i>Chloroflexi</i> 3%	FW34		<i>Chlorobacteria</i> <i>Chloroflexi</i>
	<i>Nitrospiraceae</i> 6%			<i>Nitrospirae</i>
<i>Cytophagaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Saprospiraceae</i>			<i>Bacteroidetes</i> 11%	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Planctomycetaceae</i> <i>Phycisphaeraceae</i>	<i>Gemmataceae</i> 2%			<i>Planctomycetes</i>
<i>Methylomirabilis</i>				NC10
<i>Chthoniobacteraceae</i>		<i>Verrucomicrobiaceae</i>		<i>Verrucomicrobia</i>
	<i>Acidobacteria</i> 12%	<i>Acidobacteriaceae</i>		<i>Acidobacteria</i>
		<i>Synechococcaceae</i>		<i>Cyanobacteria</i>
			<i>Furmicutes</i> 6%	<i>Furmicutes</i> ( <i>Clostridium</i> et <i>Bacillus</i> )
<i>Hyphomonadaceae</i> DB1-14 <i>Beijerinckiaceae</i> <i>Hyphomicrobiaceae</i> <i>Rhodobacteraceae</i> <i>Rhodospirillaceae</i> <i>Sphingomonadales</i> <i>Erythrobacteraceae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i> 17%		<i>Proteobacteria</i> 63 % (appartenances non précisées)	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Comamonadaceae</i> <i>Hydrogenophilaceae</i> <i>Methylophilaceae</i> <i>Gallionellaceae</i> <i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Betaproteobacteria</i> 15%	<i>Oxalobacteraceae</i> <i>Alcaligenaceae</i> <i>Spirillaceae</i>		<i>Betaproteobacteria</i>
<i>Methylococcaceae</i> <i>Crenothrichaceae</i> <i>Legionellaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Xanthomonadales</i>	<i>Gamma-proteobacteria</i> 14%			<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Cystobacterineae</i>	<i>Delta-Proteobacteria</i> 2%			<i>Deltaproteobacteria</i>
<i>Helicobacteraceae</i>				<i>Epsilonproteobacteria</i>
6.4 %	22 %	20 %	9 %	Non définit

<sup>uu</sup> **Poudingue** : roche sédimentaire détritique faite de galets désolidarisés et soudés entre eux par des sédiments argilo-calcaires.

## 15.2 La grotte de Sulzbrunn est une réserve microbienne

La haute diversité de la flore microbienne de cette cavité et la conservation de cette flore dans son milieu naturel sur des millions d'années montrent qu'une protection particulière doit être donnée à cette grotte et que les visites doivent être particulièrement restreintes.

Cette cavité nous apporte des solutions aux problèmes du réchauffement climatique, des pollutions anthropiques, à notre régulation énergétique...

**« Cette grotte peut être prise comme une collection microbienne particulière et reconnue comme tel. C'est pour cela qu'il faut surveiller cette cavité et contrôler sa visite, afin de ne pas perturber l'équilibre de son biotope et de sa biocœnose. »**

## 15.3 Nos observations

La France peut s'inspirer du travail allemand, de l'*Institute of ground water Ecology* et de la *Bavarian Environment Agency*, accompli dans le but de comprendre la complexité du système microbien souterrain et de faire évoluer l'écologie.

Nous avons là une clé nous permettant de résoudre certains problèmes de l'environnement : l'anoxie que produit l'enfouissement des ordures ménagères est un gros problème. L'enfouissement tel que nous le pratiquons actuellement produit un sol asphyxié devenant improductif.

Cette étude montre que l'équilibre de la flore microbienne peut se produire dans un système anoxique et que cet équilibre peut perdurer de nombreuses années.

L'étude de la biologie cavernicole, n'est pas qu'un loisir, elle pourrait rendre un grand service à notre société.

# ANNEXE DES CARACTÉRISTIQUES DES ORDRES, FAMILLES, GENRES ET ESPÈCES TROUVÉS DANS LA CAVITÉ DE SULZBRUNN

## 16 CLASSIFICATION PHYLOGÉNÉTIQUE

### 16.1 Arbre phylogénétique

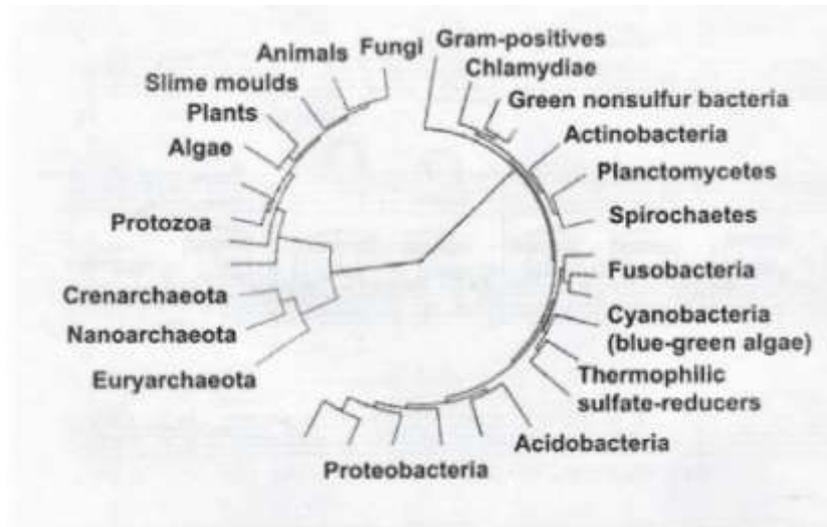


Schéma de classification



### 16.1.1 Les Phyla

Dans ce schéma de classification, les Bacteria sont (non-officiellement) subdivisées en 30 phyla. Avec chacun au moins un représentant cultivé en laboratoire. Chaque clade majeur de bactéries ne pouvant pas, à l'heure actuelle, être cultivée en laboratoire, elles sont connues seulement et de façon assez indirecte par la métagénomique, c'est-à-dire l'analyse d'échantillons en vrac issus de l'environnement. Si l'on inclut les phyla candidats dans ces clades possibles, le nombre de phyla atteint 52 voir plus. Ainsi, le nombre de phyla principaux n'a cessé d'augmenter, partant de 12 en 1987 à 30 en 2014, et dépassant 50 à l'heure actuelle. Si on inclut les phyla des *Candidas* le nombre total a été estimé à plus de 1000 phyla bactériens plus de la moitié reste à découvrir.

#### Historique

À la base du clade Bacteria, près du dernier ancêtre commun universel de tous les êtres vivants, certains scientifiques pensent qu'il y aurait un ordre d'embranchement défini, alors que d'autres scientifiques, comme Norman Pace, pensent qu'il y avait au départ une grande polytomie, c'est-à-dire un événement de spéciations multiples simultanées.

#### Phyla non cultivés

Depuis la mise en place des méthodes d'analyse de l'ADN environnemental (la métagénomique), comme l'analyse de l'ARNr 16S, un très grand nombre d'espèces a été identifiées. Malgré cela, un grand nombre d'espèces non-découvertes, prouvait l'existence de plusieurs phyla non-cultivable, mais identifiés par l'analyse, montre qu'au sein de certains phyla, il manque des représentants cultivables de subdivisions majeures telles que :

- *Verrucomicrobia*
- *Chloroflexi*

Le terme de candidatus est employé pour les propositions de nouvelles espèces pour lesquelles le manque d'information à leur sujet les empêche d'être validées ou que les informations se limitent au séquençage de l'ADN, même si le génome, entier a été séquencé. Lorsque les espèces en question sont membres d'un phylum entier, on appelle ce dernier une division candidate (ou un phylum *Candidat*), et en 2003 cela concernait 26 des 52 phyla découverts.

En 1998, Hungenholtz et Norman Pace définissent un phylum candidat comme un groupe de séquences d'ARNr 16S partageant moins de 85% de similarité avec les phyla déjà existants et décrits. Plus récemment, on a proposé de diminuer ce seuil de similarité à 75%. Avant 1998 on connaissait trois phyla candidat, avant l'établissement du seuil à 85% défini par Hungenholtz.

Avant 1998, il y avait trois phyla.

- Le groupe *OS-K* (provenant de la source Octopus du Parc National du Yellowstone)
- Le groupe *Marin A* (provenant de l'océan Pacifique).
- Le groupe *Termite 1* (provenant du tube digestif de la termite *Reticulitermes speratus*) aujourd'hui classifié dans les *Elusimicrobia*).

Depuis après 1998 autres phyla ont été identifiés :

OPI,OP3,OP5 (nommée <i>Calidiserica</i> )	BRC1 (provenant d'un sol brut et racine de riz)
OP8,OP9 (nommée <i>Atribacteria</i> )	ABY1(dans des sédiments)
OP10 ( <i>Armatimonadetes</i> )	Guyamas1 (dans des cheminées hydrothermales)
OP11(dans le Parc National de Yellowston)	GN01, GN02, GN04 (dans le tapis microbien hypersalin à Guerrero Negro)
WS2, WS3, WS6 (dans aquifère de Wurtsmith)	NKB19, SBR 1093 (dans des boues activées)
SC3 et SC4 (dans des sols arides)	TM6, TM7 (dans des couches de tourbe, intermédiaire)
VadimBE97(nommée <i>Lentisphaerae</i> )	
NC10 (dans la grottes inondées, rizières, ...)	

Actuellement un phylum candidat appelé *Poribacteria* et *Tectomicrobia* ont été découverts, vivant en symbiose avec les éponges et faisant l'objet de recherches. Enfin, on a proposé que *Nitrospina gracilis* ayant été pendant longtemps sans affiliation phylogénétique, appartienne à un nouveau phylum, celui des *Nitrospinac* (Michael S. Rappé et Stephen J. Giovannomi, 2019).

Parmi les autres phyla candidats faisant l'objet de recherches, on peut citer le TM7, les génomes d'organismes ayant été séquencés « draft génomes », le WS6 et le groupe Marin A. Deux espèces du phylum *Candidat* OP10, appelé aujourd'hui *Armatimonadetes*, ont été récemment cultivées.

L'*Armatimonas rosa* isolée du rhizoplan<sup>vv</sup> d'un roseau d'un lac japonais, et le *Chthonomonas calidirosea* (Kevin C.Y. Lee, Péter F. Dunfied, 2011) provenant d'un isolat d'un sol géothermiquement chauffé à la « Porte des Enfers » (Tikiere, Nouvelle Zélande).

Une espèce du phylum *Candidat* OP5, *Calidisericum exile*, a également été cultivée, ce qui a donné lieu à l'appellation de ce phylum *Caldiserica*. Le phylum *Candidat* VadiBE97 est désormais connu sous le nom de *Lentisphaera* depuis que les espèces *Lentisphaera araneosa* et *Victivallis vadensis* ont été cultivées (Koji Mori, Kaoru Yamaguchi, 2009).

**« Le microbisme non cultivable rend les investigations et les recherches microbiologiques relativement difficiles. Malgré toutes les investigations de recherche microbiologique, malgré l'évolution des méthodes d'analyse, des prélèvements fait de plus en plus, sur les milieux extrêmes (fonds marins, les profondeurs terrestres, dans les parties des volcans,...), malgré tout cela, nous voyons que la connaissance de la microflore environnementale est loin d'être finalisée ».**

## 16.2 Analyse des embranchements bactériens de la flore de la grotte de Sulzbrunn

Cette analyse consiste à étudier les caractéristiques de chacune des classes bactériennes trouvées dans les résultats de la PCR, ayant été publiés dans *ISME Journal*. Les genres n'ayant pas été toujours représentés ou étudiés, il sera pris comme exemple les caractéristiques des genres les plus représentatifs des familles, déjà identifiés dans le milieu karstique.

Analyse sur les biofilms et l'eau effectuée par PCR en pourcentage dans chaque structure  
(*ISME Journal*)

Classe bactérienne	Snottites	Biofilms « subaerial »	Biofilms « submersed »	Eau de source minérale	Eau de mélange
<i>Bacteroidetes</i>	11,6	11,7	1,2 ± 0,6	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,04
<i>Planctomycetes</i>	18,4	21,5	5,5	< 1	< 1
<i>Verrucomicrobia</i>	10,7	2,7 ± 0,5	< 1 ± 0,6	< 1	< 1
<b>N C10</b>					
<i>Alphaproteobacteria</i>	28,6	25,3	16,3	< 1	2,5 ± 1,2
<i>Betaproteobacteria</i>	2,4	2,9	34,5	63,8	43,6
<i>γ-Proteobacteria</i>	21,4	25,3	38,0	12,6	40,4
<i>δ-Proteobacteria</i>	1,4 ± 1	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,2	4,8	1,3 ± 0,5
<i>Non identifier</i>	5,5	8,8	4,4	14,4	9,0

### Analyse par structure des méthylotrophes

Snottites	10,5 + 5,2 %	OTUs
Biofilms « subaerial »	12,6 + 10,5 %	OTUs
Biofilms « submersed »	46,3 + 13,6 %	OTUs
Eau de source minérale	8,4 + 35,8 %	OTUs
Eau de mélange	47,3 + 35,8 %	OTUs

### Nos observations :

<sup>vv</sup> **Rhizoplan** : La colonisation saprophytique tout comme l'infection de préémergence proviennent de propagules formées dans la spermosphère, alors que l'infection des hypocotyles provient de propagules formées dans les rhizosphères ou dans les rhizoplans, selon les isolats

Dans les snottites et les biofilms « subaerial » les valeurs des biomasses sont relativement identiques, mais dans les snottites elles semblent plus régulières.

Dans l'eau il y a une forte variation pouvant provenir des changements de flux et de pluviométrie.

Les biofilms « submersed » ont une flore méthyloprophile significativement plus importantes sûrement due à la teneur plus forte de l'A<sub>w</sub> (eau libre) permettant une plus grande activité microbienne.

### 16.3 Embranchements et familles observées dans la cavité de Sulzbrunn (ISME Journal)

Classes bactériennes	Snottites Biofilms	Eau de source	Eau de mélange
<b>Bacteroidetes</b>	<i>Cytophagales</i> <i>Cytophagaceae</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Sphingobacteriales</i> <i>Saprospiraceae</i> ( <i>Arenibacter</i> )	≈ 1	≈ 1
<b>Planctomycetes</b>	<i>Planctomycetales</i> <i>Planctomycetaceae</i> <i>Phycisphaerales</i> <i>Phycisphaeraceae</i>	≈ 1	≈ 1
<b>NC10</b>	<i>Methylomirabilis</i>	≈ 1	≈ 1
<b>Verrucomicrobia</b>	<i>Chthoniobacterales</i> <i>Chthoniobacteraceae</i> <i>Fuku N18</i>	≈ 1	≈ 1
<b>Alphaproteobacteria</b>	<i>Caulobacterales</i> <i>Hyphomonadaceae</i> <i>DB1-14</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Beijerinckiaceae</i> <i>Hyphomicrobiaceae</i> <i>Rhodobacterales</i> <i>Rhodobacteraceae</i> <i>Rhodospirillales</i> <i>Rhodospirillaceae</i> <i>Rickettsiales</i> <i>Sphingomonadales</i> <i>Erythrobacteraceae</i>	≈ 1	≈ 1
<b>Betaproteobacteria</b>	<i>Burkholderiales</i> <i>Comamonadaceae</i> <i>Hydrogenophilales</i> <i>Hydrogenophilaceae</i> <i>Methylophilales</i> <i>Methylophilaceae</i> <i>Nitrosomonadales</i> <i>Gallionellaceae</i> <i>Rhodocyclales</i> <i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Burkholderiales</i> <i>Comamonadaceae</i> <i>Hydrogenophilales</i> <i>Hydrogenophilaceae</i> <i>Methylophilales</i> <i>Methylophilaceae</i> <i>Nitrosomonadales</i> <i>Gallionellaceae</i> <i>Rhodocyclales</i> <i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Burkholderiales</i> <i>Comamonadaceae</i> <i>Hydrogenophilales</i> <i>Hydrogenophilaceae</i> <i>Methylophilales</i> <i>Methylophilaceae</i> <i>Nitrosomonadales</i> <i>Gallionellaceae</i> <i>Rhodocyclales</i> <i>Rhodocyclaceae</i>
<b>Gammaproteobacteria</b>	<i>Methylococcales</i> <i>Methylococcaceae</i> <i>Crenothrichaceae</i> <i>Legionellales</i> <i>Legionellaceae</i> <i>Pseudomonadales</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Xanthomonadales</i>	<i>Methylococcales</i> <i>Methylococcaceae</i> <i>Crenothrichaceae</i> <i>Legionellales</i> <i>Legionellaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Xanthomonadales</i>	<i>Methylococcales</i> <i>Methylococcaceae</i> <i>Crenothrichaceae</i> <i>Legionellales</i> <i>Legionellaceae</i> <i>Xanthomonadales</i>
<b>Deltaproteobacteria</b>	≈ 1	≈ 1	≈ 1
<b>Epsilonproteobacteria</b>	≈ 1	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas</i>

Ce tableau montre que l'eau de source et l'eau de mélange ont peu de bactéries des groupes *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *NC 10*, *Verrucomicrobia*, *Alphaproteobacteria*, étant des germes habituellement retrouvés dans les cavités karstiques.

Dans les eaux de mélange et l'eau de source, on trouve une présence abondante de ferrobactéries, aussi en plus petite quantité dans les biofilms « submersed », sûrement dû à une faible diffusion des bactéries de l'eau à travers le biofilm, comme *Gallionella*, *Siderooxydans*, *Ferriphaselus*, *Ferrobacterium*, étant des bactéries de sources chaudes, profondes, d'eau riche en fer, montrant que l'eau de la source minérale est d'origine profonde.

Les *Xanthomonadales* des biofilms « submersed » proviennent de l'eau de mélange, leur présence se limitant à ce type de biofilm « submersed ».

Les *Pseudomonas* sont des germes très répandus dans la nature. Ils sont présents dans les snottites et les biofilms, mais peu présents dans les eaux de la grotte, confirmant que l'eau de source a eu peu de contact avec la flore de l'épi-karst.

Cette différence entre l'eau et les structures (biofilms et snottites) montre, qu'il y a eu peu d'apport microbien par l'eau venant de l'extérieur de la cavité.

Les bactéries de cet embranchement trouvées dans la grotte de Sulzbrunn sont :

<i>Cytophagales</i> <i>Cytophagaceae</i>	<i>Flavobacteriales</i> <i>Flavobacteriaceae</i> ( <i>Arenibacter</i> )	<i>Sphingobacteriales</i> <i>Saprospiraceae</i>
---	---	--

### 17.1 Phylum *Bacteroidetes* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition de l'embranchement *Bacteroidetes* par catégorie d'échantillons sur le total de chacune des structures :

Snottites	11 %	de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	11 %	de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	1,2 % ± 0.6	de la flore de cette structure
Eau de minérale	1,3 % ± 0.2	de la flore de cette structure
Eau de mélange	1,2 % ± 0.04	de la flore de cette structure

#### Généralités

Dans ce phylum des *Bacteroidetes*, on trouve la classification suivante :

- Phylum *Fibrobacter* ; classes *Fibrobacteria* ; Ordre *Fibrobacteriales*
- Phylum *Chlorobi*
  - Ordre *Chlorobiales*
  - Ordre *Ignavibacteriales*
- Phylum *Bacteroidetes*
  - Ordre *Bacteroidales*
  - Ordre *Cytophagales* selon les auteurs inclus dans *Ordre Bacteroidales*
  - Ordre *Flavobacteriales*
  - Ordre *Sphingobacteriales*
  - Ordre *Saprospirales*

#### 17.1.1 Ordre *Bacteroidales* (Grotte de Sulzbrunn)

Classes de cet ordre :

- *Bacteroidia*
- *Cytophagia*
- *Flavobacteria*
- *Sphingobacteria*

##### 17.1.1.1 Famille *Bacteroidaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Cette famille comprend les genres suivants :

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acetofilamentum</i></li> <li>• <i>Acetomicrobium</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acetothermus</i></li> <li>• <i>Bacteroides</i></li> <li>• <i>Capsularis</i></li> </ul>
---	--

#### Habitat

- Sols ; Sédiments ; Eau de mer ; Intestin des animaux et des humains.

##### 17.1.1.1.1 Genre *Bacteroides* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Castellani et Chalmers 1919

**Ordre *Bacteroidales* ; Famille *Bacteroidaceae* ; Genre *Bacteroides***

Espèces de *Bacteroides* les plus connus :

<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> :	<i>B. ovatus</i>	<i>B. coprocola</i>	<i>B. salyersiae</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>B. uniformis</i>	<i>B. eggerthii</i>	<i>B. stercoris</i>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>B. acidifaciens</i>	<i>B. massiliensis</i>	<i>B. polypragmatus</i>
<i>B. distans</i>	<i>B. tectus</i>	<i>B. nordii</i>	<i>B. xylanolyticus</i>
<i>B. vulgatus</i>	<i>B. caccae</i>	<i>B. plebeius</i>	
	<i>B. coagulans</i>	<i>B. pyogenes</i>	

## Morphologie

Les *Bacteroides* sont en formes de cocci anaérobies strictes ; bactéries de Gram (-) ; elles ont des récepteurs ganglioside GSLs étant des protéines de 35 KDa, typiques du gonocoque ;

## Caractéristiques biochimiques

Les *Bacteroides* sont des bactéries anaérobies ne possédant pas de superoxydes dismutase, ni catalase. Elles font parties des bactéries protéolytiques. Les membranes *Bacteroides* ne contiennent pas de stérols. Les hopanoïdes<sup>ww</sup> (composé organique pentacyclique présente dans la membrane plasmique) ou squalènes<sup>xx</sup> (appelé aussi spinacène ou saprène est un triterpène, isoprénoïde à 30 at. Carbone et 50 at. H) sont présent chez la plupart des bactéries sauf chez les Archaea et les bactéries anaérobies. Le système respiratoire des *Bacteroides* utilise comme quinone la ménaquinone. Les espèces *Bacteroides ureolyticus* et *B. gracillis* utilisent H<sub>2</sub> et les formates comme donneurs d'électrons, les fumarates (COOH-CH=CH-COOH → acide fumarique) et les nitrates utilisés dans la respiration anaérobie. Ils ne dégradent pas les glucides et provoquent divers infections humaines.

## Orientation du diagnostic des *Bacteroides* :

Fermentation des sucres (+) ; sans formation de pigment noir sur gélose au sang ; se développe sur milieu contenant 5 mg de Bile /l ; négatif sur Vert brillant 100g /l ;

## Culture

Les *Bacteroides* se reconnaissent facilement à l'action favorisante que la bile exerce sur leur croissance.

Milieu pour les *Bacteroides* sous anaérobie :

- Bouillons et géloses de Schaedler avec de la Vitamine K3 dans le milieu.
- Gélose Columbia (+ sang) avec mélange Kanamycine et vancomycine.
- milieu CTA + glucides avec antisérum E (immunofluorescence indirecte).
- milieu CDC .
- peut utiliser « Trypticase soy agar (BBL) » avec agar, extrait de levure (Difco) 5g, hémine 5mg, Vitamine K1 (3 phytylménadione).

Milieu à pH 7.5 ; stérilisation 15 mn à 112 °C ; à la température du milieu refroidie à 48 °C faire une répartition et une injection dans le milieu de :

On répartit le sang de mouton défibriné dans les boîtes de Pétri, puis on ajoute 1 ml par boîte de :

- CDC kanamycine (100 µg/ml) + vancomycine (7.5 µg/ml)
- CDC + Paronomycine (100 µg/ml) + vancomycine (75 µg/ml)

<sup>ww</sup> Un **hopanoïde** est un composé organique pentacyclique dérivé de l'hopane et appartenant à une famille de molécules présentes dans la membrane plasmique des bactéries où elles jouent un rôle semblable à celui du cholestérol chez les eucaryotes en améliorant la résistance et la rigidité membranaires .

<sup>xx</sup> Le **squalène** parfois appelés aussi spinacène ou supracène ou supraène est un triterpène, isoprénoïde à trente atomes de carbone et de cinquante atomes d'hydrogène, de nom : (E) 2,6,10,15,19,23\_Hexaméthyl -2,6,10,18,22, tétracosahexène. Ses 6 unités d'isoprène sont toutes en configuration trans. C'est un lipide de composition hydrocarbonée naturellement produit par tous les organismes supérieurs y compris les humains (il est notamment retrouvé dans le sébum humain) et c'est un intermédiaire essentiel dans la biosynthèse du cholestérol, des hormones stéroïdes et la vitamine D chez humain. Il est présent en grande quantité dans huile de foie des requins d'où son nom, et en moindre quantité (0.1 à 0.7%) dans l'huile d'olive et dans d'autres huiles céréalières ou provenant de l'amarante, des semences, du riz, des germes de blé,...

## Identification des *Bacteroides* galerie API 20 A



	IND	URE	GLU	MAH	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT
<i>Bacteroides asaccharolyticus</i>	02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Bacteroides bivius</i>	0	0	00	0	00	0	00	0	0	0	75	0	02	0	00	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides capillosus</i>	0	0	25	0	0	10	10	0	10	0	25	00	0	10	10	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides caccae</i>	0	0	100	0	100	100	100	1	100	00	0	100	1	50	100	75	100	0	75	00	0
<i>Bacteroides distans</i>	0	0	00	0	0	0	07	0	0	0	70	0	0	0	70	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides distasonis</i>	0	0	00	0	00	00	00	75	00	27	1	00	4	00	00	00	00	1	00	00	00
<i>Bacteroides eggerthii</i>	00	0	00	1	00	0	00	0	00	00	0	00	0	00	00	0	0	0	00	0	00
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	0	00	0	00	00	00	0	00	0	1	00	1	30	00	0	00	0	1	0	00
<i>Bacteroides gingivalis</i>	1	0	00	0	00	00	00	1	00	00	1	00	1	5	00	1	00	0	77	77	10
<i>Bacteroides intermedius</i>	00	0	00	0	0	00	00	0	0	0	00	1	6	2	00	0	00	0	0	0	0
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	0	0	00	0	00	00	00	0	0	1	40	0	20	10	00	0	00	0	0	0	0
<i>Bacteroides merdae</i>	0	0	100	0	100	75	75	1	100	20	0	100	0	1	100	70	00	0	50	20	20
<i>Bacteroides oralis</i>	0	0	00	0	00	00	00	04	11	0	22	71	7	70	00	1	02	0	44	6	0
<i>Bacteroides ovalis</i>	00	0	00	10	00	00	00	00	00	04	40	01	1	00	00	40	00	4	00	00	00
<i>Bacteroides ruminicola bravis</i>	0	0	00	0	00	00	00	00	00	00	21	57	0	00	00	0	00	7	70	0	0
<i>Bacteroides ruminicola ruminicola</i>	0	0	00	00	77	77	77	00	77	77	0	00	11	77	00	0	00	00	11	0	0
<i>Bacteroides stercoris</i>	100	0	100	0	100	100	100	00	100	1	0	100	0	1	100	0	100	0	100	0	0
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	00	0	07	0	00	00	00	10	00	00	5	00	1	70	00	22	00	0	00	00	00
<i>Bacteroides uniformis</i>	07	0	00	0	00	00	01	01	00	01	4	00	0	00	00	1	00	0	00	1	10
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	0	00	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides vulgatus</i>	0	0	00	0	00	00	00	0	00	00	11	20	0	5	00	0	00	0	02	4	3

Indole : IND ; Urée : URE ; Glucose : GLU ; Lactose : LAC ; Saccharose : SAC ; Maltose : MAL ; Salicylate : SAL ; Xylose : XYL ; Arabinose : ARA ; Gélatine : GEL ; Esculine : ESC ; Glycérol : GLY ; Cellobiose : CEL ; Mannose : MNE ; Mélézitose : MLZ ; Raffinose : RAF ; Sorbitol : SOR ; Rhamnose : RHA ; Tréhalose : TRE ; Catalase : CAT

### Antibiorésistance

Les *Bacteroides* résistent à la Kanamycine 1000 mcg /l, Vanamycine 5 mcg /l.

Alors que la plupart des bactéries anaérobies sont sensibles à la pénicilline, les *Bacteroides* sont régulièrement résistants à cet antibiotique, de même qu'à plusieurs autres. La clindamycine et le métronidazole sont les antibiotiques les plus indiqués dans les infections par les *Bacteroides*, ceux-ci y sont toujours sensibles.

### Habitat

Les *Bacteroides* sont une flore normale chez l'homme. Des études montrent que le régime alimentaire est fortement associé à la composition du microbiote intestinal : les personnes ayant un régime riche en protéines et graisses animales ont une prédominance des bactéries du genre *Bacteroides*, tandis que celles ayant un régime plus riche en glucides ont un microbiote pour lequel domine le genre *Prevotella*.

Dans le tube digestif humain les *Bacteroides* se répartissent ainsi :

Estomac	Jéjunum	Iléon	Colon
Rare	0 à 10 <sup>2</sup> g/g	10 <sup>3</sup> à 10 <sup>6</sup> g/g	10 <sup>10</sup> à 10 <sup>12</sup> g/g

Les *Bacteroides* sont présent aussi chez l'Homme dans les voies nasopharyngées et l'appareil génital en petit nombre.

### Autres habitats :

- Sols ; Sédiments ; Eau de mer ; Intestin des animaux.

### Présence dans le karst

La grandeur de ce groupe représentée par les *Bacteroidetes*, ainsi que leur vie tellurique rendent leur présence très probable dans les cavités, les grottes, les gouffres.

### 17.1.2 Ordre *Cytophagales* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Winogradsky, en 1929.

L'ordre des *Cytophagales* est souvent remplacé par l'ordre des *Sphingobacteriales* ou l'ordre des *Bacteroidales*.

À ce jour les analyses phylogénétiques ne semblent pas pouvoir définir clairement cet ordre, on parle donc d'association de groupe d'ordres *Bacteroidales-Sphingobacteriales* ou groupe de genres *Cytophaga-Flavobacterium*.

#### 17.1.2.1 Famille *Cytophagaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition de l'embranchement de l'ordre des *Cytophagales* par catégorie d'échantillons sur le total de chacune des catégories a donné :

Snottites	≈ 7,2 % de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 2,9 % de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	< 1,2 % ± 0.6 de la flore de cette structure
Eau de source minérale	< 1,3 % ± 0.2 de la flore de cette structure
Eau de mélange	< 1,2 % ± 0.04 de la flore de cette structure

Dans la grotte de Sulzbrunn, les *Cytophagales* représentent environ plus de 66 % des *Bacteroidetes* dans les snottites et environ 25 % des *Bacteroidetes* dans les biofilms « subaerial » ; pour les autres parties, biofilm et les eaux, il y a eu une présence non mesurable.

#### Phylum *Bacteroidetes* ; Ordre *Bacteroidales* ou *Cytophagales* ; Classe *Cytophagia* ; Famille *Cytophagaceae*

##### Morphologie

Les *Cytophagales* sont des bacilles minces en bâtonnets avec souvent des extrémités pointues. Elles sont dépourvues de fructifications.

Les membres du groupe *Cytophaga-Flavobacterium* sont Gram (-), hétérotrophes, formant des spores, des bactéries en forme de tiges possédant une motricité flagellée (Kirchman, 2002). Ces bactéries se distinguent par leur pigmentation de type flexirubine spécifique à ce groupe (Kirchman, 2002). En outre, les individus de ce groupe sont principalement aérobies avec certains anaérobies facultatifs (Reichenbach et coll., 1991).

##### Caractéristiques

Les *Cytophagales* sont des bactéries, hôtes du sol, des eaux douces ou marines et des stations d'épuration. Elles hydrolysent parfois la gélose et de nombreux polymères (cellulose, chitine, pectine, amidon, dextrines, kératine et protéine). Elles sont aérobies ou anaérobies facultatives strictes et mésophiles. Elles produisent des acétates, des propionates et des succinates. Les cellules ont une taille inférieure à 10 µm et les colonies sont pigmentées en jaune, orange ou rouge. Elles sont dépourvues de fructifications.

##### Phylogénétique

Les *Cytophagales* ont une analyse de l'ADN\_ADN avec un C+G % de 30 à 45 moles % ; les classant dans les *Bacteroidetes*.

Les bactéries de ce groupe appartiennent au genre *Flavobacterium* et au genre *Cytophaga* et sont caractérisées par leur séquence de l'ARNr 16 s et leur phénotype (Kirchman, 2002). En raison de plusieurs réaménagements de classification des organismes sous le genre *Cytophaga* et *Flavobacterium*<sup>46</sup>, les chercheurs réunissent régulièrement ces genres en un seul groupe, appelé groupe *Cytophaga-Flavobacterium*, les *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (Mayrberger, 2011), ou *Bacteroidetes* (Kreig 2010). Cette large étiquette phylogénétique est utilisée en raison de la compréhension limitée des espèces spécifiques au sein de chaque genre.

Par exécution FISH<sup>yy</sup> (*hybridation in situ fluorescence*) pour localiser des cibles précises de l'ARNr, puis effectuer une numération globulaire pour l'analyse quantitative.

Il est important de noter que CF319a ne reconnaît pas certains genres de *Bacteroidetes* comme *Cytophaga hutchinsonii* et des études menées à l'aide de cette sonde sous-estiment l'abondance de *Cytophaga-Flavobacterium* (Kirchman, 2002).

Weller et al., 2000 suggèrent qu'il faudrait une sonde spécifique-habitat comprenant les genres ignorés par CF319 ainsi que les genres reconnus par cette sonde, mais actuellement aucun exemplaire de cette sonde n'a été développé<sup>66</sup>.

Au total seulement 781 séquences de gène ARNr 16 s du groupe *Cytophaga-Flavobacterium* ont été séquencées, et cela représente seulement 5 % de toutes les séquences d'ARNr 16S dans ce groupe (Kirchman, 2002).

## Culture

### Milieux

- Bouillon extrait de viande dilué au 10<sup>e</sup> : agar, 1.5 %
- Tryptone (Difco) 0.005%, extrait de levure 0.005 %, extrait de viande 0.002 %, lait peptonisé 0.005%, Na-acétate 0.002%, agar 1.5 %
- Tryptone 0.02%, agar 1.5 %.
- Lait peptonisé 0.1%, extrait de levure 0.02 %, Na-acétate 0.002 %, agar 1.5 %.
- Tryptone 0.1 %, extrait de levure 0.02 %, Na-acétate 0.02 %, agar 1 %.
- Lait écrémé 0.5 %, extrait de levure 0.05%, agar 1.5%.
- CY agar en % casitone (Difco) 0.3 ; extrait de levure 0.1, CaCl<sub>2</sub> 0.1, agar 1.5 milieu à pH 7,2.
- MYX en % : **Na-glutamate 0.5**, extrait de levure 0.1, MgSO<sub>4</sub> 0.03, glucose 0.2, agar 1.5 % ; pH 7.2.
- KNO<sub>3</sub> 0.1 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %, CaCl<sub>2</sub> 0.01 %, MgSO<sub>4</sub> 0.03 %, NaCl 0.01 %, FeCl<sub>3</sub> 0.001 %, glucose 0.5 %, agar 2 %.
- **Milieu de Stanier (bactéries cellulolytiques)** en pourcentage : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou KNO<sub>3</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub> 0.02, NaCl 0.01, FeCl<sub>3</sub> 0.002 ; pH 7.0 à 7.5.
- Miley de Jensen (Bactéries cellulolytiques) en % :
- (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 %, MgSO<sub>4</sub> 0.05 %, NaCl 0.02 %, CaCO<sub>3</sub> 0.2 %, pour 100 ml, à pH 7.2.

### Milieu *Cytophaga* :

- Extrait de levure 10 g, NaCl 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, FeCl<sub>3</sub> 0.25 mg, eau distillée QSP 1 000 ml, pH 7.0 à 7.4.

Milieu de culture *Cytophaga fermentans* digérant l'agar.

- NaCl 30g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.04 g, NaHCO<sub>3</sub> 5 g, Na<sub>2</sub>S-9H<sub>2</sub>O 0. g, Fe citrate (M/250), 5 ml, extrait de levure 0.3 g, agar 5 g, oligoéléments, 2 ml, eau distillée, QSP 1000ml, ajuster à pH 7.0.
  - Oligoéléments : H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.28 g, MgSO<sub>4</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.21 g, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-3H<sub>2</sub>O 0.02 g, NaMoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.075 g, CoCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.02 g, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.025 g, eau distillée QSP 100 ml.

## Environnement

Les *Bacteroidetes* se trouvent dans la biosphère (Kirchman, 2002). Le groupe se développe dans la rhizosphère, étant directement associée à des plantes racines (Lignes-Kelly, 2005), dans des agrégats du sol, intervenant dans le cycle du carbone par la dégradation des composés organiques (Mayrberger, 2011). Le groupe *Cytophaga-Flavobacterium* prospère aussi dans les eaux côtières, les sédiments aquatiques, les cheminées hydrothermales et les régions polaires (Alonso et al., 2007).

<sup>yy</sup> **FISH** : exemple de l'imagerie en FISH par la technique de l'hybridation fluorescente in situ ; le FISH est une technique de biologie moléculaire d'hybridation in situ utilisant des sondes marquées (morceaux spécifiques d'ADN) à l'aide d'un marqueur fluorescent et utilisées sur des coupes en microscopie et en imagerie moléculaire. Le FISH est une technique de cytogénétique permettant de voir des éléments situées à l'intérieur même de la cellule.

**OTUs** : bactéries qui sont cultivables sur un milieu de culture approprié

Les *Bacteroidetes* se trouvent souvent être le groupe le plus abondant dans la zone pélagique (Alonso et coll., 2007). Dans ces niches, le groupe va être retrouvé attaché à des composés organiques et associé au plancton marin et autres animaux marins (Alonso et al., 2007).

### Décomposition de la cellulose

Certains membres des *Bacteroidetes* possèdent la capacité de dégrader la cellulose et de glisser sur leur substrat ; elles le décomposent et elles la consomment (Thomas, 2011). Cette cellulose étant trop volumineuse pour être transportée dans la cellule, les bactéries sécrètent des enzymes extracellulaires s'assemblent dans l'environnement pour former un complexe appelé le cellulosome afin de dégrader la cellulose en produits pouvant être emportés par la cellule (Bayer, 1998). Le cellulosome est attaché à la paroi cellulaire et contient des enzymes comme exo-glucanases, endo-glucanases, xylanases et hémicellulases. Ces enzymes sont organisées par la protéine centrale non catalytique la scaffoldine (échafaudée) (Bayer, 1998).

#### Genres de la famille *Cytophagaceae*

<i>Adhaeribacter</i>	<i>Echinicola</i>	<i>Pontibacter</i>
<i>Aquiflexum</i>	<i>Emticicia</i>	<i>Reichenbachiella</i>
<i>Aquimarina</i>	<i>Fabibacter</i>	<i>Rhabdobacter</i>
<i>Arcicella</i>	<i>Flexibacter</i>	<i>Ruella</i>
<i>Belliella</i>	<i>Hymenobacter</i>	<i>Spirosoma</i>
<i>Cardinium</i>	<i>Larkinella</i>	<i>Sporocytophaga</i>
<i>Chimaereicella</i>	<i>Leadbetterella</i>	
<i>Cyclobacterium</i>	<i>Leeuwenhoekella</i>	
<i>Cytophaga</i>	<i>Meniscus</i>	
<i>Dyadobacter</i>	<i>Niastella</i>	

Dans cette étude les genres de cette famille n'ont pas été identifiés. Seuls les genres les plus étudiés dans la famille des *Cytophagaceae* seront exposés.

#### 17.1.2.1.1 Genre *Cytophaga* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Winogradsky et al., 1929

**Ordre *Bacteroidales* ; Classe *Cytophagia* ; Famille *Cytophagaceae* ; Genre *Cytophaga***

**Espèce du genre *Cytophaga* :**

- *C. aprica*\*
- *C. aquatilis*\*
- *C. aurantiaca*\*
- *C. columaris*
- *C. hutchinsonii*\*
- *C. johnsonae*\*
- *C. psychrophila*
- *C. pectinovora*\*
- *C. krzemienskiae*\*
- *C. fermentans*

Les espèces marquées pas un (\*) sont cellulolytiques

Dans la grotte de Sulzbrunn, elles sont apparentées aux *Flavobacterium* et aux *Bacteroides*.

Le *Cytophaga columaris* est pathogène pour les poissons d'eau douce et de mer. Le *Sporocytophaga ressembl* est inclus aux *Cytophaga* mais la forme des cellules sont sphériques, elles sont appelées microcytes.

### Morphologie

Les *Cytophaga* sont des bacilles minces avec souvent des extrémités pointues en formes de tige de (0,9-1,7 x 2,8-4,1  $\mu\text{m}$ ) ; bâtonnets minces très courts ; non mobiles, mais mobiles par glissement ; Gram négatif, bactéries glissantes unicellulaires (caractère distinct), mais le plus souvent assez longs, polymorphes, pouvant donner des cellules sphériques (microcytes). Pas de production de fructification. On trouve ces organismes en grand nombre dans la nature où ils jouent un rôle important par leurs activités. Beaucoup sont colorés (jaune, orangé, rouge) par des pigments de type flexirubine.

## Caractéristiques

Les *Cytophaga* sont chimio-organotrophes ; la plupart sont aérobies, certains sont anaérobies facultatifs, très peu anaérobies stricts. Certains utilisent  $\text{NO}_3^-$  comme accepteur d'électrons terminal pour le métabolisme respiratoire ou pour la fermentation ; ils hydrolysent l'agar, la cellulose, la chitine, la pectine, la kératine et les protéines. Ce sont tous des organismes mésophiles avec quelques souches psychrophiles. Quelques espèces sont pathogènes pour les plantes (coton), les poissons ou l'Homme.

Ils fermentent les acétates par lesquels peuvent se former des propionates et des succinates. Au cours de la croissance des souches en aérobioses stricts, peuvent engendrer des acides organiques, en particulier sur des milieux contenant du sucre.

Tous décomposent une ou plusieurs espèces de macromolécules organiques, principalement diverses protéines et polysaccharides, y compris la cellulose, l'agar, la chitine, la pectine et l'amidon.

## Cycle du carbone

Le groupe *Cytophaga-Flavobacterium* redouble la perte du carbone organique dans le sol (production de méthane et de gaz carbonique), ils sont une causalité du changement climatique global (Mayrberger, 2011).

Les *Bacteroidetes*, en décomposant la matière organique, participent activement au cycle global du carbone du sol et recyclant des macro-agrégats, ils libèrent des micro-agrégats et des composés organiques à intégrer dans de nouveaux agrégats (Mayrberger, 2011).

La perte de matière organique est due à l'augmentation du taux du cycle global du carbone, causant la minéralisation des matières organiques avec production de gaz carbonique par les *Bacteroidetes*, est plus rapide que la fixation du dioxyde de carbone par la fonction chlorophyllienne des plantes (Mayrberger, 2011). Étant donné que la matière organique dans le sol fournit des nutriments pour les plantes, la perte amplifiée du carbone organique du sol vers l'atmosphère conduit à un plus faible rendement agricole et diminue par la suite la séquestration du dioxyde de carbone dans le sol (Mayrberger, 2011).

## Phylogénétique

Les *Cytophaga* ont une analyse de l'ADN\_ADN avec un G + C faible de 30 à 45 mol%.

## Culture

Le genre *Cytophaga* se cultive sur des milieux solides à faible teneur en éléments nutritifs (p. ex. : inférieure à 0,1 % de peptone), les colonies sont étendues en formes d'essaims, parfois pénétrant l'agar, souvent très fragiles et parfois avec une iridescence rougeâtre ou verdâtre. Sur des substrats avec une teneur élevée en éléments nutritifs (p. ex.-: au-dessus de 0,3 % de peptone), les colonies deviennent généralement compactes, souvent convexes, avec un bord lisse ou ondulé, parfois coulé dans la gélose. Cellule massive généralement plus ou moins intensément pigmentée, jaune, orange ou rouge, en raison de la présence de caroténoïdes, pigments de type flexirubine ou les deux. Quand il est recouvert avec de l'alcali (p. ex. : solution de KOH 20 % ; réaction de la flexirubine), les colonies peuvent changer de couleur du jaune au pourpre - ou rouge-brun de manière réversible, mais des espèces non-pigmentées peuvent être présentes.

**Incubation** : Température de 20 à 35° C ; pH optimum de 7

Huit espèces décrites, dont *Cytophaga hutchinsonii* et *Adhaeribacter*.



*Cytophaga diffluens*

Reichenbach (1989) in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3.,  
J.T. Staley et al. eds., Williams & Wilkins pub., p. 2041.

Production de matériel fibrillaire extracellulaire abondant. Aérobie stricts chimio-organotrophes. Catalase et oxydase positives. Utilisent les sucres et acides organiques sans production d'acide ni de gaz. Hydrolysent faiblement l'amidon. Croissance optimale à 30° C (développement 4 à 37° C). Ne requièrent pas de NaCl et tolèrent jusqu'à 40 g/l NaCl.

### Milieux

- Extrait de levure, 10 g ; NaCl, 20 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g ; MgSO<sub>4</sub>, 0.5 g ; NH<sub>4</sub>Cl, 1 g ; FeCl<sub>3</sub>, 0.25 g ; pH 7.0 à 7.4 ; QSP 1 000 ml d'eau.
- Tryptone, 0.5 g ; extrait de levure, 0.5 g ; sodium acétate 0.2 g ; extrait de viande de bœuf, 0.2 g ; gélose, 9 ; QSP 1 000 ml d'eau.
- Bouillon nutritif déshydraté, 1 g ; Extrait de levure, 1 g ; corsteep liquor, 1 ml ; NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 g ; NaCl, 30 g ; gélose ,10 g ; QSP 1 000 ml d'eau.
- Extrait de levure, 2.5 g ; gélose ,10 g ; ; pH 7.0 à 7.4 ; QSP 1 000 ml d'eau.

### Milieu spécifique

***Cytophaga fermentans*** digérant l'agar :

NaCl 30 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g ; NH<sub>4</sub>Cl 1 g ; MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.5 g ; CaCl<sub>2</sub> 0.04g ; NaHCO<sub>3</sub> 5 g ; Na<sub>2</sub>S-9H<sub>2</sub>O 0.1 g ; Fe citrate (M/250) 5ml ; extrait de levure 0.3 g ; agar 5 g ; oligo-élément 2 ml, eau distillée QSP 1000.

- **Oligoéléments** : H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.28 ; MnSO<sub>4</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.21 g ; Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-3H<sub>2</sub>O 0.02 g ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.075 g ; CoCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.02 g ; Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.02 g ; eau distillée 100 ml.

### Environnement

Les *Cytophaga* est une bactérie que l'on le trouve dans : les eaux douces, les eaux marines, les eaux usées, les matières organiques en décomposition, les déjections animales, aussi présent dans le sol, digère rapidement la cellulose cristalline. Elle pose des problèmes en papeterie.

### Phylogénétique

Analyse de l'ADN\_ADN avec un G+C de 40 mol%. Une seule espèce isolée d'un biofilm d'eau douce.

### Pathologie

Le *Cytophaga columnaris* est pathogène pour le poisson d'eau douce et marine

Chez les poissons, il pénètre à travers une ouverture comme une plaie ouverte pour causer la maladie appelé columnaris. Puis les bactéries prolifèrent et poussent sur la surface des branchies produisant une protéine étant une enzyme de dégradation, entraînant la mort cellulaire des filaments branchiaux, entraînant la mort des poissons (Durborrow, 1998).

Les poissons infectés ont souvent des lésions brun-jaunâtres sur leurs branchies et leur bouche.

#### 17.1.2.1.2 Genre *Sporocytophaga*

**Ordre Bacteroidales ; Classe Cytophagia ; Famille Cytophagaceae ; Genre Sprocytophaga.**

Dans la grotte de Sulzbrunn, cette bactérie est présente dans 5 % des *Bacteroidetes* dans les snottites et dans environ 35 % des *Bacteroidetes* dans les biofilms « subaerial ». Dans les autres éléments de la grotte, ils n'ont pas été mesurables.

#### Espèce connue : *Sporocytophaga myxococcoides*

### Morphologie

Elles ressemblent aux *Cytophaga* mais forment des cellules quiescentes (arrêt de développement ou dormance) sphériques appelées microcytes plus ou moins longues (0,3-0,8 μ de diamètre pour 8-15 μ longueur), avec des extrémités arrondis ou coniques. Les tiges les plus longues sont flexibles. Les *Sporocytophaga* sont des bactéries non mobiles, mais mobiles par glissement. *Soporocytophaga* ressemble au *Cytophaga*, mais forme des cellules quiescentes sphériques appelées microcystes.

### Caractéristiques :

*Sporocytophaga myxococcoides* est cellulolytique comme le *Cytophaga*.

## Culture

Les *Sprocytophaga* se développent sur le milieu solide du genre *Cytophaga* (voir page 148,, *Cytophagaceae*).

## Écophysiologie

Ces bactéries filamenteuses sont présentes dans les boues activées de station d'épuration.

**Pathogénicité** : Les *Sprocytophaga* sont pathogènes pour les poissons de mer.

### 17.1.2.1.3 Genre *Spirosoma*

**Ordre Bacteroidales ; Classe Cytophagia ; Famille Cytophagaceae ; Genre Spirosoma**

Suivant les auteurs ce genre peut être placé dans la famille des *Spirosomaceae*.

**Dans cette famille il y a les genres suivants :**

#### Bactéries d'eau douce

- *Spirosoma*
- *Ruella*

#### Bactéries marines

- *Flectobacillus*
- *Cyclobacterium*

#### Bactérie fermentaire.

- *Meniscus*

#### Bactérie méthylootrophe

- *Ancylobacter*

## Morphologie

*Spirosoma linguale* (Migula, 1894)<sup>46,47</sup> est l'espèce type du genre. *S. linguale* est un organisme vivant et non pathogène, en forme de bâtonnet connu pour sa morphologie particulière en forme de fer à cheval. Les cellules Gram(-) ont des extrémités rondes ou viroïdes, ou fer-à-cheval et formes annulaires, mais aussi bobines et formes en spirale. La largeur de la cellule est de 0,5 à 1 µm et le diamètre de la bague extérieure est de 1,5 à 3 µm. La longueur de la cellule est de 2 à 5 µm. Les rapports sur les filaments sont contradictoires. Bactérie non-mobile, non-sporulée, aérobie. La souche *Spirosoma linguale* est désignée 15J8-5<sup>T</sup>. Elles possèdent des vésicules à gaz.

## Caractéristiques

Les bactéries de Gram(-) Elles sont chimioorganotrophes, les plus abondantes dans le tractus gastro-intestinal appartiennent au phylum *Cytophaga – Flavobacterium - Bacteroidetes* (BFB). Beaucoup d'espèces jouent un rôle important dans la dégradation des polysaccharides dans l'intestin, bien que peu ou pas semblent être cellulitiques.

**Caractéristiques enzymatiques** : hydrolyse la gélatine, la caséine, possède une ADNase mais n'hydrolyse pas la cellulose, ne réduit pas les nitrates. Elle a plusieurs espèces produisant des indoles. Le Teste Indole (+)

**La tryptophanase** : après addition du réactif de Kovacs. Le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un composé coloré en rouge.

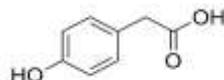
## Pigmentation bactérienne

De nombreux membres des *Bacteroidetes – Flavobacterium* (genre *Flexibacter, Cytophaga, Sprocytophaga...*) sont de couleur jaune-orange à rose-rouge. Certains ont des pigments caroténoïdes, mais d'autres peuvent plutôt avoir des polyènes d'aryle contenant un chromophore de l'acide polyénoïque<sup>zz</sup> terminé par un groupe p-hydroxyphenyl estérifié avec un resorcinol-dialkylé.

<sup>zz</sup> **Acide polyglycolique**, aussi connue sous les noms de polyglycolide et de poly(acide glycolique) (abrégée PGA), est un polymère biodégradable et thermoplastique [ 1 ], obtenu par polymérisation de la 1,4-dioxane-2,5-dione ((en) glycolide) de numéro CAS 502-97-6 et qui est l'anhydride dimérique de l'acide glycolique.

La chaîne de polyène est principalement biosynthétisée à partir d'acétate et de phényl conjugué, ainsi qu'une chaîne adjacente de trois atomes de carbone à un dérivé de la tyrosine (Reichenbach et al., 1981 ; Achenbach et coll, 1978).

Ex : Acide p- hydroxy phénylique



Des variations peuvent se produire dans la longueur de la chaîne de polyène (6 ou 8 doubles liaisons), dans un substitut de méthyle ou de chloro dans la position méta des groupes conjugués de phényl et dans le substitut alkyl du résorcinol estérifié.

Dans la Flexirubine 50 pigments différents sont connus.

### Phylogénétique

Les *Spirosoma linguale* sont des bactéries dépourvues de fructifications et ont une analyse de l'ADN\_ ADN avec un G + C % de mol 30 à 45<sup>48</sup>.

### Culture

Croissance dans l'environnement de 5 à 30 °C, incubation 37 °C

**Milieu** : gélose nutritive au sang.

Les *Flavobacterium* exigent des facteurs de croissances :

- Des aminoacides : comme la thymine (base nucléique de l'ADN).
- Des facteurs de croissances comme la biotine.

Ne pousse pas sur le citrate Simmons, ni le malonate.

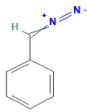
Milieus pour **Microcylus**

- Milieu de base : Vitamine « free casamino-acids » 0.1 %, glucose 0.1 %, solution de vitamines 1 %, sel minéraux solution A 2 %, agar, 1.5 % ; pH 7.2.
  - **Solution de vitamines /l** : biotine 2 mg, acide folique 2 mg, pyridoxine HCl 10 mg, riboflavine 5 mg, thiamine HCl 5 mg, nicotinamide 5 mg, pantothénate de Ca 5 mg, V. B12 0.1 mg stériliser par autoclavage ou par filtration.
  - Solution A de minéraux /l : acide nitrilotriacétique 10 g, SO<sub>4</sub>Mg-7H<sub>2</sub>O 29.7 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 29.7 g ; CaCl<sub>2</sub> 3.34 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 12.67 g, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 99 mg. Sels métalliques (sol B) 50 ml, l'acide nitriloacétique est dissous par neutralisation avec KOH. Le pH ajusté à 7.2 avec KOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avant d'amener le volume avec de l'eau distillée.
  - Solution B /100 ml, Oligoéléments : EDTA 250 mg, ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 1092 mg, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 500 mg, MnSO<sub>4</sub>-6H<sub>2</sub>O 154 mg, CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O 39.2 mg, CoCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 23.3 mg, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-10H<sub>2</sub>O 17.7 mg, Ajouter quelques gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour retarder la précipitation avant d'amener le volume avec l'eau distillée.

### Environnement

Elle a été isolée du sol de la plage sur l'île de Jeju en Corée du sud et trouvée dans un échantillon d'eau de mer prélevé dans la région de Shizuoka, au Japon, a été cultivée en eau de mer enrichie en nutriment. L'extrait d'acétone des cellules a été séché puis extrait avec EtOAc pour donner une huile étant active pour inhiber la liaison de la conotoxine des canaux du calcium de type N.

L'extrait a été soumis à la chromatographie sur colonne de gel de silice, et puis, en raison de la difficulté à suivre l'isolement des composés, le détecteur utilisé a été l'absorption UV, mettant en évidence la diphenyle-diazo-méthane :

 <p>Structure chimique du diphenyle-diazo-méthane : un noyau benzénique avec un groupe diazo (-N=N) en position 1.</p>	<p style="text-align: center;"><b>Diphenyl-diazo-méthane</b></p> <p>Le diphenyle-diazo-méthane a donné deux produits cristallins, étant actif sur les canaux du calcium dans le transfert des ions Ca<sup>++</sup> dans le cerveau.</p> <div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>
---	---

« Dans le cerveau, le calcium semble jouer un rôle important notamment dans la santé et la maladie. En quantités normales, le calcium déclenche apparemment une voie essentielle pour certains types de mémoire de signalisation ; de plus, le calcium est pensé pour causer des lésions cérébrales. Le calcium est le messager intracellulaire capable d'activer de nombreuses fonctions cellulaires. Sans calcium le système nerveux aurait pas de sorties. En forte quantité il peut donner la maladie de **Huntington** »

### 17.1.3 Ordre *Flavobacteriales* (Grotte de Sulzbrunn ; de Magura, Bulgarie ; France : étude

M. Luquet)

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition dans l'ordre *Flavobacteriales* par catégorie d'échantillons sur le total de chacune des catégories a donné :

Snottites	≈ 2,8 %	de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 2,8 %	de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	<1,2 % ± 0.6	de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1,3 % ± 0.2	de la flore de cette structure
Eau de mélange	<1,2 % ± 0.04	de la flore de cette structure

#### Phylogénétique

Dans l'ordre des *Flavobacteriales*, il a été mis en évidence 38 protéines sont spécifiques de cet-ordre ; 26 protéines étaient présentes dans toutes les bactéries, de cet ordre, analysées et 12 protéines n'étaient présentes que dans certaines espèces. Ces protéines fournissent des signatures pour l'identification des *Flavobacteria*.

#### Familles de l'ordre des *Flavobacteriales*

- *Blattabacteriaceae*
- *Crocinitomicaceae*
- *Crymorphaceae*
- *Flavobacteriaceae*
- *Ichthyobacteriaceae*
- *Schleiferiaceae*

#### 17.1.3.1 Famille *Flavobacteriaceae* (Grotte de Sulzbrunn ; de Magura, Bulgarie ; France : étude M. Luquet, 1969)

Dans la grotte de Sulzbrunn les *Flavobacteriaceae* sont signalés dans les snottites à environ 20 % et dans le biofilm « subaerial » à environ 20% des *Bacteroidetes*. Dans les autres structures (biofilms « submersed » et eaux) ils n'ont pas été enregistrés.

C'est une grande famille bactérienne, elle compose l'environnement bactérien de la biosphère.

#### Genres de la famille des *Flavobacteriaceae*

<i>Actibacter</i>	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Mangrovimonas</i>	<i>Sediminibacter</i>
<i>Aequoriicola</i>	<i>Empedobacter</i>	<i>Maribacter</i>	<i>Sediminicola</i>
<i>Aequorivita</i>	<i>Epilithonimonas</i>	<i>Mariniflexile</i>	<i>Sejonga</i>
<i>Aligibacter</i>	<i>Flagellimonas</i>	<i>Marixanthomonas</i>	<i>Spongiimonas</i>
<i>Aquimarina</i>	<i>Flaviramulus</i>	<i>Mesonina</i>	<i>Stenothermobacter</i>
<i>Arenibacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Moheibacter</i>	<i>Subsaxibacter</i>
<i>Bergeyella</i>	<i>Formosa</i>	<i>Muricauda</i>	<i>Subsaximicrobium</i>
<i>Bizionia</i>	<i>Gaetbulibacter</i>	<i>Myroides</i>	<i>Tamlana</i>
<i>Capnocytophaga</i>	<i>Galbibacter</i>	<i>Nonlabens</i>	<i>Tenacibacculum</i>
<i>Cellulophaga</i>	<i>Gelidibacter</i>	<i>Ornithobacter</i>	<i>Ulvibacter</i>
<i>Chryseobacterium</i>	<i>Gillisa</i>	<i>Pibocella</i>	<i>Vitellibacter</i>
<i>Cloacibacterium</i>	<i>Gilvibacter</i>	<i>Polaribacter</i>	<i>Wautersiella</i>
<i>Coenonia</i>	<i>Gramella</i>	<i>Psychroflexus</i>	<i>Weeksella</i>
<i>Costertonia</i>	<i>Joostella</i>	<i>Psychroserpens</i>	<i>Winogradskyella</i>
<i>Croceibacter</i>	<i>Kaistella</i>	<i>Riemerella</i>	<i>Yeosuana</i>
<i>Croceitalea</i>	<i>Kordia</i>	<i>Robiginitalea</i>	<i>Zeaxanthinibacter</i>
<i>Cruoricaptor</i>	<i>Krokinobacter</i>	<i>Sabulilitoribacter</i>	<i>Zhonia</i>
<i>Dokdonia</i>	<i>Leeuwenhoekiiella</i>	<i>Salegantibacter</i>	<i>Zobellia</i>
<i>Dongheana</i>	<i>Lutibacter</i>	<i>Salinimicrobium</i>	<i>Zunogwangia</i>
	<i>Lutimonas</i>	<i>Sandarakinotalea</i>	

## Caractéristiques

Les *Flavobacteriaceae* sont des bactéries de Gram (-). La majorité est aérobie stricte, mais trois genres de cette famille sont anaérobies :

- *Ornithobacterium*
- *Capnocytophaga*
- *Coenonia*

## Culture

La propriété de glissement caractérisant les *Cytophaga* et le *Flexibacter* oppose ces deux bactéries appartenant *Flavobacterium*.

Milieu pour séparer *Flavobacterium*, *Cytophaga* et *Flexibacter*

La propriété de glissement doit se faire sur le milieu suivant en pourcentage : extrait de levure 0.05, lab-lemco 0.02, tryptone 0.05, acétate de sodium 0.02, agar (Oxo™ de N° 28) 0.8.

Culture sous en atmosphère humide. Observer la bordure des colonies au microscope après une nuit d'incubation.

### 17.1.3.1.1 Genre *Flavobacterium* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition du genre *Flavobacterium* par catégorie d'échantillons sur le total de chacune des catégories a donné :

Snottites	≈ 0.2 %	de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 0.2 %	de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	<1,2 % ± 0.6	de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1,3 % ± 0.2	de la flore de cette structure
Eau de mélange	<1,2 % ± 0.04	de la flore de cette structure

Les *Flavobacterium* sont des bactéries de Gram négatif, elles comprennent plus de 130 espèces dont une partie est pathogène pour les poissons comme le *Flavobacterium psychrophilum* qui provoque la maladie bactérienne de l'eau froide sur la truite arc-en-ciel et ses alevins.

## Espèces du genre *Flavobacterium*<sup>67</sup>

<i>F. acidificum</i>	<i>F. chungangense</i>	<i>F. jejuense</i>	<i>F. qiangtangense</i>
<i>F. acidulophilum</i>	<i>F. chungbukense</i>	<i>F. johnsoniae</i>	<i>F. rakeshii</i>
<i>F. acidurans</i>	<i>F. chungnamense</i>	<i>F. jumunjinense</i>	<i>F. reichenbachii</i>
<i>F. ahnfeltiae</i>	<i>F. collinsense</i>	<i>F. koreense</i>	<i>F. resistens</i>
<i>F. algicola</i>	<i>F. collinsi</i>	<i>F. kyungheense</i>	<i>F. rivuli</i>
<i>F. anatolense</i>	<i>F. columnare</i>	<i>F. lacunae</i>	<i>F. saccharophilum</i>
<i>F. anhuiense</i>	<i>F. compostarbaris</i>	<i>F. lacus</i>	<i>F. saliperasum</i>
<i>F. antarcticum</i>	<i>F. crassostreae</i>	<i>F. limicola</i>	<i>F. sasangense</i>
<i>F. aquaticum</i>	<i>F. croceum</i>	<i>F. limnosediminis</i>	<i>F. segetis</i>
<i>F. akiavivens</i>	<i>F. cucumis</i>	<i>F. lindanitalerans</i>	<i>F. salegens</i>
<i>F. aquatile</i>	<i>F. cutihindinis</i>	<i>F. longum</i>	<i>F. seoulense</i>
<i>F. aquicola</i>	<i>F. daejeonense</i>	<i>F. luticocti</i>	<i>F. sinapsychrotalerans</i>
<i>F. aquidurens</i>	<i>F. daemovensis</i>	<i>F. lutivivi</i>	<i>F. sofi</i>
<i>F. araucanum</i>	<i>F. dankookense</i>	<i>F. macrobrachii</i>	<i>F. spartansii</i>
<i>F. arcticum</i>	<i>F. deflavii</i>	<i>F. maotaiense</i>	<i>F. squillarum</i>
<i>F. arsenatis</i>	<i>F. degerlache</i>	<i>F. marinum</i>	<i>F. suaedae</i>
<i>F. arsenitoxidans</i>	<i>F. denitrificans</i>	<i>F. maris</i>	<i>F. subsaxonicum</i>
<i>F. aureus</i>	<i>F. devorans</i>	<i>F. micromati</i>	<i>F. succinans</i>
<i>F. bangpakuense</i>	<i>F. dispersum</i>	<i>F. mizutaii</i>	<i>F. suncheonense</i>
<i>F. beibuense</i>	<i>F. dongtanense</i>	<i>F. myungswense</i>	<i>F. suzhouense</i>
<i>F. branchiarum</i>	<i>F. eburneum</i>	<i>F. multivorum</i>	<i>F. swingsii</i>
<i>F. branchiicola</i>	<i>F. endophyticum</i>	<i>F. nitratireducens</i>	<i>F. tegeticola</i>
<i>F. branchiophilum</i>	<i>F. ensliense</i>	<i>F. nitrogenifigens</i>	<i>F. terrae</i>
<i>F. breve</i>	<i>F. faecale</i>	<i>F. noncentrifugens</i>	<i>F. terrigena</i>
<i>F. brevivittae</i>	<i>F. ferrugineum</i>	<i>F. notoginsengisoli</i>	<i>F. terriphilum</i>
<i>F. buxtense</i>	<i>F. filium</i>	<i>F. oceanosedimentum</i>	<i>F. thermophilum</i>
<i>F. flaviflagrans</i>	<i>F. gelidilacus</i>	<i>F. omnivorum</i>	<i>F. tiangeerense</i>
<i>F. flevense</i>	<i>F. gillisiae</i>	<i>F. oncorhynchi</i>	<i>F. tilapiae</i>
<i>F. fluvii</i>	<i>F. ginsengisoli</i>	<i>F. okeanokoites</i>	<i>F. tistrinum</i>
<i>F. fontis</i>	<i>F. ginsenosidimutans</i>	<i>F. orientale</i>	<i>F. tractae</i>
<i>F. frigidarium</i>	<i>F. glaciei</i>	<i>F. oryzae</i>	<i>F. tyrosimyliticum</i>
<i>F. frigidimaris</i>	<i>F. glycines</i>	<i>F. palustre</i>	<i>F. ummariense</i>
<i>F. frigoris</i>	<i>F. granuli</i>	<i>F. paranense</i>	<i>F. urocanicophilum</i>
<i>F. fryxellicola</i>	<i>F. halimophilum</i>	<i>F. pectinovorum</i>	<i>F. urumqiense</i>
<i>F. fulvum</i>	<i>F. haoranii</i>	<i>F. pedacola</i>	<i>F. verecundum</i>
<i>F. caeni</i>	<i>F. hauense</i>	<i>F. phragmitis</i>	<i>F. vireti</i>
<i>F. cauense</i>	<i>F. hercynium</i>	<i>F. piscis</i>	<i>F. weaverense</i>
<i>F. ceti</i>	<i>F. hibernum</i>	<i>F. plurextorum</i>	<i>F. xanthum</i>
<i>F. cheniae</i>	<i>F. humicola</i>	<i>F. poosti</i>	<i>F. xinjiangense</i>
<i>F. cheonanense</i>	<i>F. hydatis</i>	<i>F. procerum</i>	<i>F. xueshanense</i>
<i>F. cheonanense</i>	<i>F. indicum</i>	<i>F. psychrolimnae</i>	<i>F. yanchengense</i>
<i>F. chilense</i>	<i>F. inkyongense</i>	<i>F. psychrophilum</i>	<i>F. yonginense</i>

## Morphologie

Les *Flavobacterium* sont des bactéries en forme de bâtonnet ; aérobies ; elles sont immobiles et dépourvues de mobilité par glissement ; elles ont des colonies de couleur jaune (d'où vient le nom de flavo).

## Caractéristiques

Les *Flavobacterium* sont des bactéries aérobies, oligotrophes (n'ont pas beaucoup besoin de matière organique). Elles sont capables de dénitrification<sup>59</sup>.

Elles ont la faculté de dégrader les hydrocarbures. Elles sont psychrotrophe, ce caractère s'accompagne d'une proportion augmentée d'acides gras insaturés dans la phase lipidique membranaire. La conformation protéinique est fonctionnelle à basse température et les enzymes sont thermolabiles. Les psychrotrophes dégradent les caséines des laits réfrigérés et produisent des enzymes souvent thermostables (lipase). Elles sont alcalophiles, le pH d'activité des *Flavobacterium* est compris entre pH 7.0 et 11.2<sup>49,50</sup>.

Elles demandent un Aw minimum permettant leur croissance de 0.96 Aw.

Certains *Flavobacterium* digèrent les sous-produits du nylon<sup>51,52</sup>.

## Identification des *Flavobacterium*

LDC (-) Lysine décarboxylase ; OGC (-) ; ADH (-) Arginine di-hydrolase ; TTR (-) Tétrathionate réductase.

### Caractéristiques différentielles entre les espèces de *Flavobacterium* – Galerie API 20 A

Nom	IND	GLU	SAC	SAL	ESC	GLY	CEL	MNE	RAF	TRE
<i>F. multivorum</i>	0	99	70	66	50	41	25	66	66	23
<i>F. necrophorum</i>	99	12	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. necrogenes</i>	0	100	0	0	90	0	0	99	0	60
<i>F. nucléatum</i>	97	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. varium</i>	73	77	0	0	0	0	0	72	0	0

Indole : Ind ; Urée : URE ; Glucose : GLU ; Lactose : LAC ; Saccharose : SAC ; Maltose : MAL ; Salisinate ; Xylose : XYL ; Arabinose : ARA ; Gélatine : GEL ; Esculine : ESC ; Glycérol : GLY ; Cellobiose ; Mannose : MNE ; Melezitose : MLZ ; Raffinose : RAF ; Sorbitol : SOR ; Rhamnose : RHA ; Tréhalose : TRE ; Catalase : CAT.

### Galerie API 20 E

Nom	ONPG	CIT	URE	IND	VP	GEL	GLU	OX	MOB	McC	OF/O
<i>F. Indologenes</i>	20	12	92	86	0	84	0	99	0	67	90
<i>F. meningosepticum</i>	70	18	1	81	1	91	0	99	0	48	98
<i>F. odoratum</i>	0	56	81	0	7	71	0	100	0	84	2
<i>F. oryzihabitans</i>	0	95	0	0	80	8	40	0	100	99	99

ONOG : Ortonitrophenol  $\beta$ -galactosidase ; CIT : Citrate de sodium ; URE : Urée ; IND : indole ; VP : Pyruvate de sodium ; GEL : Gélatine ; GLU : Glucose ; OX : Sorbitol (cytochrome oxydase) ; MOB : Mobilité ; Milieu Conkey ; OF Caractère de fermentation du glucose

## Culture

Les *Flavobacterium* n'ont pas la propriété de glissement caractérisant, les *Cytophaga* et les *Flexibacter*. La température d'incubation et de croissance est de 5°C à 30°C.

Le milieu de culture : C'est une gélose nutritive au sang (avec absence d'hémolyse) les colonies sont apigmentées ou pigmentées en jaune pâle ou en jaune orangé à orangé vif. Les *Flavobacterium* exigent des facteurs de croissances comme les aminoacides, la thiamine, la biotine. Elles n'utilisent ni le citrate de Simmons, ni le malonate. Elles croissent dans les milieux MEVAG, additionnés de glucides.

Classiquement, on prépare 6 milieux MEVAG, additionnés de gélose comme sources de carbone à la concentration finale de 1% contenant : glucose, lactose, tréhalose, mannitol, glycérine.

La majorité, des espèces, est protéolytique, hydrolyse la gélatine et la caséine, elle possède une ADN-ase, ne réduit pas les nitrates, ni ne dénitrifie.

La production d'indole par plusieurs espèces a une grande valeur pour le diagnostic. Les *Flavobacterium* n'ont ni décarboxylase (LDC (-) ; ODC (-) ; AHD (-)), ni TTR.

**Le milieu de culture utilisé** : extrait de levure 0.05% ; lab-lemco 0.02 % ; Tryptone 0.05% ; acétate de sodium 0.02% ; agar (Oxoïde N° 28) à .8% ;

Tester en atmosphère humide. Observer la bordure des colonies au microscope, après incubation.

## Environnement

Les *Flavobacterium* sont présentes dans le sol, les eaux (douce, de mer, les eaux usées) et l'air. Dans le karst les *Flavobacterium* peuvent faire des plaques jaune vif sur les parois.

Ils peuvent supporter des températures extrêmes aussi diverses que les sources froides ou chaudes, comme celles rencontrées dans les glaciers, les glaces polaires, ou les sédiments des sources chaudes.

Pour survivre, ce genre microbien produit une variété d'enzymes permettant l'adaptation aux conditions du milieu. L'observation des grottes karstiques nous montrent que dans les grottes froides nous avons une diminution relative des *Bacilli* et des *Micrococcus* et une augmentation des *Flavobacterium*. Les *Flavobacterium* sont en partie cryophile et résistent bien aux basses températures.

Nous pouvons dire que les Flavobactéries et les Staphylocoques sont mieux adaptés aux variations de températures du milieu. Les *Bacilli* étant plus thermophiles, il y a plus de probabilité qu'ils soient sensibles aux basses températures expliquant leur diminution.

On peut les rencontrer dans divers aliments (produits laitiers, légumes, viandes), dans l'environnement hospitalier et dans différents prélèvements biologiques d'origine humaine.

## Pathologie

Certains genres de cette famille sont pathogènes pour l'Homme et les animaux, ex : *Flavobacterium psychrophilium* (pour les poissons).

## Présence des Flavobacteria dans le karst

Les *Flavobacterium* se trouvent fréquemment dans le karst, sous forme de colonies jaune-vif, pouvant parfois recouvrir une surface non négligeable.

Les *Flavobacterium* ont été dénombrés dans l'air des grottes françaises (M. Luquet, 1969).

### Pourcentage relatif de *Flavobacterium* en France en % par le nombre de colonies totales observées, et par grotte examinée (valeurs données par l'auteur)

Zones	Sud-Ouest	Centre	Nord-Ouest	Pyr. Atlantiques
<b>Grottes ou avens</b>	1_Orliac (3,92 %)	1_Ornac (12,84 %)	1_Jacqueline	1_Pierre St. Martin
	2_Mortureux (5,26 %)	2_Mt-la-Chapelle (3,03 %)	(6,06 %)	(23,70 %)
	3_Fond Anguillère (12,84 %)	3_Rey (14,28 %)	2_Pylône (8,70 %)	2_Arphidia (4,34 %)
				3_Gezaltza Arrikutz (0,00%)

Pour Jacqueline, Pylône et Rey, problème de comptage prendre ces résultats avec des réserves.

### *Flavobacterium* les plus fréquentes retrouvées dans les cavités examinées dénombrement relatif aux *Flavobacteria*

<i>Fl. lactis</i> (22,53 % FI)	<i>Fl. dormitator</i> (7,04 % FI)	<i>Fl. marinotypicum</i> (2,81 % FI)
<i>Fl. balustinum</i> (12,67 % FI)	<i>Fl. aquatile</i> (5,63 % FI)	<i>Fl. marinovisurum</i> (2,81 % FI)
<i>Fl. fucatum</i> (9,85 % FI)	<i>Fl. peregrinum</i> (5,63 % FI)	<i>Fl. arborescens</i> (2,81 % FI)
<i>Fl. lutescens</i> (8,45 % FI)	<i>Fl. oesnokoites</i> (4,22 % FI)	<i>Fl. invisible</i> (1,41 % FI)
<i>Fl. ferrugineum</i> (7,04 % FI)	<i>Fl. devorans</i> (4,22% FI)	<i>Fl. breve</i> (1,41 % FI)
		<i>Fl. halohydrium</i> (1,41 % FI)

Cette liste ne comprend pas de germes pathogènes pour l'Homme.

La présence dans le karst des *Flavobacterium*, est due aux caractères suivants :

- La résistance de cette bactérie au pH alcalin, est une raison de sa présence. Le terrain karstique est constitué d'une couche rocheuse sédimentaire de carbonate de calcium (insoluble et alcaline). Cette présence doit donner un pH proche 8 à 9, cela étant compatible au pH de croissance de ce genre bactérien.
- L'humidité de la grotte permet un apport de l'Aw suffisant pour le développement de ce genre bactérie.
- Le faible apport de matières organiques présente dans cette cavité, est aussi un élément ayant permis à la *Flavobacteriaceae* leurs développements, cette famille bactérienne étant oligotrophes.
- La résistance à la teneur saumâtre de l'eau est aussi une raison d'expliquer cette présence bactérienne. Cette famille les *Flavobacteriaceae* est tolérante une pour son développement teneur chlorure de sodium.
- La résistance au basse température : Les *Flavobacterium* ont été trouvés dans les glaces polaires. On les trouve surtout dans les grottes froides et humide.

Tous ces points expliquent la présence de ces genres bactériens trouvés dans cette cavité. Lorsque l'on examine la répartition microbienne d'autre la grotte comme celle appelée *Four Windows Cave*, aux USA, cette une grotte acide provenant de (cheminée volcanique du fond océanique), on s'aperçoit que la répartition microbienne est plus axée sur une flore proche des *Actinobacteria*, que sur une flore *Bacteroides*.

## Écologie

Elles sont présentes dans les grottes froides, humides et dans les régions polaires.

Elles ont un métabolisme très développé leur permettant de dégrader de nombreux constituants, c'est pour cela, quelle joue un grands rôle dans l'épuration bactériologique des stations de traitement des eaux. Elles peuvent dégrader les composés aromatiques chlorés comme le pentachlorophénol.

## Biotechnologie

Elles sont capables de synthétiser de la Phénylalanine par la voie de la bioconversion de la DL\_5\_benzylhydantoïne. Elles synthétisent un caroténoïde, la zéaxanthine, lorsque les *Flavobacterium sp* sont cultivés sur du glucose, « con steep liquor », ester de palmitate, méthionine, pyridoxine et sel de fer la production est de 335 mg /l. Dans la transformation d'un diacétate de trinolone en composé S Reichstein, intervient les *Flavobacterium*.

### 17.1.3.1.2 Genre *Capnocytophaga*

Ce genre n'a pas été cité dans la publication de la grotte de Sulzbrunn, mais peut être éventuellement pris en considération dans la dénomination générale de la famille des *Flavobacteriaceae* par son caractère capnophylle, correspondant à l'atmosphère de cette grotte.

**Phylum *Bacteroidetes* ; Classe *Flavobacteria* ; Ordre *Flavobacteriales* ; Famille *Flavobacteriaceae* ;**

## Morphologie

Le genre *Capnocytophaga* est composé de bacilles fusiformes flore commensale orale, de Gram négatif ; anaérobie facultatif de 3 à 6 µm mobiles par glissement. L'observation au microscope révèle un grand polymorphisme, avec une variation de la taille et de l'aspect selon les souches et les conditions de culture. Habituellement longs, minces et effilés, les bacilles peuvent aussi prendre la forme de filaments incurvés, de coccobacilles ou de fuseaux. Certaines souches sont capnophylles (croissance à une concentration de CO<sub>2</sub> de 5 à 10 %). Ce polymorphisme se retrouve également lors de l'observation des colonies (colonies pigmentées orangées, s'étalant sur la gélose...).

## Caractéristiques

Bactérie anaérobie et capnophylle (qui peut vivre en présence de CO<sub>2</sub>), abondante chez l'Homme dans les crevasses gingivales (espace entre les dents et la gencive) et pouvant être un pathogène opportuniste. Elle peut être impliquée dans les maladies parodontales.

## Culture

Le genre *Capnocytophaga* peut également se développer en atmosphère anaérobie. Il nécessite des milieux enrichis de type gélose au sang incubés à 37 °C. L'isolement de souches de *Capnocytophaga* à partir de prélèvements polymicrobiens est également possible sur milieux sélectifs contenant des antibiotiques (Ehrmann et al. 2013).

L'identification est effectuée grâce à différents tests biochimiques utilisés pour l'identification d'espèces bactériennes à coloration de Gram négative et par la détermination rapide de réactions enzymatiques. Le diagnostic est tardif à cause de la croissance lente et difficile de *Capnocytophaga* (48 à 72 h).

## Milieux de culture et d'indentification

Anaérobie : agar Columbia Mk, agar pour les bactéries anaérobies selon Brewer Mk, O, D ; agar fer sulfate, O ; agar Mac Clung, D ; agar RCM, O ,D ; agar Schaedler, O ; agar SFD,D ; agar Veillon, P ; bouillon Rosenow, P ; bouillon au thiglycollate avec résazurine, B, Mk, O, D ; bouillon au foie, Mk ; bouillon Schaedler, O,P,D ; bouillon TGY, P ; bouillon thioglycollate, P ; bouillon Wikins Chalgren, B,O,D ; Milieu AC, D ; milieu Loeffler, O ; milieu nutritif pour anaérobie, Mk ; milieu lait de Crossley,O ; milieu thioglycollate, D ; milieu FAA,O ; AC agar, D ; Braun heart infusion, D, O, BBL ; CDC agar anaérobie au sang, BBL ; Brewer thioglycollate médium D ; Crossley milk médium,O ; Fluid

thioglycollate médium D ; Fluid thioglycollate medium, D ; médium with bref extract USP,O ; Fluid thioglycollate médium with K agar D ; Fluid thioglycollate médium with K agar, D ; Thioglycollate médium USP,O ; Thioglycollate médium without glucose and indicator,D ;Bile esculine agar avec Kanamycine BBL.

## Pathologie

Les bactéries du genre *Capnocytophaga* sont des agents pathogènes occasionnels et opportunistes. Cette bactérie est impliquée dans différents types d'infections dont la gravité sera dépendante de l'état immunitaire du patient.

Les cas rapportés dans la littérature concernent aussi bien les patients immunodéprimés que les individus immunocompétents. Chez les sujets immunocompétents, ces bactéries appartiennent à la communauté bactérienne responsable d'infections parodontales affectant et détruisant les tissus de soutien de la dent (le parodonte).

Les souches de *Capnocytophaga* sont souvent isolées à partir de poches parodontales mais aussi d'abcès apicaux et parodontaux, en association avec d'autres espèces bactériennes paro-pathogènes (Attaquant les gencives).

Cette pathologie conduit au « déchaussement » des dents et ainsi qu'à leur perte (McGuire & Nunn, 1996). Elle peut causer d'autres pathologies largement rapportées dans la littérature, telles que des bactériémies, (pouvant se compliquer d'un choc septique), des infections de l'appareil locomoteur (ostéomyélite, arthrite), pulmonaires (pleuro-pneumopathie, abcès pulmonaire), digestives (péritonite), materno-fœtales (abcès ovarien, chorioamniotite), oculaires (conjonctivite), cardiaques (endocardites), ou cérébrales (méningites). C'est un genre cliniquement important en oncologie pédiatrique ou en hématologie clinique (Jolivet-Gougeon et al., 2008), en particulier lorsque les patients sont en aplasie (Sixou et al., 2006).

Le *Capnocytophaga canimorsus*, peut se transmettre de l'animal à l'humain (chien et chat).

## Résistance aux antibiotiques

*Capnocytophaga* est le plus souvent sensible aux antibiotiques, mais l'émergence de souches résistantes aux bêtalactamines a été observée dès les années 1980. Des gènes de résistance aux antibiotiques se sont progressivement propagés parmi d'autres espèces bactériennes pathogènes par transfert horizontal dans les populations bactériennes (Jolivet-Gougeon et al., 2007).

La sensibilité aux différentes bêtalactamines a été décrite comme variable selon les souches de *Capnocytophaga* (Jolivet-Gougeon et al., 2004). Cette résistance est souvent liée à la production de bêta-lactamase.

La plupart des bêta-lactamases retrouvées chez *Bacteroides*, *Prevotella* ou *Capnocytophaga* appartiennent à la classe A d'Ambler.

## Phylogénétique de la résistance aux antibiotiques

Plusieurs bêta-lactamases, codées par le chromosome ou un plasmide et associées à des éléments génétiques mobiles, ont été décrites chez *Capnocytophaga spp*. Les plus communes sont les gènes; *CfxA3*, *CfxA2*, *CepA*, *CblA* et/ou *CSP-1* (Jolivet-Gougeon et al., 2004 ; Handal et al., 2005b ; Guillon et al., 2010). Des souches de *Capnocytophaga spp* résistantes aux céphalosporines de troisième génération, conservent une sensibilité à l'imipénème, la céfoxitine (antibiotique), et à l'association amoxicilline et acide clavulanique, observations faites par (Jolivet-Gougeon et al., 2004).

Bien que les souches résistantes aient été le plus souvent isolées de simples cas de portage, leur prévalence devient cependant préoccupante (Jolivet-Gougeon et al. 2008 ; Sixou et al., 2006).

Les bêta-lactamases à large spectre du groupe codé par les gènes *CfxA* (*CfxA*, *CfxA2* et *CfxA3*) appartiennent au groupe 2<sup>e</sup> de Bush.

Cette classe de bêta-lactamases inclut les enzymes avec une activité significative contre les céphalosporines et les monobactames, plutôt que les pénicillines.

Suite à la caractérisation de la bêta-lactamase *CfxA* chez *Bacteroides vulgatus* et de *CfxA2* chez *Prevotella intermedia* (Genbank nucléotide sous le numéro d'accèsion AF118110), il a été caractérisé, chez *Capnocytophaga ochracea E201* une nouvelle bêta-lactamase du groupe 2<sup>e</sup> de Bush gène appelée *CfxA3* (GenBank nucléotide sous le numéro d'accèsion AF472622) (Jolivet-Gougeon et

al., 2004). Le gène *CfxA3* présente 99 % d'identité avec *CfxA* de *Bacteroides vulgatus* et *CfxA2* de *Prevotella intermedia*. L'analyse de la séquence nucléotidique de 966 bp montre que le gène codant la bêta-lactamase *CfxA3* de *Capnocytophaga ochracea E201* diffère du gène *CfxA* de *Bacteroides vulgatus* par une substitution de deux acides aminés codés par les gènes (K272E et Y239D).

Le gène *CfxA2* du *Prevotella intermedia* diffère par une substitution d'un acide aminé (Y239D).

En effet, *CfxA3* diffère de *CfxA2* en ayant un acide aspartique au lieu d'une tyrosine à la position 239 et de *CfxA* en ayant un acide glutamique au lieu d'une lysine à la position 272.

### 17.1.3.1.3 Genre *Arenibacter* (Grotte Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn, les *Arenibacter* sont principalement présents dans les snottites et les biofilms « subaerial » dans lesquels ils représentent une majorité de la famille des *Flavobacteriaceae*, mais ne sont pas répertoriés dans les biofilms « submersed » et les eaux.

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition dans le genre *Arenibacter* par catégorie d'échantillons sur le total de chacune des catégories a donné :

Snottites	≈ 2,7 %	de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 2,7 %	de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	<1,2 % ± 0.6	de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1,3 % ± 0.2	de la flore de cette structure
Eau de mélange	<1,2 % ± 0.04	de la flore de cette structure

### Classe *Flavobacteria* ; Ordre *Flavobacteriales* ; Famille *Flavobacteriaceae* ; Genre *Arenibacter*

### Espèces du genre *Arenibacter* (Grotte de Sulzbrunn)

Ce genre *Arenibacter* a été trouvé dans les snottites, les biofilms « submersed » à raison d'environ 35 % des *Bacteroides* dans la grotte de Sulzbrunn.

#### Différentes espèces connues dans le genre *Arenibacter*

<i>A. algicola</i>	<i>A. nanhaiticus</i> <sup>1</sup>
<i>A. certesii</i> <sup>1</sup>	<i>A. latericus</i> <sup>1</sup>
<i>A. echinorium</i> <sup>1</sup>	<i>A. palladensis</i> <sup>1</sup>
<i>A. hampyeongensis</i>	<i>A. troitsensis</i> <sup>1</sup>

(1) Espèce définie par Ivanova and al. 2001 et Nedashkovskaya and al. 2003,2004 2006,2007.

Les espèces du genre d'*Arenibacter* n'ayant pas été définies dans la publication de l'*ISME Journal*, seront retenues les espèces d'*Arenibacter* les plus couramment étudiées.

### Espèces marines du genre *Arenibacter*

- *A. certesii* ; *A. latericus* ; *A. palladensis* ; *A. troitsensis* (Ivanova and al. 2001, Nedashkovskaya and al., 2003, 2004, 2006)<sup>53</sup>.
- L'espèce *Marinobacter algicola*, correspondant au phylum *Gammaproteobacteria* d'après Green and al. (2006) a été déclassée dans le phylum *Bacteroidetes* dans l'espèce *Arenibacter algicola* (Gutierrez and al., 2014). La spécification de l'espèce « *algicola* » peut donner une confusion de genre entre *Arenibacter algicola* et *Marinobacter algicola*<sup>54</sup>.

### Espèces du genre *Arenibacter*

- *Arenibacter hampyeongensis* HP12
- *A. palladensis* KMM 3961 (Nedashkovskaya and al., 2006)<sup>55</sup>
- *A. troitsensis* KMM 3674 (Nedashkovskaya and al., 2003)
- *A. echinorium* KMM 6032 (Nedashkovskaya and al., 2007)
- *A. latericus* KMM 236 (Ivanova and al. 2001)

**Tableau des caractéristiques biochimiques et métaboliques différentielles**

Caractéristiques	1	2	3	4	5
Mobilité	-	-	-	+	-
Na <sup>+</sup> pour la croissance	+	-	+	-	+
<b>Croissance NaCl %</b>					
8%	-	+	-	+	+
10%	-	+	-	-	-
<b>Température</b>					
42°C	-	-	+	-	+
Nitrate réducteur	-	-	+	-	+
Production d'H <sub>2</sub> S	-	-	+	-	-
Production d'acétonoïde	-	-	-	+	-
<b>Les Hydrolyses :</b>					
Urée (API 20E)	-	-	-	-	+
Tyrosine	-	V	-	V	-
Production d'acide :					
D- glucose	+	+	-	+	+
D - galactose	+	-	-	-	+
Mélibiose (galactose-glucose ; liaison 1-6)	+	-	-	+	+
D - Raffinose	-	+	-	+	+
L - Rhamnose	-	+	-	-	+
Glycérol	-	-	-	+	-
Utilisation du mannitol, malate et citrate :					
Enzymes (API ZYM)	-	-	+	-	-
Lipase (14C)	+	-	+	-	V
- Chymotrypsine	-	-	-	-	+
- galactosidase	-	-	-	-	+
<b>Sensibles aux antibiotiques :</b>					
Ampicilline	-	-	+	+	+
Carbenicilline	+	-	+	-	-
Olcadomycine					
Tetracycline					
<b>Analyse ADN de la valeur G + C</b>	<b>37</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>39 - 40</b>	<b>37 - 38</b>

**Tableau des acides gras des *Arenibacter***

*(Classifié de la manière identique au tableau précédent)*

**Acides gras cellulaires en pourcentage du total de la cellule des membres du genre *Arenibacter***

Fatty acid	1	2	3	4	5
<b>Saturated</b>					
C <sub>14:0</sub>	1.0	0.7	0.7	0.7	0.5
C <sub>16:0</sub>	13.5	7.5	7.4	14.2	4.1
C <sub>18:0</sub>	2.4	2.7	2.3	1.5	2.6
<b>Unsaturated</b>					
C <sub>18:1ω6c</sub>	2.6	TR	0.6	1.8	0.7
C <sub>17:1ω6c</sub>	1.6	0.6	0.8	1.4	0.9
<b>Branched</b>					
iso-C <sub>15:0</sub>	-	TR	-	1.0	1.1
iso-C <sub>15:0</sub>	5.6	15.0	14.8	15.0	12.4
iso-C <sub>15:0</sub> G	9.3	9.9	12.1	10.3	12.7
iso-C <sub>16:0</sub>	TR	TR	0.5	0.5	1.0
iso-C <sub>17:1ω9c</sub>	3.7	4.4	5.2	5.1	4.6
anteiso-C <sub>15:0</sub>	4.6	3.6	3.2	3.6	9.7
anteiso-C <sub>15:1</sub> A	TR	-	-	-	1.6
<b>Hydroxyl</b>					
C <sub>16:0</sub> 3-OH	1.5	0.7	-	-	-
C <sub>16:0</sub> 3-OH	3.7	2.6	2.7	1.6	1.1
C <sub>17:0</sub> 2-OH	1.1	0.6	0.56	TR	2.8
iso-C <sub>16:0</sub> 3-OH	5.2	4.5	5.2	4.5	7.1
iso-C <sub>16:0</sub> 3-OH	2.2	1.0	0.8	1.4	2.3
iso-C <sub>17:0</sub> 3-OH	13.9	15.9	15.1	14.7	12.2
<b>Methyl-substituted</b>					
C <sub>13:1</sub> AT 12-13	-	-	1.3	0.7	-
Unknown RCL	-	9.7	7.5	-	-
13:565*					
<b>Summed features†</b>					
3	20.4	15.2	15.0	16.6	16.7
4	-	-	0.9	1.2	1.0

\*Unknown fatty acids are designated by their equivalent chain-length

## Espèce *Arenibacter latericus*<sup>56,57,58,59,60</sup>

### Morphologie

*Arenibacter latericus* est en forme de bâtonnet plus ou moins incurvé et aggloméré de longueur 3 à 5 µm, diamètre 0,4 à 0,5 µm ; elle est de Gram (-) ; non mobile ; sans endospores. Ses colonies de coloration orangée, luisantes sont dues à la production de caroténoïdes.

### Caractéristiques

*Arenibacter latericus* est aérobie stricte ; chimio-organo-trophique ; elle est alcalino-tolérante, halophiles. Elle nécessite un milieu marin pour sa croissance ; de catalase (+) ; de phosphatase alcaline (+) ; Elle a une cytochrome oxydase ; elle n'hydrolyse pas l'agar, l'amidon, la gélatine, les alginates, la cellulose.

Chez *Arenibacter latericus* 27 % de ses lipides polaires composent la membrane cellulaire. L'extraction totale des lipides, y compris les phospholipides et les phosphatidyléthanolamines, étant les composants majeurs de sa membrane cellulaire, donne les valeurs suivantes en acide gras, les chaînes d'acides gras saturées et insaturées représentent 70 % de la matière grasse cellulaire avec :

- En majorité des acides gras : C15 : 0 iso, C15 : 1 iso, C15 : 0 al, C15 : 0,
- En quantité mineure, on a : C17 : 0 iso, C16 : 0, C16 : 1 (n-7), C18 : 0, C18 : 1 (n-7)

Cette membrane cellulaire ne contient pas de sphingophospholipides.

Nous pouvons constater que cette analyse fait ressortir une faible diversité dans la composition en acides gras de cette bactérie. La membrane bactérienne contient des granules de polyhydroxybutyrates<sup>67</sup>.

### Métabolisme

*Arenibacter latericus* ne dégrade pas la gélatine et la caséine.

- **Produit** : -N-acétyl-galactosamidase.
- **Utilise** : -D- Glucose, L-acide glutamique, L-ornithine, uridine, glycérol, DL-- glycérophosphate, glucose-1-phosphate et le glucose - 6 - phosphate, accord du *BIOLOG system*.
- **Utilise que faiblement** : dextrine, N-acétyl-d-galactosamine, N-acétyl-D- glucosamine, Cellulose, D-fructose, - lactose, -D- lactose lactulose, glycogène, maltose, D -mannitol, D-mannose, D-mélibiose, -méthyl-D- glucoside, D-raffinose, sucrose, DL-acide lactique, furanose, acide succinique , glucuronamide, L-alaninamide, L-alanine, L-alanyl-glycine, L-asparagine, L-acide aspartique, acide glycy-L-aspartique, acide glycy-L-glutamique.

Dans les acides aminés on retrouve : L-proline, D-serine, L-serine et L-thréonine<sup>61</sup>.

### Culture

*Arenibacter latericus*, croit de 4 à 42 °C ; colonies de pigmentation orange et de formes circulaires.

**Milieu** : Agar 2216 (Difco) après isolation et purification. Colonies luisantes de couleur orange.

### Antibiorésistance

**Résistant** : Kanamycine, Benzylpénicilline, Oxacilline, Néomycine, Streptomycine, Gentamicine et Polymyxine.

### Habitat

*Arenibacter latericus* est une bactérie isolée d'échantillons de sédiments marins. Elles ont été aussi collectées en Chine et en Inde, comme bactérie commensale de l'*Holothurie* (animal marin de l'embranchement des échinodermes) dans les mers du Japon et elle vit en symbiose sur une algue brune, *Chorda filum*, dans la mer d'Okhotsk, dans l'Océan Pacifique<sup>69</sup>.

### Analyse phylogénétique :

*Arenibacter latericus* a une composition des bases de l'ADN-ADN avec un (G+C) de 37,5 à 38,2 moles%.

L'homologie des isolats, était de 83 à 94 %, indiquant que les souches des échantillons analysés par le séquençage de l'ADNr 16s appartiennent à la même espèce de la souche de type KMM 426.

L'analyse phylogénétique basée sur la détection de voisinage et la méthode de Fitch-Margoliash, a révélé que cette bactérie appartenait à la famille *Flavobacteriaceae*. D'après les résultats de l'analyse

taxonomique polyphasique, cette bactérie représente une nouvelle espèce. Il a été proposé le nom ***Arenibacter latericius* sp souche KMM 426** (VKM B, 213D LMG 19649 CIP 106861)<sup>62,63</sup>.

Elle fait partie de la collection de micro-organismes marins (KMM) déposée à l'institut « *The Pacific Institute of Bioorganic Chemistry Vladivostok* » en Russie et de la Collection de microorganismes de Moscou (Russie).

### **Espèce *Arenibacter echinorum***<sup>64</sup>

#### **Morphologie**

***Arenibacter echinorum*** est en forme de bacille, de 0,4 à 0,5 µm de diamètre et 1,5 à 2,7 µm de longueur ; mobile brillant par alternance, et contenant des pigments orange.

#### **Caractéristiques**

***Arenibacter echinorum*** est hétérotrophe, aérobie et halotolérant ; Oxydase (+) ; Catalase (+) ; Phosphatase alcaline (+) ; Nitrate réducteur (-) ; Acétoïne (+) « 3 Hydroxybutanone » (réaction Voges-Proskauer) ; indole (-) ; H<sub>2</sub>S (-) ; Na<sup>+</sup> n'est pas indispensable.

Tolérance à NaCl de 0 à 8 % maxi.

Fermentations et enzymes : D-galactose (-) ; phosphatase alcaline (+) ; et galactosidases (+) ; et glucosidases (+) ; N-acétyl--glucosaminidases (-) ; estérase (+) ; lipase (+).

#### **Composition en acides gras de l'*Arenibacter echinorum***

C15 :1 iso =13,1	C17 : 1 8c = 1,1
C15 : anti-iso = 0,5	C17 : 1 6c = 2,9
C15 : 0 iso =6,4 ;	C15 : 0 3-OH = 2,0
C15 : 0 = 22,0	C15 : 0 2-OH = 0,6
C15 : 1 6c = 4,2	C15 : 0 3-OH iso = 3,5
C16 : 0 iso = 1,0	C16 : 0 3-OH iso = 1,0
C16 : 0 = 0,6	C16 : 3-OH = 1,0
C17 : 1 9c = 3,9	C17 : 0 3-OH iso = 10,5
	C17 : 0 2-OH = 0,3

En période d'été deux acides gras supplémentaires sont présents dans la composition de cette bactérie, ce sont : C15 :0 2-OH et /ou C16 : 1 7c. (Olga I. Nedashkovskaya and al. 2006)<sup>65</sup>.

#### **Métabolisme**

***Arenibacter echinorum*** peut utiliser les citrates, les malates et le mannitol pour sa production d'énergie. Cette espèce se distingue des autres *Arenibacter* par la production d'acétonoïde (3-hydroxybutanone de couleur jaune ou verte).

Cet acétonoïde est produit par décarboxylation des -acétolactates et rentre dans la biosynthèse des acides aminées et la production d'énergie par l'intermédiaire de l'acétylcoenzyme A.

**Produit de l'acide avec :** D-cellobiose, L-fructose, D-glucose, D-lactose, Mannitol, D-mélibiose, L-rhamnose, sucrose, DL-xylose, et l'amygdalin.

**Utilise pour son énergie :** le mannitol, malates, citrates.

**Production :** -glucuronidase.

#### **Habitat**

Cette ***Arenibacter*** a été isolée des échantillons de sédiment marin, elle a été trouvée pour la première fois comme bactérie commensale des oursins ***Strongylocentrotus intermedius***.

#### **Phylogénétique**

L'analyse de l'ARNr 16s de l'***Arenibacter echinorum*** a révélé les gènes KMM 6032 T et KMM 6047 faisant partie du génome des *Arenibacter*, donc un membre de la famille des *Flavobacteriaceae*.

La similarité entre le génome de cette bactérie et l'ensemble des autres bactéries du genre *Arenibacter* est de 94,5 - 98,9 %. La teneur en ADN des bases G + C est de 39 - 40 mol%.

Cette nouvelle espèce va s'appeler ***Arenibacter echinorum sp nov KMM 6032 T*** (KCTC 22013T, LMG 22574T).

### Culture

Température de croissance de 4 à 35 °C, tolérance au NaCl de 0 à 8 %, température d'incubation 23 à 26 °C. Ne décompose pas l'agar, la caséine, la gélatine, les alginates, l'amidon, le tween 80, l'ADN, l'urée, la cellulose, la chitine.

Hydrolyse : Le tween 40 et le tween 20

**Milieu de culture** : Milieu d'enrichissement Marine Broch (Difco) avec 20 % de glycérol v/v et isolation, purification sur Agar 2216 (Difco), incubation à 25 °C pendant 48 h.

Identification : par analyses physiologiques et biochimiques : API E20 ; API EN20 ; et galerie API ZYM (bio-Mérieux).

### Antibiorésistance

- Résistant à : Ampicilline, Carbenicilline, Tétracycline (variable).
- Sensible à : Oléandomycine

### Pathogénicité

Pas d'indication sur ce sujet dans les publications examinées.

### Espèce *Arenibacter hamyeongensis*<sup>66,67,68</sup>

#### Morphologie

*Arenibacter Hamyeongensis* est de Gram (-) ; chimio-hétérotrophe ; aérobie, non-mobile et non sporulée, elle a pour longueur 1,8 à 4,0 µm et pour diamètre 0,4 à 0,5 µm ; pigmentation orangée foncée.

#### Caractéristiques

*Arenibacter Hamyeongensis* est hétérotrophe. Activité enzymatique : oxydase (+) ; catalase (+) ; Tween 20 est hydrolysé, mais agar, caséine, acetoine<sup>aaa</sup> ne le sont pas ; Nitrate réducteur (-).

#### Culture

Sa croissance se fait entre 5 et 35 °C avec un optimum de 25 °C ; son pH d'activité est de pH 6 à pH 8,5 (optimum pH 7,0 à 7,5) ; elle demande une présence de 1 à 6 % de NaCl (p/v) avec un optimum de 1 à 2 %) ; la cellule contient des pigments solubles dans le méthanol de couleur orangé, mais la flexirubine est absente.

#### Habitat

Cette flavobactérie a été isolée pour la première fois sur les côtes de Corée du Sud dans les sédiments marins en marée basse.

#### Écologie

Cette bactérie joue un rôle important dans la vie du biotope marin. Elle est une ressource biologique des micro-organismes marins entretenant l'écosystème animal et végétal.

Les *Arenibacter* sont des bactéries mixotrophes, elles utilisent des sources de carbone comme les hydrocarbures difficilement métabolisables. Cette propriété donne à ce genre bactérien, une importance majeure dans la dépollution des eaux, des mers et des sols.

---

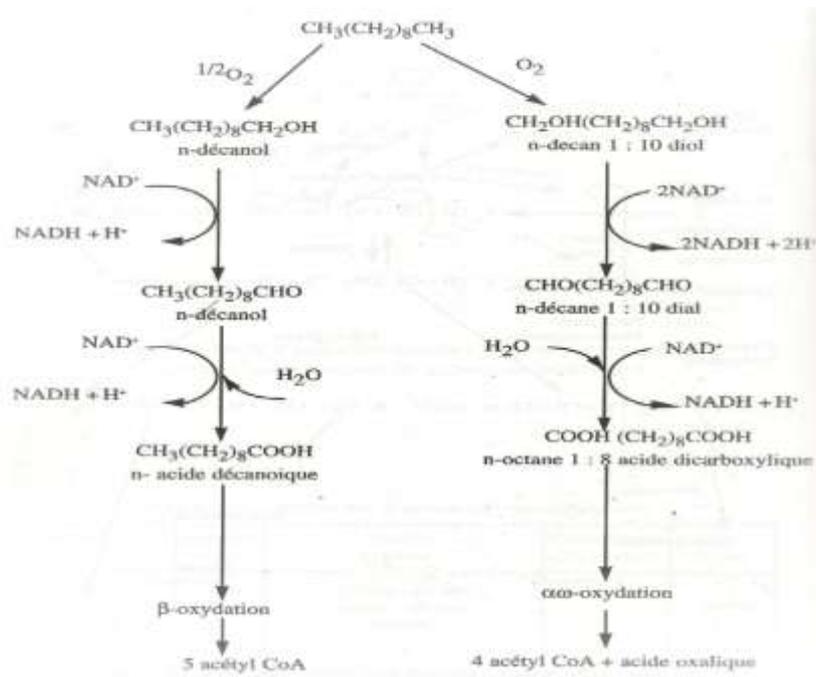
<sup>aaa</sup> **Acetoine** : molécule qui comporte la fonction -C=O-C-OH-. (Les plus connues sont 3-hydroxybutanone ou acétyle méthyl carbinol,...)

## Bactéries utilisant les hydrocarbures :

*Acinetobacter*  
*Actinomyces*  
*Aeromonas*  
*Alcaligenes*  
*Arthrobacter*  
*Bacillus*  
*Brevibacterium*  
*Corynebacterium*  
*Cytophaga*  
*Erwinia*  
*Flavobacterium*  
*Klebsiella*  
*Lactobacillus*

*Leucothrix*  
*Micrococcus*  
*Moraxella*  
*Mycobacterium*  
*Nocardia*  
*Peptococcus*  
*Pseudomonas*  
*Sarcina*  
*Serratia*  
*Sphaerotilus*  
*Spirillum*  
*Vibrio*  
*Xanthomonas*

### Le catabolisme microbien des hydrocarbures à des fins énergétiques



### Dégradation des hydrocarbures

Les réactions catalysées par l'**acétyl-CoA carboxylase** sont les étapes de la biosynthèse des acides gras, et devenant une source d'énergie pour les bactéries.

### Présence des *Arenibacter* dans le karst

La présence du genre *Arenibacter* dans les biofilms subaerial et les snottites de la grotte de Sulzbrunn peut nous confirmer l'origine marine de ce biofilm. Il nous montre que dans cette cavité la flore microbienne marine a dû s'adapter à un milieu cavernicole, sur de longues périodes et dans une atmosphère peu compatible à ce genre de bactéries aérobies. Son caractère marin nous montre qu'elle a des origines très lointaines et que dans de telles cavités nous pouvons trouver les clefs de l'origine de la vie.

### 17.1.3.2 Famille *Myroidaceae*

Elle a été rattaché la famille *Flavobacteriaceae*

Cette sous-famille se compose de deux genres :

- *Myroides*
- *Psychromonas*<sup>57</sup>

### 17.1.3.2.1 Genre *Myroides* (Grotte de Magura, Bulgarie)

Nom donné par Vancanneyt et al, 1996

Ce genre n'a pas été cité dans la publication de la grotte de Sulzbrunn, mais peut être éventuellement pris en considération, car il est souvent présent dans les *Flavobacteriaceae* des karsts, ex. grotte de Magura en Bulgarie.

L'étude de l'identification bactériologique PCR de la grotte de Sulzbrunn, n'a pas poursuivi l'analyse jusqu'aux genres et espèces dans la famille des *Flavobacteriaceae*, pouvant nous laisser entrevoir une éventualité de la présence du genre bactérien.

#### Espèces connues :

*M. guanois*

*M. pelagicus*

*M. injenensis*

*M. profund*

*M. marinus*

*M. xuanwuensis*

*M. odoratimimus*

### Ordre *Flavobacteriales* ; Famille *Flavobacteriaceae* ou Famille *Myroidaceae*

#### Genre *Myroides*

Le genre *Myroides* a été déplacé ces dernières années vers la famille des *Flavobacteriaceae* et les *Psychromonas*, dans famille *Psychromonadaceae* à l'ordre *Alteromonadales*.

La souche ayant été identifiée dans la grotte de Magura est la souche ***Myroides SP (HE 663456)***.

Dans ce genre on a ***Myroides odoratum*** étant un agent pathogène connu<sup>58</sup>.

#### Caractéristiques

*Myroides* est Gram (-) ; aérobie, immobile, oxydase (+).

**Culture** : gélose de MacConkey, incubation 37 °C.

Il produit en culture, un pigment jaune et une odeur fruitée.

#### Phylogénétique

Avec un équilibre des bases nucléiques ADN avec un G + C de 36,2 % et 38,6 %.

#### Pathologie

Une publication issue du *Department of Medicin, Finch University of Health Sciences/The Chicago Medical School, Chicago, Illinois*, signale que des *Flavobacterium* de Gram (-) ont été reclassés dans les *Myroides*<sup>69,70</sup>.

Le ***Myroides odoratum***, une des espèces, a été signalée dans des infections opportunistes. Cependant, son pouvoir pathogène est mal défini et les données sont encore en analyse. Bien que les infections, causées par cette bactérie, soient rares, elle est résistante à plusieurs antibiotiques. Il a été rapporté un cas de bactériémie par ***Myroides odoratum*** ayant progressé vers un choc septicémique. Après identification de la bactérie, la réalisation d'un antibiogramme a permis l'administration d'antibiotiques efficaces.

#### Symptomatologie

Ces bactéries se comportent comme des pathogènes opportunistes. Elles peuvent causer des cellulites bactériennes, des fasciites nécrosantes<sup>bbb</sup>, des infections des voies urinaires<sup>71</sup>, des infections de plaies opératoires, des ventriculites et des endocardites. Des infections nosocomiales ont également été signalées.

---

<sup>bbb</sup> **Fasciite nécrosante** : infection rare de la peau et des tissus sous-cutanés profonds, se propageant le long des fascia et du tissu adipeux

## Diagnostic et analyses

Il a été isolé dans l'urine humaine, les fèces, les débridages de plaie, les crachats et le sang, mais son pouvoir pathogène n'est pas bien défini, et des infections cliniques causées par cet organisme sont rares.

Nous rapportons un cas de bactériémie et cellulite microbienne due à *M. odoratum*, le cas d'une personne de 62 ans, atteinte de diabète de type 2, compliquée par une maladie vasculaire périphérique :

- Essoufflement, détresse respiratoire légère.
- Malaise général.
- Anorexie et légère fièvre pendant 3 à 4 jours.
- Hypotension à 88/60 mm Hg.
- L'examen physique a révélé un œdème à l'extrémité du membre inférieur droit et un ulcère superficiel, inflammatoire et s'étendant à la face antérolatérale distale de la jambe droite avec écoulement purulent et érythème.
- À noter aussi un ulcère profond d'environ 1 cm de diamètre avec des marges indurées sur la surface plantaire au niveau du premier métatarse, avec un écoulement odorant nauséabond.
- Le taux de leucocytes était de  $11 \times 10^9/l$  avec 80 % de neutrophiles et 19 % de mononucléaires.
- La radiographie du pied n'a révélé aucun signe d'ostéomyélite.
- Le patient a été traité empiriquement par de la Ceftazidime et de la Gentamicine en attendant d'autres cultures.
- L'ulcère du pied droit a été débridé.

## Environnement

Les *Myroides* sont des espèces couramment retrouvées dans les sols et l'eau, mais ne sont pas des composants habituels de la microflore humaine.

### 17.1.4 Ordre *Sphingobacteriales* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition de l'ordre *Sphingobacteriales* par catégorie d'échantillons sur la flore total de chacune des catégories :

Snottites	≈ 0.9 %	de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 4,8 %	de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	<1,2 % ± 0.6	de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1,3 % ± 0.2	de la flore de cette structure
Eau de mélange	<1,2 % ± 0.04	de la flore de cette structure

### Familles de cet ordre

Les *Sphingobacteriales* sont composés de cinq familles auquel il a été rajouté deux familles en 2011 :

- *Sphingobacteriaceae* (Stevn Seger Vancanneyt Sandra Kerster & Joubert 1998)
- *Saprospiraceae*.
- *Flexibacteraceae*
- *Flammeovigaceae*
- *Crenothrichaceae* (Selon NCBI 5 janv. 2011).

Selon NCBI il a été ajouté :

- *Chitinophagaceae*
- *Rhodothermaceae*

Les *Sphingobacteriales* représentent environ 40 % dans les biofilms « subaerial » et 5 % dans les snottites des *Bacteroidetes*, les autres parties analysées n'ont pas donné de résultats.

## Morphologie

Les *Sphingobacteriales* sont des bactéries de Gram (-) ; immobiles ; donnant des colonies jaunes.

## Caractéristiques

Ils ont une catalase (+) ; leurs lipides cellulaires contiennent des sphingolipides dont les parties céramides sont surtout des sphingosine ramifiées di-hydro-saturées en C17 : 0 et l'acide principal est iso-2-OH-C15 : 0.

### 17.1.4.1 Famille *Sphingobacteriaceae*

Dans cette cavité les *Sphingobacteriaceae* sont signalés dans les snottites à environ 2 % et dans le biofilm « subaerial » à environ 35% des *Bacteroidetes*. Dans les autres structures (biofilms « submersed » et eaux) ils n'ont pas été enregistrés.

**Sous embranchement *Sphingobacteriia* ; Ordre *Sphingobacteriales* ; Famille *Sphingobacteriaceae***

### Genres de la famille des *Sphingobacteriaceae*

<i>Anseongella</i>	<i>Pedobacter</i>
<i>Arcticibacter</i>	<i>Pelobium</i>
<i>Hevizibacter</i>	<i>Pseudopedobacter</i>
<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Pseudosphingobacterium</i>
<i>Nubsella</i>	<i>Solitalea</i>
<i>Olivibacter</i>	<i>Sphingobacterium</i>
<i>Parapedobacter</i>	<i>Sphingoterrabacterium</i>

## Morphologie

Bactéries de Gram (-) en forme de bâtonnet, elles ont une taille comprise entre 0,3 à 0,6 µm de largeur et 0,5 à 0,6 µm de longueur ; elles n'ont pas de flagelles et sont immobiles (certains *Bacteroidaceae* peuvent se déplacer en glissant). Elles sont aérobies. Les colonies sont de couleur jaunâtre habituellement au bout de quelques jours. Elles ont une paroi de peptidoglycanes plus mince.

## Caractéristiques

Bactérie immobile, catalase (+) ; colonies jaunes ; les lipides cellulaires contiennent des sphingolipides dont les parties céramides sont surtout des sphingosines ramifiées di-hydro-saturées en C17 : 0 et l'acide principale est iso-2-OH-C15 : 0.

### 17.1.4.1.1 Genre *Sphingobacterium* (Grotte de Magura, Bulgarie et grotte de Sulzbrunn)

**Classe *Sphingobacteriia* ; Ordre *Sphingobacteriales* ; Famille *Sphingobacteriaceae***

Il a été trouvé et identifié dans cette partie de la grotte, l'espèce *Sphingobacterium sp* dans les snottites et le biofilm « subaerial ».

#### Espèces du Genre *Sphingobacterium*

<i>S. alimentarium</i>	<i>S. cladoniae</i>	<i>S. jejuense</i>	<i>S. psychroaquaticum</i>
<i>S. anhuiense</i>	<i>S. composti</i>	<i>S. kitahiroshimense</i>	<i>S. shayense</i>
<i>S. arenae</i>	<i>S. daejeonense</i>	<i>S. kyonggiense</i>	<i>S. siyangense</i>
<i>S. bambusea</i>	<i>S. detergens</i>	<i>S. lactis</i>	<i>S. spiritivorum</i>
<i>S. caeni</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. mizutalii</i>	<i>S. Suaedae</i>
<i>S. canadense</i>	<i>S. ginsenosidimutans</i>	<i>S. mucilaginosum</i>	<i>S. thalpoophilum</i>
<i>S. changzhouense</i>	<i>S. gobiense</i>	<i>S. multvorum</i>	<i>S. thermophilum</i>
<i>S. chuzhouense</i>	<i>S. giseoflavum</i>	<i>S. nematocida</i>	<i>S. wenxiniae</i>
<i>S. cibi</i>	<i>S. hotanense</i>	<i>S. pakistanense</i>	<i>S. yanglingense</i>
		<i>S. paludis</i>	<i>S. Zeae</i>

## Morphologie

Les *Sphingobacterium* sont de Gram (-) ; bactéries immobiles. Le *Sphingobacterium BV* est une bactérie en forme de tige, avec des spores.

## Caractéristiques

Activité oxydative du carbone et de divers hydrates de carbone chimio-organotrophe ; l'uréase (+) est présente chez certaines espèces, comme *Sphingobacterium spiritivorum* et *S. canadense*.

Ils ont un indole (-) ; test de la phosphatase (-) ; catalase (+) ; oxydase (+).

Une caractéristique importante est la possession de sphingophospholipides dont les parties céramides sont surtout des sphingosines ramifiées dihydrosaturées en C17 :0 et l'acide principale est is-2-OH-C15 :0, servant également pour faire une différenciation avec la famille des *Flavobacteriaceae*. Une autre caractéristique importante pour la différenciation est la présence dans cette bactérie de ménaquinone<sup>72</sup>.

Le *Sphingobacterium mizutaii* est une bactérie chimio-lithotrophe du soufre. Elle est dénitrifiante.

Le *Sphingobacterium multivorum*<sup>73</sup> est positif pour l'activité DNase et uréase Les résultats de Yaabuchi montrent une activité oxydative d'une variété d'hydrates de carbone ; amylase (+) et uréase (+).

## Culture

Gélose de MacConkey ou glucose au sang de cheval. Incubation : température optimale de croissance de 26 °C. Les colonies sont jaunes.

Milieu : (voir *Flavobacterium* p157)

Sulfate d'ammonium	2 g	Amino-acide	250 mg
Agar	1.5 g	Vitamine et substance nutritive	35 mg
Base minérale	82.8 mg	Tampon pH 7.1 qsp 1000ml (pH final : 7.0 à 7.2)	

## Identification différentielle sur galerie API 20 NE

Noms	URE	ESC	PNPG	GLU	ARA	MNE	NAG	MAL	OX
<i>Sp. multivorum</i>	96	100	100	99	91	98	99	99	99
<i>Sp. spirilivorum</i>	1	100	100	100	1	100	100	100	100

URE : urée ; ESC : Esculine ; PNPG : p-nitro-phényl-8d=D galactopiranoside ; GLU : glucose ; ARA : arabinose ; MNE : N-acetyl -glucosamine ; MAL : maltose ; Tetra-méthyl-p-phénylène-diamine ;

## Phylogénétique

Le *S. multivorum* : Yaabuchi rapporte que le *Sphingobacterium* montre une forte concentration de l'ADN-ADN en (G + C) lui donnant une meilleure stabilité en raison de la liaison hydrogène entre les paires de nucléotides. Cette bactérie à une forte résistance aux médicaments.

Valeurs de l'ADN-ADN en (C+G) en moles %.

- *S. spiritivorum* de 39,9 à 40,5 moles %
- *S. multivorum* de 39,8 à 42,2 moles %
- *S. mizutalii* de 39,0 à 41,5 moles %

## Environnement

Les *Sphingobacterium* vivent dans le sol, l'eau, sur les plantes, et peuvent être présents dans les aliments<sup>74</sup>.

## Pathologie

Elle a été impliquée dans des infections septicémiques nosocomiales, ayant été mise en évidence par des analyses sérologiques. Elle a été suspectée dans les problèmes de mucoviscidose et mise en évidence dans les voies respiratoires de patients atteints de cette maladie sans que l'on puisse faire un rapprochement entre la bactérie et la maladie<sup>39</sup>.

Une étude italienne a eu pour objectif d'évaluer l'épidémiologie de l'infection par *Sphingobacterium* dans une cohorte de patients atteints de fibrose kystique (FK) et de mucoviscidose, chez lesquels avait été découvert cette bactérie ; les paramètres suivants ont été relevés : sensibilité aux antibiotiques, empreintes génétiques des souches isolées et analyse de certains résultats cliniques sur les patients.

Dans l'ensemble des patients, ces infections n'étaient pas associées à une détérioration de la fonction pulmonaire au cours de la période de suivi, bien que le rôle exact de ce micro-organisme dans la pneumopathie CF soit inconnu et que le nombre de patients infectés était faible. Malgré cela cette étude pourrait représenter un point de départ important pour la compréhension de l'épidémiologie et le possible rôle pathogène de *Sphingobacterium* dans les patients atteints de mucoviscidose<sup>75,76</sup>.

#### 17.1.4.2 Famille *Flexibacteraceae*

**Group FCB ; Groupe *Bacteroidetes/Chlorobi group* ; Phylum *Bacteroidetes* ; Classe *Sphingobacteriia* ; Ordre *Sphingobacteriales* ; Famille *Flexibacteraceae***

##### Genre des *Flexibacteraceae*

<i>Cyclobacterium</i>	<i>Flexibacter</i>	<i>Ruella</i>
<i>Cytophaga</i>	<i>Hymenobacter</i>	<i>Spiroma</i>
<i>Dyadobacter</i>	<i>Meniscus</i>	<i>Sporocytospaga</i>
<i>Flectobacillus</i>	<i>Microscilla</i>	

##### 17.1.4.2.1 Genre *Flexibacter*

Nom donné par Soriano 1954.

**Ordre *Sphingobacteriales* ; Famille *Flexibacteraceae* ; Genre *Flexibacter***

##### Espèces du genre *Flexibacter*

<i>F. aggregan</i>	<i>F. flexilis</i>	<i>F. sancii</i>
<i>F. columnaris</i>	<i>F. japonensis</i>	<i>F. cf. sancii</i>
<i>F. echinica</i>	<i>F. litoralis</i>	<i>F. tractuosus</i>
<i>F. elegans</i>	<i>F. polymorphus</i>	
<i>F. filiformis</i>	<i>F. roseolus</i>	

#### Morphologie

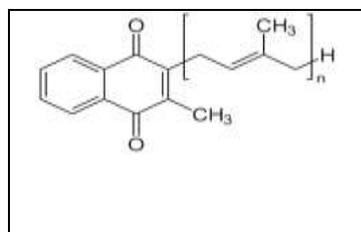
Les *Flexibacter* sont de Gram (-) ; ont des cellules en formes de bâtonnets ; bactéries à longues cellules filiformes flexibles de longueur de 10 à 50 µm. Ils sont pléomorphes et (±) mobiles par glissement.

#### Caractéristiques

Les *Flexibacter* sont non-photosynthétiques ; chimio-organotrophes.

Respiration : les quinones respiratoires sont exclusivement de la ménaquinone. Le modèle de l'acide gras est dominé par ramifiés et 2 et 3-hydroxy – acides. Elles dégradent la chitine, l'amidon mais sont incapables d'utiliser la gélose ou l'agar et la cellulose.

##### Ménaquinone respiratoire



Une **ménaquinone**, ou **vitamine K<sub>2</sub>**, est une naphthoquinone pourvue d'une chaîne latérale isoprénique de typiquement 4 à 7 unités. Une ménaquinone à *n* unités isoprène est notée MK-*n*, de sorte que les molécules les plus courantes sont MK-4 (chez les animaux) et MK-7 (chez certaines bactéries). Neuf molécules biologiquement actives appartiennent à cette sous-famille de la vitamine K, utilisée notamment comme antihémorragique et adjuvant thérapeutique pour traiter les douleurs induites par l'ostéoporose.

#### Culture

**Milieu de culture** : Agar Oxoïde N° 28 à 0,8 % ; en atmosphère humide ; observation des bordures des colonies après incubation.

Donne des colonies jaunes ou orangés ou rouges (caroténoïde de type flexirubine) en raison de pigments liés aux cellules devenant brun pourpre avec le KOH 20 % (réversions avec HCl 1 %). Pour une espèce seulement il y a une différence morphologique des cellules au repos.

Il n'utilise pas la gélose ou agar ;

(Voir les milieux pour les *Cytophaga*, page 141).

**Milieu pour les *Flexibacter littoralis* et *F. marinum* :**

Extrait de levure 1g, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 100mg, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mg, glucose (autoclavé séparément) 1g, oligoéléments, eau de mer filtrée, QSP 1000ml, pH 7.0.

Oligoéléments (mg/l) : Fe 0.5mg, Zn 0.3mg, B 01mg, Co 0.1mg, Cu 0.1mg, Mo 0.1. QSP 1000ml.

**Milieu pour *Haliscomenobacter* : on peut aussi utiliser ce milieu pour les *Flexibacter*** (voir page 176).

**Habitat**

Bactéries vivant dans les milieux terrestres et marins où elles sont très fréquentes et se reproduisant souvent en grand nombre, dans les eaux douces et le sol<sup>65</sup>.

**Pathogénicité**

Certaines peuvent coloniser ou envahir les animaux (notamment chez le poisson) ou les humains et peuvent devenir pathogènes dans certaines circonstances.

**17.1.4.3 Famille *Saprospiraceae*** (Grotte Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn la présence de cette famille dans le biofilm « subaerial » représente environ 22 % des *Bacteroidetes* de cette structure. Dans les snottites sa présence est beaucoup plus faible, environ de 6 % des *Bacteroidetes*. Dans l'eau et le biofilm « submersed », il n'y a pas eu d'information sur cette famille.

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition de l'embranchement de la famille des *Saprospiraceae* par catégorie d'échantillons sur le total de chacune des catégories a donné :

Snottites	≈ 0,5 %	de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 4,5 %	de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	<1,2 % ± 0.6	de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1,3 % ± 0.2	de la flore de cette structure
Eau de mélange	<1,2 % ± 0.04	de la flore de cette structure

**Phylum *Bacteroidetes* ; Classe *Sphingobacteriia* ; Ordre *Sphingobacteriales* ; Famille *Saprospiraceae***

**Répartition de cette famille dans les différentes structures :** dans l'étude de la grotte de Sulzbrunn, les genres appartenant à la famille des *Saprospiraceae*, n'ont pas été définis, nous allons donner un aperçu sur les genres les plus étudiés de cette famille.

**Genres de la famille des *Saprospiraceae***

<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Aureispira</i></li><li>• <i>Haliscomenobacter</i></li><li>• <i>Lewinella</i></li><li>• <i>Saprospira</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Rubidimonas</i></li><li>• <i>Phaeodactylibacter</i></li></ul>
---	--

**Morphologie**

Les *Saprospiraceae* forment des tiges épiphytes, bactéries filamenteuses dans les boues activées.

**Caractéristiques**

Les trois groupes se sont spécialisés dans l'hydrolyse des protéines et acides aminés servant de sources de carbone et d'énergie. Ils ne sont pas impliqués dans la dénitrification. Dans les différentes études, il n'a été remarqué aucun stockage de polyphosphate et polyhydroxyalcanoates par ces bactéries.

**Phylogénétique**

Le cycle complet des *Saprospiraceae* a été étudié en utilisant leur ARNr avec une approche combinée de micro-auto-radiographie (sonde chaude → radioactive) et coloration histochimique.

Le groupe épiphyte se compose de trois groupes étroitement liés, chacun contenant les clones de 11 à 16. L'isolat cultivé est plus proche de la souche type (ATCC 27775) du *Haliscomenobacter hydrossis* (< 87 % de similarité) appartenant à la famille *Saprospiraceae* du phylum des *Bacteroidetes*.

Les sondes oligo-nucléotidiques conçues pour chaque cluster (amas bactérien) et utilisées pour des études écophysologiques ont données différents niveaux hiérarchiques :

Les trois groupes se sont comportés de la même façon dans leur physiologie et étaient spécialisés dans l'hydrolyse des protéines et acides aminés servant de sources de carbone et d'énergie.

Récemment, il a été trouvé que la plupart des bactéries épi-flores peuvent s'hybrider avec la sonde oligonucléotide Sap309, étant conçue pour cibler la plupart des membres de la famille *Saprospiraceae* dans le phylum des *Bacteroidetes*<sup>77</sup> :

La sonde Sap309 s'hybride non seulement avec les bactéries épi-flores, mais aussi avec certaines bactéries filamenteuses, indiquant l'existence d'une phylogénie diverse<sup>78</sup>.

Pour tenter d'identifier les microorganismes dominants non décrites dans les stations d'épuration, il a été conçu une série de sondes oligo-nucléotidiques pour clones permettant la déphosphoration biologique en station d'épuration (clone EBPR, Skagen<sup>79</sup>).

Parmi ceux-ci, la sonde Bac111, ciblant les clones (environ 50 clones > 1 200 bp) reliées à l'espèce *Haliscomenobacter hydrossis* ATCC 27775, également hybridée avec la bactérie épi-flore, confirmant l'appartenance à la famille *Saprospiraceae*.

Cependant, la sonde Bac111 est plus spécifique que la sonde Sap309. La sonde Bac111 peut également s'hybrider avec des filaments et des coques, donc la phylogénie détaillée des bactéries épi-flores est toujours en suspens.

Ces souches bactériennes des *Saprospiraceae* peuvent être caractérisées par des sondes bactériennes de bactéries filamenteuses appartenant au phylum *Chloroflexi*, *Protéobactéries* et *Candida* phylum TM7, à l'exception du groupe 1, n'ayant pas hybridé la sonde TM7 filamenteux<sup>80</sup>.

## Environnement

Les trois groupes épiphytes étaient tous très répandus dans les usines de traitement des eaux usées domestiques et industrielles, avec ou sans la déphosphoration biologique, constituant, au total, jusqu'à 9 % du biovolume bactérien.

Un nouveau genre, *Candidatus Epiflobacter*, est proposé pour ce groupe d'épiphyte dans les usines de traitement des boues activées, où il joue probablement un rôle important dans la dégradation des protéines.

### 17.1.4.3.1 Genre *Aureispira*

Phylum *Bacteroidetes* ; Classe *Sphingobacteriia* ; Ordre *Sphingobacteriales* ;

Famille *Saprospiraceae* ; Genre *Aureispira*

## Caractéristiques

La quinone respiratoire majeure était MK-7. Les acides gras prédominants et cellulaires ont été 20 : 4-omega -6c (acide arachidonique), 16 : 0 et iso-17 : 0.

Le genre *Aureispira* est composé de deux espèces, *Aureispira marina* et *Aureispira maritima* avec une production d'acide arachidonique et production de métabolites secondaires.

## Environnement

Trois souches de bactéries, glissantes, isolées dans une éponge marine et algues du littoral sud de la Thaïlande, ont été étudiées en utilisant une approche polyphasique pour clarifier leur position taxonomique.

## Phylogénétique

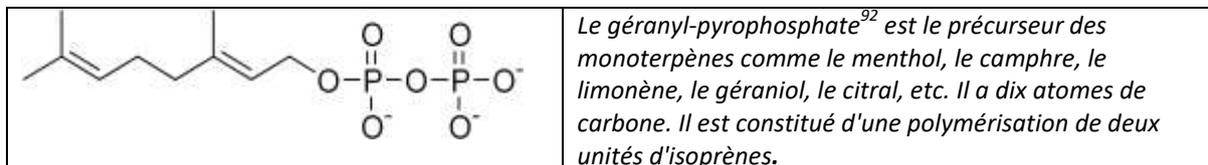
Une analyse phylogénétique, basée sur les séquences de gènes des ARNr 16 s, montre que les trois isolats forment une lignée distincte au sein de la famille *Saprospiraceae* du phylum des *Bacteroidetes* et ont été associés aux membres du genre *Saprospira*.

Dans cette étude, les auteurs ont isolé une nouvelle *Aureispira* de la souche, SP BCC-QB1 de la zone côtière de Penang en Malaisie, et la séquence du génome de cette souche a été déterminée. Le

génomique de cette souche est composé de 185 gènes contigs<sup>ccc</sup>, se composant de 7 370 077 bases, avec un DAN-ADN composé d'un G + C de 35,6 % mole et de 5 911 gènes codant pour des protéines et de 76 gènes d'ARN. Linoléoyl-CoA désaturase, le gène clé de la biosynthèse de l'acide arachidonique, est présent dans le génome.

Il a été constaté que cette souche utilise la voie mévalonate pour la synthèse de géranyl-diphosphate (GGPP), étant le précurseur des di-terpénoïdes et une nouvelle voie *via* la fualosine hydroxylase pour la synthèse de la ménaquinone respiratoire.

#### Géranyl-di-pyrophosphate



Et une nouvelle voie *via* la fualosine pour la synthèse de la ménaquinone respiratoire.

Sur la base des caractéristiques morphologiques, physiologiques et chimio taxonomiques, ainsi que les résultats d'hybridation d'ADN-ADN (hybridation de deux chaînes d'ADN) et les séquences de gènes des ARNr 16 s, les isolats représentent une nouvelle espèce d'un genre nouveau, dont le nom ***Aureispira marina*** Gen. nov., SP. a été proposée. La souche type de ***Aureispira marina*** est définie par 23(T) (= IAM 15389 (T) = 1719(T)) TISTR.

#### 17.1.4.3.2 Genre *Haliscomenobacter*

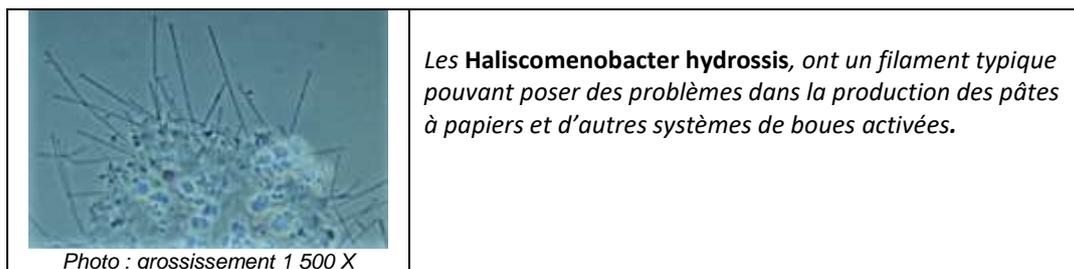
**Phylum Bacteroidetes ; Classe Sphingobacteriia ; Ordre Sphingobacteriales ;  
Famille Saprospiraceae ; Genre Haliscomenobacter**

#### Morphologie

Les *Haliscomenobacter* sont hétérotrophes aérobies stricts. Les cellules croissent comme « aiguille-like », filaments non-effilé ; cellules non flagellées, avec vraies ramifications ; sans accumulation de fer ou de molybdène ; pas de cellules en forme de disque ; sans séparations longitudinales des cellules.

Ils sont couramment observés en groupe :

#### Espèce *Haliscomenobacter hydrossis*



#### Morphologie

***H. Hydrossis*** est une petite bactérie aux filaments légèrement courbés sans septum, dépassant d'une zone floconneuse avec occasionnellement des faisceaux de longs filaments ; filaments non ramifiés de longueur variables de 10 à 100 micromètres de longueur ; cellule de diamètre 0,3 à 0,5 µm, non mobile ; les cellules sont entourées d'une gaine ; attache occasionnellement présente ; cloisons non-visible ; aucun stockage de soufre.

***H. Hydrossis*** peuvent être droites ou pliées. C'est un filament court et étroit pouvant souvent être négligé par un microscope à contraste non-phase ou à un grossissement inférieur à 400 X.

<sup>ccc</sup> **Contigs** : séquences génétiques continues, elles ordonnent et génèrent l'ensemble des clones sous forme de plasmides, cosmides, BAC ou YAC.

Habituellement, les tiges poussent vers l'extérieur d'un amas floconneux en forme d'aiguilles, cet aspect permet de les identifier assez facilement. Leur apparence est similaire aux aiguilles dans une pelote de laine. La réaction de *Neisser* négative des filaments dépasse généralement les flocons, ayant une réaction positive. Cependant dans certains cas ces bactéries filamenteuses peuvent se développer librement dans l'eau.

### Caractéristiques

Elle métabolise le glucose culture axénique, et comme donneur d'énergie et de carbone la glucosamine, le lactose, le saccharose et l'amidon. L'amidon, la gélatine et divers peptides sont hydrolysés en acides aminés, mais le poly-3-hydroxybutyrate n'est pas produit. Des études *in situ* indiquent une absorption active de propionate, de glucose et de N-acétylglucosamine, ainsi qu'une activité exo-enzymatique étant produite.

### Phylogénétique

L'analyse de l'ADN-ADN en (G + C) pour les *Haliscomenobacter* est de 49 moles%.

*H. hydrossis* appartient au groupe *Cytophaga – Flexibacter* des *Bacteroidetes* étant ciblé par la sonde spécifique au groupe CF - 319. Malheureusement toutes les bactéries filamenteuses affiliées au sein de ce groupe ne s'hybrident pas avec la sonde CF - 319.

Les sondes habituellement utilisées donnant les meilleurs résultats sur les cellules de poisson pour identifier *H. hydrossis* sont les sondes Hhyall - 654. Dans le traitement et contrôle des boues activées des eaux usées, la sonde la plus utilisée est thy - T5 - 654<sup>67</sup>.

### Culture

Le milieu de culture des *Haliscomenobacter* est l'agar oxoïde N° 10.

#### Milieu pour *Haliscomenobacter* :

Glucose 0.15g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.01g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.05g, KCl 0.05, CaCO<sub>3</sub> 0.1g, vitamine B<sup>12</sup> 10<sup>-3</sup>, thiamine 4\*10<sup>-4</sup>, agar (oxid) 10g ; QSP 1000ml d'eau distillée.

#### 17.1.4.3.3 Genre *Lewinella*

Phylum *Bacteroidetes* ; Classe *Sphingobacteriia* ; Ordre *Sphingobacteriales* ;

Famille *Saprospiraceae* ; Genre *Lewinella* (Sly et al., 1998)

#### Espèces du genre *Lewinella*

<i>L. agarilytica</i>	<i>L. lutea</i>
<i>L. antarctica</i>	<i>L. marina</i>
<i>L. aquimaris</i>	<i>L. maritima</i>
<i>L. cohaerens</i>	<i>L. nigricans</i>
<i>L. lacunae</i>	<i>L. persica</i>
	<i>L. xylanilytica</i>

### Morphologie

Les *Lewinella* sont Gram (-), aérobies, en forme de bâtonnet, chimio-organotrophes.

### Caractéristiques

Les nouvelles souches sont capables de dégrader l'amidon et le Carboxyméthylcellulose.

### Environnement

Les souches MKG 38 (T) et FYK2302, M69 (T) ont été isolées d'un échantillon de sédiments marins et d'un escargot de mer ; prélevés tous les deux sur la côte Pacifique du Japon.

La souche *L. nigricans* a été isolée des plages de Lagos au Nigeria.

### Phylogénétique

Les souches MKG 38 (T) et FYK2302, M69 (T), de nouveaux isolats issus d'analyse PCR, gènes ayant été séquencés ont indiqué qu'ils sont membres du genre *Lewinella*.

Une étude comparative polyphasique a montré que ces deux isolats représentent deux nouvelles espèces du genre *Lewinella*. Sont proposés les noms *Lewinella marina* SP. nov. (tapez souche, MKG-

38 (T) = NBRC 102633 (T) = NCIMB 14312(T)) et *Lewinella lutea* SP. nov. (tapez souche, FYK2302M69 (T) = NBRC 102634 (T) = NCIMB 14313(T)). Les descriptions de diagnose (savoir acquis par l'observation) du genre *Lewinella* a défini les espèces proposées de *Lewinella* :

#### **Espèces de *Lewinella***

- *Lewinella cohaerens*
- *Lewinella nigricans*
- *Lewinella persica*

#### **17.1.4.3.4 Genre *Saprospira***

**Phylum *Bacteroidetes* ; Classe *Sphingobacteriia* ; Ordre *Sphingobacteriales* ;**

**Famille *Saprospiraceae* ; Genre *Saprospira***

**Espèce *Saprospira grandis***

#### **Morphologie**

Le *Saprospira grandis* a des cellules hélicoïdales, spiralées, filamenteux sur 1 µm de large et de 5 à 500 µm de longueur. Les cellules individuelles dans les filaments ont environ 1 à 5 µm de longueur. Mobilité : *S. grandis* se déplace par glissement à la vitesse de 2 à 5 µm/s<sup>51</sup>. Colonies pigmentées en rouge<sup>41</sup>.

#### **Caractéristiques**

*Saprospira grandis* est une bactérie obligatoirement marine ; aérobie strictes, Gram négatif, chimio-organotrophe. Les membres de *Saprospiraceae* sont également connus pour hydrolyser activement des protéines dans les boues activées des stations d'épuration et cela met en évidence leur rôle de décomposeurs dans les divers habitats. Le *S. grandis* est connu pour être « auxotrophe » pour les acides aminés suivants : arginine, histidine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine et préfère les aliments riches en peptides et acides aminés.

#### **Phylogénétique**

La séquence complète du génome<sup>12</sup> est composée d'un chromosome de 4,35 Mbp et un plasmide de l'analyse du génome Kbp. 54,9 a révélé des voies incomplètes pour la biosynthèse de neuf acides aminés essentiels, et la présence d'un grand nombre des peptidases.

Le génome encode les multiples copies des gènes de globine couplés rsbR capteur considérées comme essentielle à la réponse au stress et la présence de ces globines capteur dans *Bacteroidetes* est sans précédent.

Trois CRISPR\_Cas9 intercalaires dans les régions du génome du *Saprospira grandis* ont été identifiés et mis en évidence sur un total de 429 séquences. Ce nombre est le plus important parmi tous les *Bacteroidetes* séquencés à ce jour.

Ces séquences sont tirées de fragments d'ADN de virus, étant précédemment infectés le procaryote et servent à détecter et détruire les ADN des virus semblables au cours des infections ultérieures (immunité bactérienne).

C'est pourquoi ces séquences jouent un rôle clé dans le système de défense antivirale des procaryotes.

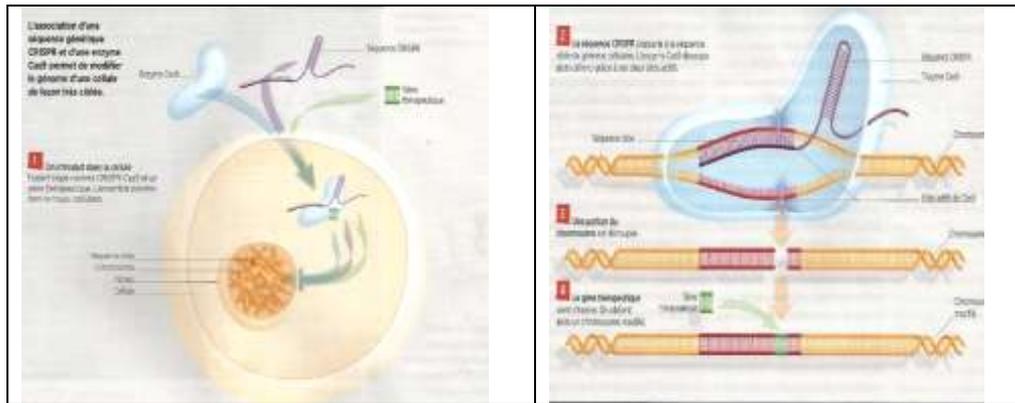


Schéma de La Recherche N° 21 – Mars -Avril 2017

## Méthodologie de l'analyse du génome

Il y a trois copies identiques du gène de l'ARNr 16 s dans le génome du *Saprospira grandis* Lewin Str et une copie a été choisie pour la recherche contre la base de données de séquences de nucléotides à l'aide de NCBI BLAST.

- La plus forte identité de séquence sur la souche d'origine *Saprospira grandis* Lewin Str a été obtenue sur *Saprospira grandis* SS98-5 (99,7) isolée de la baie de Kagoshima, au Japon en 1998 avec une similarité de 99,4 %.
- Le *Saprospira grandis* DSM 2844 : son génome a été analysé avec une similarité pour la souche type d'origine à raison de 98 %<sup>81</sup> étant la seule souche avec une séquence du génome disponible à l'Institut du Génome (JGI).

Les quatre copies du gène dans le génome de *S. linguale* 1 t sont également identiques avec la séquence de l'ARNr 16 s, ils sont publiés antérieurement sous la dénomination de souche LMG 10896 (AM000023).

## Culture

*Saprospira grandis* peut bien croître à 30 °C, mais peut survivre à 40 °C pendant plusieurs heures (plage de développement 6 °C à 47 °C). Milieu contenant des carbones peptidiques et des protéines. Sa salinité de développement est celle de l'eau de mer.

Elles exigent des peptones, des protéines ou des mélanges d'acides aminés comme source d'azote.

### Milieu pour les *Saprospira* :

Tryptone (Difco) 5 g, extrait de levure (Difco) 5 g, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O 100 mg, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mg, oligo-éléments ; pH 7 , QSP 1 000 ml d'eau de mer filtrée.

**Oligo-éléments** : Fe 0.5 mg, Zn 0.3 mg, B 0.1 mg, Co 0.1 mg, Cu 0.1 mg, Mo 0.1 mg, QSP 1 000 ml d'eau de mer filtrée ou d'eau distillée.

**Milieu pour le *Saprospira albida*** : même milieu avec le glycérol en remplacement du glucose. Autoclaver le milieu.

## Environnement

*Saprospira grandis* a été isolée de la baie de Kagoshima, au Japon en 1998. Elle a été trouvée dans le sable littoral marin et dans les zones côtières à divers endroits dans le monde entier. *Saprospira grandis* a été isolé pour la première fois par Str. Lewin<sup>82</sup> sur La Jolla plage à San Diego et en Californie et par le microbiologiste marin Ralph A. Lewin<sup>83</sup>.

*Saprospira grandis* est une bactérie rare, pouvant s'attaquer aux autres germes à l'aide d'un mécanisme appelé « mixotrophie » pour obtenir les nutriments<sup>84</sup>.

Tout d'abord isolées et décrites par Gross en 1911<sup>85</sup>, les deux espèces d'eau douce de *Saprospira* ont été isolés et étudiés.

Les bactéries de la famille *Saprospiraceae* s'attaquent aux diatomées nocives<sup>86</sup> et *Cyanobactéries* comme *Microcystis aeruginosa*<sup>87</sup>. Les *Saprospiraceae* se retrouvent dans une communauté de biofilm bactérien épiphytes colonisant les surfaces des algues. Cette association de *Saprospiraceae*

avec des algues et du phytoplancton marin est un intérêt considérable car les bactéries peuvent jouer un rôle actif dans le contrôle des efflorescences des algues nuisibles dans les océans<sup>88,89</sup>.

La lyse des cellules de cyanobactéries par *Saprospira* a également été signalée dans une autre étude et les expériences indiquent que la lyse a eu lieu par contact direct de cellule-cellule et non par le biais de substances bactéricides<sup>90</sup>.

Une autre caractéristique curieuse de *S. grandis* est la présence de structures ressemblant à des phages, connues comme des « rhabidosomes<sup>ii</sup> »<sup>91</sup>. Bien que ces « rhabidosomes » ressemblent superficiellement aux particules phagiques, aucune activité bactéricide n'a été enregistrée dans des essais de croissance<sup>92</sup>.

### ***Saprospira grandis* présente dans la grotte de Sulzbrunn**

*Saprospira grandis* n'a pas été spécifiée dans les analyses de la grotte de Sulzbrunn, seule la famille *Saprospriaceae* (à qui, elle appartient) a été signalée.

Du fait des caractéristiques des germes auxotrophe<sup>ddd</sup> pouvant s'attaquer à d'autres bactéries, le *Saprospira grandis* pourrait entrer dans le cycle de la biocœnose observée dans cette cavité, en permettant d'éliminer certaines bactéries et de ce fait permettre de garder un équilibre reproductif possible en recyclant des d'éléments nutritifs étant en déficit comme c'est le cas du déficit en phosphore ayant été observé dans cette cavité.

### **Pathologie**

Non signalée.

---

<sup>ddd</sup> **Auxotrophie** :incapacité d'un organisme vivant de synthétiser un composé organique nécessaire à son développement. Un **auxotrophe** est un organisme qui est caractérisé par ce défaut. Pour l'inverse, on parle de prototrophie. En génétique, une souche est dite auxotrophe lorsqu'elle présente une mutation qui rend impossible la synthèse d'un métabolite essentiel. Par exemple une levure mutante, portant une mutation bloquant la synthèse d'uracile est auxotrophe à l'uracile. Ce genre de souche ne pourra se développer dans un milieu que si de l'uracile peut y être prélevé. À l'opposé, un prototrophe uracile pourra se développer en milieu dépourvu d'uracile. Les marqueurs génétiques auxotrophiques sont souvent utilisés en génétique moléculaire.

Dans l'embranchement *Planctomycetes* de la grotte de Sulzbrunn, il a été identifié :

*Planctomycetales*  
*Planctomycetaceae*

*Phycisphaerales*  
*Phycisphaeraceae*

### Répartition dans la cavité

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition des *Planctomycetes* par catégorie d'échantillon sur le total de la flore de chacune des catégories, a donné :

Snottites	19 %	de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	21 %	de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	5,5 %	de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	de la flore de cette structure
Eau de mélange	<1 %	de la flore de cette structure

Dans cette étude les résultats donnent les genres mais ne définit pas les espèces de *Planctomycetes* analysés. Les *Planctomycetes* dans les snottites et les biofilms aériens étaient principalement associés à la lignée Pal46 et à *Planctomyces* spp. (*Planctomycetaceae*), ainsi que les *Phycisphaeraceae*.

### Ordre *Planctomycetales* ; Famille *Planctomycetaceae*

### Classification de l'embranchement de *Planctomycetes*

Chez les *Planctomycetes*, on trouve les classes suivantes :

#### 18.1 Phylum *Planctobacteria* (Grotte de Sulzbrunn, gouffre de la Sambuy)

- Clade *Planctobacteria* (Cavalier - Smith, 2002)
  - Ordre *Brocadiales* (Jetten and al., 2011)
    - ✓ Famille *Brocadiaceae* (Jetten and al., 2011)
    - ✓ Genre *Candidatus* (Jetten and al., 2001).

#### 18.1.1 Ordre *Planctomycetales* (Grotte de Sulzbrunn, Four Windows Cave, gouffre de la Sambuy)

Nom donné par Schlesner and Stackebrandt 1987, Emend Ward 2011)

- Famille *Planctomycetaceae* (Schlesner and Stackebrandt 1987, Emend Ward 2014)
  - Sous famille *Isosphaeraceae* (Kulichevskaya and al., 2015)
    - ✓ Genre *Bythopirellula* (Storesund and Ovreas 2013)
    - ✓ Genre *Candidatus* (Khramenkov and al., 2013)
      - Seule espèce **C. Anammoximicrobium**» (Khramenkov and al., 2013)
    - Genre *Aquisphaera* (Bondoso and al., 2004)
    - Genre *Blastopirellula* (Shlesner and al. 2004)
    - Genre *Gemmata* (Franzmann and Skerman, 1985)
    - Genre *Gimesia* (Sheuner and al. 2015)
    - Genre *Isosphaera* (Giovannoni and al. 1995)
    - Genre *Paludisphaera* (Kulichevskaya and al., 2015)
    - Genre *Pirellula* (Shlesner and Hirsh 1987 emend Shlesner and al., 2004)
    - Genre *Planctomicrobium* (Kulichevskaya and al., 2015)
    - Genre *Planctomyces* (Gimesi 1923)
    - Genre *Planctopirus* (Scheuner and al., 2015)
    - Genre *Rhodopirellula* (Schlesner and al., 2004)
    - Genre *Roseimaritima* (Bondoso and al., 2015)

- Genre *Rubinisphaera* (Scheuner and al., 2015)
- Genre *Rubripirellula* (Bondoso and al., 2015)
- Genre *Schlesneria* (Kulichevskaya and al., 2007)
- Genre *Singuilisphaera* (Kulichevskaya and al., 2008)
- Genre *Telmatocola* (Kulichevskaya and al., 2012)
- Genre *Thermogutta* (Slobodkina and al., 2015)
- Genre *Thermostilla* (Slobodkina and al., 2015)
- Genre *Zavarzinella* (Kulichevskaya and al., 2009)
- *Chlamydiae*
  - Ordre *Chlamydiales*
    - Famille *Chlamydiaceae*
- *Lentisphaerae*
  - Ordre *Lentisphaerales*
  - Ordre *Oligosphaerales*
  - Ordre *Vicvallales*

**Les observations faites en PCR dans la grotte de Sulzbrunn ont révélé les familles suivantes :**

- *Planctomycetaceae*
- *Phycisphaeraceae*

### **Caractéristique de cet ordre**

L'ordre des *Planctomycetales* est apparenté aux *Chamydiales* unicellulaire ou en rosette ; avec des cellules sphériques ou ovoïdes bourgeonnantes ; comportant un appendice multi-fibrillaire ; avec des formations en rosettes ; un flagelle, certaines de ces bactéries ont un aspect filamenteux, dans cette catégorie on a :

- *Planctomycetes*
- *Pirellula gemmata*
- *Isosphaera*

Les cellules sphériques possèdent des vacuoles à gaz et les colonies sont de couleur saumon

### **Présence de peptidoglycane.**

Les Cellules des *Planctomycetales* sont constituées de peptidoglycane, elles sont mobiles : elles possèdent des bourgeons polaires. Les cellules en bâtonnet peuvent lyser l'hôte sur lequel elles se fixent. Elles sont aérobies.

#### **18.1.1.1 Famille *Planctomycetaceae*** (Grotte de Sulzbrunn, Four Windows Cave, gouffre de la Sambuy)

Nom donné par Schlesner & Stackebrandt, 1987

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition de la famille des *Planctomycetaceae*, par catégorie d'échantillon sur le total de la flore de chacune des structures, a donné :

Snottites	≈15,6 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈12,5 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈2,8 %	de la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	de la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<1 %	de la flore totale de cette structure

Dans les biofilms et snottites de la grotte de Sulzbrunn les genres de la famille des *Planctomycetaceae* ayant été trouvés sont les *Planctomyces* et les *Pir 14*.

### **Taxonomie**

La famille des *Planctomycetaceae* (c'est-à-dire les membres de l'ordre *Planctomycetales*) a été prise en considération dans l'évolution de l'écologie moléculaire et de la biologie cellulaire.

Les *Planctomycetes* forment une division distincte du domaine bactérien caractérisés par leur reproduction par bourgeonnement et l'absence de peptidoglycane dans leurs parois cellulaires.

Quatre genres cultivés ont été décrits :

Genres décrits	Autres genres de cette famille
<i>Planctomyces</i>	<i>Blastopirellula</i>
<i>Pirellula</i>	<i>Candidatus Jettenia</i>
<i>Jonquille</i>	<i>Rhodopirellula</i>
<i>Isosphaera</i>	<i>Schlesneria</i>
<i>Gemmata</i>	<i>Singulisphaera</i>
	<i>Zavarrinella</i>

## Généralités

La famille *Planctomycetaceae* sont des bactéries difficilement classées, proche des eucaryotes par la présence d'une membrane nucléaire dans la partie de la couche cellulaire interne (appelé aussi muréine), étant un important hétéropolymère servant comme un élément protecteur. On pensait qu'au lieu de cela leur membrane externe était constituée de glycoprotéine riche en glutamate. Récemment on a trouvé que parmi les *Planctomyces*, trois de leurs représentants possèdent une paroi cellulaire contenant des peptidoglycanes.

## Morphologie

Les *Planctomyces* ont une particularité morphologique avec l'apparition de membrane-liée interne, souvent désignés comme le paryphoplasme (espace libre sans les ribosomes), pirellosome (espace contenant des ribosomes) et le nucléoïde (région condensée en acide nucléique, chez ces espèces, elles sont entourés par une double membranes) — faux noyau —, faisant dire que ce phylum est proche des eucaryotes. Jusqu'à la découverte du genre *Poribacteria* (bactéries en symbioses avec des éponges), les *Planctomyces* ont été les seules bactéries connues avec ces compartiments internes apparents. Une étude de la reconstitution tridimensionnelle par tomographie électronique d'un représentant de l'espèce, *Gemmata obscuriglobus*, a donné des interprétations de ces observations. Une étude en 2013 a révélé l'apparition de compartiments internes pouvant être dus à une membrane unique continue fortement invaginée. Cette observation peut vouloir dire que seule deux membranes existent étant le cytoplasme et le périplasme comme cela est le cas des bactéries de Gram (-). Toutefois, la membrane ainsi disposée triple la surface de la cellule comparativement à son volume pouvant être lié aux capacités de biosynthèse des stérols.

Une étude en 2014 à l'aide d'une méthode similaire a confirmé cette hypothèse observant des compartiments clos. Il a été récemment démontré que *Gemmata obscuriglobus* est capable d'absorber de grosses molécules grâce à un procédé ressemblant à l'endocytose étant connu dans les eucaryotes pour englober de grosses molécules externes.

## Génome des *Planctomyces*

Le séquençage de l'ARNr 16S montre que les *Planctomyces* sont assez éloignés des autres eubactéries. Les groupes les plus proches semblent être les *Verrucomicrobia* et *Chlamydiae*. Un certain nombre de gènes impliqués dans des voies essentielles ne sont pas organisés en opéron<sup>eee</sup>,

<sup>eee</sup> **Opéron** : unité d'ADN fonctionnelle regroupant des gènes qui opèrent sous le signal d'un même promoteur, une section d'ADN qui déclenche leur transcription. Les gènes sont ainsi transcrits en ARN messager ensemble et concourent à la réalisation d'une même fonction physiologique. Donc, soit tous les gènes d'un opéron sont transcrits ensemble, ne soit aucun n'est transcrit puisqu'ils sont tous sous le contrôle du même promoteur.

Néanmoins elles semblent principalement présentes chez les procaryotes et les nématodes.

Les opérons ont été décrits la première fois par Paul Chauvin et Jacques Monod en 1960. Un des cas les plus célèbres est l'opéron lactose, que l'on trouve par exemple chez la bactérie *Escherichia coli*.

### Structure générale d'un opéron



Un opéron caractéristique

Un opéron est constitué de trois composants principaux :

- Le promoteur : c'est une séquence de nucléotides qui permet la transcription du gène en ARNm. Il est reconnu par l'ADN-polymérase qui initie la transcription. Lors de la synthèse de l'ARN, le promoteur indique quel gène doit s'exprimer et donc quelles protéines la cellule doit produire. Dans un opéron il est commun à tous les gènes.

étant assez inhabituel chez les bactéries (Glöckner, 2003). Un certain nombre de gènes semblables à des gènes eucaryotes ont été mis en évidence à l'aide de comparaison de séquences. Par exemple un gène de *Gemmata obscuriglobus* présente une similarité significative par rapport au gène de l'intégrine alpha-V, étant une protéine jouant un rôle important dans la transduction du signal transmembranaire chez les eucaryotes (Jenkins et al., 2002).

### Reproduction et cycle de vie

Le cycle de vie de nombreux *Planctomyces* implique alternance cellules sessiles et flagellées et essaim. Les cellules sessiles nagent un certain temps sous la forme flagellée, puis perdent ce flagelle afin de s'installer et s'attacher aux parois pour commencer la reproduction.

Les *Planctomyces* ont une division de cellule polaire, de type levure. Au cours de la division, les cellules attachent leur pôle végétatif aux surfaces avec des tiges ou des substances excrétées. La cellule mère est conservée et une nouvelle cellule fille est formée, contrairement à la fission binaire où la cellule-mère se divise en deux cellules-filles égales. Une cellule mobile est issue de cette séparation.

### Environnement

Les *Planctomyces* sont généralement aquatiques et se trouvent dans l'eau de mer, l'eau douce, l'eau saumâtre et l'eau des tourbières, même acide. Ils sont oxydants de l'ammonium, ils convertissent l'ammonium et les nitrites en diazote (N<sub>2</sub>). Cinquante pour cent de la production des océans en gaz azote est la résultante de ce processus microbien.

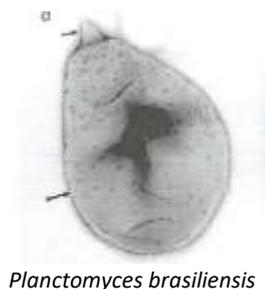
#### 18.1.1.1.1 Genre *Planctomyces* (Grotte de Sulzbrunn & gouffre de la Sambuy)

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition du genre *Planctomyces*, par catégorie d'échantillon sur le total de la flore de chacune des structures, a donné :

Snottites	≈3 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈2,7 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈0,9 %	de la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	de la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<1 %	de la flore totale de cette structure

Dans la grotte de Sulzbrunn le genre *Planctomyces* est présent dans les snottites et les biofilms « subaerial », dans les biofilms « submersed » sa présence est relativement faible, mais absente dans les eaux de la grotte.

### Morphologie



*Planctomyces brasiliensis*

#### *Planctomyces*

C'est une bactérie marine pouvant être trouvée dans divers habitats à travers le monde. Les *Planctomyces* ont une multiplication par bourgeonnement. Ils ne possèdent pas de peptidoglycane étant un élément de la membrane bactérienne très répandu aussi bien chez les bactéries de Gram (-) que chez les bactéries de Gram (+). Seuls les Mycoplasmes, les *Planctomyces*, les *Chlamydiae* et les Archaea en sont dépourvus. Dans de nombreux cas, leur ADN est entouré d'une membrane semblable à une « membrane nucléaire » comme les eucaryotes. Elles ont des prosthecae pour adhérer aux parois et peuvent produire de dépôts d'oxyde de fer.

- L'opérateur : c'est un segment d'ADN auquel un signal chimique (une molécule régulatrice) se lie. Ce peut être soit un signal répresseur soit un signal activateur de la transcription des gènes de l'opéron.
- Les gènes structuraux : ce sont les gènes contrôlés de manière coordonnée grâce à l'opérateur, c'est-à-dire co-transcrits sous forme d'un ARN messager polycistronique.

Le gène régulateur ne fait pas partie de l'opéron en lui-même, mais il est essentiel à son fonctionnement. Ce gène code le signal moléculaire qui se lie à l'opérateur. Cependant il peut être spatialement très éloigné de l'opéron sur le chromosome.

Les *Planctomyces* ont un flagelle comme les *Pirellula*, *Gemmata*, *Isosphaera*. Ils sont composés de cellules sphériques possédant des vacuoles contenant du gaz et leurs colonies sont de couleur rose saumon.

Du fait de la grande variété structurale, c'est un très bon marqueur taxonomique.

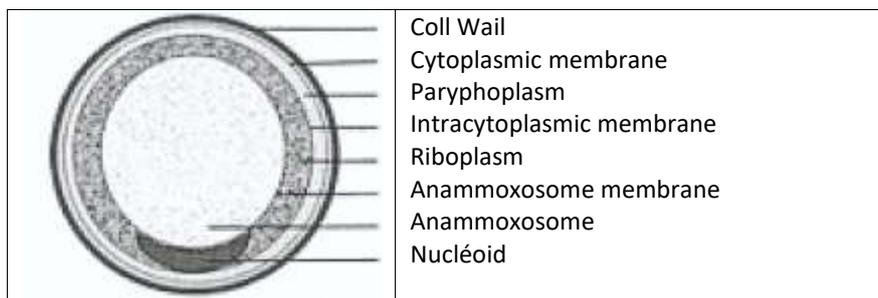
La différenciation de la structure membranaire permet la distinction des genres et des espèces.

Elles sont apparentées aux *Chlamydiales* et sont unicellulaires ou en rosettes, se multipliant par bourgeonnement et sont appendiculées, cellule sphérique ou ovoïdes avec un appendice multi-fibrillaire.

Leurs structures internes complexes les rapprochent des eucaryotes. En plus d'avoir un noyau plus ou moins enrobé dans une couche de la membrane externe que l'on nomme nucléoïde, il existe deux autres membranes séparées se nommant :

- Le riboplasme (ou pirellubosome) renfermant le ribosome et les protéines.
- Les paryphoplasmes ne contenant pas de ribosome.

#### Membrane cellulaire de *Planctomycetes*



#### Cycle de vie

Le cycle de vie est constitué de deux phases où alternent une cellule sessile (immobile, accrochée à une paroi) et une cellule à flagelle. Les cellules sessiles bourgeonnent pour former des cellules à flagelle, nageant un certain temps avant de se rattacher à leur tour à une paroi et commencer leur reproduction.

#### Caractéristiques des *Planctomyces*

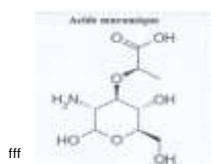
Les *Planctomyces*, comme les *Chamydiales* n'ont pas d'acide muramique<sup>fff</sup> (ose-aminé, N acétyl muramique  $\supset$  paroi des bactéries). Elles sont dépendantes de l'ATP des cellules de l'hôte. Les *Planctomyces* sont des bactéries sans prosthecae mais elles sont pédonculées, elles forment des dépôts d'oxyde de fer.

Les *Isosphaera* et *Jonquille* ont été décrites uniquement pour deux seules espèces : ***Gemmata obscuriglobus*** et ***Isosphaera pallida***.

#### 18.1.1.1.2 Genre *Gemmata* (Gouffre de la Sambuy, France ; « Four Windows Cave », USA)

Nom donné par Franzmann & Skerman 1985

La publication de l'étude de la grotte de Sulzbrunn ne nous ayant pas précisé le genre de *Planctomyces* présent dans cette grotte, le choix du genre *Gemmata* a été retenu pour définir cette bactérie. Le genre *Gemmata* a été retrouvé dans de nombreuses grottes aux États-Unis d'Amérique (*Four Windows Cave*) et en France (*gouffre de la Sambuy*).

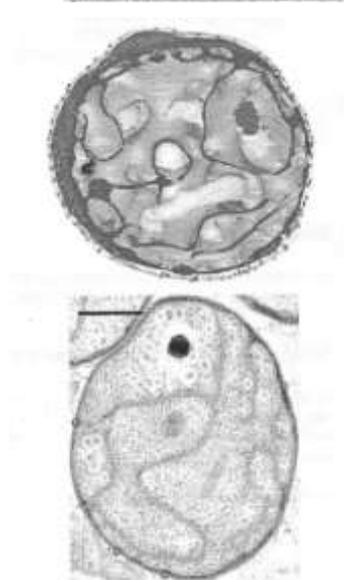
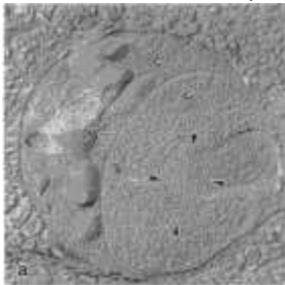


**Acide muramique** : ose aminé présent sous forme d'acide N-acétylmuramique (NAM) dans la paroi des bactéries, il est associé à du N-acétyl-glutamique ainsi qu'à des acides aminés pour former le peptidoglycane. L'acide muramique N-acétylé dérive d'ailleurs lui-même de la N-acétylglucosamine auquel il est ajouté sur le troisième carbone un résidu HOOC-CH(CH<sub>3</sub>)-OH (structure lactate). La biosynthèse se fait également à partir du phosphoénolpyruvate. Sa présence dans la paroi bactérienne des procaryotes permet de différencier les eubactéries des *Archaea*.

## Description

Le génome, les fonctions de contrôle du métabolisme, de la biosynthèse, du transport, de la traduction et de la réplication de l'ADN du *Gemmata obscuriglobus* sont identiques à ceux rencontrés chez les bactéries, cependant certains gènes ont été trouvés dans le génome des eucaryotes, comme l'intégrine alpha-V et la protéine inhibiteur de la trypsine (Jenkins and al., 2002). Bien qu'il y ait similitude avec les eucaryotes, les analyses faites sur l'ARNr 16s ont confirmé leur classement dans les procaryotes. Ceci signifiant que toutes ces caractéristiques eucaryotes ont évolué indépendamment, cela peut nous permettre de mieux comprendre l'évolution des eucaryotes.

(Photo : [www.microsottranslator.com/bv.aspx?microbewiki.kenyon.edu/index.php/File\\_Gemmata\\_J.P.G.](http://www.microsottranslator.com/bv.aspx?microbewiki.kenyon.edu/index.php/File_Gemmata_J.P.G.))



## Structure cellulaire et métabolisme

**Morphologie :** *Gemmata obscuriglobus* est une bactérie sphérique, ces bactéries sont aérobies chimio-hétérotrophes ; leurs membranes cellulaires ne sont pas constituées par du peptidoglycane et présentent des structures de puits sur leurs surfaces cellulaires. Dans leurs membranes cellulaires, il y a une bicouche lipidique étant censée protéger les cellules contre la lyse par choc osmotique, pouvant remplir un rôle important dans la stabilisation des Planctomycetes dans leurs milieux oligotrophes osmotiquement stressant.

**Bactéries à reproduction bourgeonnante :** les bactéries Planctomycetales, ont une division de cellule polaire, de type levure.

Barre d'échelle 500 nm.

Micrographie électronique et reconstruction tridimensionnelle sur des cellules entières de *Gemmata obscuriglobus*. Cette reconstruction suggère des membranes continues et non fermées.

## Caractéristiques biochimiques

*Gemmata* utilise un processus anammox<sup>999</sup> (oxydation anaérobie de NH<sub>4</sub>). L'oxydation anaérobie de l'ion ammonium a une action environnementale dans le cycle de l'azote. Ce métabolisme microbien est propre aux bactéries *Planctomycetales*.

## Environnement

Les *Gemmata* ont été isolées pour la première fois dans un barrage d'eau douce du Queensland en Australie<sup>93</sup>. Ces bactéries sont intéressantes car elles présentent plusieurs des structures et des processus cellulaires étant généralement réservés aux cellules eucaryotes (ex. la forme nucléaire),

<sup>999</sup> **Anammox** : abréviation pour oxydation anaérobie de l'ammonium NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (**anaerobic ammonium oxidation** en anglais). Il s'agit d'une voie métabolique microbienne importante du cycle de l'azote. Les bactéries qui réalisent ce processus ont été identifiées en 1999 et ont constitué à l'époque une surprise pour la communauté scientifique. Ce type de réactions se déroule dans de nombreux milieux naturels. Méthode d'élimination de l'ammonium développée par l'université de technologie de Delft.

mais elle reste classée dans les procaryotes. Leurs nucléotides, entourés d'une double membrane appelée « corps nucléaire » (qui cependant n'a pas la complexité d'un noyau d'eucaryote), sa capacité à se reproduire uniquement par bourgeonnement et son absence de paroi composée de peptidoglycane, ne permettent pas de la classer dans les eucaryotes.

### Écologie

Les genres *Gemmata* et *Isosphaera* ont été isolés du sol, de l'eau douce et d'une solution d'ampicilline de laboratoire. Un nucléoside double-membrane-délimitée a été observé dans des isolements de *Gemmata* apparentés, mais pas dans *Isosphaera*. Cette observation peut relier les *Gemmata* aux eucaryotes.

*Jonquille obscuriglobus* est une bactérie sphérique ayant été isolée dans un barrage d'eau douce. Au cours d'une étude ayant analysé la diversité *Planctomycetales* d'une usine de traitement des eaux usées, les échantillons prélevés dans des digesteurs aérobies, anaérobies et anoxiques ont mis en évidence 3,8 % de *Gemmata* (Chouari et al., 2003).

### Résistance aux antibiotiques

L'absence de peptidoglycane de cette espèce bactérienne donne une résistance à un large éventail d'antibiotiques. Les antibiotiques utilisent souvent une altération de la paroi bactérienne pour limiter le développement bactérien.

### Pathogénicité

*Gemmata* est non pathogène. Cependant, les *Planctomycetes* sont plus proches des phylums *Chlamydiae* et *Verrucomicrobia*, eux contenant des espèces pathogènes chez l'Homme.

La diversité du groupe s'étend au-delà de ces deux autres genres de *Planctomyces* au statut de *Candidatus* (*Brocadia* et *Kuenenia*) et consistant en anaérobies autotrophes oxydant l'ammonium.

#### 18.1.1.1.3 Genres *Souches Planctomycetes Pla 46 (Pir 4)* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition des genres *Planctomycetes Pla 46*, par catégorie d'échantillon sur le total de la flore de chacune des structures, a donné :

Snottites	≈12 % de la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈7,2 % de la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈1,9 % de la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 % de la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<1 % de la flore totale de cette structure

### Définition

Il y a des preuves moléculaires, que ces bactéries appartiennent au phylum *Planctomycetes* et elles sont abondantes dans des éponges marines, y compris les membres du genre *Aplysina*.

Dans une culture bactérienne d'un prélèvement fait sur des éponges *Aplysina* et analysé sur des milieux oligotrophes sélectifs pour les *Planctomycetes*, il a été isolé 116 souches bactériennes.

### Morphologie

La microscopie électronique a révélé une morphologie de cellules en forme de poire ou de goutte étant caractéristique du genre *Planctomycetes Pirellula*.

### Phylogénétique

Le séquençage presque complet des gènes ARNr 16 s respectifs a révélé que les isolats étaient affiliés à deux groupes distincts du genre *Pirellula* : un isolat provient d'une éponge méditerranéenne, un isolat d'une éponge des Caraïbes et un de l'eau de mer des Caraïbes.

Le dépistage de la collection de souches par fluorescence *in situ* hybridation avec la sonde spécifique *Planctomycetes Pla 46* a donné trois candidats positifs.

### Culture

Les *Planctomycetes* prélevés dans des éponges ont été cultivés sur les milieux oligotrophes ils ont progressé lentement et ils n'ont pas pu croître sur des milieux riches en nutriments. Le

**Planctomycetes Pirellula souche SP. 797** était pigmenté en rose tandis que les deux autres isolats, souches 16 et 81, n'ont pas été pigmentés.

L'application des sondes des oligonucléotides spécifiques à la souche sur des tissus d'éponge coupés par cryosection montrent que les isolats contribuent seulement une fraction mineure à la communauté microbienne associée aux éponges de l'espèce **Aplysina spp.**

### Environnement

Le **Planctomycetes Pirellula** a été isolé d'une éponge méditerranéenne, un isolat d'une éponge des Caraïbes et un de l'eau de mer des Caraïbes.

## 18.2 Phylum **Phycisphaerae** (Grotte de Sulzbrunn)

- **Phycisphaerae** (Fukunaga and al. 2010) Ordre **Tepidisphaerales** (Kovaleva and al.)
  - Famille **Tepidisphaeraceae** (Kovaleva and al.)
    - Genre **Tepidisphaera**.
- Ordre **Phycisphaerales** (Fukunaga and al. 2010).
  - Famille **Phycisphaeraceae** (Fukunaga and al., 2010)
    - Genre **Alcisphaera** (Yoon, Jos, 2014 Kasai)
    - Genre **Phycisphaera** (Fukunaga and al., 2010)

### 18.2.1 Ordre **Phycisphaerales** (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition des genres **Phycisphaerales**, par catégorie d'échantillon sur le total de la flore de chacune des structures, a donné :

Snottites	≈4,4 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈6,5 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈1,8 %	de la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	de la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<1 %	de la flore totale de cette structure

Dans la grotte de Sulzbrunn il a été mis en évidence une seule familles de cet ordre **Phycisphaeraceae**

#### 18.2.1.1 Famille **Phycisphaeraceae** (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition des genres **Phycisphaerales**, par catégorie d'échantillon sur le total de la flore de chacune des structures, a donné :

Snottites	≈0,9 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈1,2 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈0,7 %	de la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	de la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<1 %	de la flore totale de cette structure

Dans cette grotte cette famille est présente dans les snottites, les biofilms « subaerial », en plus faible quantité dans les biofilms « submersed », mais absente dans les eaux de la grotte.

- Le genre identifié dans la grotte est la souche **Pir4** et **SM1A02**

### Phylum **Planctomycetes** ; Ordre **Phycisphaerales** ; Famille **Phycisphaeraceae**

#### Genres connus

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Algisphaera</i></li> <li>• <i>Phycisphaera</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u><i>SM1A02</i></u></li> <li>• <u>La souche <i>Pir4</i></u></li> </ul>
---	--

#### Définition

La famille des **Phycisphaeraceae** sont des bactéries aquatiques, vivant sur les algues vertes, se reproduisent par bourgeonnement. On les trouve sur les algues marines. Les organismes cellulaires,

de ce groupe, sont sphériques. Ils ont une *Holdfast* (pédoncule) à l'extrémité d'une mince extension cylindrique du corps cellulaire qui, à la fin de la reproduction les aide à se fixer les uns aux autres. La littérature nous informe que trois souches de *Phycisphaeraceae* ont été étudiées :

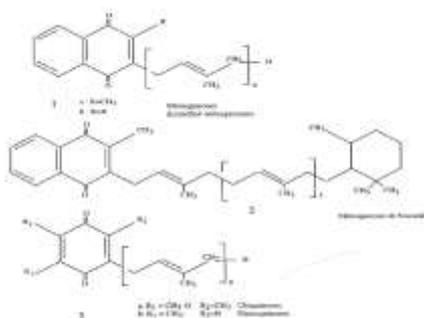
- FYK 230 1 M 01 (T),
- FYK 230 1 M18
- FYK 230 1 M52,

### Morphologie

Ce groupe de la famille des *Phycisphaeraceae* est de Gram (-) ; avec des cellules sphériques mobiles et anaérobies facultatives. Les colonies sont de souches circulaires et pigmentées en rose. Les cellules souches se reproduisent par scissiparité.

### Caractéristiques

Pour les *Phycisphaeraceae* la respiration se fait majoritairement à l'aide de la quinone isoprénoïde MK-6.



Structure des principales quinones respiratoires

### Culture

Elles se cultivent sur un milieu « Marine 2216 d'Agar (Difco) à 25 °C ».

### Phylogénétique

La teneur en G + C de l'ADN était de 73 % de mol.

L'analyse phylogénétique de trois souches marines prélevées sur des algues vertes par la méthode PCR avec des séquençages de gènes, a indiqué que les souches sont bien les membres du groupe WPS-1 (Nogales et coll., 2001)<sup>123</sup> mais n'ont pas pu valablement décrire les taxons au sein du phylum des *Planctomycetes*.

La plus forte valeur de similarité avec les *Planctomyces brasiliensis* DSM 5305(T) étudiée par séquençage des gènes des trois souches marines a établi une valeur 78,7 % en comparaison de la souche.

À partir des données taxonomiques obtenues dans cette étude, il a été proposé que les nouvelles souches marines doivent être placées dans un nouveau genre et espèce nommée *Phycisphaera mikurensis* Gen. nov., sp au sein d'une nouvelle classe *Phycisphaerae* ; ordre *Phycisphaerales* ; famille *Phycisphaeraceae* dans le phylum des *Planctomycetes*. La souche type de *Phycisphaera mikurensis* est FYK2301M01(T) (= NBRC 102666(T) = CCCR 22515(T)).

### Environnement

Les *Phycisphaeraceae* sont des bactéries isolées d'une algue marine (*Porphyra* SP) recueillie sur île de Mikura, au Japon.

#### 18.2.2.1.1 Genre *Algisphaera*

Afin de définir avec plus d'information sur le métabolisme de la classe *Phycisphaerae*, la souche *Algisphaera agarilyca* a été retenue.

L'étude faite par Jaewoo Yoon Jae-Hyuk et Hiroak Kasai le 28 août 2013 a été acceptée le 14 novembre 2013 au *Springer Science + Business Media Dordrecht 2013*.

**Phylum *Planctomycetes* ; Classe *Phycisphaerae* ; Ordre *Phycisphaerales* ;  
Famille *Phycisphaeraceae* ; Genre *Algisphaera***

**Espèce connue *Algisphaera agarilytica***

**Morphologie**

*Algisphaera agarilytica* est de Gram (-), aérobic stricte, pigmentée en rouge-rose, mobile, sphérique. Bactérie bourgeonnante possédant une morphologie cellulaire unique très distincte, des parois cellulaires dépourvues de peptidoglycanes et une organisation cellulaire unique (Koënic et al, 1984 ; Schlesner et Stackbrant, 1992 ; Fuerst, 1995, 2004, 2005, Ward et al, 2006, Fuerst 2013). Cette souche n'a pas d'endospore.

**Caractéristiques**

*Algisphaera agarilytica* dégrade l'agar ; les principaux acides gras de la souche 06S JR2 t ont été identifiés comme C16 : 0 ; C18 : 1\*9 c et antéiso – C 15 ;0.

L'analyse des acides aminés des hydrolysats des parois cellulaires a indiqué que le nouvel isolât de l'*Algisphaera agarilytica* ne contenait pas d'acide di-amino-pimélique dans la paroi cellulaire.

La teneur en ADNg de la souche a été déterminée comme étant de 63 % moles de la fraction retenue.

La quinone respiratoire a été identifiée en tant que ménaquinone 6 (MK 6).

Caractères métaboliques : catalase (+) ; oxydase (-) ; les pigments de type flexirubine sont absents.

Acidification (les tests de production des acides sont fait sur les fermentations) : le glycérol, la L-arabinose, le ribose, le D-xylose, le glucose, le rhamnose, l'inositol, le mannitol, le N-acétylglucosamine, l'amygdaline, l'arbutine (tache pigmentaire), le citrate de fer, la salicyline, le cellulose, le maltose, le saccharose, le tréhalose, l'amidon, le glycogène.

Phosphatases : la phosphatase acide et la naphthol-AS-BI-phospho-hydrolase sont présentes.

Mais la phosphatase alcaline et l'estérase (C4), estérase lipase (C8), la leucine arylamidase, la valine-arylamidase, la lipase -galactosidase (C4), la cystine arylamidase, l'chymotrypsine, la N-montrés-glucosaminidase, l'-glucosidase, la blucosidase, la trypsine, la glucuronidase, la -galactosidase et la frucosidase sont absentes.

**Phylogénétique**

Des analyses phylogénétiques basées sur la séquence du gène l'ARNr 16S ont indiqué que la nouvelle souche était associée à la classe des *Phycisphaerae* et partageait 89,2 % de similarité de séquence avec *Phycisphaera mikurensis* FYK 2301 M01 T étant le seul membre de la classe des *Phycisphaerae* valablement nommé.

De par la position phylogénétique distincte et la combinaison des caractéristiques génotypiques et phénotypiques, la souche est considérée comme représentant un nouveau genre dans la famille des *Phycisphaeraceae*, donc le nom d'*Algisphaera agarilytica* gen nov sp est proposé.

La souche type de *A. agarilytica* 06SJR 6-2 t (CCCR 32382T = NBRC 10989T).

Les types écophysologiques connus des *Planctomycetes* sont listés. Actuellement la classification du phylum *Planctomycetes* est encore en développement. Le phylum *Planctomycetes* est considéré comme contenant trois classes distinctes :

- Classe *Planctomycetia* (Ward 2010)
- Classe *Phycisphaerae* (Fukunaga 2009)

Le *Planctomycetes* anammox à ramification profonde de l'ordre du ***Candidatus* Bocdiales** (Jetten et al, 2009).

**Environnement**

Cette souche constitue une proportion importante des milieux aquatiques et terrestres (Wang et al, 2002). Les macro-algues fournissent des environnements abondants pour différents organismes épiphytes endophytes et épizo-benthiques (Bartsch et al, 2008) pouvant utiliser un large éventail de sources de carbone organique produites par les algues (Armstrong et al, 2000). Récemment, un

nouveau genre de *Planctomycetes* appartenant au nouvel ordre, *Phycisphaerales* a été isolé à la surface de la macro algue *Porphyra* sp.

### Culture

La culture a été ensemencée par frottement d'une suspension sur une plaque de gélose marine 2216 (Difco) à 1/10<sup>e</sup> de concentration avec 1 % de Rose Bengale (4,5,6,7-tétrachloro -20,40,50,70- tétra-iodo-fluorescéine), étant un photosensibilisateur à la présence d'oxygène naissant.

Incubation de deux semaines ; à température ambiante et les colonies sont rouge-rose.

Les colonies sont reprises sur le même milieu difco additionné de 20 % (v/v) de glycérol à -70° C.

La croissance anaérobie est testée pendant deux semaines sous atmosphère stricte de CO<sub>2</sub>.

#### 18.2.1.1.2. Groupe *Phycisphaera*, souche SM1A02 (Grotte de Sulzbrunn)

Genre non classé.

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition de la souche SM1A 02 dans la famille *Phycisphaeraceae* est la suivante :

Snottites	≈ 4.4 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 6.5 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 1,5 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	Nd.	
Eau de mélange	Nd	

#### Phylum *Planctomycetes* ; Classe *Phycisphaerae* ; Ordre *Phycisphaerales* ; Famille *Phycisphaeraceae* ; Genre *Phycisphaera* SM1A02

*Phycisphaera* SM 1A02 est capable de transformer et d'utiliser l'acide méthane sulfonique (MSA) étant un intermédiaire pertinent du cycle biogéochimique du soufre. Les micro-organismes environnementaux jouent un rôle important dans la minéralisation de ce composé.

Plusieurs souches bactériennes méthylophes capables de pousser sur la MSA ont été isolées à partir du sol ou de l'eau de mer. Dans la plupart de ces souches ont été rencontrés deux gènes opérans, *msm-ABCD*, codant pour la MSA monooxygénase et le gène *msmEFGH* codant pour un système de transport.

#### La MSA monooxygénase :



Des séquences homologues également ont été amplifiées directement à partir de l'environnement ou observées dans les données de marine métagénomique, mais celles-ci ont montré une composition de base de l'ADN-ADN en (G + C) très différentes de leurs homologues de bactéries cultivées.

L'étude concernait des micro-organismes de la microflore océanique surface côtière utilisant la MSA comme un élément nutritif. Cette étude a progressé au moyen du métagénome<sup>hhh</sup> au cours des premières phases d'un enrichissement et séquençage du gène ciblé amplicon (un amplicon est un fragment d'ADN amplifié par PCR « réaction en chaîne par polymérase »)<sup>92, 93, 94, 95</sup>.

Du point de vue phylogénétique, les méthodologies ont considérablement changé. Elles ont permis de mieux cibler les caractéristiques phylogénétiques, ayant précisé que nous n'avions pas dans cette espèce de liens avec les *Archaea*, la *Pelagibacteraceae* et avec le phylum des SAR406.

Ce groupe de la famille des *Phycisphaeraceae* est similaire aux méthylophes de la famille *Hyphomonadaceae*.

---

<sup>hhh</sup> **Métagénome** : la métagénomique est une méthode d'étude du contenu génétique d'échantillons issus d'environnements complexes (ex : intestin, océan, sols, air, etc.) prélevés dans la nature (par opposition à des échantillons cultivés en laboratoire) Cette approche, via le séquençage direct de l'ADN présent dans l'échantillon, permet une description génomique du contenu de l'échantillon, mais aussi un aperçu du potentiel fonctionnel d'un environnement. L'utilisation du préfixe « *méta* » fait référence à « ce qui vient après » ; ici, la métagénomique vient après la génomique en étudiant les organismes directement dans leur environnement sans passer par une étape de culture en laboratoire.

Dramatique a été la disparition des MPME gènes liés à l'importation MSA, suggérant que les autres transporteurs doivent être présents dans la communauté enrichie, et illustrent l'insuffisance des MPME comme marqueur éco-fonctionnel pour la dégradation de la MSA en mer (nous ne pouvons pas prendre référence sur les gènes MPME, étant des gènes codant les protéines de transport de la MSA, pour définir une activité de la dégradation de la MSA chez les bactéries).

### **Acide méthane-sulfonique à travers les âges**

Il est connu que l'acide méthane-sulfonique (MSA) a été produit pendant des millénaires dans l'atmosphère à partir de l'oxydation du sulfure de diméthyle (DMS) s'échappant de la surface de l'eau de mer (Andreae, 1986 ; Hynes, Vin & Semmes, 1986, coll., 1992 ; Koga & Tanaka, 1993, Kelly & Murrell, 1999). Le DMS est essentiellement un sous-produit de la dégradation des organismes photosynthétiques marins (Todd et al., 2011) et est la principale composante des émissions de soufre volatil marine (Gondwe et coll., 2003). En raison de l'ampleur de ce processus biogéochimique, des quantités très importantes (env. 10 kg) de MSA se forment chaque année et forment des dépôts avant de remonter à la surface.

### **Analyse de composition phylogénétique**

L'analyse de l'ADN-ADN des teneurs en G+C contenu du métagénome de la source sur deux échantillons a donné 43,3 moles % sur le premier échantillon et 53,29 moles % sur un second échantillon.

### **Culture**

Culture de la biomasse : un prélèvement de 5 l d'eau de mer est filtré par microfiltration (une membrane de 1,5 µm). Après filtration la membrane a été stérilement récupérée et remise en suspension dans 200 ml de filtrat d'eau de mer. À cette dispersion il a été ajouté 1 ml de méthane-sulfonate dans une solution tampon sodique alcalin à pH 8,1 à 1 mol/l. Sur cette solution un enrichissement a été effectué aux jours 7, 9 et 12. La suspension est incubée en aérobiose à température ambiante (env. 20 °C) dans l'obscurité, mixée en permanence par un agitateur magnétique. Cette annexe a été délibérément maintenue pendant 16 jours, avec aucun repiquage, afin de produire une culture partiellement enrichie.

La biomasse à la fin du processus d'enrichissement a été recueillie par centrifugation et l'ADN a été extrait avec PowerWater DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratoire, Inc., avec les adaptations nécessaires pour tenir compte de la biomasse dans un culot, plutôt que sur un filtre).

Dans la grotte de Sulzbrunn il a été identifié un seul genre de cet embranchement : *le genre Methylomirabilis*

#### Répartition de ce genre dans la cavité :

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition de l'embranchement NC 10 par catégorie d'échantillons sur le total de la flore de chacune des catégories a donné :

Snottites	Nd	
Biofilms « subaerial »	Nd	
Biofilms « submersed »	5.4 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	<1 %	du total de la flore de cette structure

### 19.1 Phylum *Candidatus* NC10 (Grotte de Sulzbrunn)

**Préfix *Candidatus*** : dans la nomenclature bactérienne, *Candidatus* est un élément du nom taxinomique attribué à une espèce de bactérie impossible à maintenir en culture dans une collection bactériologique. Ce terme correspond à un statut taxinomique provisoire pour les organismes étant encore à cultiver. Exemple « *Candidatus Phytoplasma allocasuarinae*<sup>94</sup> », pouvant s'abrégé en « **Ca. Phytoplasma allocasuarinae** ».

Le statut *Candidatus* peut être utilisé quand une espèce ou un genre est bien caractérisé, mais pas encore cultivé. Dans ce cas, on ne peut pas utiliser les méthodes traditionnelles d'identification des bactéries, méthodes se basant sur des caractéristiques phénotypiques et physiologiques, mais beaucoup d'informations permettant une identification fiable des différentes souches bactériennes peuvent être obtenues par l'analyse phylogénétique de séquences de l'ARN-ribosomique 16s ou même du génome presque complet par la métagénomique<sup>\*\*\*</sup>.

Pour la publication valide d'une espèce, les bactéries doivent être isolées, cultivées, décrites, et un échantillon doit être déposé dans une collection de culture bactériologique. Cependant, certaines bactéries exigent des conditions de culture particulières et ne peuvent être maintenues dans ces collections. C'est le cas des agents pathogènes intracellulaires et endosymbiontes obligatoires, des symbiotes d'insectes et des populations issues des océans ou des boues.

En 1994, Murray<sup>95</sup> et Schleifer ont publié une note taxinomique dans laquelle ils recommandaient qu'une nouvelle catégorie de rang indéterminé (*Candidatus*) soit créée pour certains taxons putatifs ne pouvant être décrits avec suffisamment de détails pour justifier la création d'un nouveau taxon. Ils recommandaient également que la liste des *Candidatus* soit publiée dans *International Journal of Systematic Bacteriology* (IJSB), devenu depuis *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*<sup>96</sup>.

La note taxinomique proposant la création du statut provisoire *Candidatus* pour désigner les procaryotes décrits fut publiée dans le numéro de janvier 1995 de l'IJSB. Selon cette note, la catégorie *Candidatus* doit être utilisée pour décrire des entités procaryotes pour lesquelles plus d'une séquence d'ADN est disponible, mais pour lesquelles les caractéristiques nécessaires pour la description selon le Code bactériologique font défaut. Outre l'information de type génomique, telle que des séquences d'ADN, d'autres informations, notamment celles concernant la structure, le métabolisme et les caractéristiques de la reproduction, devraient figurer dans la description.

Des échantillons (souches types) des nouvelles bactéries cultivables proposées doivent être déposés dans au moins deux des collections de cultures de souches microbiennes ouvertes (accessibles au public) dans différents pays<sup>97</sup>.

Selon le *Comité adhoc pour la réévaluation de la définition de l'espèce en bactériologie*, les microbiologistes sont encouragés à utiliser le concept de *Candidatus* pour désigner les organismes bien caractérisés mais pas encore cultivés.

Les noms figurant dans cette catégorie doivent s'écrire de la manière suivante : *Candidatus* (en italique), suivi du nom binominal en caractères droits (avec une majuscule initiale pour le nom générique), l'ensemble étant placé entre guillemets. Exemples : « ***Candidatus Phytoplasma*** », « ***Candidatus Phytoplasma allocasuarinae*** ».

#### **19.1.1.1.1 Genre *Methylomirabilis*** (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition des *Methylomirabilis* a été détectée seulement dans le biofilm « submersed » avec une teneur de 100 % des *NC10* de l'ensemble des bactéries et environ 5.4 % de la flore bactérienne des biofilms « submersed ». Elle n'est pas présente dans les eaux de la grotte.

Il semblerait que cette bactérie ait pu être présente à l'origine de la formation de la grotte par le fait que l'eau de source et l'eau de mélange ont des teneurs très faibles en *Methylomirabilis*.

Elle a joué un rôle dans l'oxygénation de la grotte ayant permis aux germes aérobies de pouvoir rester en vie dans ce milieu micro-oxique.

#### **Phylum *C10* ; Famille non identifiée ; Genre *Methylomirabilis***

##### **Espèce « *Candidatus Methylomirabilis oxyfera* »**

La seule espèce du genre ayant été décrite à ce jour et étudiée est le « ***Candidatus Methylomirabilis oxyfera*** ».

#### **Historique**

Une collaboration internationale de chercheurs, à laquelle participent le CEA, le CNRS et l'université d'Évry-Val-d'Essonne, vient de montrer que la bactérie anaérobie « *Ca. Methylomirabilis oxyfera* », que l'on pensait capable d'oxyder le méthane sans oxygène, non seulement l'utilise bel et bien, mais surtout produit elle-même cet oxygène.

Cette nouvelle voie de production d'oxygène pourrait être antérieure à l'apparition de la photosynthèse sur terre dans l'évolution des processus métaboliques autour de l'oxygène.

Le méthane est une molécule très stable, il était généralement admis que sa dégradation sans oxygène ou sulfate était impossible.

Pourtant en 2006, une équipe de chercheur a découvert une bactérie capable d'oxyder le méthane sans utiliser d'oxygène atmosphérique. À la place de cela, ce microorganisme utilise des nitrites, que l'on trouve notamment dans les sédiments d'eau douce.

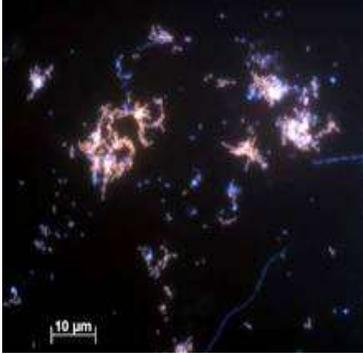
La même équipe vient aujourd'hui de montrer que cette bactérie, par un processus enzymatique entièrement nouveau, produit en fait elle-même de l'oxygène à partir des nitrites pour oxyder le méthane.

## Taxonomie

Une nouvelle branche phylogénétique au sein des autres méthanotrophes définit une association avec des ramifications profondes du *phylum* NC10, comportant le « **Candidatus Methyloirabilis oxyfera** » n'étant ni-oxydant aérobie du méthane, ni-oxydant anaérobie du méthane (AMO).

Les caractéristiques de cette branche sont représentées par le consortium des méthanotrophes (« **Ca. Methyloirabilis oxyfera** » est un genre particulier dans les méthylotrophes).

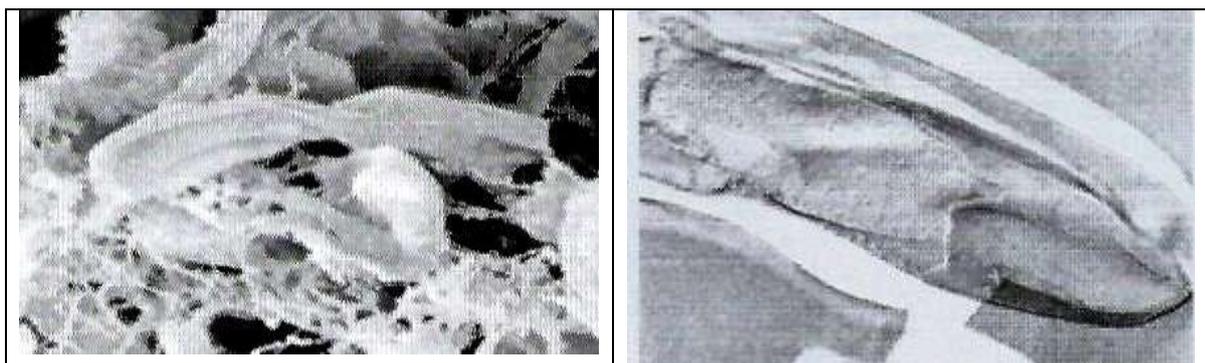
### Espèce « **Ca. Methyloirabilis oxyfera** »

 <p>Sur cette image, on perçoit bien en orange le marquage l'ADN cette bactérie et la présence d'autres bactéries, en bleu.</p> <p>© Katharina Ettwig / Radboud University Nijmegen</p>	<p><b>Morphologie</b></p> <p>Analyse avec l'utilisation de la microscopie électronique à balayage, microscopie électronique à transmission et tomographie électronique (Ming LWu, Muriel C. F. van Teeseling, Marieke J.R. Willems)<sup>78</sup></p> <p>« <b>Ca. Methyloirabilis oxyfera</b> » est une bactérie anaérobie. Les cellules possèdent une forme polygonale atypique se distinguant des autres bactéries, avec un nombre variant de côtés pour différentes raisons, leurs formes sont en bâtonnets, ayant en moyenne, <math>1\ 158 \pm 322</math> nm de long et <math>259 \pm 64</math> nm de largeur (mesurée sur un total de 50 cellules).</p>
--	---

Le « **Ca. Methyloirabilis oxyfera** » a une surface des cellules d'aspect relativement lisse. Les cellules ont des quantités différentes de ces crêtes longitudinales, entraînant une forme de cellules polygonales.

En outre, une couche supplémentaire a été observée sous la gaine ultrapériphérique, pouvant représenter une couche de surface (glycoprotéines). Les membranes intracytoplasmiques, étant une caractéristique commune chez les protéobactéries méthanotrophes, n'ont jamais été observées dans les conditions actuelles de la croissance. Nos résultats indiquent que « **Candidatus Methyloirabilis oxyfera** » est une nouvelle ultrastructure distincte des autres bactéries par sa forme cellulaire atypique et se différenciant des protéobactéries méthanotrophes classiques par son manque apparent de membranes intracytoplasmiques.

### Structure du **Ca. Methyloirabilis**



### Structure membranaire et cellulaire spécifique

Les cellules de « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » ont montré une enveloppe cellulaire typique des bactéries de Gram (-). L'enveloppe cellulaire a une largeur totale d'environ 40 nm et consistait, de l'intérieur à l'extérieur, en une membrane cytoplasmique, peptidoglycane. Le peptidoglycane comprenant une couche à proximité de la membrane externe perméable aux électrons dans l'espace périplasmique.

Les cellules du « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » diffèrent des formes prototypiques des cellules bactériennes (ex : forme polygonale de la membrane externe de la cellule). Dans les cellules

coupées longitudinalement à l'intérieur du cytoplasme, on observe des granules de lumière contenant éventuellement du matériel de réserve. Le nucléotide, étant visible comme une zone densément colorée au milieu de la cellule, occupait une grande partie du contenu cellulaire et semblait être assez condensé. Étonnamment, les membranes intracytoplasmiques n'ont jamais été observées.

### Caractéristiques biochimiques

Le phylum *NC10* est une nouvelle branche phylogénétique au sein des méthanotrophes.

Le « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » est un oxydant du méthane, ni aérobie, ni anaérobie mais grâce à la AMO en utilisant les nitrites et les nitrates comme donneurs d'oxygène pour l'oxydation et de O<sub>2</sub>, d'azote atmosphérique N<sub>2</sub> et de l'hydrogène H<sub>2</sub>, il pourrait être rattaché au consortium de méthanotrophe *Archaea* et des bactéries sulfato-réductrices par sa spécificité.

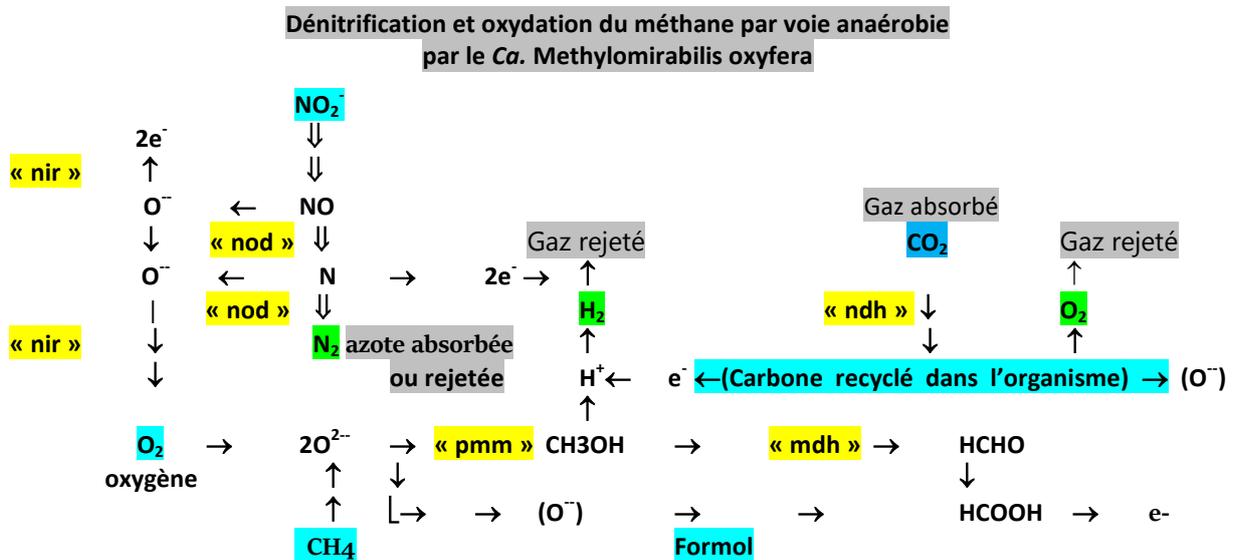
### Voie d'oxydation du méthane

Il oxyde le méthane par la dénitrification (utilisation de l'oxygène lié à l'azote organique) par une voie intra-aérobie. Il semble que « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » ait une nouvelle façon de vivre à partir du méthane, en combinant l'AMO couplé à la dénitrification, avec une respiration normale par une voie intra-aérobie nouvellement découverte pour la production d'oxygène<sup>79</sup>.

C'est pour cela qu'il a été classé dans le phylum : *NC10*.

La compréhension de cette voie de production d'oxygène a été compliquée par le fait que le « *Ca. Methyloirabilis oxyfera* » se développe très lentement, dans un milieu anaérobie et dans une communauté microbienne complexe.

On a utilisé une approche globale en séquençant l'ensemble des ADN métagénomiques (chercheur du Génoscope<sup>iii</sup>) ; ils ont utilisé une approche globale en séquences, ils sont parvenus à reconstituer le génome complet du « *Ca. Methyloirabilis oxyfera* ».



- Vert** => gaz rejeté dans atmosphère
- Jaune** => gène des enzymes actives
- Bleu** => gaz absorbé par la bactérie pour faire son énergie

Oxydation du méthane par voie anoxique à partir des nitrates et des nitrites d'origine organique. L'oxygène produit va servir à oxyder le méthane avec production de l'acide formique. Le résultat de cette oxydation va produire de l'oxygène, de l'azote, du gaz carbonique et de l'hydrogène. Les termes se trouvant entre « », sont le nom de gènes, entrant dans la production d'enzyme allant servir dans la réaction biochimique.

### Respiration par dénitrification

<sup>iii</sup> Le Génoscope (Institut de génétique, Direction des sciences du vivant, Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives) est dirigé par Jean Weissenbach, directeur de recherche CNRS.

L'oxygène est produit par une voie de dénitrification atypique, procédant par la dis-mutation du monoxyde d'azote en di-azoté atmosphérique ( $N_2$ ) et en oxygène ( $O_2$ ). Il est en partie utilisé pour activer l'oxydation du méthane; l'oxygène restant est éliminé dans la respiration normale par des oxydases respiratoires terminales<sup>39</sup>.

#### Dénitrification de l'acide nitrique en ammoniac ou en azote atmosphérique

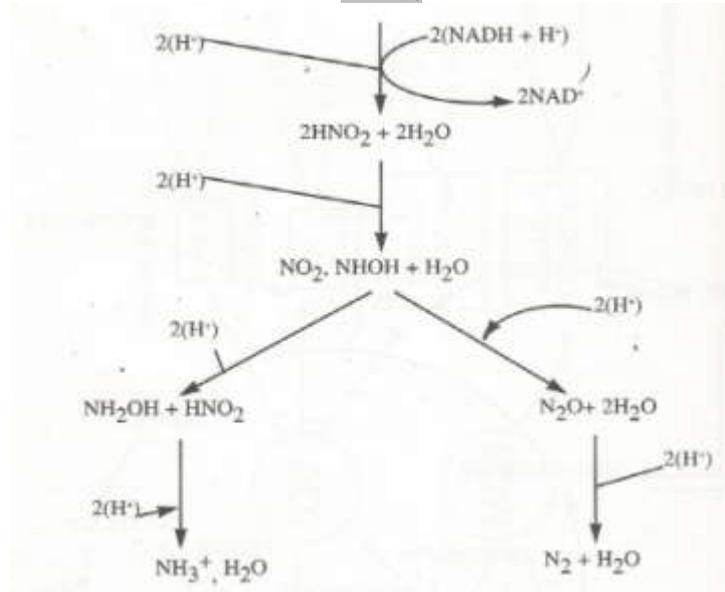


Schéma de la dénitrification

#### La respiration anaérobie

Chez certaines bactéries, la respiration peut exister en anaérobiose. Un accepteur terminal des électrons autre que l'oxygène doit donc exister.

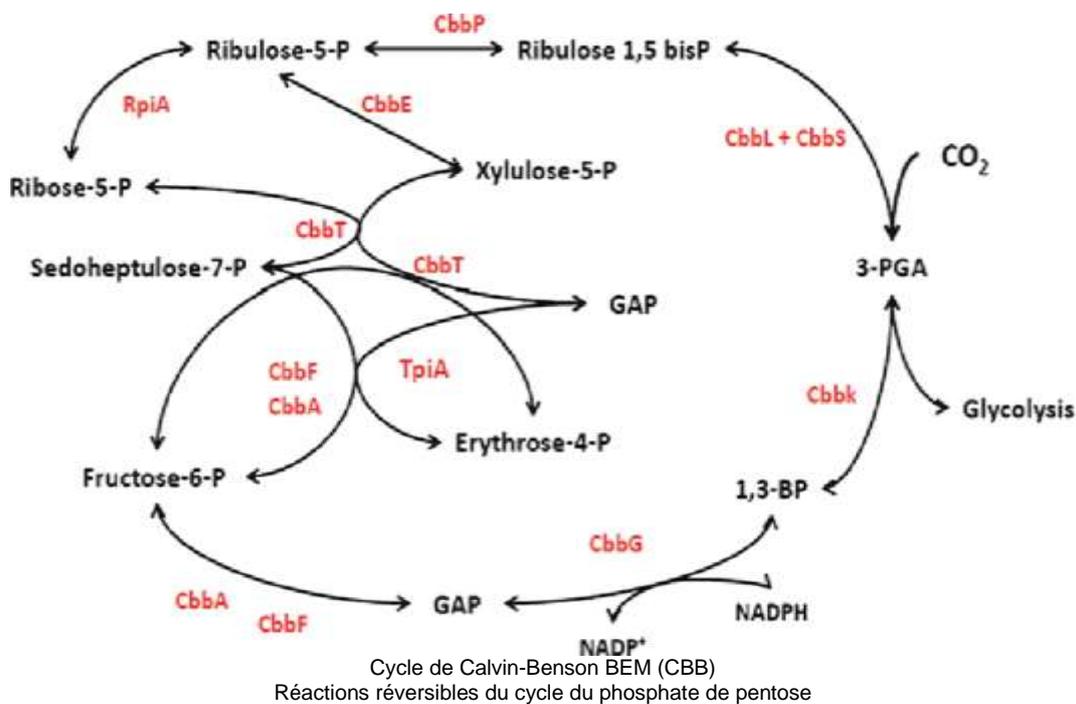
Chez les bactéries la dénitrification peut se produire à plusieurs niveaux.

Chez les *Enterobacteriaceae*, la réduction des nitrates s'arrête au stade de nitrites.

Chez les *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paracoccus*, *Thyobacillus denitrificans*, « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* », la réduction des nitrates se fait jusqu'au stade du diazote ( $N_2$ ) qui, par sa non solubilité devient du diazote atmosphérique. La dénitrification est le processus par lequel le  $NO_3^-$  et le  $NO_2^-$  sont réduits en  $N_2O$  et  $N_2$  par les bactéries. La réduction dissimulatrice de  $NO_3^-$  en  $NH_4^+$  est réalisée par les bactéries anaérobies ou anaérobies facultatives, comme les *Planctomyces*.

#### Utilisation du carbone atmosphérique

L'analyse du génome a suggéré que le « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* », comme les méthanotrophes des *Verrucomicrobia*, ayant leurs gènes encodés pour la transcription du cycle de Calvin-Benson-BEM (CBB), assimilent du carbone, signifiant que ces bactéries fixent du dioxyde de carbone, elles sont de ce fait autotrophe.



« *Candidatus Methylophilus oxyfera* » utilise les enzymes suivantes :

- L'érythrose-4-phosphate
- Le fructose - 6P. Fructose-diphosphate aldolase (CbbA) .
- Le fructose – 6P fructose/sedoheptulose bis-phosphatase (CbbF)
- Le sédo-heptulose-7-phosphate.
- Le xylulose - 5P
- Le ribose-5-P ribulose-5-épimérase (CbbE)
- Le triose-phosphate isomérase (ait).
- La transcétolase<sup>iii</sup> (CbbT)

Ce sont les enzymes habituellement utilisées pour la fixation du CO<sub>2</sub> ?

<sup>iii</sup> **Transcétolase (CbbT)** : cette enzyme catalyse en deux sens opposés deux réactions réversibles dans ces deux voies métaboliques.

- Dans la première réaction catalysée par la transcétolase dans la voie des pentoses phosphates, la thiamine pyrophosphate accepte un fragment à deux atomes de carbone du D-xylulose-5-phosphate (un cétose à cinq atomes de carbone) et transfère ce fragment au D-ribose-5-phosphate (un aldose à cinq atomes de carbone), pour former du sédoheptulose -7-phosphate (un cétose à sept atomes de carbone), ainsi que du glycéraldéhyde-3-phosphate (un aldose à trois atomes de carbone) ; dans le Cycle de Calvin, la transcétolase catalyse la réaction inverse, c'est-à-dire la conversion du sédoheptulose-7-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate en ribose-5-phosphate et xylulose-5-phosphate, ce qui constitue la seconde intervention de cette enzyme dans cette voie métabolique.

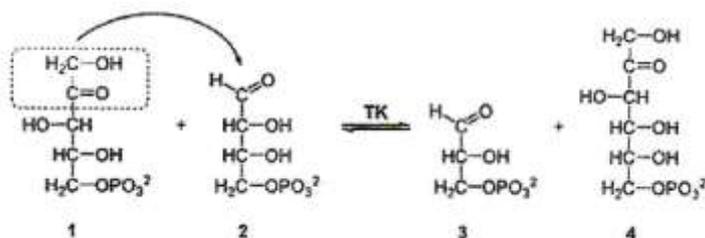
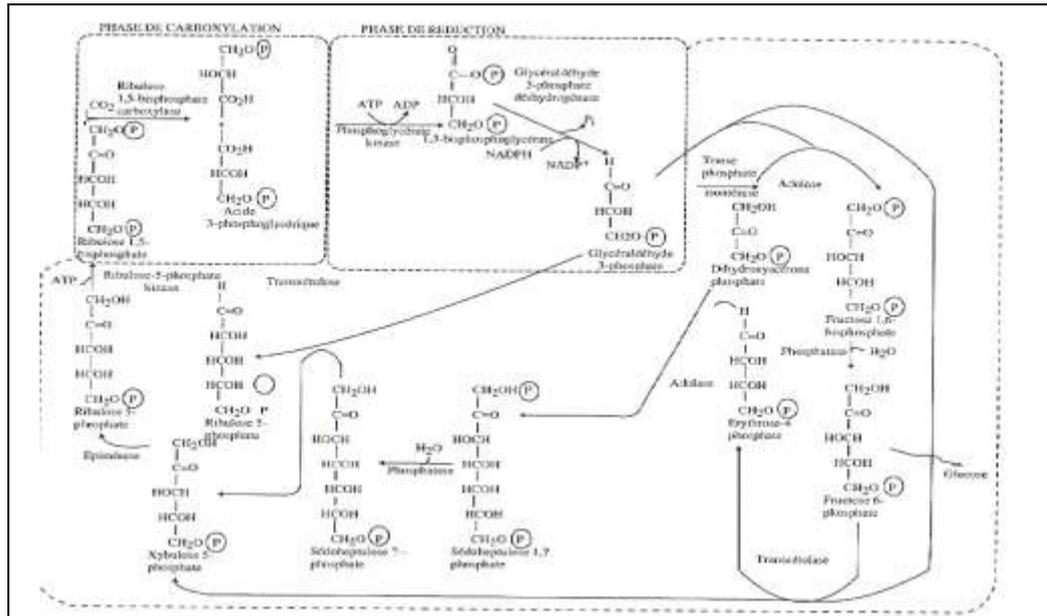


Illustration du schéma réactionnel catalysé par la transcétolase

- La seconde réaction catalysée par cette enzyme dans la voie des pentoses phosphates consiste à transférer un fragment à deux atomes de carbone du xylulose-5-Phosphate vers l'érythrose-4-phosphate pour former du fructose-6-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate ; dans le cycle de Calvin, la transcétolase catalyse là encore la réaction inverse, qui est la première intervention de cette enzyme dans cette voie métabolique.

## Cycle de Calvin-Benson BEM (CBB)<sup>98</sup>



Cycle de Calvin ou réaction photosynthétique du carbone<sup>80</sup>

### Enzymes utilisés dans le cycle de Calvin\*\*\*

Carboxylase	NADPH => NADP+	Trancétolase
Ribose 1-5 phosphatase	Triphosphate isomérase	Aldolase
Phosphoglycérate Kinase	Aldolase	Phosphatase
Glycéradéhyde-3-phosphatase		Epimérase.
déshydrogénase		

### Métabolisme

L'activité Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubis CO), une enzyme clé du Cycle de CBB dans les extraits cellulaires d'une culture d'enrichissement du « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » s'est avérée représentée jusqu'à 10% de l'activité d'oxydation totale du méthane<sup>99</sup>. La fixation du CO<sub>2</sub> a pu être mise en évidence par l'analyse de la fixation du carbone C<sup>13</sup> d'un bicarbonate pris dans le milieu de culture (Rasigarf O., Ettwig K.F., Sinninghe Damsté J.S. and al.)<sup>100</sup>.

### Enzymes mises en jeu par le « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* »

Le modèle enzymatique particulier du « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » dans le catabolisme pour l'utilisation énergétique et l'orientation du flux de protons, met en jeu les enzymes suivantes : la BC1, le complexe cytochrome oxydase bc1 (transport d'électrons) ; la MDH (méthanol déshydrogénases) ; la NADH (complexe déshydrogénase NAD (P) H) ; la NIR (nitrate réductase) ; la dismutase de l'oxyde nitrique (l'oxygène produit par une voie de dénitrification, est transformé par la dismutase du monoxyde d'azote en azote et en oxygène) ; la MMOP (forme particulière de la méthane mono-oxygénase) ; la Q (coenzyme Q).

### Composition bactérienne en lipides

La composition lipidique des « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* », était dominée jusqu'à 46 % par l'acides gras en l'acide 10-méthylhexadécanoïque (10MeC<sub>16:0</sub>). En outre, un acide gras unique a été identifié : l'acide 10-méthylhexadécenoic mono-insaturé avec une double liaison en position Δ7 (10MeC<sub>16:1Δ7</sub>), comprenant jusqu'à 10 % des acides gras totaux.

Les clés et les éléments caractéristiques du profil lipidique du « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » sont typiques des ramifications en acides gras le 10MeC<sub>16:0</sub> et 10MeC<sub>16:1Δ7</sub>.

La détection de ces acides gras dans une tourbière ou dans les milieux de culture permet de par leurs spécificités d'être utilisée comme un biomarqueur pour la détection de la bactérie.

## Oxydation du méthane

La bactérie « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » effectue l'oxydation du méthane anaérobie couplée à la dénitrification, mais le fait d'une manière particulière. Au lieu d'utiliser l'oxygène de l'environnement, comme les méthanotrophes aérobies, elle produit sa propre alimentation en oxygène en métabolisant le nitrite par l'intermédiaire de monoxyde d'azote en produisant de l'oxygène et de l'azote.

L'oxygène dans les cellules produites est ensuite utilisé pour l'oxydation du méthane par la voie d'oxydation du méthane aérobie classique impliquant Méthane Mono-Oxygénase (MMO).

Une des caractéristiques ultra-structurales des méthanotrophes les plus communes est partagée par la plupart des germes méthanotrophes.

Les Membranes Intracytoplasmiques (ICMs, intracytoplasmique membrane) de ces bactéries contiennent l'enzyme MMO sous forme particulière cylindrique pour l'oxydation du méthane, la Méthane Mono-Oxygénase particulière (MMOp) et la forme soluble de cette enzyme (MMOs), se trouvant dans le cytoplasme.

La disposition structurale cylindrique des MMOp dans la ICMs aboutit à une augmentation de la quantité enzymatique, pouvant atteindre jusqu'à 80 % du contenu total de la ICMs et il pourrait se refléter dans l'amélioration de la vitesse métabolique<sup>87</sup>.

Les arrangements ICMs se produisent sous deux formes structurales :

- Soit en faisceaux de disques vésiculaires, dans *Gammaproteobacteria* (méthanotrophes de type I)
- Soit sous forme de couches périphériques appariées dans *Alphaproteobacteria* (type II méthanotrophes).

Dans les études faites par microscopie électronique sur le « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* », cette bactérie ne semble pas posséder de membrane intracytoplasmique (ICMs), donc par hypothèse la seule source de MMO est la MMOs plasmique<sup>2</sup>.

La voie oxydative du méthane par le « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » en anaérobiose se fait par la dénitrification et est dépendante de la présence nitrite ou nitrate par une voie intra-aérobie.

## Phylogénétique

La totalité du génome de « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » a été assemblé en un seul chromosome circulaire de 2,7 Mo séquençage métagénomique.

Le génome de « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » a révélé tout le potentiel pour effectuer la conversion de nitrate (NO<sub>3</sub>) en nitrite (NO<sub>2</sub>) par libération de l'oxygène (O<sub>2</sub>), et du diazote gazeux (N<sub>2</sub>), étant suivi par l'oxydation du méthane<sup>101</sup>.

Il a été montré par la localisation immunologique des enzymes clés, l'existence de deux voies de conversion du méthane et du nitrite étant en effet présentes dans les cellules individuelles du « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* ». Les antisérums ciblant la particule méthane mono-oxygénase (MMOp) et l'enzyme nitrite réductase due au gène (*NirS*) sont utilisés pour la localisation immunologique comme double-étiquetage<sup>102</sup>.

En plus des bactéries, la réaction est catalysée par la pyrrol-quinoléine-quinone (cofacteur enzymatique PQQ) -déshydrogénase dépendante de méthanol (l'enzyme MDH)<sup>103</sup>.

Le génome du « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » code les enzymes MDHs sous trois formes différentes étant localisées dans un grand groupe de gènes, comprenant le *MxaFI* codant deux gènes *XoxF* (*XoxF1* et *XoxF2*) et un gène (*MxaI*).

Le gène *MxaFI* codant les MDHs représente les enzymes étant composées de deux sous-unités, une grande (α) contenant la protéine PQQ et deux petites (β) sous-unités enzymatiques (avec le gène *MxaI*).

Les gènes *XoxF* codant les MDHs sont des formes plus répandues dans la nature, mais mal étudiées, elles peuvent être phylogénétiquement divisées en au moins cinq différents clades.

Les gènes *XoxF* codant les MDHs décrites jusqu'ici sont des protéines homo-dimériques contenant seulement une grosse sous-unité. Elle a été purifiée et identifiée un hétérotétramère de l'enzyme la MDH.

Les deux gènes *XoxF* avec deux sous unités *MxaI* sont les gènes qui, par transcription produiront les enzymes localisées du périplasma des cellules du « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* », catalysant l'oxydation du méthanol avec une activité spécifique donc la cinétique enzymatique donne une vitesse maxi d'oxydation suivante :

- $V_{max}$  de 10 micromoles de méthanol/min/mg de protéine.
- Son  $K_m$  (qui est la constante cinétique) est de 17  $\mu\text{mol}$ .

L'inventaire requis des gènes connus pour la synthèse du cofacteur protéine PQQ étant le cofacteur enzymatique représente le groupement prosthétique, rentrant dans le métabolisme du « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*<sup>104</sup> ». Son enzyme MDH est le premier représentant des protéines du gène *XoxF*<sup>105</sup>.

### Développement en aérobiose

L'ajout d'oxygène atmosphérique de 2 % et 8 % dans la culture du « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* »<sup>106</sup> a entraîné une baisse instantanée de taux de conversion de méthane et de nitrite.

L'augmentation de la teneur en oxygène a conduit à une déviation dans l'oxydation de méthane par les nitrites, étant stœchiométrique. L'absorption d'oxygène atmosphérique par la bactérie entraîne un changement intracellulaire du cytochrome *c* par les quinones devenant donneur d'électrons.

Ce changement dans l'expression génétique se produit au niveau de l'ADNc (ADN cytoplasmique), après 23 heures d'exposition à l'oxygène, les niveaux de transcription des gènes du 1109 sont changés de manière significative par rapport à la période anoxique.

- Les gènes codant des enzymes de la voie d'oxydation du méthane ont été exprimés.
- Les gènes de la dénitrification, à l'exception de l'un des gènes de la monoxyde réductase de l'azote (*nerZ2*), ont été sévèrement réprimés.
- Le gène de l'alkyl hydro-péroxyde réductase (*ahpCet*) étant impliqué dans la synthèse et réparation des clusters du fer-soufres est surexprimé.
- La présence d'oxygène a déclenché la transcription du gène (*M. pmoCAB*) n'étant pas normalement utilisé dans la bactérie *Ca. M. oxyfera* en anaérobiose, mais étant présente dans les autres aérobies méthanotrophes.
- Par contre lors de l'apport d'oxygène, les gènes connus dans la fonction vitale telle que la biosynthèse des protéines ont été normalement exprimés<sup>88</sup>.

### Culture

Milieu de culture habituellement utilisé pour les méthanotrophes :

- Mélange de minéraux et acides aminés :
  - Cystéine et  $\text{Na}_2\text{S}$
  - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (6 g/l) et  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (6 g/l) - (tampon phosphate)
  - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (6 g/l),  $\text{NaCl}$  (12 g/l),  $\text{MgSO}_4$  (7 g/l),  $\text{CaCl}_2$  (2 g/l)
- Vitamines : biotine (2 mg/l), acide folique (2 mg/l), Pyridoxine (10 mg/l), thiamine (5 mg/l), riboflavine (5 mg/l), Calcium pantothénate (5 mg/l), V. B12 (0,1 mg), Acide p-aminobenzoïque (5 mg/l), acide lipoïque (5 mg/l).

Mélange et incubation en atmosphère anaérobiose, avec  $\text{N}_2$  80 % et  $\text{CO}_2$  20 %) ; à ce mélange de gaz on peut ajouter une proportion de méthane pour permettre l'oxydation et la formation d'acétate.

### Niches écologiques

En 2006, une université néerlandaise a prélevé un échantillon de boue dans des marais des Pays-Bas. Dans un premier temps l'équipe de chercheurs découvre cette bactérie anaérobie dans ces prélèvements. Ils se sont rendus compte en laboratoire que cette bactérie était capable d'oxyder le méthane, très présent dans l'atmosphère primitive, il y a 3,5 milliards d'années, sans utiliser l'oxygène de l'air.

La bactérie fut appelée « *Ca. Methyloirabilis oxyfera* », mais elle était présente en trop petite quantité pour être analysée. Elle a été mise en culture, puis isolée et analysée par *University Nijmegen*.

Denis Le Paslier, a fait le séquençage de l'ADN, et c'est en analysant ce génome qu'il est apparu que les gènes classiquement impliqués dans l'utilisation des nitrites étaient absents. Il a été supposé, que

cette bactérie était dotée d'une autre voie d'oxydation, qu'elle était capable de produire elle-même de l'oxygène et de l'utiliser pour oxyder le méthane. Ce qu'il a démontré en réussissant à capter cet oxygène produit.

Et c'est cela faisant dire aux scientifiques - sous le sceau de l'hypothèse - que certaines bactéries, alors que l'atmosphère terrestre et la photosynthèse n'existaient pas, produisaient déjà de l'oxygène, il y a quelques 3,5 milliards d'années. Une nouvelle piste de recherche ouvrant des voies insoupçonnées et soulevant de nombreuses questions<sup>107,108,109</sup>.

### **Environnement et écologie**

« *Ca. Methyloirabilis oxyfera* » se trouve dans les eaux douces des lacs. Par le fait qu'il produit de l'oxygène sans photosynthèse, dans des conditions de méthanisation de l'atmosphère et en présence d'une forte quantité de CO<sub>2</sub>, elle est peut-être l'une des bactéries de la flore microbienne primitive il y a 3,5 milliards d'années ayant été à l'origine de l'oxygénation terrestre et ayant produit le changement de la vie anaérobie en flore aérobie.

Ce phénomène d'oxygénation peut aussi être une qualité écologique pour éliminer les excès de méthane et de gaz carbonique tout en produisant de l'oxygène atmosphérique.

Une extension importante a été faite par l'isolement de trois espèces de *Verrucomicrobia*, étant capables d'oxyder le méthane dans des environnements extrêmement acidophiles et dans l'identification des méthanotrophes dénitrifiant comme le « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* ».

### **Pathologie**

Pas de pathologie décrite dans la littérature.

### **Biotechnologie**

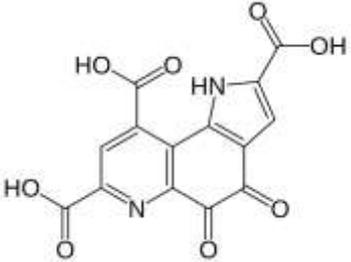
L'espèce « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* », nous montre la diversité et la complexité du microbisme cavernicole pouvant nous apporter beaucoup de choses dans la résolution de nos problèmes de pollution.

Notre société se trouve devant la difficulté de gérer les déchets anthropiques, étant les produits journaliers de la consommation humaine. Nous pouvons constater que les bactéries méthanotrophes peuvent résoudre nos problèmes et peuvent nous apporter des solutions aux traitements des déchets et à la régénération de l'atmosphère.

C'est pour cela que nous devons voir l'utilité d'orienter nos recherches pour apporter des bactéries nouvelles aux industries biotechnologiques, afin de pouvoir vivre sans avoir d'augmentation de la pollution atmosphérique.

La culture du « *Ca. Methyloirabilis* » peut servir à la production de pyrrol-quinoléine-quinone (PQQ)<sup>83</sup>, étant un anti-oxydant très puissant et pouvant permettre de donner beaucoup d'espoir dans la médecine et l'agronomie.

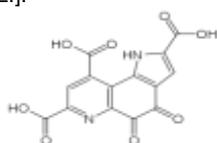
## La pyrroloquinoléine-quinone (PQQ)<sup>kkk</sup>,

	<p><b>La pyrroloquinoléine quinone (PQQ)<sup>110,111</sup></b></p> <p>Appelée aussi méthoxanine est un cofacteur utilisé par certaines enzymes d'oxydation, les autres cofacteurs d'oxydoréductases étant essentiellement le NAD<sup>+</sup>, le NADPH<sup>+</sup> H<sup>+</sup>, la FMN.</p> <p>On trouve notamment la PQQ dans alcool déshydrogénases (EC 1.1.1.1) et la méthanol déshydrogénases (EC 1.1.1.234), ainsi que dans le glucose déshydrogénases quinoprotéine (EC 1.1.5.2) utilisée pour détecter la présence de glucose.</p> <p>La PQQ stimule la croissance des bactéries et possède des effets antioxydants et neuroprotecteurs. Une carence en PQQ chez la souris provoque diverses anomalies physiologiques et cette molécule pourrait jouer un rôle nutritif significatif chez la plupart des autres mammifères.</p>
---	--

<sup>kkk</sup> **Pyrroloquinoléine-Quinone (PQQ)**, aussi appelée **méthoxanine**, est un cofacteur utilisé par certaines enzymes d'oxydoréduction, les autres cofacteurs d'oxydoréductases étant essentiellement le NAD<sup>+</sup>, le NADPH+H<sup>+</sup>, la FAD et la FMN. On trouve notamment la PQQ dans l'alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1) et la méthanol déshydrogénase (EC 1.1.1.244), ainsi que dans le glucose déshydrogénase quinoprotéine (EC 1.1.5) [R. Rucker, W. Chowanadisai, M. Nakano, « *Potential physiological importance of pyrroloquinoline quinone* », *Altern Med Rev.*, vol. 14, n° 3, 2009, p.179-183] utilisée pour détecter la présence de glucose<sup>83</sup>.

La PQQ stimule la croissance des bactéries et possède des effets antioxydants et neuroprotecteurs. Une carence en PQQ chez la souris provoque diverses anomalies physiologiques, et cette molécule pourrait jouer un rôle nutritif significatif chez la plupart des autres mammifères. Une enzyme telle que la L-amino-adipate sémino-aldéhyde déshydrogénase (AASDH, EC 1.2.1.31) pourrait également utiliser la PQQ comme cofacteur, de sorte que la PQQ pourrait être en fait une vitamine chez les mammifères, bien qu'il soit encore trop tôt pour conclure définitivement en ce sens.

La PQQ stimule également la croissance des concombres et des tomates en culture hors-sol et expliquerait pourquoi la présence de *Pseudomonas fluorescens* stimule la croissance végétale [R. Rucker, D. Storms, A. Sheets, E. Tchapanian, A. Fascetti, « *Biochemistry : is pyrroloquinoline quinone A vitamine ?* », *Nature*, vol. 433, n° 7025, 2005, E10-E11 ; discussion E11-12.].



Pyrroloquinoléine-Quinone (PQQ)

### Propriétés antioxydante du PQQ<sup>84</sup>

La Pyrroloquinoléine-Quinone (PQQ) est une molécule étudiée pour ses effets bénéfiques sur les mitochondries. Cette molécule rentre dans la respiration cellulaire à travers la chaîne respiratoire, notamment ses effets promoteurs de croissance de nouvelles mitochondries dans les cellules âgées et d'expression des gènes gouvernant la reproduction, la protection et la régénération des mitochondries, ainsi que ses effets protecteurs contre le stress oxydant.

**N**om donné par Hedlund, Gosink & Staley 1998

*Chthoniobacterales*  
*Chthoniobacteraceae*

*Fuku N18*

### Répartition dans la cavité

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition de l'embranchement des *Verrucomicrobiae* par catégorie d'échantillon sur le total de la flore de chacune des catégories a donné :

Snottites	10 %	de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	2,6 ± 0.5 %	de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	1 ± 0.6 %	de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1%	de la flore de cette structure
Eau de mélange	<1 %	de la flore de cette structure

La présence des *Verrucomicrobiae* se trouve principalement dans les snottites, elle est très peu présente dans les autres structures et les eaux.

L'embranchement des *Verrucomicrobiae* est de plus en plus reconnu comme étant le plus fréquemment rencontré dans le règne bactérien, en particulier dans les sols et dans le microbiome intestinal animal et humain.

L'embranchement de *Verrucomicrobiae* se divise en deux classes :

- Classe des *Verrucomicrobia*
- Classe des *Spartobacteria*

**Classe *Verrucomicrobia*** (Grotte de Sulzbrunn, grotte de « Four windows cave », USA)

- Ordre *Verrucomicrobiales* (Ward-Rainey, Rainey, Schlesner & Stackebrandt)
- Ordre *Fukun N18*

### 20.1.1 Ordre *Verrucomicrobiales* (Grotte de Sulzbrunn, grotte *Four windows cave* - USA)

Nom donné par Ward Rainey, Schlesner and Stackebrandt (1996)

**Familles composant cet ordre :**

- *Rubritaleaceae*
- *Verrucomicrobiaceae*

#### 20.1.1.1 Famille *Verrucomicrobiaceae* (Grotte de Sulzbrunn, grotte *Four windows cave* - USA)

**Division *Verrucomicrobia* ; Classe *Verrucomicrobiae* ; Sous ordre *Chlamydiales* ;**

**Genres de la famille des *Verrucomicrobiaceae*.**

- Genre *Akkermansia* donc *Akkermansia muciniphila*
- Genre *Haloferula*
- Genre *Luteolibacter*
- Genre *Persicirhabdus*
- Genre *Prosthermansia*
- Genre *Roseibacillus*
- Genre *Verrucomicrobium*
- Genre *Poribacteri*

#### 20.1.1.1.1 Genre *Verrucomicrobium*

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition de l'embranchement des *Verrucomicrobiae* par catégorie d'échantillon sur le total de la flore de chacune des catégories, a donné :

Snottites	2,7 %	de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	2,6 ± 0,5 %	de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	1 ± 0,6 %	de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1%	de la flore de cette structure

Eau de mélange <1 % de la flore de cette structure

Dans la grotte de Sulzbrunn les *Verrucomicrobium* représente environ 20 % des bactéries de l'embranchement des *Verrucomicrobiae* dans les snottites. Elles ne sont pas identifiables dans les biofilms et les eaux de la grotte.

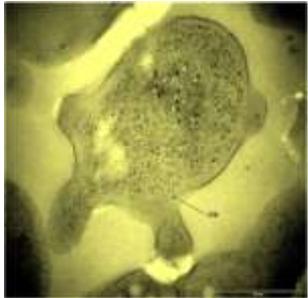
### Ordre *Verrucomicrobiales* ; Famille *Verrucomicrobiaceae* ; Genre *Verrucomicrobium*

Dans la grotte de « Four Windows Cave » aux USA les espèces de *Verrucomicrobia* identifiés sont :

• Az C019 clone	• FW9B	• <i>V. spinosum</i>
• Env. clone C019 arid solis	• FW2B	

### Espèce *Verrucomicrobium spinosum*

La taxonomie couramment acceptée est basée sur la *List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature* et la phylogénie repose sur le gène ARNr 16s.

	<p style="text-align: center;"><b>Verrucomicrobium</b><sup>97</sup></p> <p><b>Morphologie :</b> bactéries Gram (-), coccoïdes ou en forme de bâtonnet avec une structure cellulaire particulière avec des protubérances ressemblant à des verrues (prosthecae de 2 à 8). Prosthecae sont des cellules remplies de gaz. Elles sont une exception les rendant proches des cellules procaryotes, par leurs caractéristiques culturales et atypiques dans le règne bactérien.</p> <p>Selon les espèces, elles peuvent être aérobies ou anaérobies stricts ou facultatives. Elles n'ont pas de flagelles.</p> <p><b>Habitat :</b> aquatique ou terrestre (sol). Elles sont trouvées à des températures froides (eaux antarctiques) où dans des sources chaudes (75 à 90 °C). D'autres espèces vivent dans des environnements extrêmes, riches en sulfure, pH forts où faibles.</p>
--	---

### Caractères morphologiques des *Verrucomicrobia*

Les bactéries prosthecates<sup>III</sup> comme les *Verrucomicrobia* sont les bactéries portant une ou plusieurs adhérences appelées pédoncules (appelées prosthecae), ayant donné le nom à cette division de « verruco » (verrue). Chaque prosthecae est une excroissance de la cellule, contenant du matériel pariétal et chromatique restreint du cytoplasme. Ces pédoncules servent à la flottaison. Pour une cellule minuscule, l'eau se comporte comme un liquide très visqueux (le coefficient de Reynold « Re » est très inférieur à 1) et les protubérances similaires sont un moyen efficace d'accroître la surface sans ajout de masse à la cellule, ils sont des éléments de flottation économique. Ces parties d'excroissances peuvent être remplies de gaz en augmentant la flottabilité. Elles peuvent être un moyen d'adhérence aux parois et un moyen de regroupement des bactéries entre elles<sup>108</sup>.

### Caractéristiques biochimiques

Les *verrucomicrobia* ont besoin des hydrates de carbone pour leur énergie, elles peuvent utiliser le méthane. Elles ont un rôle dans la dégradation de la cellulose (comme *V. spinosum*). Ce genre figure parmi les bactéries présentes dans le tube digestif humain et constituant de la microflore intestinale.

### Phylogénétique

Vu qu'il est très difficile de faire une culture de *Verrucomicrobia*, l'analyse PCR sera le seul moyen de pouvoir les analyser dans les sols et dans les cavités<sup>112</sup>. Cette analyse va consister à l'extraction de l'ADN, avec une amplification par PCR et un séquençage. L'ADN est extraite des sols à l'aide du kit d'isolation de l'ADN « BIO MO power Soil » et suivant la méthode décrite dans Lauber et coll.,

<sup>III</sup> **Bactéries prosthecate :** bactéries portant une ou plusieurs appendices appelées pédoncules (qui peuvent atteindre 8 µm de long et 2 µm de diamètre). Chaque prostheca est une excroissance de la cellule, contenant du liquide pariétal et une partie restreinte de cytoplasme. Ces pédoncules servent de flottaison, ils sont efficaces pour permettre à la bactérie de rester à la surface de l'eau. Dans le cas du *Caulobacter* cette prostheca fonctionne comme une tige terminale de fonction adhésive pour ancrer la cellule sur une surface.

2008<sup>113</sup>. L'amplificon (fragment d'ADN amplifié par PCR, avec une polymérase) pour barres *pyrosequencing*<sup>mmm ;114,115,116,117,118,119</sup> sont générés en utilisant les méthodes décrites dans Lauber et coll., 2009.

Les analyses du gène codant pour l'ARNr 16s ont mis en évidence qu'une partie du génome des *Verrucomicrobia* était constituée de la même codification que les *Chlamydia* (cette appartenance n'a pas l'approbation de tous les microbiologistes, mais en absence de classification elle est la seule à être envisageable pour le moment)<sup>120</sup>.

## Environnement

Un petit nombre d'analyses fait sur une bactérie difficilement cultivable ne permet pas de déceler les espèces particulières de *Verrucomicrobia*, se trouvant en petit nombre<sup>99</sup>.

Une étude très intéressante pour la connaissance de la microbiologie du karst, a été faite sur les différents sols prélevés en Amérique du Nord, en Amérique du Sud, en Europe et en Antarctique. Études faites par Scott T Bates, Kathrym G. Eilers, Christian L. Lauber and al., 2012<sup>121</sup>, avec des variabilités en pH de 3,4 à 9,9 et des teneurs en concentration en carbone de 0,12 à 23,94 mg/kg de sol, ayant fait ressortir le point suivant :

Il est probable que l'abondance des bactéries de la division des *Verrucomicrobia* a été sous-estimée dans de nombreuses études, sous-estimation due à un mauvais ciblage dans les sondes PCR utilisées (Andersson and al., 2008)<sup>122</sup>.

---

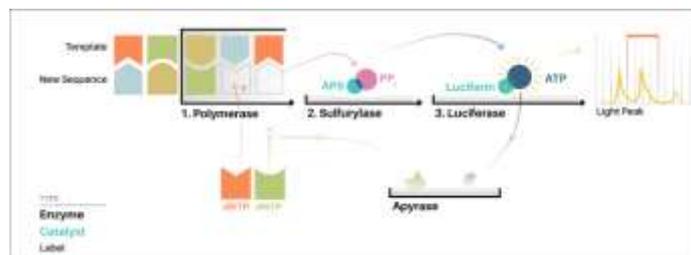
<sup>mmm</sup> **Pyrosequencing** : méthode de séquençage de l'ADN basée sur le principe de « séquençage par synthèse », dont le séquençage est réalisé en détectant le nucléotide incorporé par un de l'ADN polymérase.

Première méthode reposant sur la détection de luminescence sur une réaction en chaîne en relâchant des pyrophosphates. Le principe de *pyrosequencing* a d'abord été décrit en 1993 par Bertil Pettersson, Mathias Uhlen et Pal Nyren, en combinant la méthode de séquençage de la phase solide à l'aide de streptavidine recouvert de billes magnétiques polymérase d'ADN recombinant manquant 3' to 5' exonuclease activité et détection de luminescence à l'aide de l'enzyme luciférase firefly. Le mélange des trois enzymes (ADN polymérase, ATP sulfurylase, et firefly luciférase) et un nucléotide (dNTP) sont ajoutés à simple brin d'ADN à séquençer et l'incorporation de nucléotides est suivie en mesurant la lumière émise. L'intensité de la lumière détermine si 0, 1 (non ou oui) ou plusieurs nucléotides ont été incorporées, ce qui montre combien les nucléotides complémentaires sont présents sur le brin de modèle. Le mélange de nucléotides est supprimé avant que le mélange suivant soit ajouté.

Ce processus est répété avec chacun des quatre nucléotides jusqu'à ce que la détermination de la séquence d'ADN d'un seul modèle soit valide.

Deuxième méthode : axée sur la solution de *pyrosequencing*, a été décrit en 1998 par Mostafa Ronaghi, Mathias Uhlen et Pal Nyren<sup>93</sup>. Dans cette méthode alternative, une enzyme supplémentaire apyrase est introduite pour supprimer les nucléotides qui ne sont pas incorporés par l'ADN polymérase. Cela a permis le mélange d'enzymes dont l'ADN polymérase, la luciférase et l'apyrase pour être ajoutés au début et conservés tout au long de la procédure, permettant ainsi un montage simple adapté pour l'automatisation. Un instrument automatisé basé sur ce principe a été introduit sur le marché l'année suivante par la société *Pyrosequencing*.

Troisième méthode : une variante de micro-fluidique de la *pyrosequencing* méthode qui a été décrite en 2005 par Jonathan Rothberg et ses collègues à la société *454 Life Sciences*. Cette approche alternative pour le *pyrosequencing* reposait sur le principe original de fixation de l'ADN à séquençer sur un support solide et ils ont montré que le séquençage pourrait être réalisé d'une manière hautement parallèle utilisant un microfabriques « microfabriques » « microarray ». Cela a permis le séquençage à haut débit et un instrument automatisé a été introduit sur le marché. Cela est devenu l'instrument premier du séquençage des générations suivantes, commence alors une nouvelle ère dans la recherche en génomique, avec une chute rapide des prix pour le séquençage de l'ADN ce qui permet le séquençage du génome entier à des prix abordables



### Procédure Pyrosequencing

Ne prêtent pas à la classification par l'intermédiaire de taxonomie linnéenne aussi facilement à l'instar de nombreux eucaryotes comme les plantes et les animaux.

**Phénétiqque** : correspond à une méthode de classification du vivant reposant sur le nombre de caractères communs à deux ou plusieurs espèces. Elle s'appuie sur le principe que des individus partagent d'autant plus de similitudes que leur dernier ancêtre commun est récent.

C'est une méthode numérique et mathématique, permettant d'établir une matrice des distances, représentée à l'échelle par un phénogramme. Elle se distingue de la cladistique.

Les membres les *Verrucomicrobia* sont estimés entre 1,2 et 10,9 % des bactéries totales du sol et en moyenne représentent 5 % de tous les sondes gènes des ARNr 16 s (Schoenborn L. et P. H. Janssen, données inédites)<sup>123,124,125,126,127,128,129,130,131,132</sup>.

Ils semblent être beaucoup plus répandues dans les sols qu'on ne le pensait ; leur abondance moyenne dans le sol de 23 % est comparable à celui des autres phylums considérés comme phylums dominants du sol<sup>133</sup> :

- - *Proteobacteria* 39 %
- - *Verrucomicrobiae* 23 %
- - *Acidobacteria*<sup>134</sup> 20 %
- - *Actinobacteria*<sup>135</sup> 13 %

### Démarches analytiques du *Verrucomicrobia*

Certaines bibliothèques des sols manquent de gènes d'ADN des membres du phylum des *Verrucomicrobia*, mais ce sont généralement des études avec moins de 70 séquences analysées<sup>136,137</sup>.

En plus d'être abondants, les membres de ce phylum semblent être des membres actifs de la communauté microbienne du sol, elles ont été utilisées pour la réalisation de 1 à 9,8 % des sondes ARNr 16S des bactéries présentes dans les sols<sup>138,139,140,141</sup>.

Une sixième subdivision (subdivision 6) a été proposée par (Vanderkerckhove et coll), basée sur un seul séquençage d'ARN 16 s séquence, du gène ARNr cloné à partir d'une bactérie d'habitat d'eau douce, LD19. À l'heure actuelle, seuls trois de ces subdivisions sont reconnues par le *Manual of Systematic Bacteriology de Bergey's*, et ils se voient accorder les rangs des familles : *Verrucomicrobiaceae* (section 1), *Opiritaceae* (subdivision 4), et *Xiphinematobacteriaceae* (subdivision 2). Il est prévu que ces subdivisions devront finalement être reclassées (au rang de classe) sur une parité phylogénétique avec les autres, phylums mieux caractérisés comme les *Protéobactéries* et *Firmicutes*.

La classe proposée *Verrucomicrobiae*, que nous considérons comme équivalente à la sous-section 1, est nommée selon les caractéristiques phylogénétiques représentées par la bactérie aquatique *Verrucomicrobium spinosum* et contient également quatre espèces de bactéries aquatiques du genre *Prostheco bacter*<sup>142,143</sup>.

On caractérise également les représentants de subdivision 4, tels que *Opiritus terrae* et des souches, isolées du sol<sup>144,145, 146</sup> et les bactéries marines *Fucophilus fucoidanalyticus*.

L'organisme de ces derniers a été mal classifié en tant que membre de la classe des *Gammaproteobacteria*. Seul un isolat a été signalé pour chacune des subdivisions en 2 et 3, Ellin428<sup>147</sup> et Ellin5102<sup>148</sup> respectivement, et aucun isolat n'a encore été signalé pour les subdivisions de 5 ou 6.

### Observation donnée par Janssen en 2006<sup>149</sup>

Dans les sols de prairies le binôme *Verrucomicrobiae* et *Spartobacteriae* ont des teneurs moyennes pouvant atteindre 32 % de la flore totale.

Il a été constaté la présence dominante du phylum des *Verrucomicrobia* dans presque tous les sols, cette présence avait pour classe les *Spartobacteriae* étant le seul représentant ayant pu être cultivé à ce jour (Schlesner and al., 2006 et Sangwan and al., 2004)<sup>150,151</sup>. Dans le phylum des *Verrucomicrobia* des sols, 92 % de ce phylum appartient à la classe des *Spartobacteria*.

Les autres bactéries de cette division sont les genres *Opirituae* (5 à 1 %) et quelques phylotypes<sup>nnn</sup> étant plus proches de l'espèce « *Candidatus Xiphinematobacter brevicolli* » étant un

<sup>nnn</sup> **Phylotype** : similarité utilisée pour classer un groupe d'organismes par leur phénétique relation. Cette similitude phénétique, particulièrement dans le cas asexué, les organismes peuvent refléter les relations évolutives. Le terme est grade-neutre, de sorte que les phylotypes peuvent être décrits à différents niveaux, tels que des espèces, de classe, de 97 % de similarité génétique ou d'homologie. Le terme est souvent utilisé en microbiologie, depuis les génomes des procaryotes, qui échangent librement du matériel génétique, ne se prêtent pas à la classification par l'intermédiaire de taxonomie linnéenne aussi facilement à l'instar de nombreux eucaryotes comme les plantes et les animaux.

Phénétique : correspond à une méthode de classification du vivant reposant sur le nombre de caractères communs à deux ou plusieurs espèces. Elle s'appuie sur le principe que des individus partagent d'autant plus de similitudes que leur dernier ancêtre commun est récent. C'est une méthode numérique et mathématique, permettant d'établir une matrice des distances, représentée à l'échelle par un phénogramme. Elle se distingue de la cladistique.

endosymbiote du nématode *Xiphinema* vivant dans la rhizosphère comme un phytopathogène (Vandekerckhove and al., 2002)<sup>152</sup>.

Cependant la majorité des phylotypes dominants étaient plus proches de l'espèce *Chthoniobacter flavus*, un hétérotrophe des sols libres (Seven and al., 2004).

Dans les sols agricoles *Spartobacteriae* chute de 36 % de l'ensemble des *Verrucomicrobia*, alors que la bactérie *Opitutae rose* passe à 44 % des *Verrucomicrobia* et à 19 % de la flore microbienne totale.

## Environnement

Dans les forêts de conifères des prélèvements ont été faits sur une profondeur de 160 cm, l'abondance relative des *Verrucomicrobia*, a été de 2 à 20 % de la flore totale dans une profondeur de 0 à 6 cm mais monte à 52 % dans les profondeurs de 10 à 50 cm.

Il est possible, que les *Verrucomicrobia* soient plus abondants dans les prairies en raison de l'association avec des hôtes eucaryotes. La sous-classe *Spartobacteria*, contient des taxons, ainsi que plusieurs endosymbioses associés à un ver nématode du genre *Xiphinema* (Vanderkerckhove and al., 2000).

Généralement les prairies tempérées abritent de fortes concentrations de biomasse de nématodes, pouvant expliquer cette présence importante de *Spartobacteriae* dans cette horizon (Janssen, 2006 ; Fierer and al., 2009)<sup>153,154</sup>.

Dans les plaines et partie boisées, il a pu être constaté une augmentation frappante de *Verrucomicrobia* aux profondeurs intermédiaires<sup>98</sup> avec une dominance de 23 % en moyenne de *Verrucomicrobia* sur certaines communautés bactériennes dans un horizon de 10 à 50 cm sous la surface, cette tendance est respectée dans d'autres écosystèmes.

D'une façon générale il est signalé que la flore microbienne diminue fortement lorsque l'on s'enfonce dans le sol (Winogradsky<sup>155</sup> — pédo-microbiologiste russe). Il semble donc que cette observation ne soit pas totalement applicable à la division des *Verrucomicrobia*. Ces bactéries sont mieux adaptées pour une vie dans des horizons plus profonds. Les *Verrucomicrobia* peuvent être plus abondants dans les horizons souterrains en raison de leurs stratégies de cycle biologique d'organisme oligotrophes (De Racha and al., 2010). Ces bactéries étant difficilement cultivables avec un taux de croissance lent (Janssen and al., 1997 à 2002)<sup>156</sup> pouvant leur permettre d'exploiter des ressources rares dans les sols moyennement profonds. Ils peuvent aussi être méthanotrophes dans les sols et les sources d'eaux chaudes (Semrau et coll., 2008 ; Den Camp and al., 2009). Dans le sous-sol l'abondance de *Verrucomicrobia* peut correspondre au pic d'oxydation du méthane se produisant dans les profondeurs des massifs forestiers (Mohanty and al., 2006 et 2007). Les *Verrucomicrobia* sont susceptibles d'occuper des niches écologiques très différentes dans les horizons de surface et souterrains, mais les facteurs environnementaux réglementent leur diversité et l'abondance dans la flore microbienne présente<sup>157</sup>.

## Pathologie

Dans cette même famille des *Verrucomicrobiaceae* on trouve l'espèce *Akkermansia muciniphila* (nom donné par un microbiologiste hollandais à ce *Verrucomicrobia*), étant une bactérie anaérobie stricte, isolée des déjections fécales humaines. Elle utilise la mucine comme source d'énergie et d'azote (représente environ 1 % des bactéries intestinales)<sup>158</sup>. Cette observation pose le problème des risques en cas de déficience de protection intestinale par la mucine (chimique et bactérienne), pouvant être considéré comme un facteur pathogène du tractus gastro-intestinal. Toutefois il a été remarqué que l'abondance de l'*Akkermansia muciniphila* était en déficit dans le tube digestif des personnes obèses ayant une moins grande diversité microbienne<sup>159</sup>.

Le Dr Patrice Cani et son équipe ont identifié une protéine de la paroi de l'*Akkermansia* interagissant avec les récepteurs des cellules immunitaires au niveau de l'intestin. Cette activité renforce la barrière épithéliale (il faut noter que l'*Akkermansia* utilise les sécrétions de mucus intestinaux pour son énergie vitale)<sup>160</sup>.

D'autre part, une étude (E. Delmas et al., *Nature Medecine*, 21, 610, 2015)<sup>161</sup> montre que l'obésité serait une réaction inflammatoire des adipocytes chez les personnes obèses et qu'il existe une protéine sécrétée par les macrophages, la IRF5, étant responsable de cette inflammation auto-

immune. Cette protéine active la production des macrophages déclenchant un phénomène inflammatoire sur les adipocytes (étant les réserves graisseuses). Les macrophages attirent d'autres cellules immunitaires telles que les Lymphocytes T. La IRF5 réduit le collagène de surface des membranes des adipocytes abdominaux par l'inhibition du gène TGFB1 au sein de ces mêmes macrophages or la protéine codée par ce gène induit la production de collagène, ayant pour effet de réduire la membrane des adipocytes<sup>102,101</sup>.

Nous pouvons faire un lien entre ces deux observations sur le microbiote<sup>162</sup>, l'une étant une action d'un microbiote, digérant le mucus intestinal en interagissant sur les actions immunitaires et l'autre, une protéine bloquant le gène de la formation du collagène de l'enveloppe des adipocytes en augmentant le volume de ceux-ci par un phénomène inflammatoire dus aux macrophages<sup>163</sup>.

### **Verrucomicrobia dans le karst**

Les *Verrucomicrobia* sont souvent identifiés dans de nombreuses grottes étudiées (notamment *Four Windows Cave* aux États-Unis d'Amérique, Gouffre de la Sambuy en France). Cela rejoint les analyses faites sur les études relatées par Scott T Bates, Kathrym G. Eilers, Christian L. Lauber<sup>164</sup> sur la présence de cette bactérie dans les sols de surface et nous montre que les *Verrucomicrobia* ont une possibilité d'adaptation aux profondeurs terrestres. Elles sont issues de cheminées volcaniques océaniques et résistent à des températures extrêmes. Expliquant la présence de cette bactérie dans les milieux karstiques.

Dans la grotte de Sulzbrunn les *Verrucomicrobia* proviennent des molasses alpines ayant recouvert les côtes marines il y a 15 millions d'années.

#### **20.1.1.1.2 Genre *Fuku N18* (Grotte de Sulzbrunn)**

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition du groupe *Fuku N18* par catégorie d'échantillon sur le total de la flore de chacune des catégories, a donné :

Snottites	6,8 %	de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	< 2,6 ± 0,5 %	de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	< 1 ± 0,6 %	de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	de la flore de cette structure
Eau de mélange	<1 %	de la flore de cette structure

Dans la grotte de Sulzbrunn ce genre se trouve particulièrement dans les snottites, il représente environ 2,5 % de la flore totale de cette structure et environ 45 % des *Verrucomicrobiae* dans les snottites. Ce genre est non défini dans les autres structures.

### **Division *Verrucomicrobia* ; Classe *Verrucomicrobiae* ; Sous ordre *Chlamydiales* ; Ordre *Verrucomicrobiales* ; Famille *Verrucomicrobiaceae* ; Genre *Fuku 18N***

#### **Généralités**

Il y a très peu d'études faites sur ce genre bactérien, les méthodes d'identification PCR actuelles ne sont pas adaptées. Une étude dans les lacs norvégiens et britanniques a été réalisée<sup>103</sup>:

« La répartition des quinze groupes de bactéries diversifiées d'eau douce typiques dans quinze lacs en Europe du Nord a été étudiée à l'aide d'hybridation inverse ligne. L'évaluation statistique des données en fonction des caractéristiques des lacs a montré que les pH, la température et le temps de rétention hydrologique théorique (THRT) des lacs ont été plus fortement liés aux variations de la distribution des taxons bactériens.

Cela suggère que les pH, température et le temps de renouvellement des cellules bactériennes orientent la diversité des taxons dans les zones de drainage.

Ces associations suggèrent que ces facteurs environnementaux sont importants dans la détermination de la distribution des taxons.

Cependant, les méthodes d'empreintes génétiques ne sont pas bien adaptées pour révéler l'identité des différents taxons. Une autre méthode pour la caractérisation des communautés bactériennes est l'hybridation avec analyse par fluorescence (FISH), dans lequel les sondes taxons particuliers sont utilisées, améliorant l'identification.

L'hybridation inverse a été utilisée avec sondes ciblées de gènes afin d'analyser la répartition des 15 groupes bactériens concernant les gradients environnementaux. Les groupes choisis étaient précédemment désignés "grappes bactériennes préjugées typique d'eau douce" puisqu'il a été démontré par les séquences de gènes en ARNr 16S de la base de données de plusieurs plans d'eaux douces, que ces groupes contenaient plus de séquences de sources l'eau douce trouvées dans des prélèvements terrestres ou sources marines<sup>165,166</sup>.

Verrucomicrobia groupe CLO-14 a été détecté dans quatorze lacs et a été associée à un pH faible et une haute (THRT) et température. L'autre groupe de Verrucomicrobia projeté pour (FukuN18) a été détecté dans seulement trois lacs. »

## 20.2 Classe *Spartobacteria* (Grotte de Sulzbrunn)

Les bactéries de la classe *Spartobacteria* appartiennent au groupe PVC est constitué l'ordre suivant :

### 20.2.1 Ordre *Chthoniobacterales* (Grotte de Sulzbrunn)

#### Famille : *Chthoniobacteraceae*

Elle comprend trois genres connus :

- Genre *Chthoniobacter*
- Genre *Terrimicrobium*
- Genre *Xiphinematobacter*

#### Phylogénétique

##### Phylum : *Verrucomicrobia* ; Classe : *Spartobacteria* ; Ordre *Chthoniobacterales*

Des séquences environnementales indiquent que la classe *Spartobacteria* est largement distribuée dans le monde par des bactéries du sol, abondantes et actives.

La diversité microbienne a été étudiée dans le cadre d'études écologiques à l'aide de gènes marqueurs phylogénétiques par des prélèvements de micro-organismes dans différents environnements, sans avoir à les cultiver en laboratoire<sup>167</sup>.

La majorité de ces études a été réalisée avec le gène de l'ARNr 16 s. Un des principaux résultats de cette approche est qu'il y a de nombreux groupes de bactéries pour lesquelles il y a très peu ou pas de représentants connus cultivés. Ce manque de souches cultivées signifie que d'autres enquêtes sur l'écologie, la fonction, la physiologie et la génétique de ces nouveaux organismes sont difficiles, mais pas impossible.

En particulier les sols sont habités par une immense diversité de groupes de bactéries, y compris phylums, ordres, classes et groupes nouveaux, sont mal ou pas du tout représentés compte tenu de l'impossibilité de les mettre en culture<sup>168</sup>.

Le phylum des *Verrucomicrobia* est une des lignées primaires du domaine des bactéries, avec très peu de représentants cultivés<sup>169, 170, 171</sup>,

Des gènes des ARNr 16 s provenant de membres de ce phylum ont été détectés dans les sols du monde entier<sup>172</sup>.

Les membres les *Verrucomicrobia* sont estimés entre 1,2 et 10,9 % des bactéries totales du sol et en moyenne représentent 5 % de tous les sondes gènes des ARNr 16 s (Schoenborn L. et P. H. Janssen, données inédites)<sup>173</sup>.

Certaines bibliothèques des sols manquent de gènes d'ADN des membres du phylum des *Verrucomicrobia*, mais ce sont généralement des études avec moins de 70 séquences analysées.

Ce petit nombre d'analyses fait sur une bactérie difficilement cultivable ne permet pas de déceler les espèces particulières de *Verrucomicrobia*, se trouvent en petit nombre.

En plus d'être abondants, les membres de ce phylum semblent être des membres actifs de la communauté microbienne du sol, elles ont été utilisées pour la réalisation de 1 à 9,8 % des sondes ARNr 16S des bactéries présentes dans les sols

Le phylum des *Verrucomicrobia* a été officiellement divisé en cinq subdivisions monophylétiques numérotées de 1 à 5 par Hugenholtz et coll.<sup>174</sup>

Une sixième subdivision (subdivision 6) a été proposée par (Vanderkerckhove et coll), basée sur un seul séquençage d'ARN 16 s séquence, du gène ARNr cloné à partir d'une bactérie d'habitat d'eau douce, LD19. À l'heure actuelle, seuls trois de ces subdivisions sont reconnues par le *Manual of Systematic Bacteriology de Bergey's*, et ils se voient accorder les rangs des familles : *Verrucomicrobiaceae* (section 1), *Opiritaceae* (subdivision 4), et *Xiphinematobacteriaceae* (subdivision 2). Il est prévu que ces subdivisions devront finalement être reclassées (au rang de classe) sur une parité phylogénétique avec les autres, phylums mieux caractérisés comme les *Proteobacteria* et *Firmicutes*.

La classe proposée *Verrucomicrobiae*, que nous considérons comme équivalente à la sous-section 1, est nommée selon les caractéristiques phylogénétiques représentées par la bactérie aquatique *Verrucomicrobium spinosum*<sup>175</sup> et contient également quatre espèces de bactéries aquatiques du genre *Prostheco bacter*<sup>176</sup>.

On caractérise également les représentants de subdivision 4, tels que *Opiritus terrae* et des souches, isolées du sol et les bactéries marines *Fucophilus fucoidanolyticus*.

L'organisme de ces derniers a été mal classifié en tant que membre de la classe des *Gammaproteobacteria*. Seul un isolat a été signalé pour chacune des subdivisions en 2 et 3, Ellin428 et Ellin5102 respectivement, et aucun isolat n'a encore été signalé pour les subdivisions de 5 ou 6<sup>177</sup>.

### 20.2.1.1 Famille *Chthoniobacteraceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Bactérie découverte à Victoria en Australie en 2002.

Dans la grotte de Sulzbrunn, la répartition de la famille *Chthoniobacteraceae* par catégorie d'échantillon sur le total de la flore de chacune des catégories, a donné :

Snottites	1.3 %	de la flore de cette structure
Biofilms « Subaerial »	$< 2,6 \pm 0.5$ %	de la flore de cette structure
Biofilms « Submersed »	$< 1 \pm 0.6$ %	de la flore de cette structure
Eau de source minérale	$< 1$ %	de la flore de cette structure
Eau de mélange	$< 1$ %	de la flore de cette structure

Dans la grotte de Sulzbrunn, les *Chthoniobacteraceae* représentent environ 14 % des bactéries de l'embranchement *Verrucomicrobia* des snottites. Elles ne sont pas identifiables dans les biofilms et les eaux de la grotte.

## Classe *Spartobacteria* ; Ordre *Chthoniobacterales* ; Famille *Chthoniobacteraceae*

### 20.2.1.1.1 Genre *Chthoniobacter* (Grotte de Sulzbrunn)

#### Description

Les *Chthoniobacter* sont des bactéries du sol dont actuellement une seule espèce de ce genre a été étudiée c'est le *Chthoniobacter flavus*, elle a été découverte dans les pâturages dans la région de Victoria, en Australie, en 2002<sup>178</sup>.

#### Taxonomie

(Extrait : *Applied and Environmental Microbiology journals ASM.org, Appl EnvironMicrobiol. 2004 Oct*)

Au moins six subdivisions de *Verrucomicrobia* sont identifiées par une analyse comparative des gènes ARNr 16 s, principalement obtenues directement sur des échantillons environnementaux. À ce jour, seulement deux de ces subdivisions (1 et 4) ont caractérisé des représentants de culture pure. Il a été isolé et caractérisé le premier représentant connu de culture pure de la subdivision 2.

La souche Ellin428 est une bactérie hétérotrophe aérobie étant capable de se développer avec de nombreux éléments de la biomasse végétale saccharidés, mais ne pousse pas avec les acides aminés ou des acides organiques autres que le pyruvate.

#### Morphologie

Les *Chthoniobacter* ont des cellules sont jaunes, en formes de bâtonnet ou de tige immobile et la coloration de Gram négatif, et ils contiennent du peptidoglycane avec des liens directs du type « A1y

meso-Dpm ».

### **Caractéristiques métaboliques**

Les principaux acides gras cellulaires sont : C14 : 0 ; C15 : 0 ; C16 : 1ω7c ; et/ou 2 OH, : sont C15 : 0 et C16 : 0.

La seule espèce de la famille est un chimio-hétérotrophe aérobie vivant sur l'utilisation métabolique du carbone organique de la biomasse végétale et utilise l'énergie chimique car elle n'a pas de fonction chlorophyllienne. Le sol n'est pas totalement anoxique il peut contenir de l'oxygène suffisamment pour entretenir cette flore bactérienne.

### **Phylogénétique**

La teneur en G + C de l'ADN génomique est de 61 % en mol.

Le nombre de paires de base est de 7 848 700 c'est base sont dites de longue durée.

Un nouveau genre a été proposé : *Chthoniobacter* ; Espèce : ***Chthoniobacter flavus*** Gen. nov., SP. (nov. Ellin428) a été isolé de la souche type, ainsi qu'une nouvelle classe a été créée, classe des *Spartobacteria* nov.

### **Culture**

L'isolat pousse bien à 25° C sur une variété de masse filtrante biologique standard, dont certains utilisés dans la culture systématique de bactéries du sol. La gamme de pH pour la croissance est 4.0 à 7.0. De faibles niveaux de ménaquinone MK-10 et MK-11 ont été détectés.

### **Écologie**

Cette bactérie se développe sur de nombreux saccharides, pouvant être trouvés dans la biomasse végétale, mais elle est incapable de croître sur les acides aminés ou les acides organiques autres que les pyruvates, la bactérie est probablement impliquée dans la décomposition du carbone organique dans le sol. L'étude de ces bactéries de ce genre peut nous aider à mieux comprendre le cycle du carbone dans le sol. Cela pourrait avoir d'énormes répercussions sur les sciences agricoles et environnementales. L'augmentation du carbone organique du sol à un rôle dans l'amendement de celui-ci en permettant la rétention en eau et en anions et cations, c'est-à-dire dans la capacité d'échange cationique du sol. Cette capacité évite le lessivage et l'érosion des nutriments<sup>179</sup>.

Des études écologiques moléculaires suggèrent que les membres des subdivisions 2 et 3 sont plus répandus et abondants dans les sols. Les gènes des ARNr 16 s provenant de représentants de la subdivision 2 sont les composant les plus identifiés des gènes des ARNr 16 s des *Verrucomicrobia* détectées dans les enquêtes basées sur la PCR sur les communautés bactériennes sol (L. Schoenborn et P. H. Janssen, données inédites)<sup>180,181,182,183,184,185,186,187,188,189</sup>.

Un tel gène d'ARNr 16 s, désigné EA25, a été estimé à l'origine d'une espèce avec une taille de population de jusqu'à 2x10<sup>8</sup> cellules/g de sol et par conséquent pourrait représenter de 1 à 10 % de l'ensemble des bactéries dans le sol<sup>190,191</sup>. Les données disponibles suggèrent que les membres de la subdivision 2 constituent un groupe globalement distribué, abondant et actif des bactéries du sol. Compte tenu de l'importance apparente de ce groupe, une compréhension de leur écologie et de leur fonction, une meilleure compréhension de cette classe bactérienne, seraient clairement utiles dans la connaissance de la biologie du sol.

Toutefois il n'a pas été possible d'établir une corrélation entre l'abondance de leurs ARNr 16 s avec des paramètres mesurables du sol et du climat. Récemment, il a été isolé une souche Ellin428, sur la première culture pure connue représentant de ce groupe important des bactéries du sol<sup>192</sup>.

#### **20.2.1.1.2 Genre *Terrimicrobium***

##### **Espèce *Terrimicrobium sacchariphilum***

##### **Morphologie**

C'est une bactérie anaérobie ; mésophile ; les cellules de souche NM-5 (t) sont de Gram (-) ; non-mobiles ; non-sporulée ; avec de courtes tiges (0,5 à 0,7 μm x 0,6 à 1,2 μm).

## Caractéristiques

*Terrimicrobium sacchariphilum* est une bactérie fermentant les glucides, elle est désignée par NM-5 (t). La souche pourrait croître sur de l'arabinose, du xylose, du fructose, du galactose, du glucose, du ribose, du mannose, du cellobiose, du lactose, du maltose et du saccharose. Les principaux produits de fermentation du glucose sont les acétates et les propionates. Les acides organiques, les alcools et les acides aminés ne sont pas utilisés pour la croissance. Les nitrates, les sulfates, les thiosulfates, le soufre élémentaire, les sulfites et les nitri-acétates de fer (III) ne sont pas utilisés comme accepteur terminal d'électrons<sup>193</sup>.

Les principaux acides gras cellulaire sont : Iso-C14 :0, C18 :0, et C16 : 0.

## Phylogénétique

La teneur de l'ADN G+C en est de 46,3% de mol. L'analyse de séquence de l'ARNr 16S a révélé que la souche *Terrimicrobium sacchariphilum* NM -5 (t) appartenait à la classe *Spartobacteria*, avec deux subdivisions du phylum *Verrucomicrobia*<sup>194</sup>.

Phylogénétiquement, les espèces les plus proches étaient le *Chthoniobacter flavus* (89,6 % de similarité dans le séquençage) et un nouveau genre et espèce *Terrimicrobium sacchariphylum* Gen., nov , sp, étant proposé. La souche type de l'espèce est NM-5 (t) (=JCM 17479T = CGCCM 1.5168T)<sup>195</sup>.

## Culture

*Terrimicrobium sacchariphilum* se développe de façon optimale à 37° C avec une zone de croissance de 20 à 40° C et un pH optimum de 7 avec une zone de pH 5,5 à 8.

## Environnement

Elle a été isolée dans un champ de riz paddy en Chine et dans les sols.

### 20.2.1.1.3. Genre *Candidatus Xiphinematobacter*

**Phylum : *Verrucomicrobia* ; Classe : *Spartobacteria* ; Ordre : *Chthoniobacterales* ; Famille : *Chthoniobacteraceae* ; Genre : « *Candidatus Xiphinematobacter* »<sup>99</sup>**

### Espèce *Candidatus Xiphinematobacter phi*

#### Morphologie

Les *Candidatus Xiphinematobacter*<sup>196</sup> phi sont des bactéries de Gram (-) ; immobiles et sporulantes ; en forme de tiges avec des extrémités arrondies de 0,7 µm diamètre et 1,0 à 3,2 µm de longueur.

Cette bactérie vit en symbiose intracellulaire dans un nématode du nom de *Xiphinema*.

Cependant la cellule de la bactérie dans les premiers jours du stade de développement dans le nématode a une forme ridée, pléomorphe. Les entités plus longues sont généralement consistantes d'une cellule mère à une cellule fille donnant lieu à des séries typiques de genre bactérien.

En coupe mince les cellules bactériennes ont deux ou trois membranes consistantes ; de l'intérieur à l'extérieur elles sont constituées d'une membrane cytoplasmique, portant des électrons de membranes externes denses, ainsi que chez de nombreux individus elle contient une membrane vacuolaire étant probablement dérivée de la membrane de la cellule de l'hôte et a souvent des discontinuités.

Chez *Candidatus Xiphinematobacter phi*, on n'observe aucune couche de peptidoglycane. Toutefois, une monocouche hexagonale de périplasme de 10 unités de protéines est parfois présente. L'ADN est souvent condensé aux pôles de la cellule.

#### Environnement

*Candidatus Xiphinematobacter phi* vit en symbiose cytoplasmique avec des nématodes du groupe *Xiphinema americanum* (*nematoda longidoridae*) dans laquelle ils sont censés induire la parthénogénèse thélytoque (transmission maternelle de mère à fille).

L'endosymbiote dans l'œuf se déplace vers le pôle où se situe le primordium de l'intestin, par conséquent les bactéries peuplent ensuite l'épithélium intestinal des vers juvéniles. Durant la mue de

l'hôte jusqu'à la femelle adulte, les endosymbiotes se concentrent autour des ovaires en développement, elles coupent la paroi ovarienne.

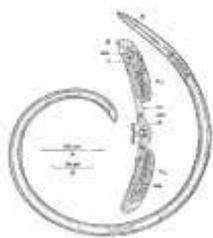
### Phylogénétique

Les valeurs G+C de l'ADN n'ont pas été déterminée pour cette espèce bactérienne.

### Nématodes dans la grotte de Sulzbrunn

La présence de bactérie du genres de la famille des *Chthoniobacteraceae* peut être un indicateur de l'existence de nématodes dans cette cavité. Les *Xiphinema* sont les hôtes des *Candidatus Xiphinematobacter phi* la présence de ces derniers seraient une preuve dans l'entourage de némathelminthes<sup>197</sup>.

#### Espèce Nématode *Xiphinema americanum*



Morphologie générale (A) et le système reproducteur (B) d'un ensemble *X. americanum* femelle. G<sub>1</sub>, branche antérieure ; G<sub>2</sub>, branche postérieure ; OOC, ovocyte ; ovules, ovaire ; Ovi, voies génitales ; s., bactéries symbiotiques ; SPH., sphincter ; ut., utérus.

*Xiphinema americanum* (Nématode poignard américain) est une espèce de nématode pathogène des plantes. C'est une des nombreuses espèces appartenant au genre *Xiphinema*. Elle a été décrite par N. A. Cobb en 1913, l'a trouvé sur les deux côtés des États-Unis d'Amérique sur les racines de l'herbe, de maïs et agrumes. Non seulement *Xiphinema americanum* est connu comme vecteur de virus de plantes, mais aussi comme « Le nématode parasite le plus destructeur des plantes en Amérique » et l'un des quatre principaux parasites nématodes dans le Sud-est des États-Unis.

### Morphologie du (Nématode poignard américain) *Xiphinema americanum*

La longueur de l'adulte *Xiphinema americanum* varie entre 1,3 et 3 mm. Le nématode a une dague, caractérisé par des odontostyles de 100 µm (chez certains némathelminthes, partie de l'appareil digestif constitué d'aiguilles mobiles et creuses plus ou moins longues, servant à ponctionner les sucs cellulaires des hôtes), est utilisé pour une pénétration profonde des apex (qualifie se trouvant au sommet ou à une extrémité) racinaires avec son « sper » étant comme son stylet. L'odontostyle est relié à la paroi de la cheilostome<sup>ooo</sup> par une membrane plissée, appelée la « bague de guidage ». La bague de guidage est attachée à un anneau odontophore (anneau du tube digestif).

La femelle possède un corps habituellement en forme de C. La forme du corps s'effile vers les extrémités. Les deux anneaux de l'odontophore sont distants de 3 µm. *Xiphinema americanum* a l'œsophage appelé « *dorylaimoid*<sup>ppp</sup> ». L'œsophage contient une ampoule musculaire de 80 µm de longueur et 20 µm de large. La valve (B du schéma) se trouve entre l'œsophage et l'intestin elle occupe de 46 à 5 % de la longueur totale du corps et se trouve en position équatoriale avec une transversale à fente forme, avec le vagin d'un diamètre d'un tiers du diamètre du corps. Les paires d'ovaires normalement sont amphidelphique. Le prérectum du *X. americanum* a une hauteur de 120-140 µm de long, avec un rectum étant à peu près de la même longueur que le diamètre du corps à l'anus. La queue contient 2 ou 3 paires de pores, et est en forme de cônes (conoïdes) et avec courbes sur le dos avec un terminaison subaiguë. Les mâles ont une configuration globale similaire aux femelles, mais sont légèrement plus petits en longueur. Les mâles de *X. americanum*, se trouvent rarement dans la nature. Les mâles ont les testicules diorchides étant connectés au cloaque, avec une branche antérieure et une branche postérieure.

<sup>ooo</sup> **Cheilostome** (le nom de Cheilostatida est accepté) : ordre de bryozoaires dans la classe *Gymnolaemata*, ce sont des animaux invertébrés exclusivement marins vivants en colonies. Les colonies de Cheilostome sont composées de carbonate de calcium et poussent sur une variété de surfaces, y compris les rochers, coquillages, herbiers et laminaires. La colonie a des formes allant de la simple feuille incrustée à des formes ramifiées et même détachées. Comme dans d'autres groupes de bryozoaire chaque colonie est composée de quelques-uns à des milliers de formes différents (polypodes). Chaque individu n'a qu'un intestin en forme de U et aucun appareil respiratoire ou circulatoire ni système nerveux.

<sup>ppp</sup> **Dorylaimoid** : extensions fortement circularisées, qui portent des anneaux aplatis, ou de boutons, ampoule terminale de l'œsophage.

## 21 EMBRANCHEMENT ALPHAPROTEOBACTERIA (BV2)

Dans cet embranchement *alphaproteobacteria* il a été identifié dans la cavité de Sulzbrunn :

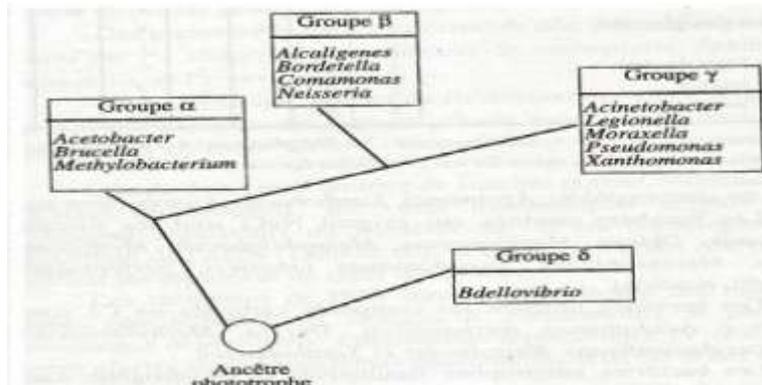
*Caulobacterales*  
*Hyphomonadaceae*  
 DB1-14

*Rhizobiales*  
*Beijerinckiaceae*  
*Hyphomicrobiaceae*

*Rhodobacterales*  
*Rhodobacteraceae*  
*Rhodospirillales*  
*Rhodospirillaceae*

*Rickettsiales*  
*Sphingomonadales*  
*Erythrobacteraceae*

### Les *Proteobacteria* aérobies



### Répartition des *Alphaproteobacteria* dans la cavité

Répartition microbienne dans la grotte de Sulzbrunn de l'embranchement des *Alphaproteobacteria* présent sur la flore totale de chacune des structures :

Snottites	27,2 %	sur la flore totale de la structure
Biofilms « subaerial »	23,6 %	sur la flore totale de la structure
Biofilms « submersed »	18,1 %	sur la flore totale de la structure
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de la structure
Eau de mélange	2.5 ± 1,2 %	sur la flore totale de la structure



« Les *Alphaproteobacteria* du lac Dzioni Dzoha à Mayotte montre des précipitations de carbonate de calcium lacustre formant des Stromatolite étant principalement liée à la photosynthèse anoxygénique, ouvrant de nouvelles perspectives dans l'analyse du registre fossile. Les stromatolites sont des formations organo--sédimentaires, c'est-à-dire un empilement de couches de matières organiques et sédimentaires le plus souvent ils sont composés de carbonate de calcium se développant en milieu aquatique datant du précambrien. »

Les analyses faites sur ces structures fossiles montrent que les plus anciennes couches fossiles datent de 3.5 milliards d'années. Elles sont dans la région Barberton en Afrique du Sud. Les analyses bactériologiques par CPR ont établi la présence de cyanobactéries dans ces stromatolites ».

### Généralités

#### Population des *Alphaproteobacteria*

Les protéobactéries (*Proteobacteria*) comprennent des bactéries pathogènes, d'autres encore sont responsables de la fixation biologique de l'azote. Le terme « *Proteobacteria* » vient du dieu grec *Protée*, divinité marine ayant la capacité de se métamorphoser (diversité de forme et de métabolisme). La plupart des protéobactéries sont mobiles grâce à un flagelle, mais d'autres peuvent être immobiles ou se déplacer par glissement. Ces dernières sont les *Myxobactéries*, un groupe unique de bactéries capables de s'agréger, formant des corps fructifiant multicellulaires. Elles ont une grande variété de métabolismes. Les *Proteobacteria* sont à Gram (-), c'est-à-dire qu'elles possèdent une membrane externe composée de lipopolysaccharides (LPS) pauvre en peptidoglycane.

Les *Proteobacteria* classées en quatre groupes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) en fonction de la teneur en ADN (G+C = Guanine + Cytosine en pourcentage).

### Propriétés des *Proteobacteria*

Les *Proteobacteria* sont des bactéries possédant de la bactériochlorophylle et utilisant la lumière comme source d'énergie ; cette branche bactérienne contient aussi quelques bactéries non-photosynthétiques.

Les *Alphaproteobacteria*<sup>198</sup> sont un groupe très important de bactéries, dont une partie nous intéresse particulièrement pour leur adaptation à la vie dans l'eau et les sols et donc à la vie karstique.

À des fins de présentation environnementale, l'analyse d'une partie des bactéries hélicoïdales de cette classe bactérienne, sera étudiée dans la partie de la parasitologie pour une meilleure compréhension du lien hôte-parasite et dans les risques aquatiques, notamment pour la leptospirose. Elles jouent un rôle dans la fixation biologique de l'azote dans les sols<sup>199</sup>.

### Classification des *Alphaproteobacteria*

- Nombre d'espèces : 1 488 classées sur la base de l'ARN 16s.
- Répartition actuelle : mondiale.

### Classe *Alphaproteobacteria*

(Classification de : George M. Garrity, Timothy G. Lilburun, James R. Cole, Scott H. Harrison, 2006.)

- Ordre *Caulobacterales*
- Ordre *Kordiimonadales* (Kwon *et al.* 2005, ord. nov.)
- Ordre *Parvularculales*
- Ordre *Rhizobiales*
- Ordre *Rhodobacterales*
- Ordre *Rhodospirillales*
- Ordre *Rickettsiales* (voir les pathologies parasitaires)
- Ordre *Sphingomonadales*

### Famille *Alphaproteobacteria* identifiées dans la grotte de Sulzbrunn

- *Beijerinckiaceae*
- *Caulobacteraceae*
- *DB1-14*
- *Erythrobacteraceae*
- *Hyphomonadaceae*
- *Hyphomicrobiaceae*
- *Rhizobiaceae*
- *Rhodobacteraceae*
- *Rhodospirilliaceae*
- *Rickettsiaceae*
- *Sphingomonaceae*

#### 21.1.1 Ordre V *Caulobacterales* (Grotte de Sulzbrunn & du Rideau de fer au Canada)

Nom donné par Henrici et Johnson, 1935

Répartition microbienne dans la grotte de Sulzbrunn de l'ordre des *Caulobacterales* sur la flore totale de chacune des structures :

Snottites	≈ 4 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 3 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 2,1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<2,5 ± 1,2 %	sur la flore totale de cette structure

## L'ordre des *Caulobacterales* n'a qu'une famille : *Caulobacteraceae*

### 21.1.1.1 Famille *Caulobacteraceae* (Grottes de Sulzbrunn et du Rideau de fer au Canada)

La famille *Caulobacteraceae* sont des bactéries aquatiques filamenteuses formant des tiges ou des masses d'hydroxyde ferrique ou de la gomme, généralement placées dans l'ordre des *Pseudomonadales*, bien qu'elles soient parfois classées dans les *Eubacteriales*.

Genres connus :

- *Asticcacaulis*
- *Brevundimonas*
- *Caulobacter*
- *Nitrobacteria*
- *Phenylobacterium*
- *Woodsholea*

#### 21.1.1.1.1 Genre *Caulobacter* (Grottes de Sulzbrunn et du Rideau de fer au Canada)

##### Morphologie

Les *Caulobacter* sont des cellules Gram (-), en forme de bâtonnets, pouvant être flagellées de façon polaire ou posséder une tige. Les *Caulobacter* manquent d'organites intracellulaires. Ils sont hétérotrophes, aérobies et se trouvent dans les milieux aquatiques, attachés aux particules, aux matières végétales ou autres micro-organismes par sa tige.

##### Division cellulaire

*Caulobacter* est asymétrique, il se divise pour produire une cellule essaim motile et une cellule de tige. La cellule de l'essaim, possédant un flagelle, nage pendant environ 30-45 mn avant de se séparer du flagelle et produit une différenciation en se dotant d'une cellule de tige.

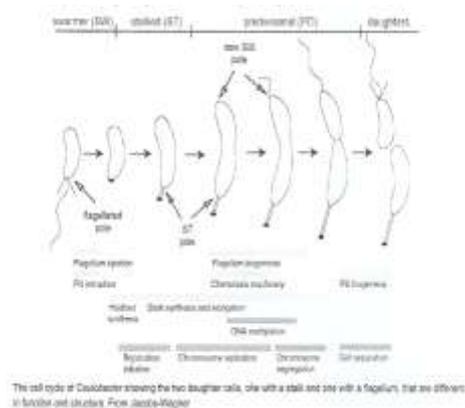
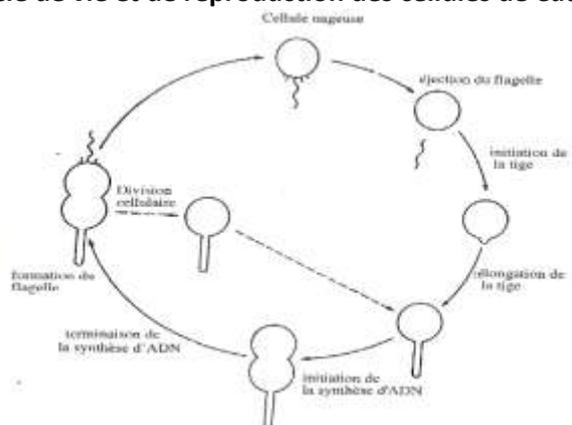
Le flagelle est éjecté de la « swamer » par la destruction des structures (anneau de MS) à la base du flagelle. Au sein de la cellule de l'essaim, les chromosomes ne sont pas répliqués ; cependant, la réplication du chromosome commence immédiatement dans la cellule-fille avec la tige, et lorsque l'essaim perd sa queue (Stanford), la tige adhère aux surfaces grâce à un adhésif organite appelé le crampon.

Plusieurs protéines de transduction du signal des deux composants sont impliquées dans la progression du cycle cellulaire en s'accumulant à un ou deux pôles « dans un modèle spatial et temporel étant reproduit au cours de chaque cycle » (Jacobs-Wagner, 2003).

En outre, la méthylation de l'ADN est un élément de différenciation de la transcription. Tout au long du cycle cellulaire, les chromosomes étant progressivement méthylés par « hemi-méthylation »<sup>20</sup> au cours de la réplication de l'ADN, cela se traduit par une différenciation active des protéines régulatrices ou une répression de la transcription (mécanisme épigénétique).

Ceci a été étudié en utilisant le gène *CtrA*, codant pour une protéine de régulation du cycle cellulaire. Le gène *CtrA* a deux promoteurs, dont un « se déclenche dès le début » dans la phase S et est reconnu par l'enzyme CcrM ADN méthyltransférase. L'analyse a montré que le régulateur P1 est effectivement réprimé par la méthylation de l'ADN (Reinsenauer et Shapiro, 2002).

##### Cycle de vie et de reproduction des cellules de *Caulobacter*



Le *Caulobacter* se divise asymétriquement pour produire deux types de cellules filles étant fonctionnellement et structurellement différentes. Le corps cylindrique d'une cellule de la tige est d'environ 0,7 micromètres de diamètre et de 2 à 3 micromètres de longueur. La cellule de l'essaim est plus petite que la cellule de tige au début ; leurs hydrodynamiques divergent en raison des morphologies différentes entre les cellules de l'essaim et de tige allant permettre de l'observer et de l'isoler relativement facilement (Stanford).

Le pédoncule est plus long en milieu pauvre en phosphate (<0.2 µm) et plus court en milieu riche en phosphates.

### Phylogénétique

*Caulobacter crescentus* est structuré dans un chromosome circulaire et se compose de 4 016 942 bp encodage pour 3 767 gènes. Il a été constaté que *Caulobacter crescentus* possédait un génome codant pour la transcription des protéines : code bi-signal étant le composant pour la progression du cycle cellulaire, pouvant être lu sous deux ou plusieurs formes selon les méthylation. *Caulobacter* utilise également la méthylation de l'ADN (épigénétique)<sup>19</sup> comme un mécanisme de régulation dans la progression du cycle cellulaire.

*Caulobacter* dispose également des groupes de gènes étant essentiels pour la survie dans des environnements pauvres en nutriments. Certains de ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la chimiotaxie, fonction du canal de la membrane externe, dégradation des composés avec des cycles aromatiques avec une répartition des sources de carbone d'origine végétale (liste de Nierman et coll., 2001). D'autres sont impliqués dans les fonctions extra-cytoplasmiques comme « facteur signal », permettant à la bactérie de répondre à « un large éventail de fluctuations environnementales » (Nierman et coll., 2001).

Le dosage ADN-ADN en C+G donne pour ce genre 65mol% et l'espèce type retenue est *C. vibrioide*

### Mutation de la tige

Afin d'analyser les mécanismes régulateurs du cycle cellulaire et autres mécanismes de *Caulobacter*, de nombreuses souches mutantes ont été créées et étudiées. Ces mutants sont un moyen pratique pour analyser les gènes. La synthèse de la tige, par exemple, est grandement affectée par la quantité de phosphates dans l'environnement de la bactérie.

Ces tiges, généralement de 1 micromètre de longueur, atteignent jusqu'à 20 à 30 micromètres de longueur en réponse aux carences en phosphates. Le ratio accru en surface/volume est cependant un facteur d'amélioration de l'absorption des nutriments. Un seul type de cellule mutante, le mutant *skl*, a augmenté sa tige en élévation même dans un milieu riche en phosphates.

Ce type de cellule mutante correspond à des homologues des gènes de *Pst* qui, dans *Escherichia coli* et les autres bactéries, codent pour des protéines de transport de haute affinité pour les phosphates. Ces cellules mutantes *skl* permettent l'expression des gènes *PhoB* des cellules anormales du *Caulobacter* de type sauvage dans un milieu riche en phosphates. On a également constaté que ce même gène *phoB* est nécessaire pour l'élévation de la tige durant les carences en phosphates car il encode la transcription du *régulon-Pho*. Dans *E. coli*, le gène *PhoB* réprime la transcription des gènes *régulon-Pho* en se liant à au gène *Pho* des boîtes générant du gène *régulon-Pho*. Chez *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, il a été démontré que des mutants du gène *pst* peuvent réprimer le gène *PhoR*, et ainsi induire le *régulon-Pho* et la formation d'une tige allongée (Brun et coll., 2000).

### Culture

Les cellules mutantes sauvages cultivées dans un milieu différent :

Milieu PYE, milieu HIGG contenant du phosphate de 10 mM ou 30 µM phosphate.

- A-C) Les tiges allongées dans les cultures sauvages de *Caulobacter*, elles n'apparaissent que dans le milieu déficient en phosphates.
- D-F) mutation dans les cellules du le gène *phoB*, on remarque que les tiges ne sont jamais pleinement en mesure de s'allonger.

- G-I) Les tiges allongées, quel que soit le milieu dans le cas de mutation dans le gène de la *TVP* (De Brun et coll.).

**Milieu de culture :** Peptone 2 g, extrait de levure 1 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.2 g, riboflavine 1 mg, gélose 10 g, eau QSP 1 000 ml ; pH 7.0 stérilisé 15 mn à 121°C.

**Milieu d'enrichissement :**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.136 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 g, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 1 mg, MnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.25 mg, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 0.5 mg, 0.213 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.02 g, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.5 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.25 mg, QSP 100 ml ; ajuster le pH 7.2 avec NaOH agar 1.9 %.

Milieu d'isolement :

Peptone 1g, extrait de levure 0.3 g, agar 1.8 g QSP 100 ml ; pH 7.2 avec de NaOH.

## Écologie

*Caulobacter* en général, vit dans un milieu aquatique dilué où les nutriments sont limités, dont le plus courant, le phosphore, étant un élément essentiel pour une croissance saine.

Le manque de cet élément nutritif induit chez *Caulobacter* un allongement considérable de sa tige pouvant atteindre jusqu'à 30 fois sa longueur initiale dans un milieu riche en phosphates (Brun et coll., 2000).

*Caulobacter crescentus* se trouve généralement dans les lacs. Il sert de modèle dans l'étude de la régulation du cycle cellulaire, de la division asymétrique et de la différenciation cellulaire.

## Autres caractéristiques

*Caulobacter crescentus* est une bactérie présentant une propriété particulière : son pédicule a une grande capacité adhésive, due à des polysaccharides (PNAS, avril 2006. Chercheurs de l'université d'Indiana et de l'université Brown/Rhode Island).

Les bactéries nageuses finissent par se fixer car la réplication et la division cellulaire se fait uniquement lors de la phase immobile.

## Remarques

Les *Caulobacter* nous montrent que les bactéries peuvent avoir des mutations d'ordre épigénétique leur permettant une adaptation au milieu karstique.

### 21.1.1.1.2 Genre *Brevundimonas* (Grotte du Rideau de fer, Canada)

Nom donné par Segers et coll.

Le genre de *Caulobacterales* n'étant pas identifié dans la grotte de Sulzbrunn, afin de connaître les caractéristiques des *Caulobacterales*, il a été retenu une bactérie présente dans une grotte du Canada « la grotte du rideau de fer »).

**Ordre *Caulobacterales*** (Henrici & Johnson, 1935) ; **Famille *Caulobacteraceae*** ;

**Genre *Brevundimonas*** (Segers and al. 1994)<sup>200</sup>.

## Morphologie

Cellule en bâtonnet de (diamètre 0.5µm et L 1.4 µm<sup>qqq</sup>), mobile avec un flagelle polaire. Sa structure de flagelle est composée de deux types de flagelline ; ce sont des cellules bourgeonnantes (division par fission binaire), appendiculées possédant un prosthecae. La reproduction de *Brevundimonas* se fait par scissiparité au pôle opposé du prosthecae. La bactérie est oligotrophe.

## Caractéristiques métaboliques

Le *Brevundimonas* : a une catalase (+) et oxydase (-) ; cette bactérie est aérobie ; ne fait pas fermenter le lactose, ne fermente pas les hydrates de carbone, n'a pas d'activité hémolytique ; il oxyde l'éthanol en acide.

## Analyse génétique

65 % du génome de *Brevundimonas diminuta* donne des résidus identiques avec celui de *E coli* et

<sup>qqq</sup> µm = micron mètre = 10<sup>-6</sup> mètre

79 % avec celle de *Caulobacter crescentus* étant une bactérie non pathogène des eaux. La teneur en ADN-ADN donne en G+C une valeur de 65 à 68 mol% selon les espèces. L'espèce prise ne référence est *Brevundimonas diminuta* (ancien *Pseudomonas diminuta*)<sup>201</sup>.

### Culture

Il pousse dans une solution d'eau peptone ; croissance optimum à un pH 7 à une température comprise entre 30 à 37°C avec une température d'incubation de 35° C.

**Les milieux :** soit un milieu au sang, soit : Peptone 2 g/l ; Levure 1 g/l ; Sulfate de Mn ; riboflavine 1mg/l ; gélose 10 g/l (stérilisation 15 mn à 121° C).

### Écologie

La bactérie *Brevundimonas*<sup>202</sup> est une bactérie du sol. Elle est rarement isolée de l'eau. C'est une bactérie montrant une résistance élevée, dans des conditions hors de son biotope et résiste aux irradiations atomiques et cosmiques. Elle peut survivre pendant 100 000 ans à 30 cm de profondeur dans le sol avant d'avoir une réduction de 10 % de sa population<sup>203</sup>.

Les souches du *Brevundimonas diminuta* ATCC ont été isolées de l'environnement (eau douce) dans les années cinquante avant l'ère des quinolones, et pourtant elle est résistante à la ciprofloxacine, suggérant une résistance aux quinolones. Ceci nous montre qu'il peut exister des résistances non acquises dans la nature<sup>189</sup>.

### Pathologie

Même s'il n'est pas considéré comme pathogène, il y a des rapports cliniques sur ce micro-organisme montrant une pathologie sur des malades atteints de cancer. Toutes les souches analysées sur le plan clinique montrent que cette bactérie est résistante aux fluoroquinolones. L'espèce de ce genre, la plus rencontrée en pathologie est le *Brevundimonas diminuta*.

Les cas de pathologies sont rapportés sur des malades atteints de malignité hématologique ou sous chimiothérapie ou ayant subi une greffe.

### Sensibilité aux antibiotiques

- Sensibles à l'amikacine, à l'imipenème et à la tricarcilline /clavulanate.
- Rarement sensibles au triméthoprim /sulfaméthoxazol, à la certriaxone et à la ceftazidime.
- Résistantes aux céfépimes, au ciprofloxacine, à l'ampicilline, au gatifloxacine et à la nn. En général il y a une résistance aux quinolones.

#### 21.1.2 Ordre *DB1-14* (Grotte de Sulzbrunn)

Répartition microbienne dans la grotte de Sulzbrunn de l'ordre DB1-14 sur la flore totale de chacune des structures :

Snottites	≈ 3,9 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 0,6 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 1,5 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<2,5 ± 1,2 %	sur la flore totale de cette structure

**Pas d'information trouvée sur cet ordre bactérien.**

#### 21.1.3 Ordre *VI Rhizobiales* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Kuykendall en 2006.

Répartition microbienne dans la grotte de Sulzbrunn de l'ordre des *Rhizobiales* sur la flore totale de chacune des structures :

Snottites	≈ 7,2 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 6,6 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 4,8 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<2,5 ± 1,2 %	sur la flore totale de cette structure

## Caractéristiques

Les *Rhizobiales*, fixent l'azote et sont symbiotiques avec les racines des plantes, elles apparaissent dans plusieurs familles différentes.

Dans la grotte de Sulzbrunn, ces bactéries sont détectées en particulier dans les biofilms « subaerial », plusieurs méthanotrophes facultatives ont été trouvées telles que *Methylocella*, *Methylosorus* et *Methylobacter* ayant été identifiées seulement en faible abondance <1 %<sup>204</sup>.

### L'ordre des *Rhizobiales* comprend les familles suivantes :

<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Aurantimonadaceae</i> (Denner et al 2003)</li><li>• <i>Bartonellaceae</i> (Gieszczykiewicz 1939)</li><li>• <i>Beijerinckiaceae</i> (Garrity 2006)</li><li>• <i>Bradyrhizobiaceae</i> (Garrity 2006)</li><li>• <i>Brucellaceae</i> (Breed et al 1957)</li><li>• <i>Cohaesibacteraceae</i> (Hwang and Cho 2008)</li><li>• <i>Mabikibacteraceae</i> (Coi et al. 2017)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Hyphomicrobiaceae</i> (Babudieri 1950)</li><li>• <i>Methylobacteriaceae</i> (Garrity et al 2006)</li><li>• <i>Methylocystaceae</i> (Bowman 2006)</li><li>• <i>Phyllobacteriaceae</i> (Mergaert and Swings 2006)</li><li>• <i>Rhizobiaceae</i> (Conn 1938).</li><li>• <i>Xanthobacteraceae</i> (Lee et al. 2003)</li></ul>
---	--

### Chacune des familles contiennent au moins six genres les plus connus

- *Bradyrhizobium*
- *Rhizobium*

Ces bactéries fixant l'azote, elles sont habituellement en endosymbiose avec les légumineuses nodulantes, microsymbiotes.

La famille *Methylocystaceae* pouvant être reliée à cet ordre, comporte des genres méthanotrophes, ils utilisent le méthanol, le méthane, comme source d'énergie et le carbone (minéral).

### Autres genres

- *Bartonella*
- *Brucella*
- *Agrobacterium* (utilisé en génie génétique)

Ce sont des pathogènes pour l'homme.

#### 21.1.3.1 Famille *Rhizobiaceae*

##### Morphologie

Les cellules sont mobiles (1 à 4 flagelles), péritriches,

##### Liste des genres de la famille des *Rhizobiaceae*

<i>Agrobacterium</i>	<i>Chelatobacter</i>
<i>Allorhizobium</i>	<i>Kaistia</i>
<i>Corbophilus</i>	<i>Rhizobium</i>
	<i>Ensifer</i>

## Caractéristiques

Le *Rhizobiaceae* est une bactérie avec un LDC (-) ; un ADH (+) ; avec production d'acide dans l'extrait de levure + mannitol en milieu agar ;

Sources de carbone sont : ribose (+) ; galactose, arabinose, cellulose (+) ; Inositol, raffinose (+) ; utilisation de l'asparagine (+) ; utilisation de l'histidine (+) ; avec un APP (-).

Ces bactéries sont présentes dans le sol, sont stimulées par les excréments de la rhizosphère<sup>112</sup>. La légumineuse excrète dans ses exsudats racinaires des flavonoïdes, venant interagir avec la protéine NodD, produite constitutivement par la bactérie. La protéine NodD<sup>'''</sup>, ainsi activée, induit

<sup>'''</sup> **Nodulines** : elles servent à la reconnaissance par la plante en utilisant des intermédiaires de signaux chimiques. Dont divers composés déterminants une chimiotaxie positive étant émis par les racines des plantes parmi celle-ci, on trouve les flavonoïdes, indicateur des gènes « nod » contrôlant la synthèse des facteurs NOD, responsable de la reconnaissance entre la possibilité de symbioses et du déclenchement de l'organogénèse modulaire. Ce développement de nodule est programmé par la plante et déclenché par la bactérie.

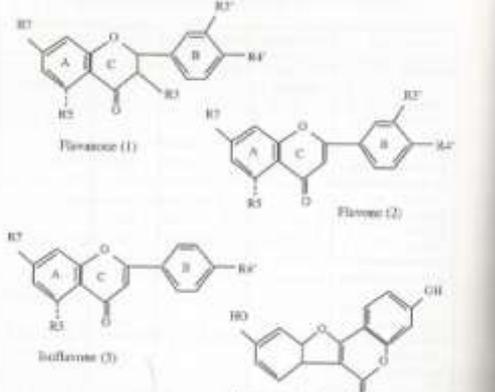
l'expression des gènes « *nod* » du plasmide pSym, codant des protéines impliquées dans la synthèse du facteur Nod, dont dépend l'évolution ultérieure de l'interaction symbiotique (production de nodulines). Les bactéries rentrent dans la plante hôte par les poils absorbants et refoulent la membrane cytoplasmique, entourant le cordon bactérien. Les bactéries de l'infection pénètrent le cortex en passant entre les cellules. Les bactéries sont finalement libérées dans la cellule végétale. Elles sont enveloppées de la membrane cytoplasmique de l'hôte porteuse de la leghémoglobine<sup>555</sup> fixant l'oxygène. La multiplication se fait quand le cordon bactérien atteint des cellules tétraploïdes. La bactérie devient alors un bactéroïde à morphologie mal définie (masse, X, larve) fixant l'azote atmosphérique. A l'état libre : les Rhizobia ne fixent l'azote qu'en atmosphère anaérobie<sup>113</sup>.

Caractéristiques	Stade bactéroïde
Viabilité	Légèrement réduite
Sensibilité osmotique	Augmentée
Contenu de l'ADN	Inchangé
Métabolisme des lipoïdiques	Accumulation de PHB
Transport d'électrons	Pas de cytochromes C et aa <sub>3</sub>
Synthèse des hèmes	Augmentation (leghémoglobine)
Nitrogénase	Jusqu'à 10% des protéines solubles

La fixation de l'azote par le *Rhizobium* :

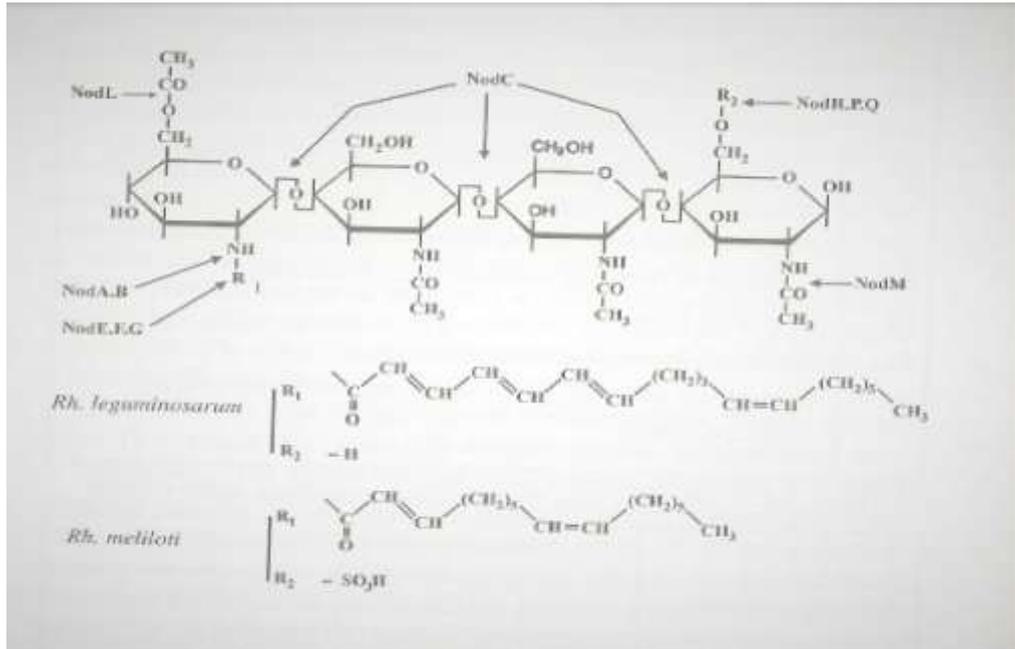
La fixation de l'azote atmosphérique en symbiose avec des légumineuses correspond à une fixation de 100 à 300 K de N/ ha/an, alors que la fixation de l'azote lorsque la bactérie est libre correspond à 1 à 3 K de N /ha/an.

**Flavonoïde présents dans les exsudats des racines de légumineuse.**

	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 3,5,7,3'-tétrahydroxy-4-méthoxyflavone inducteur pour le <i>Rhizobium leguminosarum</i> <b>bv viciae</b>.</li> <li>2) 3',4',5b,7-tétrahydroxyflavone inducteur pour le <i>Rhizobium mélioti</i></li> <li>3) 4',7-dihydroxyisoflavone inducteur pour <i>Bradyrhizobium japonicum</i></li> <li>4) Coumestrol intermédiaire du métabolisme du phénylpropane. Inducteur faible du : <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>R. galegae</i></li> <li>• <i>R. leguminosarum</i></li> <li>• <i>R. loti</i></li> <li>• <i>R. meliloti</i></li> </ul> </li> </ol>
---	--

<sup>555</sup> **Leghémoglobine** : protéine de coloration rouge (présence de fer) et présentant des similitudes avec les hémoglobines animales, permet aux *Rhizobium* de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule. Elle permet ainsi d'éviter l'inactivation de la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène tout en assurant l'apport d'O<sub>2</sub> indispensable à ces bactéries aérobies. Elle est synthétisée par la plante-hôte (globine) et par le bactéroïde (groupe prosthétique hème) lié étroitement à la globine.

## Structure des nodulines facteurs « Nod »



## Culture

**Croissance** : pas de croissance à 44°C ; croissance à pH 8 (+) ;

**Milieu de développement pour le *Rhizobium*** :

- **Milieu de Pochon** : NaCl 0.2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g, CaCO<sub>3</sub> 0.1 g, mannitol 10 g, extrait de levure 4 g, gélose 15 g, QSP eau distillée 1 000 ml.
- **Milieu YMB** : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, NaCl 0.1 g, mannitol 10 g, eau de levure 100ml, eau distillée QSP 1 000 ml.
  - Eau de levure : 100 g de levure de boulanger dans 1 000 ml. Laisser à la température du laboratoire.
- **Milieu** : Extrait de levure 1 g, mannitol 10 g, agar 15 g, extrait de sol 200 ml, ajuster à pH7 eau distillée QSP 800 ml.
- **Milieu** : Extrait de sol de jardin déshydraté à l'air 80 g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 g, eau distillée QSP 200 ml ; centrifuger amener à pH 7 ; stériliser 1 h à 120° C.

### 21.1.3.2 Famille *Beijerinckiaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Garrity and al., 2006.

Répartition microbienne dans la grotte de Sulzbrunn de la famille des *Beijerinckiaceae* sur la flore totale de chacune des structures :

Snottites	≈ 3,5 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 5,2 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ <1,8 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<2,5 ± 1,2 %	sur la flore totale de cette structure

## Ordre *Rhizobiales* ; Famille *Beijerinckiaceae*

### Genres de la famille des *Beijerinckiaceae*

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Beijerinckia</i></li> <li>• <i>Camelimonas</i></li> <li>• <i>Chelatococcus</i></li> <li>• <i>Methylocapsa</i></li> <li>• <i>Methylocella</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Methyloferula</i></li> <li>• <i>Methylosorus</i></li> <li>• <i>Methylovirgula</i></li> <li>• <i>Pseudochelatococcus</i></li> </ul>
---	--

Les deux genres ayant été identifiés dans la grotte de Sulzbrunn de cette famille sont :

- *Methylocella*
- *Methylorosula*

### Morphologie

Les *Beijerinckiaceae*, sont des bactéries en bâtonnets mobiles incurvées avec granules de PHB, des formes de cystes, des capsules existent chez certaines espèces.

La *Derxia* est un bâtonnet, mobile par flagelle polaire (présent dans les muqueuses et les sols tropicaux) ou immobile.

### Caractéristiques

Ce sont des bactéries aérobies fixatrices de l'azote atmosphérique, acido-résistantes. Elles sont les principales bactéries transformant le méthanol produit dans les sols des forêts à feuilles caduques. Montrant leur importance dans les sols forestiers.

#### 21.1.3.2.1 Genre *Beijerinckia*

Le genre *Beijerinckia* comprend les espèces suivantes :

- *B. indic*
- *B. mobilis*
- *B. fluminensis*
- *B. dexil*

### Morphologie

Les *Beijerinckia* sont des bactéries en forme de bâtonnet incurvé avec granule de PHB lorsque les cellules sont jeunes et deviennent en forme de poire lorsqu'elles vieillissent. La taille des bâtonnets a 1.7 à 4.5 µm de longueur et 0.5 à 1.5 µm Ø ; A chaque extrémité de la cellule il y a un litoïdes polaires, ces deux structures aux extrémités réfractives peuvent être impliquées dans la protection de la lumière. Ces lipoïdes se composent de de poly-hydroxybutyrate (PHB). Des cystes et des capsules existent chez certaines espèces. Elles sont mobiles (+) par flagelles péritriches et non polaires ou immobiles. Colonies très muqueuses. Elles sont appelées bactéries libres. Elles résistent au gel pendant 3 à 4 mois à la température de -4 °C.

### Caractéristiques

Les *Beijerinckia* sont aérobies, chimio-hétérotrophes avec la capacité de fixation de l'azote N<sub>2</sub>. Elles sont très résistante à l'acide. La fixation de l'azote augmente lorsque l'acidité s'amplifie avec un seuil pour pH 2.7 (Barbosa et al. ,2002). Elles peuvent produire des polysaccharides sous forme de boue.

### Métabolisme

Cette bactérie a une catalase (+) ; elle utilise les sucres, les alcools, les acides organiques, elles peuvent hydrolyser l'amidon. En milieu alcalin elles peuvent diminuer les pH à la valeur de 4.0 à 5.0. Cette acidification est accomplie par l'acide acétique avec une certaine proportion d'acide lactique (Becking, 1961). Elles ont besoin de molybdène, de fer et de Magnésium pour la fixation de l'azote atmosphérique. Le CaCO<sub>3</sub> inhibe la croissance des *Beijerinckia*.

### Phylogénétique.

Elles possèdent un ADN circulaire.

### Culture

La température de **croissance est de 10 à 35°C.**

**Croissance sur gélose (+).**

**Milieux pour les *Beijerinckia* :**

Glucose 20g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g ; amener à pH 7 ; QSP 1000 ml.

### Milieux particulier pour le *Beijerinckia derxii* :

- Mannitol 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g, CaCO<sub>3</sub> 0.5 g, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.005 g, FeCl<sub>3</sub> et Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O traces ; agar 15.0% ; QSP 1 000 ml.
- Amidon 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.02 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15 g, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.1 g, FeCl<sub>3</sub> solution aqueuse à 10 % une goutte, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.002 g, Bleu de bromothymol solution à 0.5 % dans éthanol 0.5 ml, Agar 20 % ; QSP 1 000 ml.

### Environnement

Les *Beijerinckia* sont des bactéries importantes dans les sols acides ont été retenus, mais pourtant trouvé aussi dans des sols alcalins. Elles jouent un grand rôle dans la croissance des plantes en raison de son métabolisme et son pouvoir de fixation de l'azote atmosphérique. Elles peuvent survivre au froid, ceci les rendant idéales pour les régions tempérées, connaissant le gel saisonnier. Elles produisent des boues facilitant la rétention de l'eau dans le sol des forêts tropicales. Elles sécrètent des pigments ayant leurs importances dans la stimulation d'autres microbismes dans l'environnement. Les boues de polysaccharides peuvent protéger la Nitrogénase de l'oxydation atmosphérique.

Chez le *B. derxii* est capable de stimuler la croissance des plantes en libérant des stimulateurs comme l'acide indolacétique (IAA), l'éthylène, des polyamines et certains acides aminés dans le sol. Il a été montré que chez le riz l'augmentation du nombre de *B. derxii* avait une action bénéfique sur la croissance de celui-ci. Des occurrences similaires ont été soulignées dans les sols de plantation de canne à sucre. Les *Beijerinckia* ont été isolés dans les rhizosphères et les phyllospères<sup>ttt</sup> des plantes.

#### 21.1.3.2.2 Genre *Methylocella* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Dedysh et coll, 2012

Dans la cavité de Sulzbrunn les *Methylocella* représentent respectivement sur le total des méthylothropes dans chacun des éléments de la grotte :

Snottites	<1 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	<1 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	Nd	
Eau de source minérale	Nd	
Eau de mélange	Nd	

**Classe *Alphaproteobacterium* type II** (total de la flore 1 %)

**Ordre *Rhizoliales* ; Famille *Beijerinckiaceae* ; Genre *Methylocella*** (Dedysh and coll., 2000)

### Morphologie

Cellule en forme de bâtonnet, non-pigmentée ; contrairement aux bactéries méthanotrophes ayant une seule membrane, le *Methylocella* en a plusieurs. Dans la membrane cytoplasmique on peut observer des inclusions vésiculaires coloration Gram (-). Le *Methylocella tundrae* est non-mobile ; fixateur de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>).

***Methylocella palustris*<sup>205</sup>** : bactéries aérobies, Gram négatif, incolore, non motiles, en forme de bâtonnets incurvés, se multipliant par division cellulaire normale et contenant des granules de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate intracellulaires (un à chaque pôle). Le système de membrane intracytoplasmique est différent en fonction des cellules de type I et II méthanotrophes. Les cellules contiennent un vaste espace périplasmique et un système de membrane vésiculaire relié à la membrane cytoplasmique.

### Métabolisme

Le *Methylocella* est une bactérie aérobie, ayant pour activité l'oxydation du méthane ; elle utilise la voie de la sérine pour l'assimilation du carbone.

<sup>ttt</sup> En microbiologie, la **phyllosphère** est l'ensemble des parties des plantes situées au-dessus du niveau du sol et considéré comme habitat pour les micro-organismes

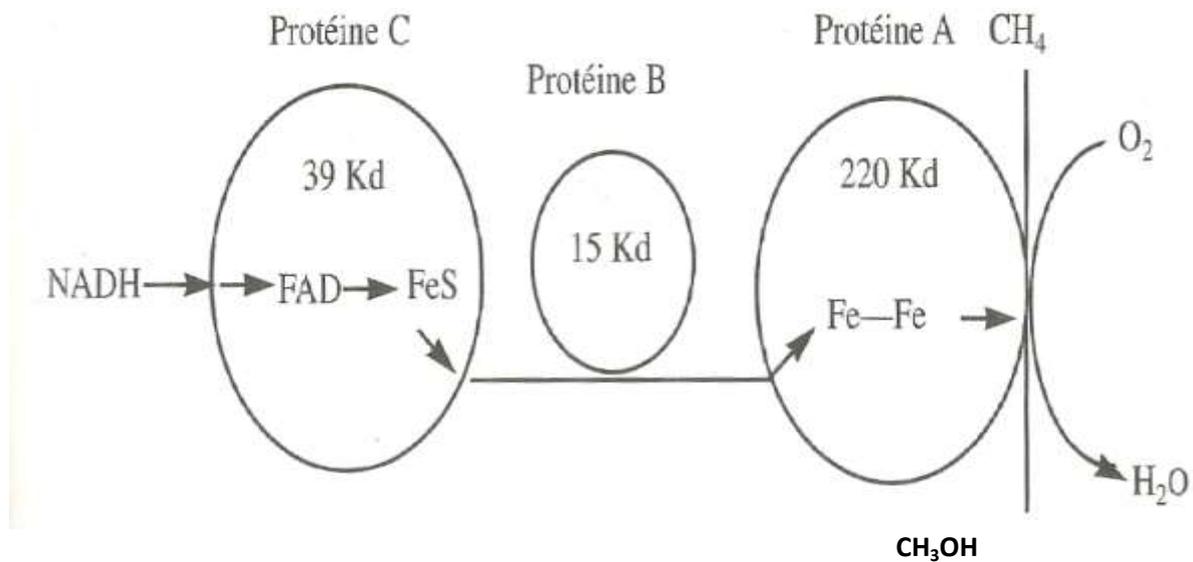
Sa composition en acides gras est : C14 : 0 = 2,6 \_ 4,1 ; C16 : 17c = 7,2 \_ 11,3 ; C16 : 0 = 7,2\_ 7,7 ; C17 : 0 (iso) =0,3 ; C17 : 18c = 0,0\_ 0,3 ; C17 : 16c =0,0 \_ 0,1 ; C17 : 0 cyclo = 5,0 \_ 6,5 ; C18 :0 = 0,4 \_ 0,6 ; C18 : 17c =59,2 \_ 61,7 ; C19 : 18c = 7,9 \_ 13,6 en % des acides gras.

L'acétate a été choisi comme le substrat modèle de multi-carbone parce qu'il s'agit d'un produit de fermentation dans les sols inondés.

Pour le *Methylocella palustris*<sup>206</sup> les principaux phospholipides des acides gras sont des acides : C 18 : 1.

### Rôle des facteurs NADH, FAD, FeS dans l'action de la mono-oxygénase

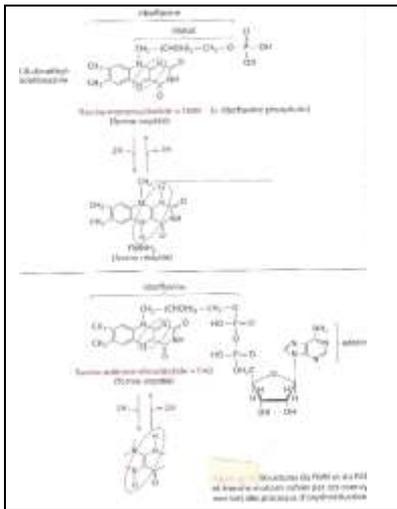
Le fer, NADH, FAD, jouent un rôle important dans l'oxydation du méthane en alcool méthylique.



### Composants de la méthane-mono-oxygénase

Jean Paul Larpent, *Mémento technique de microbiologie*, éd. TEC-DOC, 1997 ; p 315

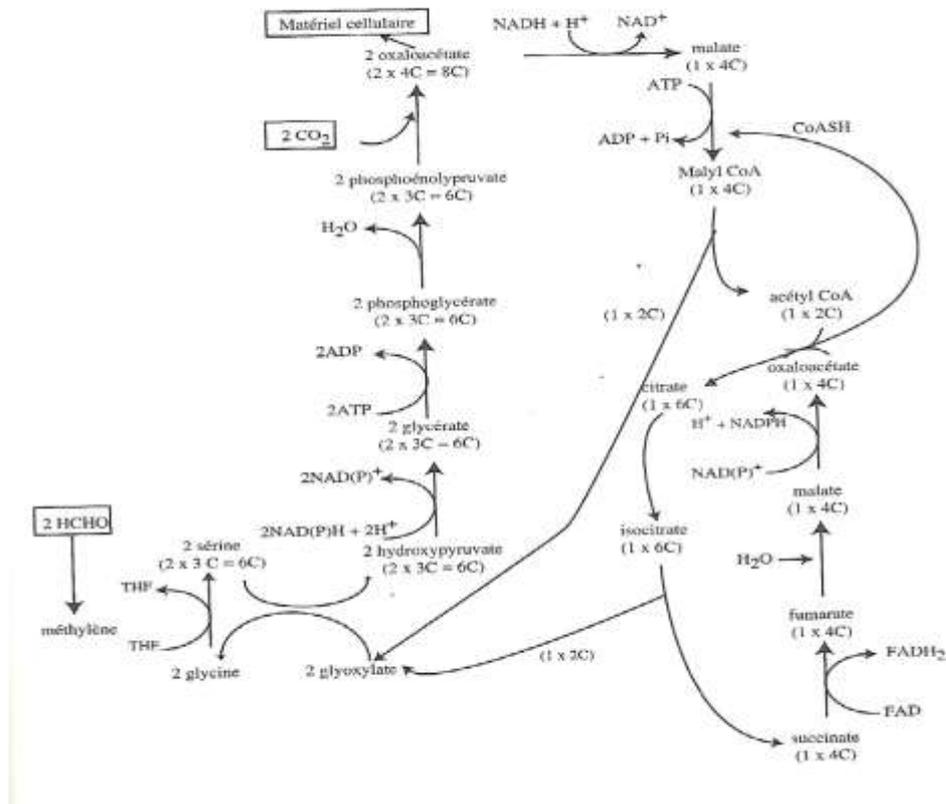
	<p><b>Le NADH « Nicotinamide Adénine Dinucléotide »</b></p> <p>C'est une enzyme présente dans toutes les cellules vivantes. Il s'agit d'un dinucléotide dans la mesure où la molécule est constituée d'un premier nucléotide, dont la base nucléotidique est l'adénine, uni à un second nucléotide, dont la base est le nicotinamide. Le NAD existe soit sous la forme oxydée, notée <math>NAD^+</math>, soit sous la forme réduite, notée NADH.</p> <p>NAD intervient dans tous les transports d'électrons dans les réactions d'oxydo-réduction.</p> <p>Le NAD peut être synthétisé <i>in vivo</i> à partir du tryptophane et de l'aspartate, deux acides aminés protéinogènes, ainsi que la vitamine B<sub>3</sub> (niacine). NAD est également convertie en nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP).</p>
--	--



### Le FAD « Flavine Adénine Dinucléotide »

Le Flavine Mono Nucléotide (FMN) et le Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) sont des coenzymes de déshydrogénase souvent appelées flavoprotéines ou ferments jaunes (ex : le ferment jaune respiratoire de Warburg) en raison de leur coloration, due au groupement chromophore constitué par le système de double liaison conjuguées du noyau flavine. Il est un coenzyme proche de la vitamine B<sub>2</sub>, mais ne contient pas de D-ribose remplacé par le D-ribitol (un pinta alcool), ce n'est donc pas véritablement un nucléotide. La structure du FMN « Flavine Nono Nucléotide » est transformée en FAD lors des procédures d'oxydo-réduction.

Contrairement au NAD et au NADP, le FMN et le FAD sont très fortement liés au site actif de la déshydrogénase correspondante. Il n'y a donc pas de dissociation du coenzyme de l'enzyme.



Voie de la Sérine pour les bactéries de type II ; de l'assimilation du formaldéhyde.

Méthanotrophisme de type II

Jean Paul Larpent, *Mémento technique de microbiologie*, éd. TEC-DOC, 1997

### Phylogénétique

Elles ne sont pas monophylétiques (groupe dont toutes les espèces sont représentées par un seul membre) dans l'embranchement des *Alphaproteobacteria* du type II.

Elles sont précédemment connues comme des méthanotrophes des genres *Methylosinus* et *Methylocystis*. Au lieu de cela, les espèces de *Methylocella* sont étroitement liées aux non-méthanotrophes hétérotrophes comme *Beijerinckia indica* (les méthanotrophes sont souvent)

L'espèce *Methylocella* (s), ont une morphologie différente de tous les autres méthanotrophes.

Cette spécificité vient du fait qu'il n'y a encore aucune preuve que l'espèce *Methylocella* possède l'enzyme monooxygénase (*pMMO*) de méthane, particule trouvée dans toutes les autres bactéries méthanotrophes<sup>207</sup>. Au lieu de cela, l'espèce *Methylocella* semble posséder seulement la forme

soluble de méthane monooxygénase (*sMMO*) étant un sous-ensemble des autres méthanotrophes. L'espèce *Methylocella* manque également d'un système bien développé de membrane intracytoplasmique lié à *pMMO* comme dans d'autres méthanotrophes, ayant une série moins extensive des vésicules membranaires adjacentes à la membrane interne de la cellule<sup>208,209,210</sup>.

**Particularité PCR ARNr s16 :** Pour l'identification on cible le gène *mmoX* codant une sous-unité de l'enzyme méthane mono-oxygénase. La teneur de ce gène est liée au nombre de cellules pendant la croissance du *Methylocella silvestris*, sur l'acétate ou le méthane<sup>211</sup>.

### Méthodologie de l'analyse et de l'identification par hybridation

**Identification :** se fait par l'hybridation sur cellules entières, avec sondes d'oligonucléotide fluorescent étiquetés ciblés ARNr 16 s, une étude a été effectuée sur une culture de *Methylocella silvestris* BL2 en atmosphère de méthane, avec un milieu contenant de l'acétate et du succinate.

La conception de l'hybridation cellulaire, par sonde et l'optimisation des conditions d'hybridation a été réalisée comme décrit plus haut.

Pour chaque préparation de cellules, deux sondes marquées avec différents colorants fluorescents ont été appliqués. Le premier, *Mcells-1023* (5'-TCCGCCAGCCTAACTGA-3'), a été développé spécifiquement pour la cible *Methylocella silvestris*, marqué par l'indicateur indo-carbocyanine pour l'agent (Cy3).

La deuxième sonde a été étiquetée avec le 5 6-carboxyfluorescéine-N-hydroxysuccinimide ester (FLUOS) et a été soit :

- Une sonde nouvellement conçue, ciblant aussi bien le *M. silvestris* et le *M. palustris*, *Mcell-1445* (5'-GCCTCTCCTTGCGGT-3').
- La bactérie universelle avec la sonde EUB338. Sondes Oligo-nucléotidiques furent achetées chez MWG Biotech (Ebersberg, Allemagne).
- Les sondes de l'oligonucléotide, *Mcells-1023*, *Mcell-1445*, ont été développés à l'aide de l'outil consistant en l'utilisation « des paquets de sondes ARB » (version 2. 5 b, disponible et la spécificité des cibles de ces sondes a été vérifiée en utilisant l'outil de correspondance aux bases de données Ribosomal (sondes témoins permettant la vérification de l'hybridation).

La fixation de la cellule et l'hybridation des sondes étiquetées pour les oligonucléotides fluorescents ont été réalisés comme décrit plus haut<sup>212</sup>.

Pour l'optimisation des conditions spécifiques de l'hybridation, *Beijerinckia indica subsp indica* et *Azorhizobium caulinodans* ont servi comme organismes de contrôle non-ciblés, ils affichent respectivement le plus petit nombre d'incompatibilités dans les régions cibles des sondes *Mcells-1023* et *Mcell-1445*. (Le témoin, ne doit pas interférer dans les régions ciblées de la sonde, avec les sondes d'oligonucléotides).

La température optimale de l'hybridation, fournissant la spécificité élevée de la cible est de 50° C.

Les préparations cellulaires ont été examinées au microscope Zeiss Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Allemagne) équipés de filtres légers 41001 AHF/AF (AHF Analysentechnik, Tübingen, Allemagne) pour les sondes marquées FLUOS et AHF/F 41007 pour sondes marquées Cy3. La même procédure a été utilisée pour examiner la pureté du méthane, acétate et succinate des cultures de *Methylocella palustris* K<sup>213214</sup>, à l'aide de la sonde de *palustris*-spécifique de *M. Mcell-1026* au lieu de *Mcells-1023*<sup>215</sup>.

**Méthode d'analyses moléculaires :** l'ADN devant servir au clonage a été extrait à l'aide d'une procédure de rupture mécanique. Une partie du gène de l'ARNr 16 s a été amplifiée par PCR avec des amorces universelles bactériennes ciblant les *Escherichia coli* postes 907 à 926 ; 1513 à 1494<sup>216</sup>.

Les produits ont été clonés dans *Escherichia coli* en utilisant le TOPO TA, d'un clonage kit (Invitrogen, Karlsruhe, Allemagne)<sup>217</sup>.

Une amplification PCR directe issue de clones positifs en utilisant les amorces de vecteur selon les instructions du fabricant.

Les produits PCR ont été purifiés à l'aide de la trousse de purification *QIAquick PCR* (QIAGEN, Hilden, Allemagne)<sup>218</sup> et permettant le séquençement (d'au-moins 550 paires de bases) sur un séquenceur d'ADN 377 ABI avec BigDye chimie de terminator (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Allemagne).

Pour réaliser une extraction maximale de l'ADN pour PCR quantitative, les montants de 2 ml de la culture étant lysée en combinant la perturbation mécanique cellulaire avec l'incubation de la protéinase K et trois cycles de congélation rapide en N<sub>2</sub> liquide suivie du dégel<sup>166</sup>.

Une extraction par le phénol-chloroforme<sup>174</sup> a été effectuée ensuite dans des tubes de 2 ml « Gel de verrouillage de Phase » (Eppendorf). (Extraction de phases aqueuses et de la phase du solvant).

Pour chaque extrait, la PCR quantitative en temps réel basé sur « SybrGreen » détection a été réalisée en trois exemplaires sur un je-Cycler (Bio-Rad, Munich, Allemagne), en utilisant les principes de détection et de mélanges PCR décrites précédemment. Un fragment du gène 16 s ARNr a été quantifié à l'aide des amorces universelles ciblant tous les membres de la bactérie.

Un gène de *mmoX* (codant pour une sous-unité soluble du méthane monoxygénase), le fragment a été quantifiée à l'aide de l'apprêt « mmoXB-1401b » en combinaison avec une amorce vers « (mmoX-ms-945f, 5'-TGGGGCGCAATCTGGAT-3') » dans un triple PCR consistant en une dénaturation par la procédure suivante de :

- Trois minutes à 94° C,
- Suivie de 45 cycles d'une minute de dénaturation à 94° C,
- Puis une minute de recuit à 50° C
- Une minute d'allongement à 72° C.

L'identité des produits a été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose avec un séquençage. Les étalons ont été préparés à partir des séries de dilution des produits PCR des 16 gènes ARNr et « *mmoX* » de *Methylocella silvestris*<sup>219</sup>.

### Similarité par identification de ARNr S16

Les similarités phylogénétiques des *Methylocella* entre les espèces :

Le *M. tundrae* ayant une similarité avec le *M. palustris* de (97 %) ;

Le *M. tundrae* ayant une similarité avec le *M. silvestris* de (97,5 %).

Similarité ADN \_ par l'hybridation T4 du *M. palustris* K<sup>T</sup> et du *M. silvestris* (respectivement 27 % et 32 %). Une nouvelle espèce, *Methylocella palustris*<sup>220</sup>, sont proposées pour trois souches de bactéries oxydant le méthane isolé des sphaignes des tourbières acides.

Les trois souches sont plus étroitement liées à la bactérie hétérotrophe acidophile *Beijerinckia indica subsp indica* (96,5 % de similarité de séquence, par la méthode 16 s ADNr). Il a été décidé collectivement de créer une nouvelle espèce *Methylocella palustris* Gen. nov., SP. nov. ; souche *KT* (= ATCC 700799T).

### Culture

Caractéristiques culturales : température de développement 5 à 28° C (op. 15 à 20° C) ; pH 4,2 à 7,5. (op. 5 à 5,5) ; les souches se sont développées uniquement sur supports à faible teneur en sel (0,2 à 0,5 g/l).

Cette bactérie est incapable de croître sur des substrats contenant des liaisons carbone-carbone ; cette bactérie est capable d'utiliser uniquement le méthane, le méthanol, ainsi que les acétates, pyruvates, les succinates, les malates et l'éthanol. Dans les cultures faites à ce jour les acétates et le méthane ont été utilisés comme substrat avec une souche BL2 de *Methylocella silvestri*. Le rendement de convection du carbone et les taux de croissance étaient plus élevés sur une culture sur acétate que par une culture dans le méthane. Le *Methylocella silvestris* souche BL2 se développe de manière plus robuste et l'acétate a été choisi, car il est présent dans les sols inondés<sup>221</sup>.

L'utilisation de l'acétate de substrats de carbone, le pyruvate, succinate, malate et éthanol par *Methylocella silvestris* BL2T (= DSM 15510T = NCIMB 13906T), *Methylocella palustris* KT (= ATCC 700799T), *Methylocella tundrae* T4T (= DSM 15673T = NCIMB 13949T) et *Methylocapsa acidiphila* B2 (= DSM 13967T = NCIMB13765T) ont été testés de la même manière que les autres habitudes d'utilisation de substrat, pour descriptions taxonomiques des organismes.

### Milieu

D'autres cultures ont été faites sur acétate pour le *Methylocella silvestris* BL2 en utilisant le milieu basal de sels DNMS (nitrate diluée des sels minéraux, pH 5,8).

Pour les essais de courbe de croissance, les cultures sont cultivées sur 400 ml de milieu dans 1 litre de gaz dans un erlenmeyer (fioles avec bouchons en silicone).

Les cultures furent incubées à 25° C sous agitation dans un agitateur rotatif à 120 tr/min.

### Écologie et environnement

Récemment, de nouvelles espèces méthanotrophes ont été isolées de la tourbe acide, de forêt et de toundra des sols, respectivement :

- *Methylocella palustris*<sup>222,223</sup>
- *Methylocella silvestris*
- *Methylocella tundrae*<sup>224</sup>

Avec *Methylocapsa acidiphila*<sup>225</sup>, ces espèces forment un groupe taxonomique distinct d'acidophiles, les bactéries méthanotrophiques.

Les bactéries méthanotrophes occupent une position clé dans le cycle global du méthane. Dans les sols inondés et les zones humides à l'interface (eau et air) leurs activités limitent le potentiel d'efflux de méthane dans l'atmosphère, dans les sols et les terres bien aérés<sup>226,227</sup>. Ces bactéries consomment directement le méthane atmosphérique<sup>228,229</sup>. Ce méthane sera transformé en acétate étant utilisé par la bactérie lorsque le méthane sera déficitaire. La bactérie consomme de préférence l'acétate comme source d'énergie.

Les *Methylocella* : actuellement nous connaissons 11 genres de bactéries méthanotrophes avec des tolérances environnementales diverses et des propriétés biochimiques spécifiques. Mais une spécificité commune à tous est l'incapacité de se développer sur des substrats contenant des liaisons carbone – carbone. La croissance est limitée pour le méthane, le méthanol et dans certain cas formate, formaldéhyde et méthylamine. Une étude avec l'utilisation du carbone <sup>14</sup>C a montré que de petites quantités d'acides organiques peuvent être utilisées comme source d'énergie par ces bactéries<sup>230</sup>.

### Nouvelles espèces de méthanotrophe du genre *Methylocella*

- *Methylocella palustris*, bactérie méthanol-oxydante acidophile (Dedysh, S. N., W. Liesack and all.) ; la teneur de l'ADN-ADN en (G + C) est de 61,2 moles %.
- *Methylocella silvestris*<sup>231</sup>, bactérie méthanotrophe isolée des forêts à cambio-sol.
- *Methylocella tundrae*<sup>232</sup>, ayant été isolée de la tourbe acide des forêts et dans la toundra (Dedysh, S. N., Y. Y. Berestovskaya and all.) ; la teneur de l'ADN-ADN du *M. tundrae* a un C + G de 63,3 mol%.
- *Methylocella acidiphila*, espèce formant un groupe taxonomique acidophile des bactéries méthanotrophiques. Bactérie ayant une activité méthanol-oxydant et fixant l'azote (N<sub>2</sub>) atmosphérique (V. N. Khmelenina, N. E. Suzina and all.).

### Généralités sur la fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries

Les bactéries fixant l'azote atmosphérique comme les *Azotobacter* produisent des cystes, mais pas les *Azomonas*. La nitrogénase est un système complexe formé de deux composants protéiques majeurs :

- Une protéine Mo-Fe (MM = 220000 Da) liée à une ou deux protéines Fe (MM = 64000 Da).
- La protéine Mo-Fe contenant 2 atomes de molybdène et 28 à 32 atomes de fer.

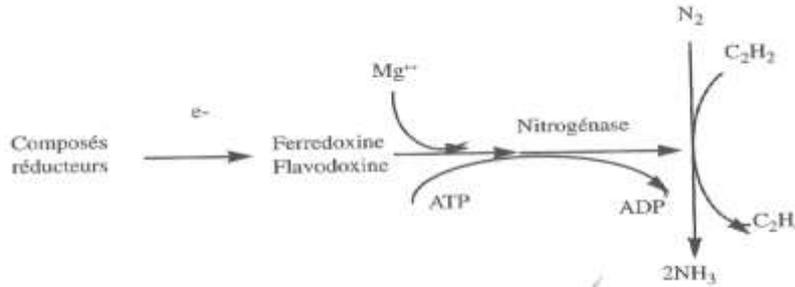
La protéine Fe a 4 atomes de fer. La protéine Fe est d'abord réduite par la ferrédoxine puis se lie à l'ATP. La liaison avec l'ATP diminue le potentiel de réduction de la protéine Fe lui permettant aussi de réduire la protéine Mo-Fe. L'ATP est hydrolysée lors de ce transfert d'électrons. Finalement la protéine Mo-Fe réduite donne des électrons à l'azote atomique.

Les *Azotobacter* privés de molybdène produisent une nitrogénase à vanadium comme chez le *Klebsiella*. 17 gènes Nif ont été identifiés (le molybdène est un cofacteur de la nitrogénase, en son absence l'*Azotobacter* produit une nitrogénase ayant comme cofacteur du molybdène)<sup>233</sup>.

## Le bilan général de la fixation de l'azote atmosphérique



### Ferrédoxine réduite

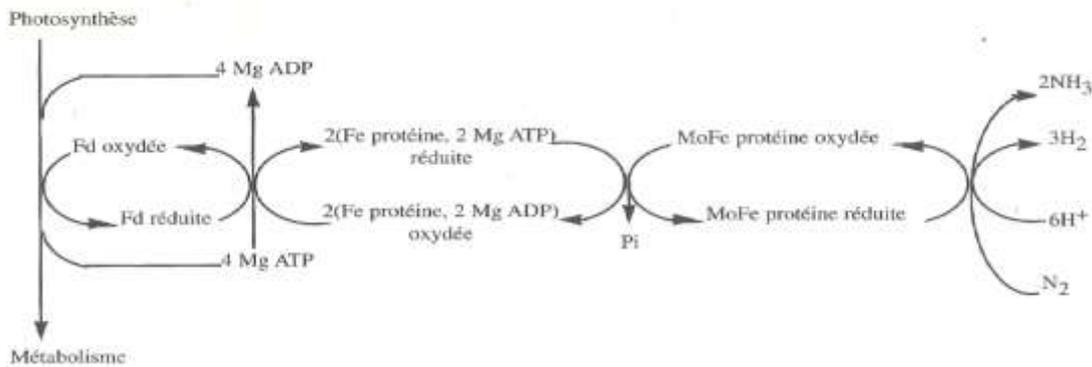


### Fixation de l'azote atmosphérique

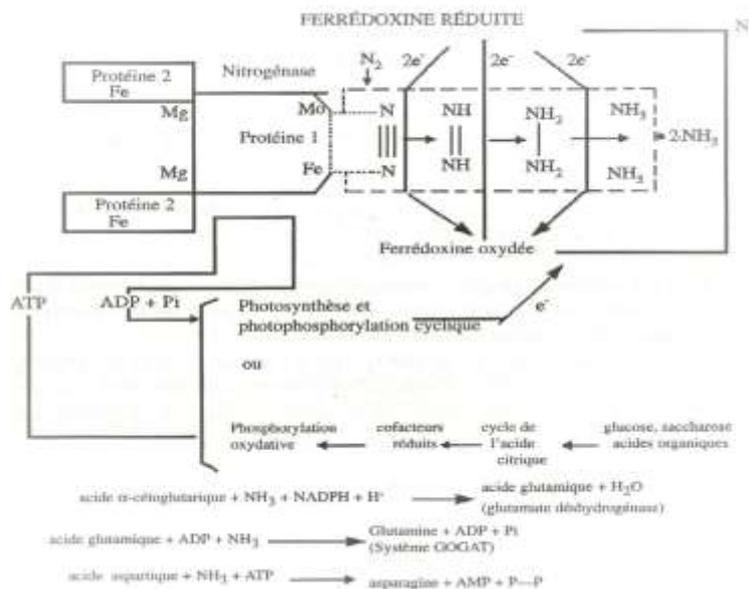
#### Fixation de l'azote atmosphérique dans différentes espèces :

Les *Frankia*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Nostoc* fixe l'azote par l'intermédiaire de la photosynthèse

Les lichens sont la résultante de la symbiose entre des algues et des fongiques. Certaines espèces sont fixatrices d'azote si l'algue est une *Cyanobactérie* fixatrice d'azote<sup>234</sup>.



Jean Paul Larpent, *Mémento technique de microbiologie*, éd. TEC-DOC, 1990 ; p.659



#### Fixation de l'azote par intermédiaire de la Nitrogénase et par réduction de la ferrédoxine

Jean Paul LARPENT, *Mémento technique de microbiologie*, éd. TEC-DOC, 1997

## Répartition du caractère nitrogénase chez les bactéries (hormis les *Cyanobactéries*)

Proteobacteria	Genres	
	α	<i>Beijerinckia, Xanthobacter, Bradyrhizobium, Rhizobium, Rhodimicrobium, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Aquaspirillum, Azospirillum.</i>
β	<i>Derxia, Vitreoscilla, Methylomonas, Aquaspirillum, Thiobacillus, Alcaligenes.</i>	
γ	<i>Azotobacter, Azomonas, Beggiatoa, Thiobrix, Amoebobacter, Chromatium, Ectothiorhodospira, Thiocapsa, Thiocystis, Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Erwinia, Vibrio, Alcaligenes.</i>	
δ	<i>Desulfovibrio.</i>	
Gram positif	G + C élevé	<i>Arthrobacter, Frankia.</i>
	G + C bas	<i>Bacillus, Clostridium.</i>

Jean Paul LARPENT, *Mémento technique de microbiologie*, éd. TEC-DOC, 1990 ; p.301

### Environnement

Les *Methylocella* étant des germes de tourbières humides ou dans les sols inondés<sup>235</sup> et les zones humides à l'interface (eau et air), l'origine de cette bactérie dans cette cavité pourrait venir des molasses alpines ayant recouvert la zone marine côtière. C'est peut-être cela, avec le fait que cette bactérie est aérobie, expliquant la faible présence de cette flore dans la grotte<sup>236</sup>

### Biotechnologie

Sur le plan biotechnologique, le *Methylocella* a beaucoup d'intérêt :

- Par le fait que cette bactérie est aérobie (elle peut être cultivée dans les fermenteurs classiques, et peut de ce fait être cultivée et commercialisée).
- Elle peut servir pour la fabrication de la nitrogénase, pouvant être entrée dans la fabrication de réacteurs enzymatiques et à la production d'hydrogène.

#### 21.1.3.2.3 Genre *Methylosula* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Berestovskaya et coll., 2012

Dans la cavité de Sulzbrunn les *Methylosula* représentent sur le total des méthylophiles dans chacun des structures de la grotte :

Snottites	1 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	1 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	Nd	
Eau de source minérale	Nd	
Eau de mélange	Nd	

### Ordre *Rhizobiales* ; Famille *Beijerinckiaceae* ; Genre *Methylosula*

#### Morphologie

Trois souches de bactéries Gram négatifs, aérobies, motiles possédant des flagelles bipolaires ont été isolées dans ce genre (souches V-022 T, Ch-022, Ju 022). Les cellules sont en forme de bâtonnet, 0,5 à 0,6 µm de largeur et 1,3 à 4,5 µm de longueur et se reproduisent par fission irrégulière. La teneur de l'ADN\_ADN en G + C de la souche V-022(T) a été de 65,2 % de mol.

#### Caractéristiques

C'est une bactérie aérobie, méthylophile, utilisant un carbone, tels que méthane, méthanol et amines méthylées. Beaucoup de souches connues de bactéries dites méthanotrophes utilisent des composés ne contenant aucune liaison carbone – carbone (Lidstrom, 2006 ; Bowman et al., 1997 ; Bodrossy et coll., 1997). Cependant, une variété d'organismes est connue, comme pouvant se développer facultativement soit sur composés multi carbones soit sur composés mono carbone (Doronina et al., 1998 ; Lidstrom, 2006 ; Dedysh et al., 2005 a)<sup>237</sup>.

Traditionnellement, la fonction principale, des méthylotrophes aérobies, est aussi méthanotrophe. Elle forme le principal récepteur biologique du méthane dans son cycle global (Sénum & Gaffney, 1985)<sup>238</sup>.

### Métabolisme

Ces bactéries hétérotrophes, aérobies, acidophiles<sup>239</sup>, présentent une activité méthano-oxydase, méthylotrophes facultatives, utilisant le méthanol, les méthylamines et un large éventail d'autres sources de carbone à des fins énergétiques tels que les sucres et polysaccharides, l'éthanol et les acides aminés.

Les isolats utilisent la voie de Calvin-Benson pour l'assimilation des composés de carbone et sont incapables de fixer l'azote. Les nouvelles souches ont été modérément acidophiles<sup>240</sup> et psychrotolérantes.

La composition en acides gras des membranes des souches du *Methylosula polaris* en pourcentage est la suivante :

C16; 0 iso = 0,7 % ; C16: 1 7c = 3,6 % ; C16: 1 5c = 6,8 % ; C16 ;0 = 6,5 % ; C17: 0 cyclo = 1,7; C17 :0 (iso) = 0,5 % ;

C18 : 0 (iso) = 0,3 % ; C18 ;1 7c = 66,7 % ; C18 : 0 = 1,7% ; C19 : 1 8c = 11,1 % ; C19 : 0 = 0,4 en % des acides gras extraites.

Les membranes contiennent des acides gras phospholipidiques C 18 :1 ω7c.

Cette composition est semblable à celle trouvée précédemment pour *Methylocella tundrae*<sup>241</sup> et *Methylocapsa acidiphila* (Dedysh et al., 2004)<sup>242,243</sup> avec de petites variations sur les C14 et C16.

Les différences métaboliques des sucres sur les différentes souches de *Methylosula polaris* sont dans le tableau suivant :

**Éléments métabolisés par l'espèce *Methylosula polaris***

Éléments De croissance	V-022	Ch - 022	Ju - 022
Tréhalose	+	+	-
Raffinose	+	-	+
Glycérol	+	-	+
Inositol	+	+	-
Éthanol	+	+	-
Isoleucine	+	+	-
Phénylalanine	+	-	+
Cystéine	-	+	-
Sérine	-	-	+
<b>ADN G+C contient (mol%)</b>	<b>65,2</b>	<b>64,0</b>	<b>65,0</b>

### Culture

Croissance sur une plage de pH de 4 à 7,8, optimale à un pH de 5,5 à 6. Température de croissance psychrotolérante de 4 à 30° C (optimum 20-25° C) arrêt de croissance à 30° C ; méthanol tolérant (0,1 à 0,5 % v/v) ; résiste à 0,1 à 0,5 % de NaCl, inhibé à 50 % avec 1,5 % de NaCl et arrêt de croissance à 2 % NaCl.

### Milieux de culture

Extrait de levure et extrait d'hydrolysate de caséine acide, acides aminés proline, histidine ou méthionine et sels d'acides organiques.

Le milieu utilisé par Berestovskaya et al., 2002, est le Pate Count Agar 2A + 0,5 Méthanol, incubé à 10° C dans une atmosphère 30 % méthane et 70 % d'air.

### Analyses génétiques

L'analyse de l'ARNr 16 s en PCR a révélé que les trois isolats V-022(T), Ch-022 et Ju-022, présentent

entre elles une similarité des séquences génétiques de 99,9 % et elles forment une nouvelle lignée au sein de la classe *Alphaproteobacteria*. Le nom ***Methylosula polaris*** est proposé pour accueillir cette nouvelle espèce avec les souches V-022(T) (= DSM 22001 (T) = VKM V-2385(T)) comme la souche type de l'espèce<sup>244</sup>.

### Environnement et écologie

***Methylosula*** a été isolée des sols humides et acides de la toundra près de la ville de Vorkouta et du Chukotka et dans la péninsule Lougorski en Russie où ont été mises en évidence les souches désignées par V-022(T), Ch-022 et Ju-022. Des bactéries méthylophiles ont aussi été observées dans les lacs hypersalés où le flux total des composés méthylés sont produits par la dégradation des osmolytes<sup>uuu</sup> (Sorokin et al., 2007)<sup>245</sup>.

### Habitat

Elle est très répandue dans les milieux naturels, se trouvant dans de nombreux habitats aquatiques et terrestres (Anthony, 1982 ; Bowman et al., 1997 ; Sorokin et al., 2007)

Récemment, il a été démontré que ces bactéries se développent en association avec des plantes et de ce fait deviennent une source d'émission de méthanol d'importance mondiale. Elles sont à l'origine d'usines de méthanol, elles utilisent jusqu'à 40 à 46 % du carbone total volatil dans l'atmosphère (MacDonald & al., 1993).

Il a été étudié une possibilité d'associations de plante-bactérie pour obtenir une participation de ces derniers dans le « cycle de méthanol » (Trotsenko et al., 2001)<sup>246</sup>. Ces observations nous montrent l'importance de cette flore méthanotrophique dans la lutte contre le réchauffement climatique par la diminution du taux de méthane atmosphérique<sup>247</sup>.

### Activité enzymatique du *Methylosula*

Les mesures de l'activité des enzymes clés du métabolisme des cellules cultivées formant la méthylamine montrent la présence de l'activité de méthylamine déshydrogénase et de formaldéhyde ayant été oxydé par la BA-dépendante formaldéhyde déshydrogénase en formiate.

**Activité enzymatique en mol/minute/mg de protéine**

Enzymes	Cofacteurs	Activité
Méthylamine déshydrogénase	PMS	90
Formaldéhyde déshydrogénase	NAD <sup>+</sup> NAD <sup>+</sup> , GSH	2 520
Formate déshydrogénase	NAD <sup>+</sup>	140
Hydroxy-pyruvate réductase	NAD <sup>+</sup>	Non identifié
3_Hexulose Phosphate synthétase		Non identifié
Ribulose 1,5, bis phosphate carboxylase		10

### Pathologie

À ce jour nous n'avons pas de publication sur les risques pathologiques liés à cette bactérie.

### Intérêt en biotechnologie

La problématique du traitement des ordures ménagères, étant à l'heure actuelle un problème majeur de notre société, soulève le problème des gaz méthaniques formés par la décomposition des produits organiques. À cela nous pouvons ajouter qu'avec le réchauffement climatique les résidus

<sup>uuu</sup> **Osmolytes** : petites molécules de matières organiques solubles dans la solution intracellulaire, jouant un rôle dans la lutte contre les stress liés à l'environnement. Dans de nombreux cas, les stress environnementaux menacent la stabilité de la conformation des protéines et donc divers osmolytes ont été sélectionnés pour stabiliser les macromolécules intracellulaires.

Les osmolytes peuvent être subdivisés en catégories :

- Glucides de petite taille (dont des sucres tels que le tréhalose, des polyols-glycérol, inositol, sorbitol, etc.)
- Acides aminés (glycine, proline, taurine, etc.)
- Méthylamines, NH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> (la méthylamine apparaît naturellement dans les processus de putréfaction et est un substrat de méthanisation. Elle est aussi un agent-tampon dans le lumen thylakoïdal des chloroplastes des plantes, siphonnant efficacement les protons nécessaires à l'ATP synthase).

Le rein est un exemple d'organe où l'effet des osmolytes est essentiel pour la survie de l'organisme. L'action de ces osmolytes permet de contrer les effets délétères de concentrations élevées d'urée et les variations de la salinité du milieu de tissus rénaux.

organiques végétaux dans les eaux stagnantes sont aussi une source de production de méthane. C'est pour cela que la biotechnologie doit se pencher sur la production de germes méthanotrophes<sup>vvv</sup>, afin de pouvoir réduire par l'ensemencement microbien la production de méthane dans des milieux naturels pouvant être des producteurs méthaniques<sup>248</sup>.

### 21.1.3.3 Famille *Methylobacteriaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Ito and Lizuka, 1971 ; Green and Bousfield, 1983

***Methylobacteriaceae*** : bactéries Gram (-) ; aérobie ; en forme de bâtonnet. La couleur rose très caractéristique de ses colonies est due aux caroténoïdes qu'elle produit. Elle produit également de la bactériochlorophylle.

Le seul genre ayant été actuellement défini dans cette famille est *Methylobacterium* étant divisé en deux groupes selon l'activité métabolique basse ou élevée des espèces. ***M. radiotolerans*** appartient au groupe à activité métabolique élevée.

**Genres dans cette famille :**

• <i>Meganema</i>	• <i>Microvirga</i>
• <i>Methylorubium</i>	• <i>Psychroglaciecola</i>
• <i>Methylobacterium</i>	

#### 21.1.3.3.1 Genre *Methylobacterium* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Ito and Lizuka, 1971 et Patt & coll., 1976.

Dans la cavité de Sulzbrunn le genre *Methylobacterium* représente respectivement le total de chacun des éléments de la grotte :

Snottites	1 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	1 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	Nd	
Eau de source minérale	Nd	
Eau de mélange	Nd	

### Ordre *Rhizobiales* ; Famille *Methylobacteriaceae* ; Genre *Methylobacterium*

Espèce dans la grotte : les espèces n'ont pas été définies.

#### Espèces connues

*Methylobacterium adhaesivum* ; *M. aminovorans* ; *M. aquaticum* ; *M. chloromethanicum* ; *M. dichloromethanicum* ; *M. extroquens* ; *M. fujisawaense* ; *M. hispanicum* ; *M. isbiliense* ; *M. lusitanum* ; *M. mesophilicum* ; *M. nodulans* ; *M. organophilum* ; *M. podarium* ; *M. populi* ; *M. radiotolerans* ; *M. rhodesianum* ; *M. rhodinum* ; *M. suomiens* ; *M. thiocyanatum* ; *M. variable* ; *M. zatmanii* ; *M. spp.*

#### Morphologie

Les ***Methylobacterium*** sont en forme de bâtonnet, membrane intracytoplasmique en faisceau de disques vésiculaires ; Sans membrane en paire périphérique ; Mobilité (±) ; bactérie aérobie ; cellule de repos cyste ; Gram (-) ; mono-flagellée.

#### Caractéristiques

Voie d'assimilation du carbone de type RMP ; ne fixe pas le CO<sub>2</sub> ; n'a pas de cycle TCA ; n'a pas de nitrogénase ; Croissance à 45°C (±) ; sa teneur de l'ADN-ADN en C+G est de 50-54 mol% selon les espèces.

<sup>vvv</sup> **Méthanotrophes** : bactéries qui sont capables d'oxyder le méthane pour le transformer en acide formique, mais elles ne peuvent utiliser comme source de carbone que les molécules qui ont un seul atome de carbone (méthane, alcool méthylique, CO<sub>2</sub>...).

**Méthylotrophes** : bactéries qui oxydent le méthane mais qui peuvent utiliser d'autres sources de carbone pour produire leur énergie vitale.

## Morphologie différentielle

Groupes :

Type I : *Methylomonas*, *Methylobacterium*

Type II : ***Methylococcus capsulatus***

Type III : *Methylosinus*, *Methylocystis*

Caractéristiques	Groupes		
	Type I	Type II	Type III
<b>Morphologie</b>	Bâtonnet	Coque	Bâtonnet droit ou incurvé pyriforme
<b>Membranes intracytoplasmiques</b>			
• Faisceau de disques vésiculaires	(+)	(+)	(-)
• Membranes en paires périphériques	(-)	(-)	(+)
	(±)	(-)	(±)
Mobilité	Cyste	Cyste	Cyste
Cellule de repos	RMP	RMP	Sérine
Voie d'assimilation du C	(-)	(+)	(-)
Fixation du CO <sub>2</sub>	(-)	(-)	(+)
Cycle TCA complet	(-)	(+)	(+)
Nitrogénase	(-)	(+)	(+)
Croissance à 45 °C	50 - 54	62.5	61.7 – 63.1
C + G mol %			

## Caractérisation des espèces de *Methylobacterium*

- ***Methylobacterium podarium*** : considéré comme faisant partie de la flore commensale de l'Homme, il est présent sur les pieds et il peut même vivre à l'intérieur de la bouche.
- ***Methylobacterium thiocyanatum*** : a été isolé dans des plaques sur la langue et dans la partie sous gingivale humaine.
- ***Methylobacterium mesphilium*** et ***M. zatmanii*** : opportuniste pathogène chez les patients immunodéprimés. Cette bactérie résiste à la chloration. Elle a été isolée dans les eaux suite à différente enquête de pseudo-foyer dans les centres dentaires et de prélèvement de sang. Cette observation a incité les centres hospitaliers à faire des contrôles sur leurs eaux de consommation.
- ***Methylobacterium fujisawaense*** : caractéristique catalase (+) ; oxydase (-) ; méthylo-trophique facultative. Pathologie : cette bactérie n'est pas considérée comme pathogène mais dans certains cas elle peut le devenir chez les immunodéprimés.
- ***Methylobacterium radiotolerans*** : les *Methylobacterium* sont divisés en deux groupes l'un avec une activité lente, l'autre une activité rapide. Le ***M. Radiotolerans*** fait partie des germes à activité rapide.
- ***Methylobacterium extorquens*** : il est impliqué dans la fixation de l'azote atmosphérique pour le développement des plantes légumineuses.

## Métabolisme

La voie d'alimentation du *Methylobacterium* en carbone est du type RMP (Ribulose monophosphate pour l'assimilation du formaldéhyde par la bactérie) ; ne fixe pas le CO<sub>2</sub> ; Cycle TAC complet (-) ; Nitrogénase (-) ; produit des bactériochlorophylles.

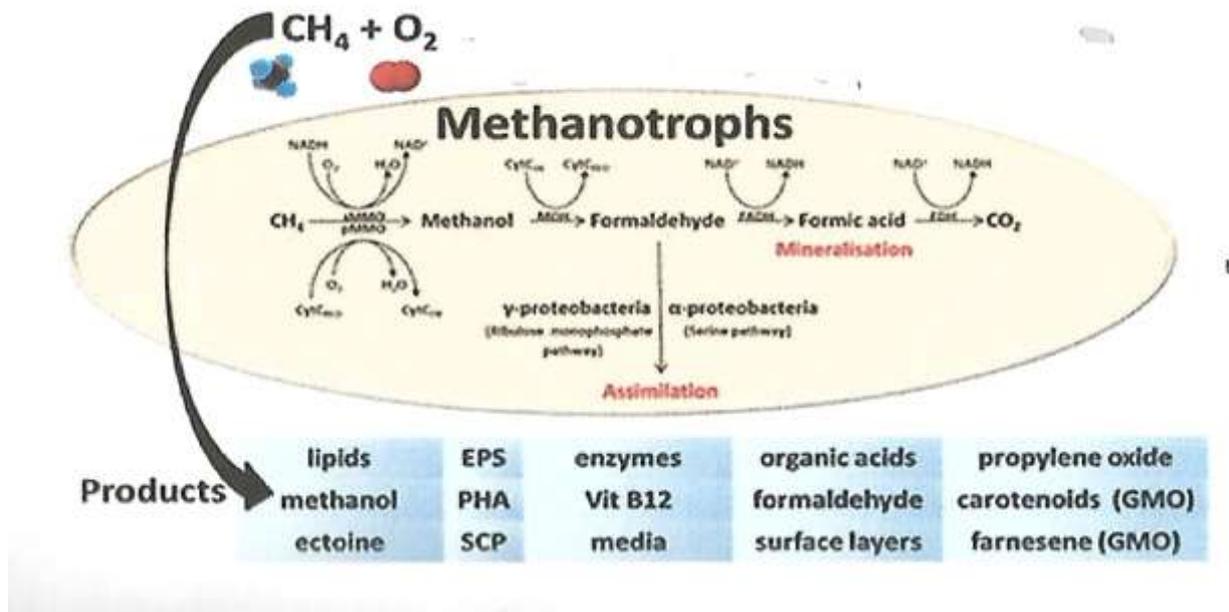
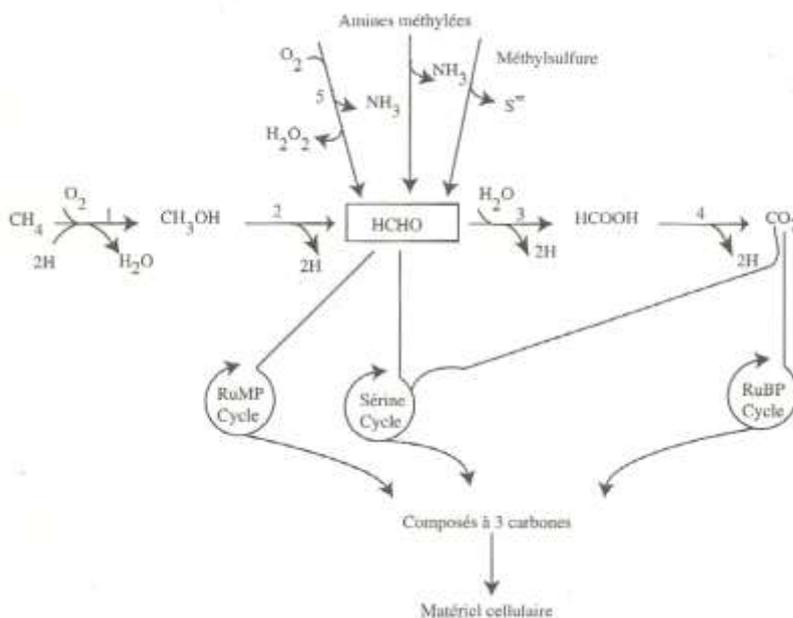


Schéma présenté par P.J. HYPERLINK, Copyright ©2015 American Chemical Society).

Les bactéries *Methylobacterium* ont deux types d'activités métaboliques, soit fortes ou faibles selon les espèces. Elles utilisent le méthanol étant produit par les plantes et stimule la germination des plantes, peut-être par la production de phytohormones. Les *Methylobacterium* sont méthylotrophes facultatifs c'est-à-dire qu'ils peuvent métaboliser les liaisons carbone-carbone avec un ou plusieurs atomes (Chistoserdova and al.). Elles sont méthantrophes, elles oxydent le méthane avec l'oxygène de l'air et utilisent le carbone du méthane comme énergie.

### Cycle RuMP

Le 3 ribulose + 3 HCHO  $\Rightarrow$  3 fructose-6-phosphate  $\Rightarrow$  Fructose 1-6 bisphosphate via ATP / ADP  $\Rightarrow$  2 glycéraldéhydes – 3 phosphates (2\*3 C)  $\Rightarrow$  matériel cellulaire.



### Métabolisme des composés à 1 carbone par les bactéries aérobies méthylotrophes

Jean Paul LARPENT, *Mémento technique de microbiologie*, éd. TEC-DOC, 1997 ; p 315

Les bactéries méthylotrophes sont des micro-organismes croissant sur un composé n'ayant pas de liaison C-C, donc seulement sur les substrats en C1 tel que :

Méthane, Méthanol, Les méthylées aminés, comme le diméthyl-sulfoxyde et le diméthyl-sulfure). Parmi les bactéries susceptibles de se développer sur le méthanol, il existe cependant des espèces pouvant se développer sur des composés à plusieurs carbones.

Les bactéries pouvant se développer sur le méthane (donc sur le méthanol) grâce à une méthane monoxygénase :

*Methylobacterium*

*Methylomonas*

*Methylococcus*

Les bactéries utilisant seulement le méthanol sont :

*Methylococcus*

*Methylophaga*

*Methylophilus*

Les bactéries méthylo trophes utilisant facultativement de composés en C-C :

*Hyphomicrobium*

*Rhodomicrobium*

*Rhodopseudomonas*

*Mycrobacterium*

*Bacillus*.

### Phylogénétique

Teneur de l'ADN-ADN en (C+ G) est de 50 - 54 moles %

**Structure du génome :** Le *Methylobacterium extroquens* a été partiellement séquencé et il a des similarités avec des gènes impliqués dans l'assimilation végétale des *Rhizobium* et des *Agrobacterium* (Lidstrom et Chistoserdova, 2002).

### Milieu vital

Le *Methylobacterium* est une bactérie se trouvant principalement dans le sol, les feuilles et d'autres parties de la plante (Lidstrom et Chistoserdova, 2002) ; elle peut être commensale à l'Homme (sur les pieds). Par son caractère d'oxydant du méthane on peut la trouver dans des champs de culture du riz et dans les zones humides de dégradation animale ou végétale (Eller and Frenzel, 2001).

### Culture

Croissance (+) à 45° C ; donnant des colonies de couleur rose due à sa production de caroténoïde ; avec l'incubation prolongée, donne des colonies de teinte corail ; la micrographie électronique des colonies *Methylobacterium* souche *FM4* révèle un film couvrant la colonie (Anesti and al.).

Les *Methylobacterium* poussent sur des milieux contenant de la méthylamine, du méthanol, et des molécules contenant des liaisons C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>.

**Milieu :** Agar media (TSA et R 2A) ; Ce sont des bactéries à croissance lente.

### Environnement et écologie

Problèmes techniques des *Methylobacterium* : ils forment des tapis ayant une forte cohésion à l'interface entre l'eau et les carburants bruts, comme il peut se produire dans les tanks de stockage de carburant ou dans les tanks de distillats de mazout ou les réservoirs de moteurs diesels.

Ces chimio-films ayant pour origine la formation de biofilms présentent des problèmes potentiels dans les filtres et les injecteurs étant souvent à l'origine de pannes. Les biofilms sont généralement riches en azote, lorsque l'on retire de ceux-ci la phase polaire (phase hydrophile) les biofilms sont également éliminés. La constitution du biofilm a un faible pourcentage d'huile (composée apolaire) avec un large éventail de composés polaires tel que les acides gras et les N-hétérocycles.

### Aspect agronomique du *Methylobacterium*

Une souche a été trouvée pour produire de la zéatine (hormone végétale du riz) cytokinine par le biais de la production de phytohormones, d'autres souches sont connues pour produire des indoles acétiques. Il a été montré que des souches pouvaient fixer l'azote atmosphérique dans le sol par des

modules racinaires avec les légumineuses comme pour les *Rhizobium* (symbiose de racines avec les bactéries).

Une souche de *Methylobacterium* a été décelée comme endosymbiote dans les cellules des bourgeons de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) on pense que cette présence a un rôle dans la floraison de la plante.

### **Écologie et réchauffement climatique, rôle du *Methylobacterium***

La production du riz contribue pour 20 % de l'émission globale en méthane dans l'atmosphère.

La croissance démographique des trente prochaines années va augmenter de 60 % le dégagement de ce gaz à effet de serre. Par conséquent les germes méthanotrophes sont un moyen de lutter contre cette montée des gaz méthaniques (*Les fenêtres de Chiang Mai*, Thaïlande).

Il est important d'étudier et de produire des germes méthanotrophes susceptibles de se développer dans divers milieux, afin d'avoir une efficacité optimale dans l'oxydation du méthane atmosphérique pour l'équilibre de l'écosystème.

Nous avons :

- Les *Methylobacterium* ayant par leurs caractères hétérotrophes, la possibilité d'être relativement malléables et cultivables.
- Les *Methylosorus* demandant des températures de développement relativement basses.
- Les *Methylocella* demandant une concentration en méthane atmosphérique relativement élevée.

D'autres types de méthanotrophes des familles de *Methylococcaceae* et *Methylobacteriaceae* peuvent être utilisées à cet effet, il faut donc voir dans cette flore quels sont les germes les mieux adaptés permettant une utilisation facile et un rendement d'oxydation maximum du méthane.

Davantage de recherches sur les méthanotrophes doivent être faites afin de mieux comprendre leur développement et la complexité de leurs moyens d'action sur l'oxydation des gaz afin de définir une préférence écologique parmi les flores méthanotrophes existantes (Eller and Frenzel, 2001).

Les méthanotrophes peuvent produire des protéines monocellulaires, biopolymères, composants pour applications nanotechnologiques (couches de surface), des métabolites solubles (méthanol, formaldéhyde, acides organiques et ectoïne). Ils peuvent aussi produire aussi des lipides (comme les biodiesels, aussi des lipides étant utilisés pour la santé).

Le milieu de culture est enrichi en vitamine B12 et l'ambiance en méthane sert de source de carbone et peut-être un moyen d'élimination du méthane.

Ils peuvent être génétiquement modifiés pour produire de nouveaux composés tels que les caroténoïdes<sup>249</sup>.

Certaines enzymes (déshydrogénases, oxydase et catalase) sont des produits de valeur avec un rendement de conversion élevé et peuvent produire le méthanol ou séquestrer le CO<sub>2</sub> comme l'acide formique.

Des cultures vivantes peuvent être utilisées pour la biorestauration, la transformation chimique (propène à l'oxyde de propylène), la dénitrification des eaux usées, en tant que composants de biocapteurs, ou éventuellement pour produire directement de l'électricité. Cet examen montre le potentiel de méthanotrophes et leurs consortiums pour générer la valeur tout en utilisant le méthane comme source de carbone.

Le méthane gaz comme source de carbone a une faible solubilité dans l'eau et il est plus léger que l'air, donc la production massive de méthane biologique ou anthropique produit directement une pollution atmosphérique.

Les bactéries méthanotrophes représentent un potentiel de purification par séquestration du gaz à effet de serre tout en étant économiques et montrent l'intérêt des produits dérivés que nous apportent ces bactéries<sup>250</sup>.

### **Pathologie du *Methylobacterium***

Certaines souches de *Methylobacterium* sont reconnues comme pathogènes opportunistes chez les immunodéprimés.

### 21.1.4 Ordre III *Rhodobacterales* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la cavité de Sulzbrunn l'ordre des *Rhodobacterales* représente respectivement sur le total des méthylotrophes dans chacun des éléments de la grotte :

Snottites	≈ 5,6 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 2,8 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 2,1 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	< 1 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	<1 %	du total de la flore de cette structure

L'ordre *Rhodobacterales* est variablement utilisé selon les auteurs : soit il est cité, soit remplacé par l'ordre des *Rhizobiales*.

#### Dans cet ordre il n'existe que trois familles

- Famille *Rhodobacteraceae*
- Famille *Hyphomicrobiaceae*
- Famille *Hyphomonadaceae*

**Morphologie** : Coques, bâtonnets, spirilles

**Croissance** : Aérobies ; anaérobies facultatives ou strictes, mésophiles.

**Nutrition** : Chimioorganotrophes ; photosynthétiques.

#### Caractéristiques

Les *Rhodobacterales* sont des bactéries de Gram (-). Elles contiennent des bactéries chimio-organotrophes et photo hétérotrophes.

#### Phylogénétique

Les *Rhodobacterales* sont dans l'ordre des *Alphaproteobacteria*, ils jouent le rôle d'agent de transfert de gènes.

Le transfert d'apparence virale réalisé par les *Rhodobacterales*, consiste en un transfert ADN d'une bactérie vers une autre bactérie, ce transfert peut être un facteur de mutation et de l'évolution bactérienne.

#### Environnement

Beaucoup se produisent dans les habitats aquatiques.

#### 21.1.4.1 Famille *Rhodobacteraceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par (Garrity et al., 2006)

Les résultats des *Rhodobacteraceae* par structure est la même que pour l'ordre des *Rhodobacterales*. Dans cette cavité la famille des *Rhodobacteraceae* est présente dans les snottites, les biofilms « subaerial » et biofilms « submersed ». Les résultats de l'étude sur cette cavité ne donnent pas de précision sur les genres trouvés. Le nombre important de genres dans cette famille ne nous permet pas de pouvoir définir un genre commun à l'ensemble. Seules les généralités de cette famille seront étudiées.

#### Morphologie

Les bactéries pourpres ont une morphologie très variable :

Noms	Morphologies
<i>Rhodospirillum</i>	Spiralées
<i>Rhodospseudomonas</i>	Bâtonnet
<i>Rhodobacter</i>	Ovoloïde
<i>Rhodopila</i>	Sphérique
<i>Rubrivivax</i>	En cercle
<i>Rhodomicrobium</i>	Ils forment des prosthecae

## Caractéristiques

Ce sont des bactéries de Gram (-). Elles sont chimio-organotrophes et photohétérotrophes. Les bactéries pourpres sont conc toutes potentiellement photoautotrophes, capables de se développer à la lumière en anaérobiose avec du CO<sub>2</sub>, comme accepteur d'électron et des composés organiques comme donateur d'électrons (fixation du CO<sub>2</sub>) par le cycle de Calvin-Benson<sup>57</sup>. Toutes ces bactéries photosynthétiques contiennent les centres de réaction photochimique contenant un ou plusieurs chlorophylles<sup>251</sup>.

## Environnement

Ces des bactéries prédominent dans la vase, l'eau des lacs et des étangs où la matière organique est abondante et le niveau en sulfure est faible. Il existe aussi des espèces marines.

## Définition des *Rhodobacteraceae*

Il existe une très forte diversité bactérienne dans la famille des *Rhodobacteraceae* ; malgré le grand nombre de genres cette famille reste bien structurée.

Les *Rhodobacteraceae* sont fondamentalement des bactéries se développant dans les milieux marins. Ils comprennent principalement des germes aérobies photohétérotrophes et chimio-hétérotrophes, mais aussi non-sulfureux.

Ils ne réalisent la photosynthèse qu'en milieu anaérobie<sup>252</sup>. Ils sont profondément impliqués dans le soufre et le cycle biogéochimique du carbone et la symbiose aquatique avec des micro et macro-organismes.

Une partie de cette famille est actuellement non-reconnue comme membre des *Rhodobacteraceae*. Ce sont les genres *Stappia*, *Ahrensia*, *Agaricola* et *Rhodothalassium* n'appartenant plus, du point de vue phylogénétique, à cette famille.

Les 90 autres genres sont répartis en 5 groupes phylogénétiques (*Rhodobacter*, *Paracoccus*, *Rhodovulum*, *Amaricoccus*) pouvant être considérés comme des familles indépendantes.

## Ordre *Rhodobacterales* ; Famille *Rhodobacteraceae*

### Genres de la famille des *Rhodobacteraceae*

<i>Actibacterium</i>	<i>Hannashchia</i>	<i>Pacificibacter</i>	<i>Roseicitreum</i>
<i>Acuticoccus</i>	<i>Jhaorihella</i>	<i>Paenirhodobacter</i>	<i>Roseicyclus</i>
<i>Aestuariibius</i>	<i>Kandeliimicrobium</i>	<i>Palleronia</i>	<i>Roseinatronobacter</i>
<i>Aestuariicoccus</i>	<i>Ketogulonicigenium</i>	<i>Pannonibacter</i>	<i>Roseisalinus</i>
<i>Aestuariivita</i>	<i>Labrenzia</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Roseivavax</i>
<i>Agaricola</i>	<i>Lacimonas</i>	<i>Paradonghicola</i>	<i>Roseobacter</i>
<i>Ahrensia</i>	<i>Leisingera</i>	<i>Paraphaeobacter</i>	<i>Roseovarius</i>
<i>Albidovulum</i>	<i>Lentibacter</i>	<i>Pararhodobacter</i>	<i>Rubellimicrobium</i>
<i>Albimonas</i>	<i>Limibaculum</i>	<i>Pelagibaca</i>	<i>Rubribacterium</i>
<i>Albirhodobacter</i>	<i>Limimaricola</i>	<i>Pelagicola</i>	<i>Rubricella</i>
<i>Aliiroseovarius</i>	<i>Litoreibacter</i>	<i>Pelagimonas</i>	<i>Rubrimonas</i>
<i>Aliisedimentitalea</i>	<i>Litorimicrobium</i>	<i>Phaeobacter</i>	<i>Ruegeria</i>
<i>Alkalimicrobium</i>	<i>Litorisediminicola</i>	<i>Planktomarina</i>	<i>Sagittula Gonzalez</i>
<i>Amaricoccus</i>	<i>Litorisediminivivens</i>	<i>Planktotalea</i>	<i>Salinihabitans</i>
<i>Amylibacter</i>	<i>Litorivivens</i>	<i>Plastorhodobacter</i>	<i>Salinovum</i>
<i>Antarctobacter</i>	<i>Loktanella</i>	<i>Plemorphobacterium</i>	<i>Salipiger</i>
<i>Aquicoccus</i>	<i>Lutimaribacter</i>	<i>Polymorphum</i>	<i>Sedimentitalea</i>
<i>Aquimixticola</i>	<i>Maliponia</i>	<i>Pontibaca</i>	<i>Sediminimonas</i>
<i>Ascidiacéihabitans</i>	<i>Mameliella</i>	<i>Ponticoccus</i>	<i>Seohaecicola</i>
<i>Boseongicola</i>	<i>Mangrovicoccus</i>	<i>Pontivivens</i>	<i>Shimia</i>
<i>Brevirhabdus</i>	<i>Maribius</i>	<i>Primorskyibacter</i>	<i>Silicibacter</i>
<i>Catellbacterium</i>	<i>Maricaulis</i>	<i>Profundibacterium</i>	<i>Silicimonas</i>
<i>Celeribacter</i>	<i>Marimonas</i>	<i>Pseudaestuariivita</i>	<i>Sinorhodobacter</i>
<i>Cereibacter</i>	<i>Marinibacterium</i>	<i>Pseudodonghicola</i>	<i>Staleyia</i>
<i>Citreicella</i>	<i>Marinovum</i>	<i>Pseudohalocynthiibacter</i>	<i>Stappia</i>
<i>Citreimonas</i>	<i>Maritimibacter</i>	<i>Pseudomaribius</i>	<i>Sulfitobacter</i>

<i>Cognatishimia</i> <i>Cognatiyoonia</i> <i>Confluentimicrobium</i> <i>Cribrhabitans</i> <i>Defluviimonas</i> <i>Dinoroseabacter</i> <i>Donghicola</i> <i>Epibacterium</i> <i>Falsirhodobacter</i> <i>Flavimaricola</i> <i>Frigidibacter</i> <i>Gaetbulicola</i> <i>Gemmobacter</i> <i>Haematobacter</i> <i>Halocynthiibacter</i> <i>Halodurantibacterium</i> <i>Halovulum</i> <i>Hasllibacter</i> <i>Hirschia</i> <i>Huaishuua</i> <i>Hwanghaeicola</i> <i>Hyphomonas</i>	<i>Maivita</i> <i>Marivivens</i> <i>Methylarcula</i> <i>Monaibacterium</i> <i>Nautella</i> <i>Neptunicoccus</i> <i>Nereida</i> <i>Nesiotobacter</i> <i>Nioella</i> <i>Nitropelagi</i> <i>Oceanibulbus</i> <i>Oceanicella</i> <i>Oceanicola</i> <i>Oceaniglobus</i> <i>Oceaniovalibus</i> <i>Octadecabacter</i>	<i>Pseudoceanicola</i> <i>Pseudooctadecabacter</i> <i>Pseudopelagica</i> <i>Pseudophaeobacter</i> <i>Pseudo</i> <i>Pseudorhodobacter</i> <i>Pseudoroseicyclus</i> <i>Pseudoroseovarius</i> <i>Pseudoruegeria</i> <i>Pseudoseohaecicola</i> <i>Pseudovibrio</i> <i>Psychromarinibacter</i> <i>Puniceibacterium</i> <i>Rhodobaca</i> <i>Rhodobaculum</i> <i>Rhodosalinus</i> <i>Rhodovulum</i> <i>Roseibaca</i> <i>Roseibacterium</i> <i>Roseibacula</i> <i>Roseibium</i>	<i>Tabrizicola</i> <i>Tateyamaria</i> <i>Thalassobacter</i> <i>Talassobius</i> <i>Thalassococcus</i> <i>Thiobacimonas</i> <i>Thioclava</i> <i>Thiosphaera</i> <i>Tranquillimonas</i> <i>Tritonibacter</i> <i>Tropicibacter</i> <i>Tropicimonas</i> <i>Vadicella</i> <i>Wenxinia</i> <i>Xinfangfangia</i> <i>Xuhuaishuua</i> <i>Yangia</i> <i>Yoonia</i> <i>Youngimonas</i>
--	---	---	--

Cette famille comprend 150 genres, divisés en 25 groupes. PARKER Charles Thomas, WIGLEY Sarah, GARRITY George M (1 January 2003). "Taxonomic Abstract for the families", *The NamesforLife Abstract*

#### 21.1.4.1.1 Genre *Rhodobacter* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Imhoff et coll., 1984.

Les résultats des *Rhodobacter* par structure est la même que pour l'ordre des *Rhodobacterales*.

#### Espèces du genre *Rhodobacter*

	Selon NCBI (8 janv. 2011) <sup>1</sup> :
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Rhodobacter apigmentum</i></li> <li>• <i>Rhodobacter azotoformans</i></li> <li>• <i>Rhodobacter blasticus</i></li> <li>• <i>Rhodobacter capsulatus</i></li> <li>• <i>Rhodobacter gluconicum</i></li> <li>• <i>Rhodobacter litoralis</i></li> <li>• <i>Rhodobacter massiliensis</i></li> <li>• <i>Rhodobacter sphaeroides</i></li> <li>• <i>Rhodobacter veldkampii</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter aestuarii</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter apigmentum</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter azotoformans</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter blasticus</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter capsulatus</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter changlensis</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter gluconicum</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter johrii</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter litoralis</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter maris</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter megalophilus</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter ovatus</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter sphaeroides</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter veldkampii</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter vinaykumaraii</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>Rhodobacter vinaykumani</i></a></li> <li>• <a href="#"><i>unclassified Rhodobacter</i></a></li> </ul>

#### Morphologie

Les *Rhodobacter* sont en forme de bâtonnet courts ou ovoïdes (0.5 à 1.2 \* 2 à 4 µm) ; à division binaire ; pigments localisés dans des membranes internes vésiculaires (chlorophylle A et caroténoïdes) ; coloration jaune-brun à rouge ou vert-brun.

## Caractéristiques

L'ordre des *Rhodobacterales* et la famille des *Rhodobacteraceae* ont une composition en acide gras : C18 :1ω7 ; C16 : 0 ; C16 :1ω7 ; C18 : 0 (Yoon et al., 2007a ; Venkata Ramana et al., 2009 ; Jung et al., 2010 ; Park and Yoon, 2014)<sup>253</sup>.

## Réserves non azotées

Les réserves bactériennes carbonées pour les *Rhodobacter* sont de l'acide - polyhydrobutyrique (PHB). Le PHB se dépose dans la cellule sous forme de fibrilles protégées par une couche de protéines. Le PHB est présent chez le *Bacillus*, *Spirillum*, *Sphaerotilus*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*.

## Habitat

Les *Rhodobacteraceae* sont des bactéries se trouvant souvent dans les habitats aquatiques marins. L'abondance de cette famille sur de vastes aires de répartition mondiale et la plupart des genres ont été décrits que relativement récemment. Mais deux exceptions notables étant le *Rhodonostoc capsulatum* (Molisch, Die, 1907) et le *Micrococcus denitrificans* (Beijerinck et Minkman, 1910), décrits de nos jours respectivement sous les noms de *Rhodobacter capsulatus* et *Paracoccus denitrificans*<sup>254</sup>.

La diversité métabolique et écologique du groupe apporte encore plus de complexité. Malgré toutes ces difficultés, l'image est loin d'être un chaos, et il peut être considéré comme un groupe bactérien important à étudier.

## Espèce *Rhodobacter sphaeroides*

### Caractéristiques

Le *Rhodobacter sphaeroides* est une bactérie ayant ses meilleures conditions de croissance obtenues par la photosynthèse anaérobie. Elle est photo-hétérotrophe et photo-autotrophique et devient chimio-hétérotrophe en aérobiose en absence de lumière.

Le *Rhodobacter sphaeroides* est également capable de fixer l'azote atmosphérique, son métabolisme est très diversifié, étant capable d'un développement par fermentation hétérotrophe et avoir une respiration aérobie et anaérobie.

Cette bactérie a été étudiée pour son activité photosynthétique bactérienne. Elle ne nécessite pas de condition particulière pour la croissance. La régulation photosynthétique est d'un intérêt principal pour l'étude de la photosynthèse car elle a un système complexe pour détecter les tensions d'oxygène.

Dans le cas d'une réduction partielle d'oxygène cette bactérie développe des invaginations de sa membrane cellulaire dans lesquelles sont logées l'appareil photosynthétique. Ces investigations ayant le nom de Chromophores.

### Phylogénétique

Le génome du *R. sphaeroides* a deux chromosomes, l'un de 3Mb (CI) et l'autre de 900 Kb (CII) et cinq plasmides naturels. De nombreux gènes sont dupliqués entre les deux chromosomes, mais régler différemment. En outre il y a chromosome (CII) semblant coder pour les protéines de fonctions encore inconnues. Ces gènes semblent avoir une activité sur le caractère autotrophe de cette bactérie.

Il a été identifié vingt ARNs composant de nombreux réseaux de régulation dont vingt ARNs ont été expérimentalement identifiés dans le *R. sphaeroides* et les souches ont été exposés pour être affectés par l'oxygène (O<sub>2</sub>) afin de générer un stress photo-oxydatif par la bactiochlorophylle lors de l'exposition à l'oxygène et à la lumière. Un gène de ARNs le **SoY** (Oxygène résistance ARN Y) a été reconnu pour la résistance au risque d'oxydation dû à l'oxygène produite, étant actif par le transport métabolique de cet oxygénation. Le gène **SoX** est un deuxième ARNs induit par l'oxygène pour la résistance contre les hydro-péroxydes organiques. Un groupe de quatre ARNs homologues gènes appelés **CcR** (ccUCCUCC) a été aussi reconnu pour jouer un rôle dans la résistance du stress

oxydatif. Le gène *PcrZ* (ARNs Z contrôle la photosynthèse)<sup>255</sup> est un ARNs transaction contrecarrant l'induction redox-dépendante des gènes de la photosynthèse, par les régulateurs protéiques.

## Culture

### Le milieu de culture liquide :

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.2g, MnSO<sub>4</sub>-4H<sub>2</sub>O 2.23mg, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.04g, Fer citrate 4 mM, 1ml, Glutamate Na 1.9g, acide DL-malique, 2.7g, QSP 1000 ml d'eau distillée ; pH 7. Dans un flacon ensemencer les milieux de telle manière que le dépôt soit de 5cm Les flacons doivent être totalement remplis et hermétiquement clos. Bien agiter. Incubation a 25°C pendant 7 jours avec un éclairage 24h/24h égal à celui donné par une lampe de 60 w placée à 30 cm environ de la culture.

## Environnement

La bactérie *R. sphaeroides* est appelé bactérie violette, elle a été isolée dans des lacs profonds et des étangs d'eaux stagnantes.

### Les *Alphaproteobacteria* de la grotte de Sulzbrunn.

La présence d'*Alphaproteobactéria* étant en majorité des bactéries photosynthétiques des snottites et des biofilms « submersed », nous montre que ce type de bactérie vient bien de la période côtière marine de cette cavité. Cet indicateur a une valeur principale dans l'étude de l'évolution de la cavité. Il y aurait aucune raison qu'une bactérie se développe dans un biotope lui étant défavorable, mais il peut s'être formé une biocœnose ayant permis à ces bactéries de subsister à des conditions défavorables à leur biotope habituel.

#### 21.1.4.2 Famille *Hyphomicrobiaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Répartition microbienne dans la grotte de Sulzbrunn de la famille *Hyphomicrobiaceae* sur la flore totale de chacune des structures :

Snottites	≈ 1,8 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 0,1 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ <1,8 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<2,5 ± 1,2 %	sur la flore totale de cette structure

### Ordre *Rhodobacterales* ; Famille *Hyphomicrobiaceae*

#### Les genres dans la famille des *Hyphomicrobiaceae*

<i>Ancalomicrobiu</i>	<i>Filomicrobium</i>	<i>Polyprosthecobacterium</i>
<i>Angulomicrobium</i>	<i>Gemmiger</i>	<i>Prosthecomicrobium</i>
<i>Aquabacter</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Rhodomicrobium</i>
<i>Arsenicitalea</i>	<i>Hyphomonas</i>	<i>Rhodoplanes</i>
<i>Blastochlororis</i>	<i>Maritalea</i>	<i>Seliberia</i>
<i>Cucumicacter</i>	<i>Methylorhabdus</i>	<i>Youhaiella</i>
<i>Devosia</i>	<i>Methylterrigena</i>	
<i>Dichotomicrobium</i>	<i>Paradevosia</i>	
	<i>Pedomicrobium</i>	
	<i>Pelagibacterium</i>	

## Morphologie

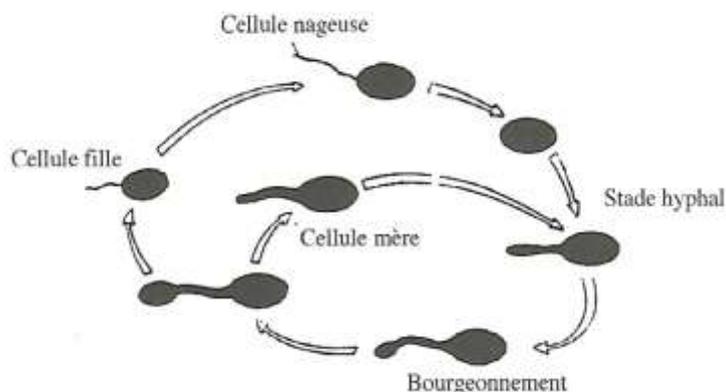
La famille *Hyphomicrobiaceae* contient des bactéries Gram (-), méthanotrophes facultatifs, possédant des bourgeonnements parallèles à l'axe de la prosthecae. Ils se développent sur H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>, les cellules filles sont uni-flagellées.

Il y a des cas particuliers dans cette famille :

- *Hyphomonas* n'est pas méthanotrophe.
- *Filomicrobium* utilise les acides organiques et les cellules filles ne sont pas flagellées.

- *Pedomicrobium* possède des bourgeons perpendiculaires à l'axe de la prosthecae et formant des dépôts de fer et de manganèse.

*Dichotomicrobium* a quatre prosthecae pouvant se ramifier et porter des pilis.



Cycle de développement des *Hyphomicrobium*  
Jean Paul Larpent, *Mémento technique de microbiologie*, éd. TEC-DOC, 1997 ; p.303

#### 21.1.4.2.1 Genre *Hyphomicrobium* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Stutzer et Hartleb, 1899.

##### Morphologie

Les *Hyphomicrobium* ont des cellules en forme de bâtonnets,  $\varnothing$  0.3 à 1  $\mu\text{m}$  et longueur 1 à 3  $\mu\text{m}$ ; elles possèdent un bourgeoisement parallèle à l'axe de la prosthecae et elles sont non-sporulées ; Les hyphes peuvent se présenter sous forme d'un bourgeoisement à raison d'une à deux unités subpolaires ou latérales ; dans les cellules filles les flagellations sont 1 à 3 dans la position polaire. Le nombre d'hyphes de 1 à 2 polaires, subpolaires et latérales. Elles forment des colonies brunes ; avec des bactéries bourgeoisantes appendiculées.

##### Caractéristiques

Le *Hyphomicrobium* est capable de dénitrification facultative, il est chimio-organo-hétérotrophe avec une respiration aérobie et pouvant se développer dans  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , et  $\text{O}_2$ . Il n'a pas de symbiose, n'a pas de croissance anaérobie par l'intermédiaire d'accepteur d'électron du fer ou du soufre.

Le *Hyphomicrobium* est méthylotrophe facultatif. La source de carbone utilisée par les bactéries pour l'énergie est un carbone de type C1 et elles peuvent utiliser aussi quelques acides organiques.

Cette bactérie est neutrophile, mésophile.

##### Culture

*Hyphomicrobium* a un pH optimum au-dessus de 7 à l'exception d'une seule espèce avec un optimum inférieur ; température d'incubation mésophile.

**Exigence de croissance :** le dioxyde de carbone est nécessaire pour la croissance et les acides oligo-carbophiliques, c'est-à-dire la croissance peut se produire sur des supports de sels minéraux sans ou avec une très faible source de carbone supplémentaire (autotrophe). La croissance peut être stimulée par l'extrait de sol si le pH demeure près du neutre. Une bonne croissance avec 0,1 à 0,2 % (p/v) de composés de carbone tels que le méthanol ou la méthylamine. L'ion ammonium  $\text{NH}_4^+$  est une bonne source d'azote minérale, mais les composés de l'azote organique (acides aminés) peuvent également être utilisés.

Sur milieu solide, *Hyphomicrobium* a des petites colonies, même après une incubation prolongée ; elles sont brunâtres, transmissibles, beige léger et lumineux ou incolores en lumière réfléchie. La surface de la colonie est brillante ou granulaire, plissée ou lisse. Souvent les anciennes colonies affichent des anneaux concentriques et changent de couleur, de la plus foncée brune au lumineux jaune orangé

**Milieu de culture :**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.36 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.13 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  9.95 mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2.5 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.5 mg, gélose 15 g ; eau distillée QSP 1 000 ml ;

ajouter après stérilisation du méthanol 4ml, de l'urée à 20% poids volume d'eau distillée 30ml, stérilisé par filtration.

**Milieu d'enrichissement :** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.36 g, (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 g, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 1 mg, MnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.25 mg, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.213 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.02 g, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.5 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.25 mg, amener 100 ml ; ajuster pH7,2 agar 1.9%.

Ou

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.136 g, KNO<sub>3</sub> 0.04 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.48 g, MnCl<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O 0.01 g, FeCl<sub>3</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.02 mg, Eau QSP 100 ml, pH (ajuster avec HCl ou NaOH), pH 7.2.

**Milieu d'isolement :** peptone 1 g, extrait de levure 0.3 g, méthylamine HCl 0.675g, agar 1.8 g, amener à 100 ml et à pH 7.2 avec NaOH.

**Milieu pour *Hyphomicrobium neptunium* :**

**Solution 1** Dans 30 ml mettre : NaCl 19.45 g, MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 8.80 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.24 g, CaCl<sub>2</sub> (anhydre) 1.80 g, KCl 0.55 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.16 g, KBr 0.08 g, K<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.022 g, SrCl<sub>2</sub> 0.034 g, NaSiO<sub>3</sub> 0.004 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.0016 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.008 g, citrate de fer et d'ammonium 0.10 g, Stériliser par autoclavage.

**Solution 2** Dans 70 ml mettre : acide L-glutamique 23.77 g, acide L-aspartique 26.27 g, L-serine 18.77 g, L-méthionine 0.43 g, eau QSP 70 ml amenée à pH 7.2 avec de NaOH 6N.

## Phylogénétique

*Hyphomicrobium* a une teneur de l'ADN-ADN avec un (C + G) de 59 à 65 moles %.

## Environnement

L'*Hyphomicrobium* vie dans les sols et les eaux douces.

### 21.1.4.3 Famille *Hyphomonadaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Lee et al., 2005.

**Ordre *Rhodobacterales* ; Famille *Hyphomonadaceae*<sup>22</sup>**

Genres de la famille des *Hyphomonadaceae*:

Genres	Genres
• <a href="#">Alqimonas</a>	• <a href="#">Hyphomonas</a>
• <a href="#">Asprobacter</a>	• <a href="#">Litorimanas</a> <sup>[1]</sup>
• <a href="#">Euryhalocaulis</a>	• <a href="#">Maribaculum</a>
• <a href="#">Delonqia</a>	• <a href="#">Maricaulis</a>
• <a href="#">Fretibacter</a>	• <a href="#">Marinicauda</a>
• <a href="#">Glycocaulis</a>	• <a href="#">Panticaulis</a>
• <a href="#">Hellea</a>	• <a href="#">Oceanicaulis</a>
• <a href="#">Henriciella</a>	• <a href="#">Robiginitomaculum</a>
• <a href="#">Hirschia</a>	• <a href="#">Viadrubacter</a>
• <a href="#">Hyphobacterium</a>	• <a href="#">Woodsholea</a>

NCBI taxonomy page for Hyphomonadaceae

#### 21.1.4.3.1 Genre *Hyphomonas* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Pongratz, 1957 ; Moore et coll., 1984 ; Weiner et coll., 2000.

#### **L'espèce la plus connue dans ce genre est : *Hyphomonas neptunium***

Elle a été nommée *Hyphomicrobium neptunium* puis renommée *Hyphomonas neptunium* après analyse en PCR.

## Morphologie

L'*Hyphomonas neptunium* est une bactérie en forme de bâtonnet de longueur 1 à 3 µm et de diamètre 0,3 à 1,2 µm ; elles ont deux paires hyphes polaires, subpolaires ou latérales. Elles ont une flagellation monotriche pour les cellules filles ; les colonies sont incolores. C'est une bactérie bourgeonnante et appendiculée. C'est une bactérie biphasique (ayant deux morphologies au cours de sa vie) à prosthecate, se référant à un organisme ayant une tige ou un appendice.

L'*Hyphomonas neptunium* est une bactérie unique en ce sens qu'elle ne se divise pas par fusion binaire, mais plutôt par bourgeonnement asymétrique. Les cellule-mères sont non-motiles, tandis que les filles le sont, jusqu'à ce qu'elles deviennent des cellules mères. Les cellules mobiles en essaim utilisent seulement les flagelles polaires et ne répondent pas à n'importe quel stimulus chimique.

Il a été suggéré que la motilité de l'*Hyphomonas* est un mécanisme de dispersion aléatoire plutôt qu'un système de navigation contrôlée par une stimulation pour localiser un emplacement spécifique. *Hyphomonas* utilise son prosthecae également dans la reproduction ; les matériaux génétiques sont transférés dans la cellule fille *via* la prosthecate. Le genre *Hyphomonas* comprend 50 espèces

### Caractéristiques

L'*Hyphomonas neptunium* utilise acides aminés, les protéines, mais n'est pas méthanotrophe. L'*Hyphomonas* a sa membrane externe se composant principalement de lipopolysaccharides.

### Phylogénétique

L'analyse de l'ADN-ADN l'*Hyphomonas neptunium* donne un taux de (C+ G) entre 57 et 62 % mol. Les informations d'hybridation de l'ADN-ADN ont montré une relation plus étroite avec *Hyphomonas* (Pongratz, 1957) et son incapacité à utiliser les molécules C1 comme source de carbone est la différence phénotypique avec le *Hyphomonas polymorpha*.

*Hyphomonas neptunium* a un génome circulaire avec 3705022 bp, il a 3552 gènes nucléoïdes et 47 gènes d'ARN. Il a au total 162 protéines de transport, les principaux transporteurs comprenant ATP dépendant 23,5%, soit les transporteurs secondaires 66%, les canaux ioniques 5.6% et le système de phosphotransférase au pts 2.5%.

### Culture

#### Milieu liquide :

- NaCl 19.45 g, MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 8.8 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.24 g, CaCl<sub>2</sub> (anhydre) 1.8 g, KCl 0.55 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.16 g, Kbr 0.08 g, K<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> 0.022 g, SrCl<sub>2</sub> 0.034 g, NaSiO<sub>3</sub> 0.004 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.0016 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.008 g, citrate de fer<sup>III</sup> et d'ammonium 0.1 g, QSP 300 ml, Stériliser par autoclave 112 °C.
- Acide L-glutamique 23.77 g, acide L-aspartique 26.27 g, L-serine 18.77 g, L-méthionine 0.43 g ; QSP pour 700 ml ;solution amenée à pH 7.2, avec une solution à 6 n de NaOH, puis stériliser par autoclavage.
- Mélanger les deux milieux.

### Environnement

*Hyphomonas neptunium* est une bactérie marine, les huit espèces du genre *Hyphomonas* ont été isolées de la mer de Barcelone en Espagne. Elle a été initialement nommée *Hyphomicrobium neptium*, mais plus tard a été renommée sur les bases de son identification sur l'homologie de l'ADN.

Son activité protéolytique lui donne une importance dans l'écologie pour l'élimination des produits organiques.

### Pathologie

En 1957 Pongratz, diagnostique l'*Hyphomonas neptunium* dans le mucus nasal d'un plongeur sous-marin ayant une sinusite infectieuse.

### 21.1.5 Ordre *Rhodospirillales* (Grotte de Sulzbrunn)

*Rhodospirillales*, nom donné par Pfennig & Truper 1971.

Dans la cavité de Sulzbrunn l'ordre des *Rhodospirillales* représente respectivement le total de chacun des éléments de la grotte :

Snottites	≈ 3,6 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 2,6 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	< 0,3 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	< 1 %	du total de la flore de cette structure

Eau de mélange < 2,5 ± 1,2% du total de la flore de cette structure

#### Familles de cet ordre :

- *Acetobacteraceae*
- *Rhodospirillaceae*

#### 21.1.5.1 Famille *Rhodospirillaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Pfennig & Truper, 1971.

Dans la cavité de Sulzbrunn, la famille *Rhodospirillaceae* est représentée respectivement sur le total de chacune des structures de la grotte :

Snottites	≈ 2,3 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 1,4 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	< 0,3 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	< 1 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	< 2,5 ± 1,2%)	du total de la flore de cette structure

Dans la grotte de Sulzbrunn ils sont détectés particulièrement dans les biofilms « subaerial ». Dans cette étude il n'y a pas eu d'identification particulière de genre de cette famille ayant de nombreux genres très diversifiés. Il n'est donc pas possible de définir un exemple de genre pouvant représenter cette famille.

#### Ordre *Rhodospirillales* ; Famille *Rhodospirillaceae*

#### Définition

La famille des *Rhodospirillaceae* a une majorité de ses bactéries pourpres, produisant de l'énergie par photosynthèse que l'on a initialement appelées les bactéries pourpres non-sulfureuses.

On les retrouve souvent dans les milieux aquatiques anaérobies, tels que la boue et les eaux stagnantes, même si elles sont capables de survivre dans l'air.

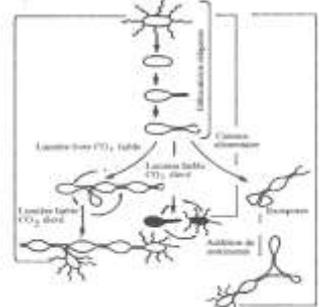
Cette famille inclut également *Magnetospirillum*, contenant des chaînes de minuscules particules de magnétite. Ces bactéries sont susceptibles d'être sensibles au champ magnétique, leur permettant de s'orienter soit vers le bas ou le haut, ainsi que du Nord ou au Sud, pour revenir au fond d'un étang (magnétotaxie). Des chaînes de magnétite similaires trouvées dans des météorites martiennes ont suggéré une preuve de vie sur Mars.

#### Genres de la famille des *Rhodospirillaceae*

<i>Azospirillum</i>	<i>Inquilinus</i>	<i>Phaeovibrio</i>
<i>Caeispirillum</i>	<i>Insolitospirillum</i>	<i>Rhodocista</i>
<i>Constrictibacter</i>	<i>Limimonas</i>	<i>Rhodospira</i>
<i>Dechlorospirillum</i>	<i>Magnetospira</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Defiuvicoccus</i>	<i>Magnetospirillum</i>	<i>Rhodovibrio</i>
<i>Desertibacter</i>	<i>Magnetovibrio</i>	<i>Roseospira</i>
<i>Dongia</i>	<i>Marispirillum</i>	<i>Skermanella</i>
<i>Elstera</i>	<i>Nisaea</i>	<i>Telmatospirillum</i>
<i>Candidatus Endolissocinum</i>	<i>Novispirillum</i>	<i>Thalassospira</i>
<i>Ferrovibrio</i>	<i>Oceanibaculum</i>	<i>Tistia</i>
<i>Fodinicuvata</i>	<i>Pelagibius</i>	<i>Tistrella</i>
	<i>Phaeospirillum</i>	

#### Morphologie

La famille des *Rhodospirillaceae* fait partie des bactéries pourpres, et ont des morphologies très variables comme :

	<p>Variation de morphologie entre les genres</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Spirales pour le genre <i>Rhodospirillum</i></li> <li>• En bâtonnets pour le genre <i>Rhodopseudomonas</i></li> <li>• Ovoïdes pour le genre <i>Rhodobacter</i></li> <li>• Sphériques pour le genre <i>Rhodopila</i></li> <li>• En cercle Pour le genre <i>Rubrivivax</i></li> <li>• Formant de prosthecae <i>Rhodomicrobium</i></li> </ul>
<p>Représentation schématique du cycle de développement des <i>Rhodomicrobium</i> Jean Paul Larpent, <i>Mémento technique de microbiologie</i>, éd. TEC-DOC, 1997, p.303</p>	

## Caractéristiques

Les *Rhodospirillaceae* sont très divers sur le plan métabolique. Elles se développent normalement de façon anaérobie comme des photo-organo-hétérotrophes et utilisent des molécules organiques comme source d'électrons et de carbone. Certaines espèces peuvent oxyder des quantités très faibles non toxiques de sulfure en sulfate, mais elles n'oxydent pas le soufre. En absence de lumière la plupart des bactéries pourpres non-sulfureuses peuvent se développer de façon aérobie comme chimio-organotrophes, mais certaines espèces réalisent des fermentations en anaérobiose. L'oxygène inhibe la synthèse de la bactériochlorophylle et des caroténoïdes. Ils sont profondément impliqués dans le soufre et le cycle biogéochimique du carbone et la symbiose avec aquatique avec des micro - et macro-organismes.

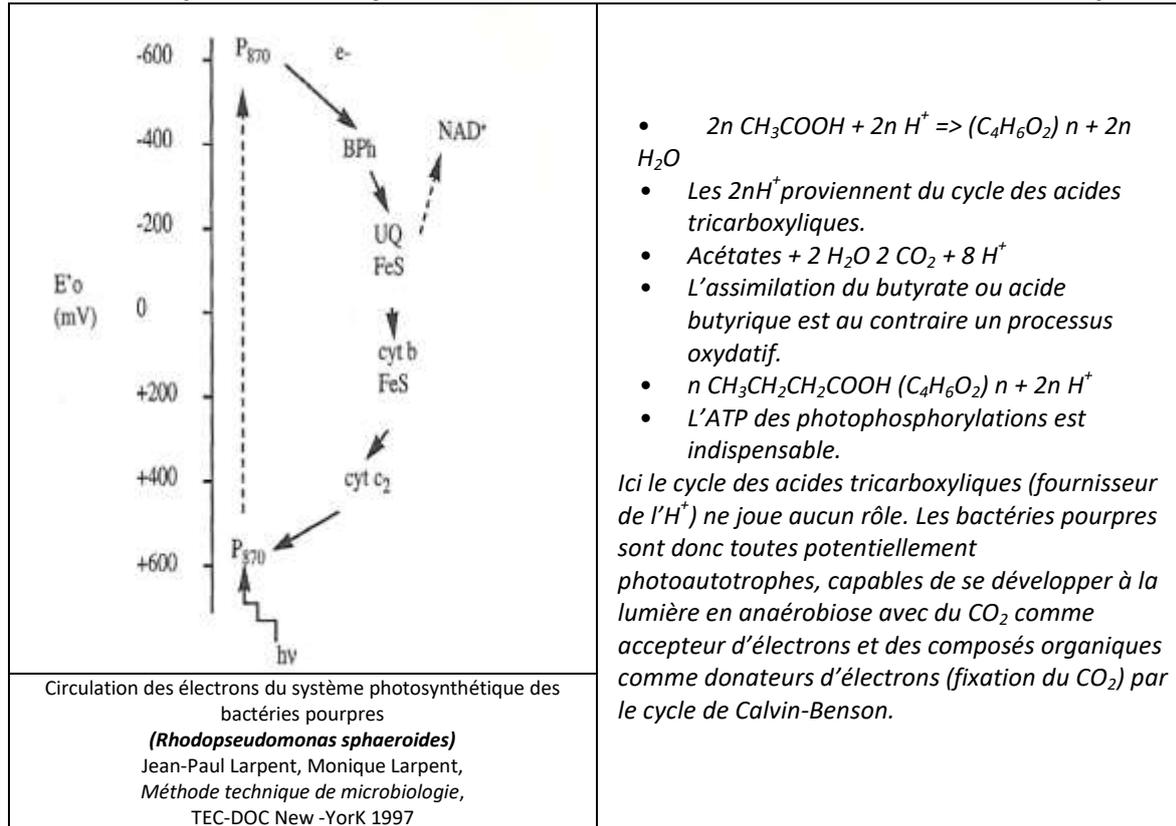
Les *Rhodospirillaceae* peuvent fixer l'azote atmosphérique ( $N_2$ ), toutes ses bactéries contiennent des bactériochlorophylles de type (a) ou (b) localisées dans la membrane cytoplasmique. La plupart peuvent utiliser certains intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques (succinates, fumarates et malates) aussi bien que des pyruvates et les lactates comme seule source de carbone et de pouvoir réducteur.

Quelques-unes telles que *Rhodospirillum rubrum* et *Rhodopseudomonas sphaeroides* assimilent les acétates ou les butyrates sous forme de poly-hydrobutyrate. Certaines (*Rhodopseudomonas palustris* et *Rhodopseudomonas capsulatus*) possèdent un cycle glycoxylique leur permettant d'assimiler et transformer les acétates en glucides sans fixer le  $CO_2$ . Le *Rubrivivax gelatinosus* peut se développer à l'obscurité en anaérobiose avec du  $CO_2$  comme seule source de carbone.et d'énergie.

Si le substrat organique est plus réduit que le  $CO_2$ , la fixation du  $CO_2$  est simulée car le  $CO_2$  fournit l'accepteur d'électrons provenant de l'oxydation du substrat organique.

L'assimilation des acétates (processus réducteur) peut se faire sans  $CO_2$  mais avec l'ATP fourni par la photophosphorylation<sup>256</sup>:

## Variation du potentiel d'oxydo réduction en fonction des modifications métaboliques



## Photosynthèse bactérienne

Toutes ces eubactéries photosynthétiques utilisent des chloroplastes de morphologie très variable, étant le centre de réaction photochimique impliquant le cycle de Calvin-Benson dans leur métabolisme du carbone et fixation du  $\text{CO}_2$ .

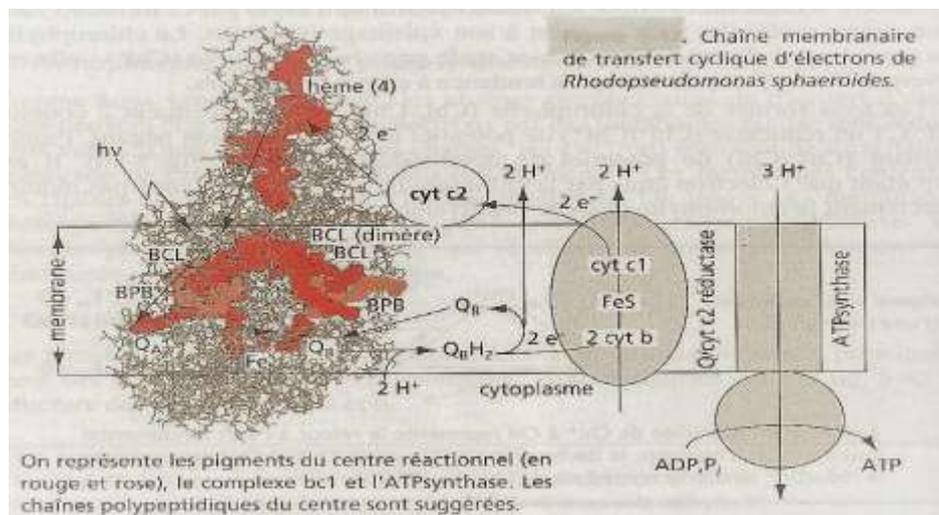
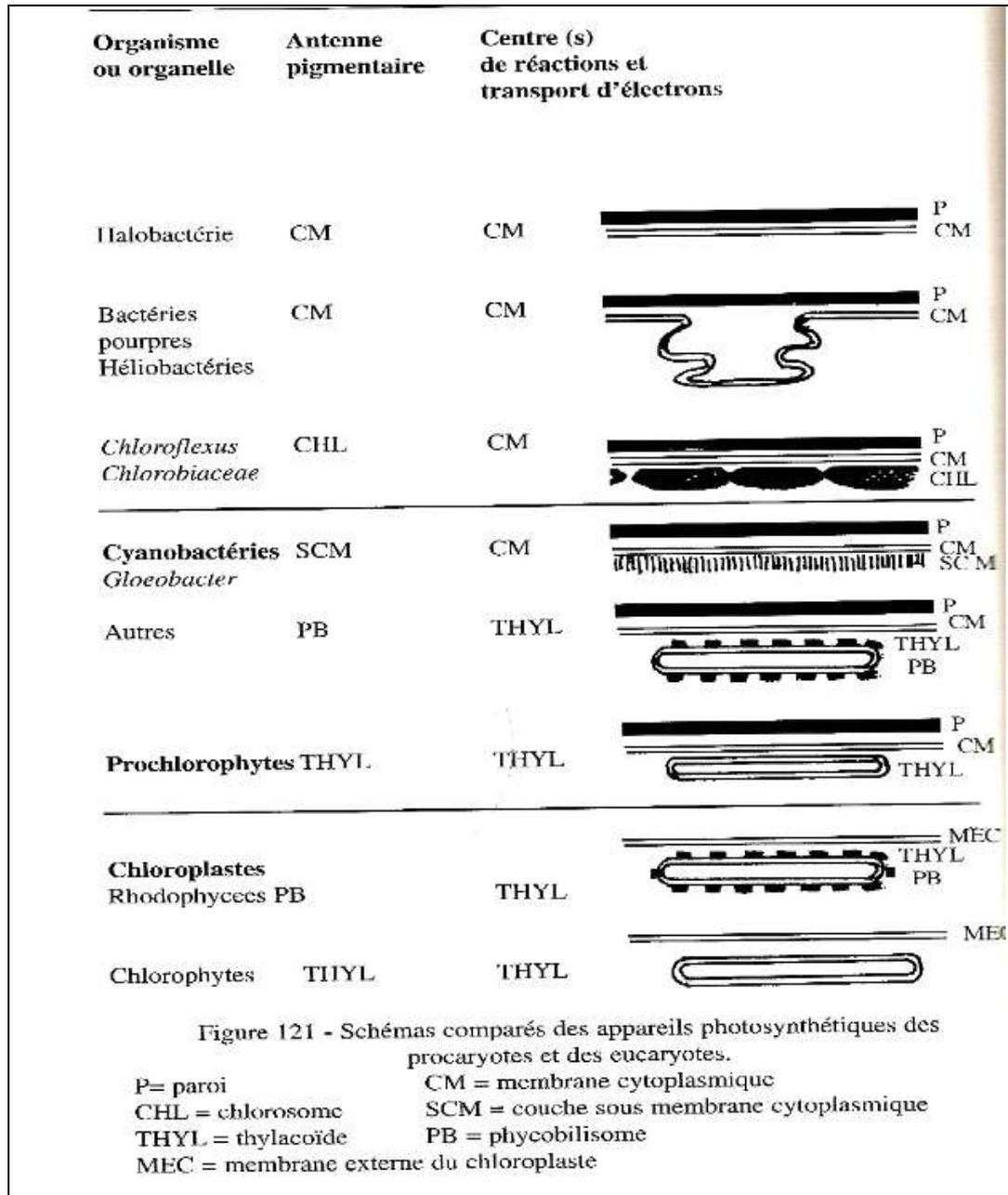


Schéma de Jacques Henry WEIL, *Biochimie générale*, Dunod, 2005, p.184

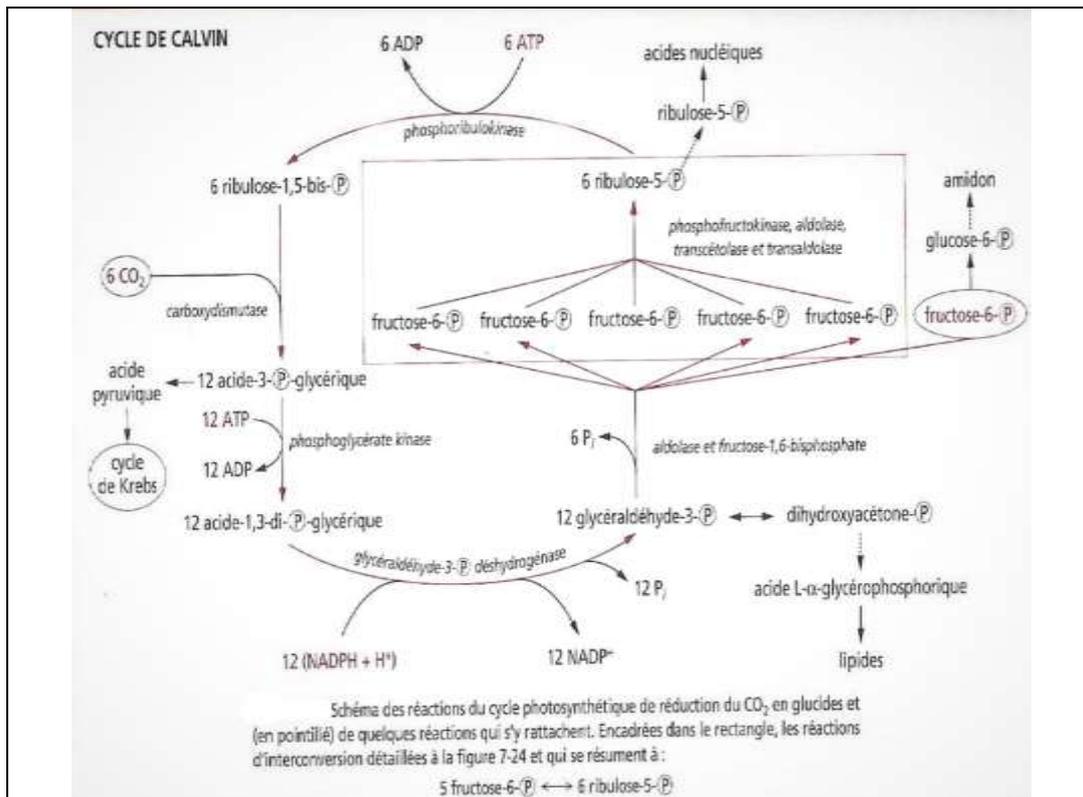
Dans les membranes cytoplasmiques des bactéries photosynthétiques, on trouve, à côté d'une chaîne de transfert d'électrons, une antenne et un centre réactionnel. La structure du centre réactionnel de divers *Rhodospseudomonas sphaeroides* a été déterminée grâce à la résolution atomique par diffraction de rayon X, ayant permis de proposer un mécanisme de séparation de charge. La chlorophylle excitée par l'énergie lumineuse provenant de l'antenne est une bactériochlorophylle localisée du côté extra-cytoplasmique. Devenue très réductrice, elle fournit un

électron à un pigment localisé dans son voisinage immédiat (bactériophéophytine<sup>www</sup>) et de là *via* d'autres couple redox, à une quinone localisée sur la face opposée de la membrane, côté cytosolique. À ce stade une séparation de charge a eu lieu de part et d'autre de la membrane. Une bactériochlorophylle portant une charge positive d'un côté, une quinone radicalaire portant une charge négative de l'autre. L'absorption d'un second photon par la bactériochlorophylle entraîne un nouveau cycle de séparation de charge.

### Morphologie microbienne de la fonction chlorophyllienne



<sup>www</sup> **Bactériophéophytine** : Dans la bactériochlorophylle, il y a 3 sous-unités polypeptidiques, 4 molécules de bactériochlorophylle, 2 molécules de **bactériophéophytine** (macrocycle de chlorophylle privé de Mg), 1 molécule de caroténoïde, 2 molécules d'ubiquinone et 1 atome de fer.



Jacques Henry Weil, *Biochimie générale*, éd. DUNOD ; p.263

Le cycle de Calvin étant la phase obscure de la photosynthèse, montre la réduction du CO<sub>2</sub> en glucide. L'énergie biochimique se traduit par la production d'ATP et de NADPH. La phase obscure de la photosynthèse est la réaction permettant la réduction du CO<sub>2</sub> en glucide, grâce à l'ATP et au NADPH formés pendant la « phase lumineuse ».

La famille des *Rhodospirillaceae* sont des bactéries pourpres comme le *Rhodospirillum rubrum* formant des poly-hydroxy butyrates et des composés homologues appelés poly-hydroxy alcanoates, le monomère étant souvent le D-hydroxy-valérate. Toutes ces molécules se colorent avec les réactifs des lipides (noir de soudan).

Des granules de polyphosphate appelés « vultine » associés à la région nucléaire, ou granules métachromatiques, parce qu'ils se colorent en rouge avec des colorants basiques bleus, sont constitués de polyphosphates linéaires pouvant contenir jusqu'à 500 molécules d'ortho phosphate. Ce polymère peut représenter jusqu'à 50 % du phosphore total de la cellule.

La synthèse des polyphosphates est catalysée par la poly-phosphatase kinase à partir de l'ATP.

Elles interviennent également, au cours du transfert d'un résidu ortho phosphate avec les enzymes, suivantes :

- L'AMP phosphotransférase.
- La polyphosphate NAD<sup>+</sup> kinase.
- La polyphosphate glucokinase.
- La 1-3-biphosphoglycérate-polyphosphatase

La polyphosphate phosphotransférase et les poly-phosphatases hydrolysent les polyphosphates.

## Culture

Croissance à pH 7 pour *Rhodopseudomonas rubrum* et 5 à 6 pour *Rhodopseudomonas acidophila* ; incubation 25° C pendant 7 jours ; avec un éclairage de 60 W placé à 30 cm environ de la culture ;

Milieux pour les *Rhodospirillaceae* : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g ; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,2 g ; NaCl, 2,0 g ; extrait de levure, 0,1 g ; substrat organique, 1,5 g ; pH 7.

**Milieu pour *Rhodopseudomonas spheroides*** : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 2.23 mg, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.04 g, Fer citrate A 1 ml de sol. mM, Glutamate de sodium 1.9 g, acide malique 2.7 g, QSP 1 000 ml.

## Habitat

La famille des *Rhodospirillaceae* se trouve être prédominante dans la vase, l'eau de lacs et des étangs où la matière organique est abondante et le niveau en sulfure est faible. Il existe des espèces marines.

## Symbioses existantes

Avec les *Bryophytes* (*Anthoceros*) « mousses » ou *Ptéridophytes* (*Anabacena* avec *Azolla*) « fougères »

- Espèces de *Rhodobacter* « *adriaticus, capsulatus, sphaeroides, sulfidophilus, veldkampii* »
- Espèces de *Rhodopseudomonas* « *viridis, blastica, palustris, acidophila, sulfoviridis, futila, marina* »
- Espèces de *Rhodospirillum* « *rubrum, fluvum, salexigens, molischianum, photometricum* »
- Espèce de *Rhodopila globiformis*
- Espèce de *Rhodomicrobium vannielii*
- Espèce de *Rhodocyclus gélatinus*

### 21.1.6 Ordre *Rickettsiales* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn l'ordre *Rickettsiales* sont présent dans les biofilms et les snottites mais pas dans les eaux. Dans cette étude il n'a pas été défini les genres de cet ordre trouvés dans cette cavité. Répartition microbienne des *Rickettsiales* dans la grotte de Sulzbrunn par catégorie de prélèvement :

Snottites	≈ 3,6 %	sur la flore totale de cette structure.
Biofilms « subaerial »	≈ 2,4 %	sur la flore totale de cette structure.
Biofilms « submersed »	≈ 0,4 %	sur la flore totale de cette structure.
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de cette structure.
Eau de mélange	<2 %	sur la flore totale de cette structure.

#### Définition des *Rickettsiales*

Les *Rickettsiales* forment un ordre de *Proteobacteria*. La plupart de celles ayant été décrites ne survivent qu'en endosymbiose dans les cellules animales. Certaines sont des pathogènes notoires comme le genre *Rickettsia*, provoquant diverses maladies humaines.

À l'autre extrémité de l'échelle, des études génétiques viennent étayer l'hypothèse que des membres de ce groupe seraient à l'origine des mitochondries (théorie de l'endosymbiose). D'autres ont également spéculé sur le fait que les virus pourraient s'être développés à partir d'eux ou d'organismes apparentés<sup>257</sup>.

#### Familles de cet ordre :

- *Rickettsiaceae*
- *Anaplasmataceae*
- *Holosporaceae*

#### Pathogénicité

- *Rickettsiaceae* et *Anaplasmataceae* sont pathogènes.

#### 21.1.6.1 Famille *Rickettsiaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Pinkerton, 1936.

Répartition microbienne de la famille des *Rickettsiaceae* dans la grotte de Sulzbrunn par catégorie de prélèvement :

Snottites	≈ 1,9 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 1,8 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 0,4 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<2 %	sur la flore totale de cette structure

Les *Rickettsiaceae* sont prédominants dans l'ordre des *Rickettsiales*. La plupart sont pathogènes pour l'Homme, particulièrement le genre *Rickettsia*. Ils passent une partie de leur cycle de vie dans le corps des arthropodes tels que les tiques ou les poux et sont ensuite transmis à l'Homme ou d'autres mammifères par le biais de piqûres.

Ce sont des bactéries de Gram (-) très sensibles à l'exposition environnementale, ils sont donc obligés de trouver un hôte à infecter, pour avoir la possibilité d'endosymbiose étant leur lieu de résistance.

### Genres de la famille des *Rickettsiaceae*

Groupe *Rickettsiae*

- *Candidatus* Cryptoprodotis
- *Candidatus* Gigarickettsia
- *Candidatus* Hemipteriphilus
- *Candidatus* Trichorickettsia
- *Occidentia*
- *Orientia*
- *Rickettsia*

### Famille *Rickettsiaceae incertae sedis*

- *Candidatus* Megaira
- *Candidatus* Phycorickettsia

### Analyse génomique

L'analyse génomique comparative de la famille des *Rickettsiaceae* a identifié trois protéines appelées RP030, RP187 et RP192, étant typiques de cette famille et se trouvant dans la membrane de leurs cellules bactériennes. Elles servent de marqueur moléculaire pour la famille.

En outre la signature de certaines protéines observées, comme facteur de transcription et de réparation d'accouplement (le facteur MFT), ayant 10 acides aminés, faisant parties des protéines ribosomiques L19, l'une de ces protéines sont spécifiques pour les espèces de *Rickettsiaceae*. Elles ont été identifiées et le principal facteur a été appelé facteur sigma 70 avec la protéine FtsZ.

### Taxonomie

La famille *Rickettsiaceae* regroupe actuellement le genre *Rickettsia*, le genre *Orientia* et les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* avec les genres *Ehrlichiae*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* et *Wolbachia*.

Dans la famille *Anaplasmataceae*, *Ehrlichia sennetii*<sup>258</sup> infeste les monocytes et les macrophages, et provoque l'éhrlichiose humaine que l'on appelle fièvre ganglionnaire ou mononucléose infectieuse japonaise et *E. chaffeensis* à l'origine de l'éhrlichiose américaine et ayant pour vecteur *Amblyomma americanum* (tique)<sup>259</sup>.

#### 21.1.6.1.1 Genre *Rickettsia* (Grotte de Sulzbrunn)

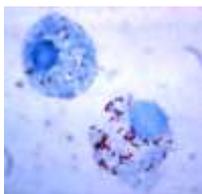
Nom donné par Rocha Lima en 1916.

#### Embranchement *Alpha Proteobacteria* ; Ordre *Rickettsiales* ; Famille *Rickettsiaceae*

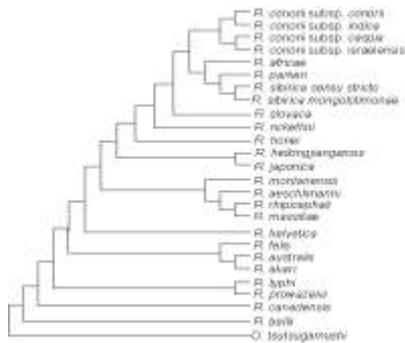
##### Morphologie du *Rickettsia*

Sont en forme de petit bâtonnet (0,3 µm de diamètre et de 1 à 2 µm de long), se multipliant par scissiparité et par un cycle de développement complexe. Bactéries intracellulaires strictes, elles sont incapables de prendre la coloration de Gram ; elles sont cependant colorées par le colorant de Giemsa et ont des similitudes avec les bactéries à Gram (-). Ces bactéries n'ont pas de flagelles (à quelques exceptions).

Les parois des bactéries contiennent de l'acide muramique. Le glutamate est oxydé pour produire de l'ATP (la bactérie peut utiliser l'ATP de la cellule). Les espèces parasitées par la bactérie sont associées au réticulo-endothélium cellulaire et à l'endothélium vasculaire ou avec les érythrocytes des vertébrés, et il en est de même avec certains arthropodes (qui sont les vecteurs). Les *Rickettsia* sont immobiles, parasites obligatoires, la forme coccoïde se multiplie seulement dans les vacuoles des cellules de l'hôte



parasité<sup>260</sup>.



### Arbre phylogénique des bactéries du genre *Rickettsia*

L'étude basée sur la comparaison des séquences du gène codant l'enzyme citrate synthase<sup>xxx</sup>, nous indique que *R. tsutsugamushi* ou typhus des broussailles se différencie des autres rickettsioses. Nous pouvons constater qu'il existe un nombre important de *Rickettsia*, pouvant expliquer la diversité des symptômes observés et la difficulté de définir la pathologie exacte<sup>261</sup>.

### Culture

La culture est impossible sur milieux inertes, même enrichis. Elle est réalisable in-vivo dans le sac vitellin d'œufs de poules embryonnée (âgés de 6 à 7 jours), ou en culture de cellules. Après quelques jours d'incubation à 34°C, on recherche les *Rickettsia*, généralement très abondantes sur un frotti coloré. En raison des particularités culturelles, les caractères biochimiques ne sont pas recherchés. On peut aussi inoculer des vecteurs tels que les poux ou les tiques.

### Pathogénicité

Ils sont pathogènes et provoquent la rickettsiose.

### Pathologie

Les *Rickettsia* sont de très petites bactéries susceptibles d'occasionner des infections sévères chez les mammifères et chez l'Homme. Le genre *Rickettsia* se compose à ce jour de 25 espèces et de dizaines de souches encore mal connues. La majorité de ces bactéries est associée à une tique leur servant de vecteur et souvent de réservoir. Les autres sont vectorisées par des poux, des puces ou des *thrombiculidés* (galle). Parmi les 16 rickettsioses connues actuellement, plusieurs ont d'abord été considérées comme étant non pathogènes pour l'Homme. On supposait aussi à tort que chaque rickettsiose se cantonnait à un seul continent. Les rickettsioses sont des maladies infectieuses, ré-émergentes, polymorphes, potentiellement mortelles, mondialement répandues. À n'en pas douter, de nombreuses pathologies inexpliquées résultent encore de rickettsioses méconnues. En conséquence, toute *Rickettsia* isolée chez une tique doit a priori être suspectée d'être pathogène.

### Manifestations cliniques

Les *Rickettsia* se multiplient fréquemment à leur point d'inoculation pour donner une escharre. Leur tropisme pour les cellules endothéliales des petits vaisseaux sanguins explique l'apparition de vascularite, d'inflammation périvasculaire et de thrombose. La conséquence de ces atteintes se traduit par l'apparition d'un purpura autour des lésions capillaires.

Les péri-vascularites provoquent les atteintes viscérales : gangrène de la peau et des tissus, signes d'encéphalite. La bactérie peut provoquer des syndromes fébriles et des méningites. Elle ne se développe d'ailleurs pas aussi fréquemment dans le noyau des cellules hôtes que ces dernières et occasionne des atteintes cliniquement moins spectaculaires, expliquant sans doute qu'elle ait été reconnue plus tardivement.

<sup>xxx</sup> **Citrate synthase** : première enzyme intervenant dans le cycle de Krebs. La citrate synthase permet la transformation d'une molécule d'acétyl-coA et d'une molécule d'oxaloacétate en citrate. Cette transformation nécessite de l'eau, elle permet aussi le relargage de la coenzyme A. Cette réaction permet de lier l'acétyl-CoA à la fonction cétone de l'oxaloacétate pour former le citrate. Cette réaction est irréversible ( $\Delta G^\circ = -32 \text{ kJ/mol}$ ), elle oriente le flux du cycle, l'énergie est fournie grâce au clivage de la liaison thioester de l'acétyl-CoA.

**Tableau des genres, des caractéristiques et des pathologies des *Rickettsia*.**

Groupes	Espèces	Maladies	Vecteurs	Réservoirs
2 espèces	<i>R. prowazekii</i>  <i>R. typhi</i>	Typhus épidémique ou exanthématique  Typhus murin ou endémique	Poux <b><i>Pediculus humanus</i></b>  Puces <b><i>Xenopsylla cheopis</i><sup>yyy</sup></b>	Homme  Rat
18 espèces	<i>R. conorii</i> , <i>R. rickettsii</i> <i>R. akari</i>	Fièvre à tiques américaine La fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses	Tiques, famille <b><i>Ixodidae</i></b> <b><i>Dermacentor variabilis</i></b> <b><i>Dermacentor andersoni</i></b>	Rongeurs Chiens
26 espèces	<i>R. conorii subsp conorii</i> , <i>R. conorii israelensis</i> <i>R. rickettsii</i> <i>R. africae</i> <i>R. akari</i> <i>R. felis</i> <i>R. mooseri</i>	Fièvre à tiques Européenne La fièvre boutonneuse Méditerranéenne	Tiques <b><i>Rhipicéphalus sanguineus</i></b> <b><i>Ixodes ricinus</i></b> <b><i>I. hexagonus</i></b>	Rongeurs Lapin Chiroptères
3 espèces	<i>R. felis</i> <i>R. conorii</i> <i>R. akari</i>	Dont la fièvre boutonneuse à puces	Puces <b><i>Siphonaptera</i></b>	Chat Oiseaux Chiroptères
2 espèces	<i>R sibirica subsp. mongolotimonae</i> <i>R. slovaca</i>	La lymphangite à tique LAR	Tiques <b><i>Dermacentor spp</i></b>	Oiseaux & rongeurs
2 espèces	<i>R. africae</i> <i>R. conorii subsp.nov (Afrique sud)</i>	Fièvre Africaine atypique	Tiques Famille des <b><i>Ixodidae</i></b> <b><i>Amblyomma variegatum</i><sup>zzz</sup></b>	Beaucoup d'espèces
1 espèce	<b>Classe Orientia</b> <i>O. tsutsugamushi</i>	Typhus de broussailles	Acariens : ≈ mesurant de quelques mm à 0,4 mm <b><i>Trombiculidae</i></b>	Rongeurs Souris Taupes Musaraignes Autres rongeurs
1 espèce	<i>R. akari</i>	Fièvre vésiculeuse ou Rickettsia pox varicelliforme	Acariens <b><i>Liponyssoides</i><sup>aaaa</sup> <i>sanguineus</i></b>	Souris, taupes, musaraignes

Tableau extrait du *Mémento technique de microbiologie* de Jean-Paul Larpent, Monique Larpent-Gourgaud

## Symptomatologie

La maladie a une répartition mondiale. Après incubation de 7 à 14 jours, la période d'état se caractérise par une fièvre aiguë associée à des frissons, des céphalées, des myalgies (Le syndrome

<sup>yyy</sup> *Xenopsylla cheopis* : une des puces du rat qui joue le rôle de principal vecteur dans la transmission du bacille de la peste, *Yersinia pestis* (on estime à plus d'une centaine le nombre d'espèces de puces impliquées dans cette transmission). C'est aussi le vecteur du Typhus murin, une autre zoonose du rat.

<sup>zzz</sup> *Amblyomma hebraeum* : tique parasitant trois-hôtes qui transmet *Ehrlichia ruminantium*, (rickettsiae cause de la cowdriose — maladie infectieuse mortelle des ruminants. Elle provoque également des morsures graves. *Amblyomma variegatum*, est également une tique à trois hôtes, transmettant la cowdriose, la fièvre Q (*Coxiella burnetii*) et la maladie du mouton de Nairobi (*Nairobi sheep disease*). Appelé aussi *tropical bont tick*.

<sup>aaaa</sup> **Lymphangite** : à tique, un peu comme l'infection par *R sibirica subsp mongolotimonae*, elle se traduit le plus souvent par une escarre du cuir chevelu associée à des adénopathies cervicales douloureuses. Cependant le LAR se traduit dans 40 % des cas par une lymphangite s'étendant de l'escarre à une adénopathie satellite.

grippal est l'un des premiers signes) avec parfois céphalées, arthralgies, myalgies, nausées, vomissements. La fièvre atteint 39 °C à 41 °C avec agitation et confusion mentale. Non traitée, cette fièvre peut durer plusieurs semaines avec des céphalées, des malaises, un état de prostration.

Ensuite vers les 4<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jours une éruption de type maculo-papuleuse rosée aux contours mal définis, parfois pétéchiale, apparaît sur le tronc, épargnant le visage, la paume des mains et la plante des pieds.

Des complications graves peuvent survenir, elles incluent défaillance rénale, purpura fulminants, pneumopathie sévère, gangrène... La rapidité de la mise en œuvre du traitement contribue pour beaucoup à réduire la sévérité de l'atteinte.

En règle générale l'évolution est favorable, mais on peut observer des tableaux sévères avec atteintes neurologiques, rénales, hépatiques ou respiratoires dans 4 % des cas ; la mortalité peut se produire en absence de traitement, en particulier en cas d'antécédents médicaux ou de déficit en G6PD.

Dans le cas des maladies non traitées, une rechute peut apparaître plusieurs années plus tard

Deux rickettsioses se singularisent par leurs caractères cliniques :

- Deux européennes causées
  - À la saison froide par *R. slovaca*.
  - Au printemps par *R. sibirica subsp mongolotimonae*.
- L'autre africaine semblant être une infection bénigne, elle se caractérise par des adénopathies, et des escarres multiples.

### Diagnostic

Le diagnostic de rickettsiose repose d'abord sur des données cliniques et surtout épidémiologiques (lieu de résidence du patient, la notion de voyage récent en zone d'endémie, la saison, l'espèce de tique vectrice, le réservoir : chien, chat..., l'activité du sujet : profession, loisirs...).

### Diagnostic sérologique

La détection des anticorps spécifiques est habituellement possible après 2 à 3 semaines d'évolution de la maladie. Il n'existe que très peu de réactions croisées avec des espèces non-Rickettsiennes. D'ailleurs, la réaction de Weil-Felix utilise l'existence de réactions croisées de trois souches de *Proteus* utilisées comme antigènes (*P. vulgaris* OX2, *P. vulgaris* OX19 et *P. mirabilis* OXK).

De fortes réactions croisées sont par contre fréquentes entre les différentes espèces de *Rickettsia*, il est d'ailleurs possible que ces réponses sérologiques soient accompagnées d'une séroprotection croisée. Le sérodiagnostic de rickettsiose repose sur la fixation du complément, et sur l'immunofluorescence-IgM étant plus rapide. Concernant l'interprétation des résultats, il est nécessaire de rappeler qu'en zone d'endémie, les sérologies positives sur un seul sérum peuvent témoigner simplement de l'existence d'une cicatrice sérologique<sup>262</sup>.

Les sérums doivent être testés en fonction de l'origine géographique des prélèvements (Europe, Asie, Amérique ou Afrique). C'est la raison pour laquelle ils doivent toujours être accompagnés d'une fiche de recueil des renseignements épidémiologiques et cliniques (fiche établie par le CNR des *Rickettsia*, d'autres fiches sont aussi disponibles sur son site). Ces sérums sont quantifiés en IgG et IgM.

Il est recommandé d'adresser un second sérum à 10-15 jours d'intervalle du premier, afin d'objectiver une ascension des titres, ou une séroconversion. La fièvre à tique africaine se traduit par une séroconversion plus tardive qu'au cours des autres rickettsioses. Les IgM apparaissent environ 25 jours après le début des symptômes, les IgG après 28 jours. En conséquence, il faut demander un second sérum tardif, au moins quatre semaines après le début des symptômes.

Il existe un test de diagnostic rapide (TDR) consistant à la détection des anticorps IgG, IgM, IgA de *O. tsutsugamushi*. Il est développé dans le sérum, le plasma et le sang total. Sa sensibilité serait de 99 % et sa spécificité de 96 %.

### Seuils de positivité utilisés au Centre National des Rickettsioses (Marseille) :

- Fièvre boutonneuse méditerranéenne (*Rickettsia conorii*) : IgG > 128 et IgM > 6
- Infections à *R. africae* et *R. slovaca* : IgG > 64 et IgM > 32
- Autres rickettsioses : IgG > 64 et IgM > 32

Tableau 3. Caractéristiques cliniques des rickettsioses éruptives

Maladie	Bactérie	Éruption	Spécificité de l'éruption	Céphalées	Escarre	Escarres multiples	Adénopathies locales
Fièvre boutonneuse méditerranéenne	<i>Rickettsia conorii</i>	97 %	10 % purpurique	56 %	72 %	Très rare	Rare
Fièvre pourprée des montagnes Rocheuses	<i>Rickettsia rickettsii</i>	90 %	45 % purpurique	80 %	–	Non	Non
Siberian tick typhus North Asian tick typhus	<i>Rickettsia sibirica</i>	100 %	0	100 %	77 %	Non	Oui
Fièvre boutonneuse d'Israël	<i>Israeli tick typhus rickettsia</i>	100 %	Rarement purpurique	Oui	–	Non	Non
Fièvre vésiculeuse ou rickettsial pax	<i>Rickettsia acari</i>	100 %	Vésiculeuse	100 %	83 %	Oui	Oui
Fièvre à tique du Queensland	<i>Rickettsia australis</i>	100 %	Vésiculeuse	–	65 %	Non	Oui
Fièvre boutonneuse	<i>Rickettsia honei</i>	85 %	8 % purpurique	73 %	25 %	Non	Oui
Fièvre d'Astrakhan	<i>Astrakhan fever rickettsia</i>	100 %	0	92 %	23 %	Non	Non
Fièvre à tique africaine	<i>Rickettsia africae</i>	30 %	Vésiculeuse	Oui	100 %	Oui	Oui
Pseudo-typhus de Californie	<i>Rickettsia felis</i>	Inconstant	0	?	?	?	?
Fièvre boutonneuse orientale	<i>Rickettsia japonica</i>	100 %	0	22 %	90 %	Non	Non
Infection à <i>Rickettsia mongolotimonae</i>	<i>Rickettsia mongolotimonae</i>	Oui	0	Oui	Oui	Non	Non
Infection à <i>Rickettsia slovaca</i>	<i>Rickettsia slovaca</i>	Non	–	Oui	Oui	Non	Oui
Typhus épidémique	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Oui	Purpurique	Oui	Non	Non	Non
Typhus murin	<i>Rickettsia typhi</i>	Oui	Purpurique	Oui	Non	Non	Non
Typhus des broussailles	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Oui	0	Oui	Oui	Oui	Oui

In : – Parola P, Raoult D. – Rickettsioses éruptives. – EMC – Maladies Infectieuses 1998 ; 8-037-I-20, p. 8.

## Orientations diagnostiques

Le type de morsure tient à la stratégie de recherche d'hôtes des tiques. La première, de loin la plus fréquente, est l'attente passive en embuscade (*ambush strategy*). Les tiques attendent sur la végétation le passage d'un hôte pour s'y accrocher (tiques de type européennes comme *Ixodes ricinus* et les *Dermacentor spp*). La morsure de tique est le plus souvent unique. La seconde stratégie est l'attaque (*hunter strategy*) où les tiques attaquent les hôtes passant à leur proximité (*Amblyomma hebraeum* et *A. variegatum*). Cette stratégie se traduit le plus souvent par plusieurs morsures simultanées et donc des taches noires multiples. Certaines espèces de tiques sont susceptibles d'utiliser ces deux stratégies, en fonction des conditions climatiques.

## Particularités cliniques

### Typhus épidémique ou exanthématique

Il est transmis par les puces de rat — *Xenopsylla cheopis* — ou de chat — *Ctenocephalides felis*<sup>bbb</sup> ou pou de corps. Elle a été à l'origine de grandes épidémies accompagnant la famine et les guerres. Cette maladie est devenue rare, mais risque de persister dès lors qu'il se produit un rassemblement de population dans la misère avec de mauvaises conditions d'hygiène.

### 21.1.6.2 Famille *Anaplasmataceae*

Dans la grotte de Sulzbrunn, la famille des *Anaplasmataceae* est présente dans les biofilms et les snottites mais pas dans les eaux. Dans cette étude il n'a pas été défini les genres de cet ordre trouvé

<sup>bbb</sup> *Ctenocephalides felis* : (selon Bouche [1835]) puce du chat, insecte siphonaptère qui est connu comme l'ectoparasite le plus fréquent du chat et du chien en zone tempérée. On peut aussi la rencontrer sur au moins 50 espèces de mammifères à travers le monde. Elle peut parfois pulluler sur des animaux de ferme (veaux par exemple). Une autre puce, *Ctenocephalides canis* (selon Curtis) semble spécifique du chien mais elle est peu fréquente en France.

dans cette cavité. Répartition microbienne de la famille des *Anaplasmataceae* dans la grotte de Sulzbrunn par catégorie de prélèvement :

Snottites	≈ 1,7 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 0,6 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 0,4 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<2 %	sur la flore totale de cette structure

**Ordre Rickettsiales ou Pelagibacterales (suivant les classifications) ;  
 Famille Anaplasmataceae ; Genre Ehrlichia (maladie de Brill-Zinsser)**

**Genres de la famille des Anaplasmataceae<sup>263</sup>**

- *Anaplasma*
- *Ehrlichia*
- *Neorickettsai*
- *Wolbachia*

**21.1.6.2.1 Genre Anaplasma**

**Morphologie**

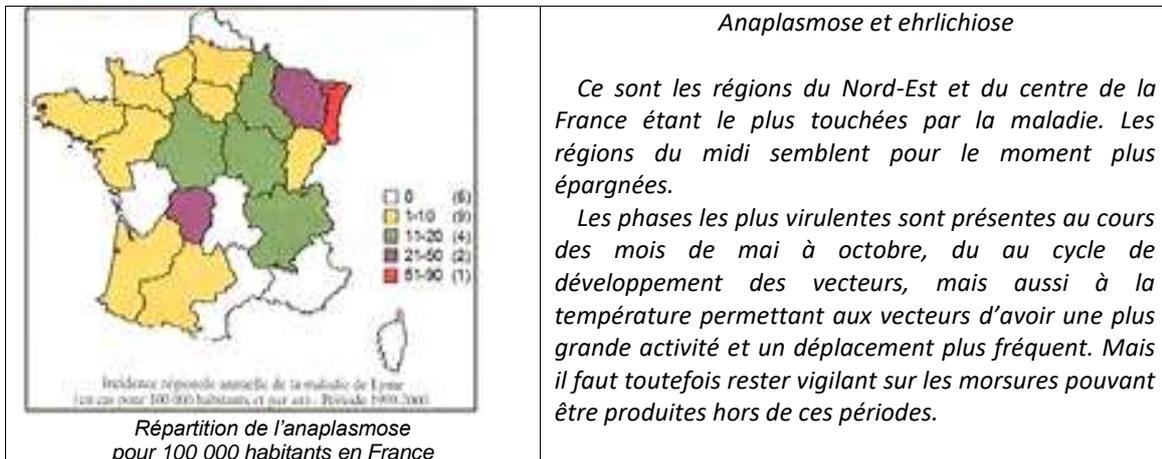
C'est une petite bactérie de 0.3 à 1 µm de diamètre. Elle se multiplie par fission binaire à l'intérieur d'une vacuole dans l'érythrocyte.

**Caractéristiques**

Comprend une espèce pathogène *Anaplasma marginale*, génotypiquement très proche des *Ehrlichia*. C'est un parasite des érythrocytes des ruminants, étant transmis par des arthropodes vecteurs. Les animaux infectés sont les bœufs, les zébus, les bisons et les antilopes.

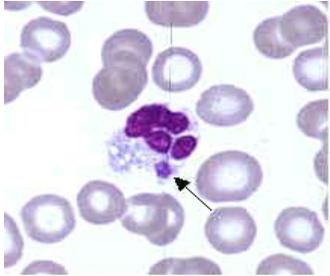
**Traitement** : la tétracycline inhibant la multiplication de la bactérie.

**Épidémiologie des Anaplasmataceae<sup>264</sup>**



### 21.1.6.2.2 Genre *Ehrlichia*

Nom donné par Moshkovski, 1945.

	<p style="text-align: center;"><b>Morphologie Ehrlichia</b></p> <p><i>Ce sont des bactéries Gram (-) pouvant infecter l'Homme ou l'animal. Agent de maladie toujours transmissible par les tiques. Elles sont intracellulaires strictes avec un tropisme particulier pour les cellules sanguines (leucocytes, plaquettes) et les cellules endothéliales. Cette famille comprend les dix genres suivants : Aegyptianella, Anaplasma, Ehrlichia, Eperythrozoon, Haemobartonella, Cowdria, Neorickettsia, Neoehrlichia, Paranasplasma et Xenohalictis étant des formes pathogènes pour l'Homme ou les animaux. Les Ehrlichia se divisent selon un cycle voisin des Chlamydia. Le relargage des particules infectieuses se fait par éclatement du phagosome. Les Ehrlichia sont transportés entre les cellules par le biais d'organes de la cellule hôte, étant les filopodes (actines) pendant les étapes initiales de l'infection, alors que dans les dernières étapes, étant l'éclatement du phagosome, ces filopodes vont protéger les bactéries contre les anticorps et les macrophages.</i></p>
---	---

### Étiologie de l'ehrlichiose

Le terme d'ehrlichiose regroupe (sous des symptômes proches ou identiques) deux groupes de maladies, chacun de ces groupes étant différents en terme épidémiologique et étiologique. On a l'Ehrlichiose Monocytaire Animale (EMA) et l'Ehrlichiose Monocytaire Humaine (EMH) également nommée « Ehrlichiose à *Ehrlichia chaffeensis*<sup>265</sup> » et anaplasmose humaine.

L'ehrlichiose a d'abord été décrite chez l'animal. Des infections humaines à l'*Ehrlichia* n'ont été diagnostiquées que plus récemment, avec d'abord l'ehrlichiose du Japon en 1953, et beaucoup plus tardivement (en 1987) l'Ehrlichiose Monocytaire Humaine avant que ne soit découverte en 1994 l'Ehrlichiose Granulocytaires Humaine<sup>266</sup>.

Il a été mis en évidence que ces bactéries pouvaient infecter l'Homme et l'animal ; deux autres espèces *Ehrlichia canis*<sup>267</sup> et *Ehrlichia ewingii* sont responsables de l'ehrlichiose canine, elles ont été récemment décrites comme pathogènes chez l'Homme.

Les espèces pathogènes pour l'Homme, jusqu'à ces dernières années étaient les plus connues sont l'*Ehrlichia sennetsu* donnant la fièvre glandulaire et l'*Ehrlichia chaffeensis* donnant l'ehrlichiose américaine ; ils ont pour cibles les monocytes et les macrophages.

### Reclassification dans le genre *Ehrlichia*<sup>268</sup>

L'évolution de la détection et des techniques analytiques génétiques ont mis au jour cinq espèces ayant démontré leurs pathogénicités humaines :

- *Anaplasma phagocytophilum* provoquant l'anaplasmose granulocytaire humaine, il est endémique à la Nouvelle-Angleterre et dans les régions du Pacifique du Nord des États-Unis d'Amérique.
- *Ehrlichia ewingii*<sup>269</sup> engendrant l'ehrlichiose *ewingii* humaine, infectant principalement les cerfs et les chiens, est la forme la plus courante dans les États du Sud et du Sud-Est des États-Unis d'Amérique.
- *Ehrlichia chaffeensis*<sup>270</sup> provoquant l'ehrlichiose monocyttaire humaine est courante dans les États du Sud des États-Unis d'Amérique<sup>271</sup>.
- *Ehrlichia canis*<sup>272</sup> ayant été détecté chez l'Homme.
- *Neorickettsia sennetsu* provoquant la fièvre glandulaire et ayant pour cible les monocytes et les macrophages. Cette maladie a seulement été trouvée au Japon et Malaisie. Les vecteurs du *N. sennetsu* sont des trématodes parasites chez les poissons. Les bactéries infectent ceux se nourrissant de poisson mal cuit ou poisson cru (selon le CDC). Les bactéries envahissent les monocytes et les macrophages. L'infection provoque la *Sennetsu fever*, étant le principal symptôme avec des maux de tête, frissons, maux de gorge, insomnie.

## Caractéristiques des Ehrlichioses

Espèce	Hôtes naturels	Symptomatologie	Cellules cibles <i>in vivo</i>	Vecteur
<i>E. canis</i>	Chiens	Ehrlichiose canine	Monocytes-Macrophages	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>E. sensu lato</i>	Homme	Fièvre glandulaire	Monocytes Macrophages	
<i>E. risticii</i>	Cheval	Ehrlichiose équine	Monocytes Macrophages Cellules épithéliales intestinales	
<i>E. equi</i>	Cheval	Ehrlichiose équine	Granulocytes	
<i>E. phagocytophila</i>	Mouton, Bétail, Bisons	Tick-Borne Fever	Granulocytes	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>E. bovis et ovina</i>	Moutons, Bétail	Ehrlichiose bovines et ovines	Monocytes Macrophages	<i>Hyalomma rhipicephalus</i> <i>H. bursa</i>
<i>E. ewingii</i>	Chiens	Ehrlichiose canine	Granulocytes	
<i>E. ondiri</i>	Bétail, Moutons	Fièvre pétéchiale bovine	Granulocytes	
<i>E. platys</i>	Chiens	Thrombopénie cyclique canine	Plaquettes	
<i>C. ruminantium</i>	Chèvres, Moutons Bétail	Péricardite	Cellules endo- théliales	<i>Amblyomma</i>
<i>N. helminthoeca</i>	Chiens et canidés	Vomissement diarrhée	Macrophages	<i>N. salmicola</i> (Helminthes)
<i>E. chaffeensis</i>	Homme	Ehrlichiose humaine, américaine	Monocytes macrophages	<i>Amblyomma americanum</i>

### Évolution de l'infection par la famille *Anaplasmataceae*

Phases de l'infection d'un globule blanc par *Ehrlichia* et *Anaplasma* :

- Pénétration d'une *Ehrlichia* dans le cytoplasme.
- Formation d'une vacuole.
- Reproduction dans une morula (groupe circulaire de bactéries ressemblant au stade morula en embryologie).
- Émission de bactéries infectantes (par lyse du phagosome) avec protection des bactéries par les filopodes.

Les *Anaplasma* et les *Ehrlichia* sont des bactéries zoonotiques intracellulaires obligatoires (elles ne peuvent se développer qu'à l'intérieur de certains globules blancs ou érythrocytes de leur hôte). Si on les colore, elles apparaissent en microscopie comme des « cocci » de 1 à 3 µm de diamètre.

Dans la phase aiguë de la maladie elles forment des « morulae » pathognomonique (spécifique organisation de ces bactéries, n'apparaissant cependant que dans 1 à 42 % des polynucléaires neutrophiles) circulant pour l'anaplasmose et dans les monocytes et macrophages pour l'EMH<sup>273</sup>.

La formation de *morula* est une caractéristique de cette famille de bactéries pathogènes, c'est un élément majeur du diagnostic. La bactérie peut aussi constituer des *morulae* dans les phagosomes et les macrophages de la rate, du foie, des poumons, des reins, de la moelle osseuse et du liquide céphalo-rachidien (détectées après biopsie)<sup>274</sup>.

La maladie s'exprime (une à trois semaines après la morsure de la tique) par un syndrome grippal aigu et non spécifique (avec fièvre dans 98 % des cas), il apparaît des céphalées (81 % des cas), des myalgies (68 % des cas) et signes digestifs possibles (anorexie, nausées, vomissements, douleurs abdominales dans 50 % des cas environ), ou de la conjonctivite. Parfois, des pharyngites, avec une toux ou des lymphadénopathies sont observées (25 % des cas), avec aussi un état confusionnel dans environ 25 % des cas<sup>275</sup>.

Les symptômes peuvent comporter une pneumopathie atypique associée, étant fréquent aux États-Unis d'Amérique, et une pneumonie interstitielle ayant été décrite en Alsace en 2002<sup>276</sup>.

Des éruptions cutanées sont plus fréquentes dans l'EMH, dans environ 30 % des cas (elles sont rares en cas d'anaplasmose granulocytaire, environ 2 %), principalement dans la première semaine, leur répartition est indépendante de la localisation de la morsure.

**Formes cliniques :** elles varient en modalités et intensités, de formes asymptomatiques (selon S. Dumler aux États-Unis d'Amérique seuls 1 % des cas seraient diagnostiqués, les autres étant infra-cliniques ou faisant l'objet d'erreurs de diagnostic) à des formes mortelles et nosocomiales (qui ont été observée dans un cas en Chine)<sup>277</sup>. Le décès est dû à une septicémie, une détresse respiratoire aiguë, rhabdomyolyse<sup>cccc, dddd</sup>, hémorragies, neuropathies périphériques ou à des infections opportunistes ou nosocomiales avec éventuelles complications graves : rénales, hépatiques ou cardiaques. Parfois 50 à 60 % des malades (aux États-Unis d'Amérique) meurent dans les formes graves<sup>278</sup>. Un diagnostic et des soins précoces atténuent la gravité des épisodes.

Une hypothèse (établie à partir de cas d'animaux, mais à confirmer) serait que des infections répétées pourraient ensuite dégénérer en phase chronique sévère<sup>279</sup>.

### Gravité de l'infection

- Pour l'EMH (Ehrlichiose monocytique humaine) : 60 % des malades sont hospitalisés, avec 2 à 3 % de décès.
- Pour l'anaplasmose : 28 à 54 % des malades sont hospitalisés (selon les sources) avec 7 à 10 % de décès.

Quand le malade guérit, il y a le plus souvent guérison spontanée sans traitement après 10 jours de fièvre chez l'enfant ; mais l'adulte est victime d'une infection plus chronique, avec fièvre rémittente durant 3 à 11 semaines.

Le risque de décès est élevé en cas de déficit immunitaire.

### Diagnostic

Les prélèvements sanguins, permettent, surtout la première semaine des manifestations, de l'infection, de caractériser la maladie :

Leucopénie dans 60 % des cas,

- Thrombocytopénie dans 68 % des EMH et 90 % des anaplasmoses,
- Anémie modérée dans 50 % des cas,
- Inclusions caractéristiques (*morulae* ou corps élémentaires) dans le cytoplasme des neutrophiles.

Insuffisance rénale dans 70 % des cas, élévation modérée des transaminases hépatiques dans 86 % des cas<sup>280</sup>, et LDH et bilirubine étant élevées dans tous les cas testés. Le frottis sanguin (coloré) montre (mais pas toujours facilement pour un non spécialiste) des *morulae* pathognomoniques. Les *morulae* ne sont visibles que dans 1 à 42 % des polynucléaires neutrophiles circulant pour l'anaplasmose (et dans les monocytes et macrophages pour l'EMH)<sup>281</sup>.

Il en existe aussi dans les phagosomes des macrophages de la rate, du foie, des poumons, des reins, de la moelle osseuse et du LCR (détectées à l'autopsie).

### Diagnostic sérologique

L'immunofluorescence indirecte (IFI), à partir de la troisième semaine, peut souvent confirmer le diagnostic. Un test Élixa existe maintenant pour l'anaplasmose humaine<sup>282</sup>, basé sur l'antigène recombinant HGE 44 et semblant dépourvu de réactions croisées avec la borréliose de Lyme, la syphilis, la polyarthrite rhumatoïde et l'ehrlichiose<sup>283</sup>.

### Diagnostic PCR

La PCR permet maintenant une confirmation en 23 à 48 heures, permettant de limiter les risques de complications (rares mais graves) par un traitement précoce<sup>284</sup>.

---

<sup>cccc</sup> **Rhabdomyolyse** : rupture (par écrasement mécanique ou intoxication) des cellules musculaires striées avec libération, par les cellules détruites, de myoglobine (équivalent de l'hémoglobine, permettant la respiration musculaire) qui est retrouvée dans les urines (myoglobinurie) et leur donne une coloration brune.

Un cas clinique d'ehrlichiose est certain aux conditions suivantes :

- Taux d'anticorps anti-**A. phagocytophilum** augmentant d'au moins quatre fois le titre entre la phase aiguë et la convalescence, avec un minimum de 1/64 ;
- PCR est positive ;
- Des *morulae* sont identifiées dans les leucocytes et le taux d'anticorps anti- *A. phagocytophilum* est positif (selon les seuils de positivité de chaque laboratoire) ;
- Coloration immunohistochimique de l'antigène **A. phagocytophilum** positive (sur biopsie ou tissus d'autopsie) ;
- Culture d'**A. phagocytophilum** positive.

Un cas est dit probable, si :

- Syndrome grippal avec sérologie au moins égale à 1/80 en IFI ;
- Ou si des *morulae* sont visibles dans les frottis sanguins<sup>285</sup>.

En cas de traitement très précoce, la sérologie peut ne pas se positiver (la PCR permet alors un diagnostic de certitude). La sérologie est positive chez 100 % des autres convalescents et peut le rester jusqu'à quatre ou cinq ans après l'infection. Une sérologie positive n'indique cependant pas nécessairement une infection aiguë (2/3 au moins des séroconversions sont asymptomatiques). Quelques réinfections documentées dans les deux ans suivant une infection par **A. phagocytophilum** montrent que l'immunité n'est pas durable ou pas toujours durable<sup>286</sup>. Seule l'évolution de la sérologie permet de conclure.

En cas de complications neurologiques, l'étude du liquide céphalo-rachidien (LCR) montre une pléiocytose<sup>eeee</sup> avec *morulae* dans les phagosomes des leucocytes. L'immuno-cytologie et la PCR prouvent aussi la présence d'*Ehrlichia* ou d'*Anaplasma* dans le LCR.

#### 21.1.6.2.3 Genre *Cowdria*

Le genre *Cowdria ruminantium* est pathogène pour le mouton, la chèvre et les ruminants ; il est transmis par les tiques. Il donne des péricardites, les cellules cibles de la bactérie sont les cellules endothéliales. La tique vectrice est l'*Amblyomma*.

#### 21.1.6.2.4 Genre *Neorickettsia*

Dans ce genre il y a l'espèce, *Neorickettsia helminthoeca*, parasite d'un helminthe *Nanophyetus salmincola* ayant un cycle parasitaire complexe faisant intervenir d'une part des escargots (*Oxytrema silicula*) et d'autre part les saumons de rivière. L'hôte final est souvent le chien, se contaminant par la nourriture (par consommation du saumon)<sup>287</sup> ; les symptômes sont une anorexie, une déshydratation, des vomissements et une diarrhée. Les cibles de la bactérie sont les macrophages<sup>288</sup>.

#### 21.1.6.2.5 Genre *Eperythrozoon*

Il affecte les ovins et caprins, transmis par un arthropode hématophage, ils sont localisés à la surface ou à la périphérie des globules rouges et sont à l'origine d'anémies, d'ictères et de fièvre.

#### 21.1.6.2.6 Genre *Haemobartonella*

Genre épi érythrocytaire, il est transmis par les poux aux vertébrés.

#### 21.1.6.2.7 Genre *Aegyptianella*

Ce genre intra érythrocytaire, il est transmis aux oiseaux par les tiques.

### 21.1.7 Ordre IV *Sphingomonadales* (Grotte de Sulzbrunn)

Répartition microbienne de l'ordre *Sphingomonadales* dans la grotte de Sulzbrunn par catégorie de prélèvement :

Snottites ≈ 2,3 % sur la flore totale de cette structure

---

<sup>eeee</sup> Pléiocytose : Présence en abondance de cellules dans un tissu ou liquide.

Biofilms « subaerial »	≈ 3,9%	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 9 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	<2 %	sur la flore totale de cette structure

Familles de l'ordre des *Sphingomonadales* avec les genres de chacune des familles

Famille : <i>Sphingomonadaceae</i>	Famille : <i>Erythrobacteraceae</i>
<b>Genres</b> <i>Sphingomonas</i> , <i>Blastomonas</i> , <i>Erythromonas</i> , <i>Novosphingobium</i> , <i>Rhizomonas</i> , <i>Sandaracinobacter</i> , <i>Sandarakinorhabdus</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Sphingomicrobium</i> , <i>Sphingopyxis</i> , <i>Sphingosinicella</i> , <i>Stakelama</i> , <i>Zymomonas</i>	<b>Genres</b> <i>Erythrobacter</i> , <i>Altererythrobacter</i> , <i>Croceicoccus</i> , <u><i>Erythromicrobium</i></u> , <u><i>Porphyrobacter</i></u>

**Morphologie** : coques, bâtonnets, spirilles.

**Caractéristiques** : fermentaires, saprophytes, dénitrifiants, méthylotrophes, fixateurs de l'Azote, pathogènes.

**Croissance** : aérobies, anaérobies facultatives ou stricts, mésophiles

**Nutrition** : chimioorganotrophes, photosynthétiques.

**Habitat** : ubiquistes, pathogènes.

#### 21.1.7.1 Famille *Sphingomonadaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Répartition microbienne de l'ordre *Sphingomonadaceae* présent dans la grotte de Sulzbrunn par catégorie de prélèvement :

Snottites	≈ 1,8 %	sur la flore totale de la structure
Biofilms « subaerial »	≈ 2,4 %	sur la flore totale de la structure
Biofilms « submersed »	≈ 3,8 %	sur la flore totale de la structure
Eau de source minérale	<1 %	sur la flore totale de la structure
Eau de mélange	<2 %	sur la flore totale de la structure

Les *Sphingomonadaceae* sont une famille de Gram (-) de l'ordre des *Sphingomonadales*. Cette famille regroupe une quinzaine de genres, dont certaines espèces sont des bactéries phyto-pathogènes. Le genre type est *Sphingomonas*.

Une caractéristique importante des *Sphingomonadaceae* est la présence de sphingolipides dans la membrane externe de la paroi-cellulaire<sup>289</sup>. Les cellules sont ovoïdes ou en forme de bâtonnet. Certaines sont également pléomorphes, c'est-à-dire que les cellules changent de forme au fil du temps. Certaines espèces sont phototrophes<sup>290</sup>. Les *Sphingomonadaceae* sont aussi connues par la capacité de certaines espèces à dégrader certains composés aromatiques. Cela rend ces bactéries intéressantes pour la dépollution de l'environnement.

**Genres de la famille des *Sphingomonadaceae***

<i>Aminobacter</i>	<i>Porphyrobacter</i>	<i>Sphingopyxis</i>
<i>Blastomonas</i>	<i>Sandaracinobacter</i>	<i>Sphingosinicella</i>
<i>Erythrobacter</i>	<i>Sandarakinorhabdus</i>	<i>Sphingobium</i>
<i>Erythromicrobium</i>	<i>Sphingobium</i>	<i>Sphingopyxis</i>
<i>Novosphingobium</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Zymomonas</i>

**Selon Worl Register of Marine species (15 août 2014)**

<i>Blastomonas</i> (Sly & Cahill, 1997)	<i>Sandaracinobacter</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Citromicrobium</i>	<i>Sandarakinorhabdus</i>	<i>Sphingopyxis</i>
<i>Lutibacterium</i>	<i>Sphingobium</i> (Takeuchi, 2001)	<i>Sphingosinicella</i>
<i>Novosphingobium</i>		<i>Proteobacter</i>

**Genres ayant des espèces non-classées**

<b>Selon NCBI (15 août 2014) :</b>	
genre <i>Blastomonas</i> genre <i>Citromicrobium</i> genre <i>Hephaestia</i> genre <i>Kaistobacter</i> genre <i>Lutibacterium</i> genre <i>Novosphingobium</i>	genre <i>Parasphingopyxis</i> genre <i>Polymorphobacter</i> genre <i>Sandaracinobacter</i> genre <i>Sandarakinorhabdus</i> genre <i>Sphingobium</i> genre <i>Sphingomicrobium</i> genre <i>Sphingomonas</i>

Dans l'étude de la cavité de Sulzbrunn, il n'a pas été défini de genre appartenant à la famille des *Sphingomonadaceae*.

1. *Spingomonas*
2. *Novoshingobium*
3. *Sandaracinoacter*
4. *Sandarakinorthabdus*
5. *Sphingobium*
6. *Spingomicrobium*
7. *Sphingosinicella*
8. *Stakelama*
9. *Zymomonas*

Codes	Tailles en $\mu\text{m}$	Mobilité	Formes	Sporulés	Colonies	Caractéristiques	Catalase	Red. Nitrate	G+c % mol	Habitats
1	0.3 - 0.8 $\varnothing$ ; 1 - 1.9 L	(+)	Bâtonnets	(-)	jaune	Chimio-organotrophe	(+)	nd	62-68	sol
2	0.3-0.5 $\varnothing$ 1 - 3 L	(+)	bâtonnets	(-)	Jaune-brun	Chimio-organotrophe	(+)	(+)	62-67	sol
3	0.3-0.5 $\varnothing$ 1.5 -2.5 L	(+)	Bâtonnets en Chaîne	nd	Jaune orangée	Chimio-organo & phototrophe	(-)	nd	69	Eau douce
4	0.3 - 0.6 $\varnothing$ 0.6 - 1 L	(-)	Bâtonnet	Granules PHB	Rouge orangée	hétérotrophe	(+)	nd	64	Lac de Bavière
5	0.3 - 0.7 $\varnothing$ 1 - 3.5 L	(+)	Bâtonnets	(-)	Jaune brun	Chimio-organotrophe		(+) aérobie (-) anaéro.	67	sol
6	0.3 - 0.5 $\varnothing$ 0.5 - 0.9 L	(+)	Bâtonnets	(-)	Jaune	Chimio-organotrophe	(+)	nd	63 - 65	Sol & aquifères
7	0.3 - 0.7 $\varnothing$ 0.6 - 1 Les	(+)	Bâtonnets	(-)	Jaune	Hétérotrophe	(+)	nd	64	Rivière Japon
8	0.5 - 0.8 $\varnothing$ 1.5- 2.0 L	Faible par flagelles	Bâtonnets	(-)	Jaune or circulaires	hétérotrophe	(+)	(+)	66	Océan Pacifique
9	0.5 - 0.8 $\varnothing$ 1.5 - 2.0 L	(-) Ou formes mobiles 4 flagelles polaires	Bâtonnets extrémité arrondies voir ellipsoïdes par paires	(-)	Jaune or circulaires	hétérotrophe	(+)	(+)	47.5 - 49.5	Bière et cidre

#### 21.1.7.1.1 Genre *Sandarakinorhabdus*

Complément d'information :

Le genre *Sandarakinorhabdus* est une bactérie aérobie ; avec accumulation PHB ; elle a un oxydase négative ; une phosphatase acide et alcaline (+) ; Oxydase (-) ; Elle utilise les acides organiques à courtes chaînes et des acide aminés ; Glycérolipides membranaires prédominants : phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-glycérol, phosphatidyl-choline, diphosphatidyl-glycérine et deux sphingo-glycolipides ; respiration : Lipoquinones respiratoire Q-10 et Q-9 ; Pigments : caroténoïdes de nostoxanthine et de Bchl a ;

#### Culture

Colonies de 1 – 3 mm, mucilagineuse, rouge -orangé.

Bonne croissance avec 1g/l de peptone et extrait de levure.

**Environnement** : une seule espèce isolée d'un lac de Bavière : *Sandarakinorhabdus limnophila*

**Observation** : Ce genre peut être intéressant à rechercher dans la grotte de Sulzbrunn.

#### 21.1.7.1.2 Genre *Stakelama*

Nom donné par State Key Laboratoire of Marine Environment Science.

Complément d'information :

Le genre *Stakelama* est une bactérie aérobie strict avec une oxydase (-) ; catalase (+) ; utilise : le maltose, le sorbitol, le lactose, tréhalose, cellobiose, les lactates, le gluconate, l'inositol, le glucose, le mannitol, les acétates, l'éthanol et les malates.

Utilise à faible dose : saccharose, glucose, galactose, malate, proline et thréonine.

N'utilise pas : le sorbose, le D-fructose, les dextrans, le citrate trisodique, les oxalates, L-alanine, L-lysine, le glycolle et l'arginine ;

Positive à la réaction du nitrate aérobie, production d'H<sub>2</sub>S ; réaction de VP (+) ;

Réaction négative pour Uréase, nitrites en anaérobiose, production indole, test rouge de méthyl et hydrolyse la gélatine, l'amidon, Tween 80 et la caséine ;

La quinone respiratoire : unique est Q-10 ;

#### Culture

Colonies jaune or, de 1mm de diamètre après 24h d'incubation à 28°C

Croissance optimale : 28°C (5 à 37°C) pH 8 (6 à 9) et résiste à 20 g/l de NaCl (0 à 50 g/l)

#### Antibiothérapie

Sensibles (µg par disque d'antibiogramme) : ampiciline (10) ; pénicilline (10) ; tétracycline (30) ; chloramphénicol (30) ; érythromycine (15) ; céfopéroxime (75) ; céfotaxime (30) ; ciprofloxacine (5) ; clarithromycine (15) ; gentamycine (120) et streptomycine (300).

Résistants à : clindamycine (2), sulfaniéthoxazole (300), vancomycine (30) et céfalothine (30).

Environnement : Océan Pacifique espèce connue *Stakelama pacifica*.

#### 21.1.7.1.3 Genre *Porphyrobacter* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Fuerst & al 1993

Le genre *Porphyrobacter* a été proposé par Fuerst et al., 1993, avec une seule espèce, *Porphyrobacter neustonensis*.

Dans cette cavité de Sulzbrunn, on le trouve aux environs de 5 à 10 % des *Alphaproteobacteria* de la flore totale des structures, des snottites et des biofilms.

Le genre *Porphyrobacter* présent sur la flore totale de chacune des structures de la grotte :

Snottites	≈ 1,7 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 2,9 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 1,2 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	<2 %	du total de la flore de cette structure

À l'heure actuelle, le genre *Porphyrobacter* comprend quatre espèces dont les noms validement publiés sont :

- *Porphyrobacter neustonensis* (Fuerst et coll., 1993)
- *Porphyrobacter tepidarius* (Hanada et coll., 1997)
- *Porphyrobacter sanguineus* (Hiraishi et coll., 2002)
- *Porphyrobacter cryptus* (Rainey et al., 2003)
- *Porphyrobacter colymbi*
- *Porphyrobacter dokdonensis*
- *Porphyrobacter donghaensis*

### Morphologie générale

Le genre *Porphyrobacter* est Gram négatif ; les cellules sont droites, pléomorphes, courbées à ovoïdes ou cocci, 0,5 à 1,0 × 0,8 à 2,0 µm. Les spores et capsules ne sont pas formés. Elles se multiplient par bourgeonnement ou par fission binaire, mobiles ou immobiles. Le genre *Porphyrobacter* synthétise une bactériochlorophylle estérifiée avec phytol et caroténoïdes comme les pigments photosynthétiques, uniquement dans des conditions aérobies et il peut en produire dans l'obscurité.

### Espèce *Porphyrobacter donghaensis* SP. nov.

Dans la grotte de Sulzbrunn il n'y a pas eu de définition de l'espèce présente du *Porphyrobacter*. L'espèce probable, proche par son biotype, serait l'espèce *Porphyrobacter donghaensis*.

### Morphologie<sup>291</sup>

*Porphyrobacter donghaensis* est Gram (-), cellules ovales ou en bâtonnets courts bâtonnets et pléomorphes, mobiles, non sporulé, produisant une bactériochlorophylle, légèrement halophile, souches contenant, SW-132 t et SW-158.

La morphologie des cellules a été examinée par microscopie optique (Nikon E600) et en microscopie électronique à transmission. Elle comporte des flagelles ayant été étudiées au microscope électronique à l'aide de cellules provenant de cultures en croissance exponentielle. Les cellules ont été colorées négativement à l'acide phospho-tungstique 1 % (p/v) et les grilles ont été examinées après séchage à l'air avec un microscope électronique à transmission Philips CM-20.

Dans des conditions anaérobies, la croissance a été déterminée après une incubation dans une chambre anaérobie sur MA et MA additionnée de nitrate ayant été élaboré par voie anaérobie utilisant de l'azote.

### Caractéristiques métaboliques

Les genres *Porphyrobacter* sont de couleur orange ou rouge et synthétisent la bactériochlorophylle (a) (Fuerst et coll., 1993 ; Hanada et coll., 1997 ; Hiraishi et al., 2002 ; Rainey et al., 2003). Les deux isolats ont été caractérisés par chimio-taxinomique comme ayant Q-10 (variation lorsque l'on augmente ou baisse de 10 points d'un paramètre) pour le lipo-quinone respiratoire prédominant et de grandes quantités d'acides gras insaturés C18 : 1v7c et C17 : 1v6c.

Les quinones isoprénoïdes sont des lipides terpénoïdes, constituants de la membrane plasmatique, intervenant dans le transport d'électrons. Il en existe deux groupes structuraux :

Ménaquinones	Benzoquinones
Phylloquinones Diméthylménaquinones	Ubiquinones Plastoquinones Naphtoquinones

Les bactéries de Gram (+) synthétisent uniquement des ménaquinones ou diméthyl-ménaquinones, mais jamais d'ubiquinones (1, 4-benzoquinones) :

Une variété de produits dérivés et analogues sont connus. Ubiquinone-1 est une 1, 4-benzoquinone naturelle étant impliqué dans l'appareil respiratoire.

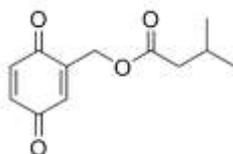
### Benzoquinones

La benzoquinone blattellaquinone est une phéromone sexuelle chez les blattes.

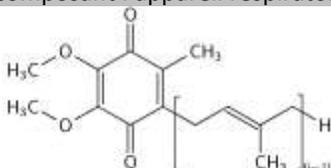
Une variété de produits dérivés et analogues sont connus. Ubiquinone-1 est une 1, 4-benzoquinone naturelle impliquant dans l'appareil respiratoire.

### La benzoquinone blattellaquinone

Elle est une phéromone sexuelle chez les blattes.

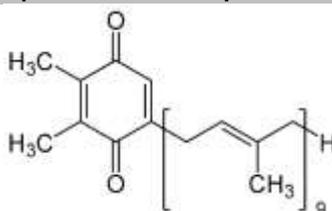


### Ubiquinone composant l'appareil respiratoire bactérien.



Ubiquinone ou coenzyme Q10 (on atome de carbones, soit 10 unités isopréniques dans la chaîne latérale).

### La Plastoquinone est identique à l'ubiquinone.



D'une manière générale ces molécules se rencontrent chez les organismes aérobies et non chez les anaérobies. Les *Sporolactobacillus* possèdent des ménaquinones de type MK7, les rapprochant des *Bacillus*.

	<b>La Phylloquinone</b>
<p><b>Phylloquinone (la vitamine K)</b></p> <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC=CC1=CC(=O)C=C(C)C1=O</chem> <p>Structure de la phylloquinone</p>	<p>La phylloquinone, également appelée vitamine K<sub>1</sub> ou phytoménadione est une 2-méthyl-1-4-naphtoquinone substituée avec un résidu 3-phytyle. C'est une vitamine K, liposoluble, stable à l'air et à l'humidité, mais se décomposant à la lumière du jour. On la trouve naturellement dans une grande variété de plantes, où elle joue le rôle d'accepteur d'électrons dans les chloroplastes au sein du photosystème-I des membranes thylakoïdes<sup>ffff</sup>. Elle intervient comme cofacteur dans la formation des facteurs de coagulation-II (prothrombine) VII, IX, et X dans le foie. Elle est utilisée pour remédier à la toxicité du coumaphène (warfarine) comme antidote pour la coumatétralyl (mort aux rats)</p> <p>Elle se trouve naturellement dans les feuilles vertes des végétaux notamment les choux, les épinards, brocolis.</p>

### Caractéristiques enzymatiques

Les codes des espèces de *Porphyrobacter* signalées dans le tableau ci-dessous :

<sup>ffff</sup> **Thylakoïdes** : compartiment membranaire à l'intérieur des chloroplastes et des cyanobactéries. Ils sont le lieu des réactions dépendant de la lumière de la photosynthèse. Les thylakoïdes sont constitués d'une membrane thylacoïde entourant un lumen (au sens biologique).

1. *P. neustonensis*
2. *P. tepidarius*
3. *P. sanguineus*
4. *P. cryptos*
5. *P. donghaensis*

Characteristic	1 (n=4)	2 (n=1)	3 (n=2)	4 (n=2)	5 (n=2)
Cell morphology	Pleomorphic	Ovals or short rods	Pleomorphic	Short rods	Pleomorphic
Catalase	+	ND	+	+	+
Oxidase	-	ND	+	+	+
Motility	+	-	+	+	-
Growth at 0% NaCl	+	+	-	ND	+
Hydrolysis of:					
Aesculin	V(+)	ND	ND	+	+
Casein	V(-)	ND	-	ND	-
Gelatin	-	-	-	+	-
Starch	-	+	-	+	+
Tween 80	+	+	-	ND	+
Utilization of:					
D-Fructose	V(-)	-	-	-	-
D-Galactose	+	ND	ND	-	-
D-Cellobiose	V(-)	ND	+	+	+
D-Mannose	+	ND	-	-	-
D-Trehalose	V(+)	ND	ND	-	-
D-Xylose	+	ND	ND	+	V(+)
L-Arabinose	-	ND	-	-	-
Sucrose	+	ND	+	+	V(-)
Acetate	-	+	+	-	V(-)
Succinate	V(+)	-	-	-	+
L-Malate	-	-	-	-	+
Pyruvate	V(+)	-	+	+	+
Lactose	-	ND	-	-	-
L-Glutamate	ND	+	+	+	-
Max. temperature (°C)	37	52	37	<60	<50
Optimum growth temperature (°C)	30	40-48	30	50	30-37
DNA G+C content (mol%)	65.7-66.4	65.0	63.8-64.0	66.2	65.9-66.8

### Résistance à la teneur en sel (ACL)

Les souches de *Porphyrobacter* SW-132 t et SW-158 étaient semblables concernant la plupart de caractéristiques morphologiques, culturelles, physiologiques et biochimiques.

Les deux souches ont augmenté de façon optimale à la température de 30 à 37° C en présence de 2 % (p/v) NaCl, elles ont pu croître à cette teneur de sel. La souche SW-132 t ne pousse pas en présence de > 6 % NaCl, alors que la souche SW-158 ne pousse pas en présence de > 7 % NaCl.

L'hydrolyse de l'esculine, de gélatine, de l'urée et de la réduction des nitrates ont été étudiés (La jeunesse, 1987) sur l'eau de mer artificielle.

L'eau de mer artificielle contient (par litre d'eau distillée) 23,6 g NaCl, 0,64 g KCl, 4,53 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 5,94 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O et 1,3 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Bruns et al., 2001). Action enzymatique : L'hydrolyse de l'hypoxanthine, la tyrosine et xanthine a été testée sur milieu MA avec les concentrations du substrat décrites par Cowan & Steel (1965).

### Acide gras du *Porphyrobacter* : souches et compositions en acides gras (%).

Fatty acids representing <1.0% in two strains were omitted. i, iso; ND, not detected.

Strain	Fatty acid composition (%) <sup>a</sup>												
	C <sub>14:0</sub> 2-OH	C <sub>15:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>15:0</sub> 2-OH	i-C <sub>16:0</sub> 3-OH	C <sub>16:0</sub> 2-OH	C <sub>17:1</sub> ω8c	C <sub>17:1</sub> ω8c	i-C <sub>17:0</sub>	C <sub>17:0</sub>	C <sub>18:1</sub> ω5c	C <sub>18:1</sub> ω7c	
SW-132 <sup>T</sup>	6.8	1.3	4.1	5.5	1.4	1.5	34.7	2.7	ND	1.0	3.4	35.8	
SW-158	8.2	1.4	5.4	9.4	1.2	ND	31.5	2.7	2.4	1.6	1.3	34.2	

<http://j.sgmjournals.org>

2233

### Digestion enzymatique

Les souches de *Porphyrobacter* SW-132 t utilisent le saccharose et l'acétate, mais pas la souche SW-158. Les deux souches produisent la bactériochlorophylle (a) en aérobiose dans l'obscurité.

Les extraits de cellules aux ultrasons des deux souches ont montré des maximas d'absorption à environ 467, 590, 808 et 867 nm, indiquant la présence de caroténoïdes et une bactériochlorophylle (a). La bactériochlorophylle est extraite par une solution d'acétone/méthanol possédant des maximums de pics d'absorption *in vitro* à 766-768 nm, confirmant ainsi la présence de bactériochlorophylle (a). Des spectres d'absorption *in vivo* similaires ont été produits pour trois autres espèces de *Porphyrobacter*, à l'exception de *P. sanguineus*, montrant une différence mineure dans le spectre d'absorption (Fuerst et coll., 1993 ; Hanada et coll., 1997 ; Hiraishi et al., 2002 ; Rainey et al., 2003)

### Phylogénétique

Les séquences de gènes des ARNr 16S font ressortir deux souches SW-132 t et SW-158 similaires à 99,9 % et leur niveau moyen de parenté ADN – ADN était de 86 %.

L'analyse de séquence de gène ARNr 16 s montre que les souches SW-132 t et SW-158 sont phylogénétiquement apparentées aux espèces *Porphyrobacter* et *Erythromicrobium ramosum*.

Les données de parenté ADN-ADN ont indiqué que les souches SW-132 t et SW-158 sont les membres génomiques de la même espèce, sur des bases phénotypiques et des données phylogénétiques et particularité génétique. Les souches SW-132 t (= CCCR 12229T = DSM 16220T) et SW-158 (= CCCR 12230) sont classées comme une nouvelle espèce de *Porphyrobacter*, dont le nom *Porphyrobacter donghaensis* SP a été proposé.

Le contenu de l'ADN-ADN en (G + C) des deux souches était de l'ordre 66,8 – 65,9 mol%.

La phylogénie, issu des séquences des gènes de ARNr 16 s a montré que le genre *Porphyrobacter* appartient à la sous-classe des *Proteobacteria* (Anzai et al., 2000 ; Hiraishi et al., 2002 ; Rainey et al., 2003).

Les références des sondes génétiques sont : DDBJ/EMBL/GenBank pour les séquences de gènes des ARNr 16 s des souches SW-132 t et AY559428 et AY559429 pour les souches SW-158.

### Culture

*Porphyrobacter* SW-132 t et SW-158 ont été isolées par la dilution avec repiquage sur gélose marine 2216 (MA ; Difco).

Sur le milieu MA, les colonies sont lisses, circulaires, convexe, rouge-orange en couleur de 0,5 – 0,8 mm de diamètre après 7 jours d'incubation à 30° C.

Il pousse à 10 et 45° C mais pas à 4 ou 50° C. Le pH optimal pour la croissance est pH 7 – 8 ; la croissance est observée à un pH de 5 mais pas à un pH de 4,5.

En l'absence de NaCl, la croissance a été étudiée dans le bouillon trypticase soja sans NaCl. La croissance à différentes concentrations de NaCl a été étudiée en bouillon marin (Difco) ou bouillon trypticase soja (Difco). La croissance à différentes températures (4 à 50° C) a été mesurée sur MA. L'hydrolyse de la caséine, amidon, Tween 20, 40 Tween, Tween 60 et Tween 80 et la catalase et l'oxydases ont été déterminés comme décrit par Cowan & Steel (1965).

### Habitat

Les souches bactériennes, SW-132 t et SW-158 de *Porphyrobacter* ont été isolées dans la mer orientale de Corée.

### Pathologie

Il n'y a pas eu à ce jour de publication sur la pathologie de *Porphyrobacter*.

#### 21.1.7.2 Famille des *Erythrobacteraceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Lee & coll., 2005.

Dans l'étude de la grotte de Sulzbrunn, il n'a pas été défini de genre autre que le *Porphyrobacter* traité dans les *Erythrobacteraceae*. Il est donc difficile de définir un genre représentatif de la famille des *Erythrobacteraceae*, car elle a une forte diversité de morphologie et de métabolisme.

Dans la cavité de Sulzbrunn la famille des *Erythrobacteraceae* présent sur la flore totale de chacune des structures de la grotte :

Snottites  $\approx 2,7\%$  du total de la flore de cette structure

Biofilms « subaerial »	≈ 1.35 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ Nd %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	<1 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	<2 %	du total de la flore de cette structure

### Genres de la famille des *Erythrobacteraceae*

- *Erythromicrobium*
- *Altererythrobacter*
- *Croceicoccus*
- *Erythrobacter*
- *Erythrobium*
- *Kirrobacter*
- *Porphyrobacter* (genre reclassé en 2014 dans les *Sphingomonadales*)

En 2005 le genre *Porphyrobacter* appartenait à la famille des *Erythrobacteraceae* il a été reclassé dans la famille *Sphingomonadaceae*.

#### 21.1.7.2.1 Genre *Erythrobacter*

##### Taxonomie

Les *Erythrobacteraceae* sont l'une des deux familles appartenant à l'ordre des *Sphingomonadales*, et il est affilié à la classe *Alphaproteobacteria*. La famille *Erythrobacteraceae* comprend cinq genres – *Altererythrobacter*, *Croceicoccus*, *Erythrobacter*, *Erythromicrobium* et *Porphyrobacter* – pour un total de 33 espèces, dont 29 les noms validés et 4 nouvelles espèces.

##### Morphologie

Les *Erythrobacteraceae* sont des bactéries Gram négatifs, aérobies, en forme de bâtonnet ou pléomorphes coccoïdes ; ils sont mobiles ou immobiles, chimio-organotrophes, produisent des pigments (jaune, orange, rouge ou rose) et ne forment pas de spores. Bâtonnets (0,2-0,3 x 1-1,3 microns) mobiles, en courtes chaînes. Gram négatif. Colonie rouge-orangé. Bchl a et caroténoïdes mais pas de membranes intracytoplasmiques.

**Caractéristiques** : catalase et oxydase positives. Certaines espèces ont besoin de biotine. La plupart des membres contiennent bactériochlorophylle de type (*A et B*), plusieurs types de caroténoïdes et monosaccharide de type glycosphingolipides. Ils ont un type de photosynthèse anoxygénique, mais certaines espèces n'ont pas de croissance à la lumière en anaérobiose. Ces bactéries utilisent la lumière comme source d'énergie. La conversion en énergie se fait par l'ATP avec pour donneur d'électrons  $H_2$ ,  $S^{2-}$ ,  $S^0$ ,  $S_2O_3^{2-}$ , Elles ont un type de centre de réaction de type II. La source de carbone est le  $CO_2$  et les matières organiques (semi-hétérotrophe) <sup>292</sup>.

##### Culture

**Croissance** : optimale à 25-30 °C sur acides organiques et sucres. Susceptibles de croître avec NaCl de 5 à 90 g/l.

Milieu : le même milieu que pour le *Chlorobium*

- Solution 1 :  $NH_4Cl$  1 g,  $KH_2PO_4$  1 g,  $MgCl_2$  0.5 g, agar 15 g pour 700 ml d'eau
- Solution 2 :  $NaHCO_3$  2 g, pour 100 ml d'eau distillée
- Solution 3 :  $Na_2S \cdot 9H_2O$  1 g, eau 100 ml.
- Solution 4 :  $FeCl_2 \cdot 6H_2O$  5 mg, eau 100 ml.
- Solution 5 :  $H_3PO_4$  1N.

Stériliser séparément 15 mn à 120°C. Refroidir à 50°C. Mélanger n°2-n°3-n°4 dans n°1 amener à pH 5 et répartir dans des tubes à essai de 16 ml.

##### Habitat

Les *Erythrobacteraceae* ont été isolées de divers environnements : dans les rizières sauvages, des suintements de sédiments dans les zones froides, des déserts de sable, les eaux tièdes, l'eau de mer, des sédiments marins et en symbiose d'invertébrés marins et des algues marines. Deux espèces, dont

*Erythrobacter longus*, ont été isolées de couches de cyanobactéries littorales.

### **Phylogénétique**

Le séquençage du génome entier a été rapporté chez seulement deux genres des *Erythrobacteraceae* familial, y compris les *Erythrobacter* (trois souches) et *Porphyrobacter* (une souche). Les membres de la famille offrent une source précieuse d'informations pour poursuivre des études axées sur des organismes les aérobies phototrophes (PAA) avec un potentiel élevé d'usage biotechnologique grâce à la présence d'importantes hydrolases.

La teneur dans l'ADN-ADN en (C+ G) est de 67 mol%.

Les bactéries de l'embranchement des *Betaproteobacteria* présentes dans la cavité :

<i>Burkholderiales</i>	<i>Hydrogenophilales</i>	<i>Nitrosomonadales</i>
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Hydrogenophilaceae</i>	<i>Gallionellaceae</i>
	<i>Methylophilales</i>	<i>Rhodocyclales</i>
	<i>Methylophilaceae</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>

### Répartition des *Betaproteobacteria* dans la cavité de Sulzbrunn

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne des *Betaproteobacteria* par catégorie de prélèvement est la suivante :

Snottites	0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	25,5 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	60 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	45.5 %	du total de la flore de cette structure

Des structures analysées, seul le biofilm « submersed » a une quantité importante de *Betaproteobacteria* étant due à la contamination par l'eau de cette structure, cela montre qu'il y a possibilité de contamination entre le biofilm « submersed » et les eaux de la grotte.

### Ordre dans la grotte de Sulzbrunn des *Betaproteobacteria*

<u><i>Burkholderiales</i></u> <u><i>Hydrogenophilales</i></u> <u><i>Methylophilales</i></u> <i>Neisseriales</i>	<u><i>Nitrosomonadales</i></u> <i>Procabacteriales</i> <u><i>Rhodocyclales</i></u>
--	--

Dans cette cavité il a été confirmé la présence d'un grand nombre de germes des familles suivantes :

- *Comamonadaceae*
- *Hydrogenophilaceae*
- *Gallionellaceae*
- *Methylophilaceae*.
- *Rhodocyclaceae*

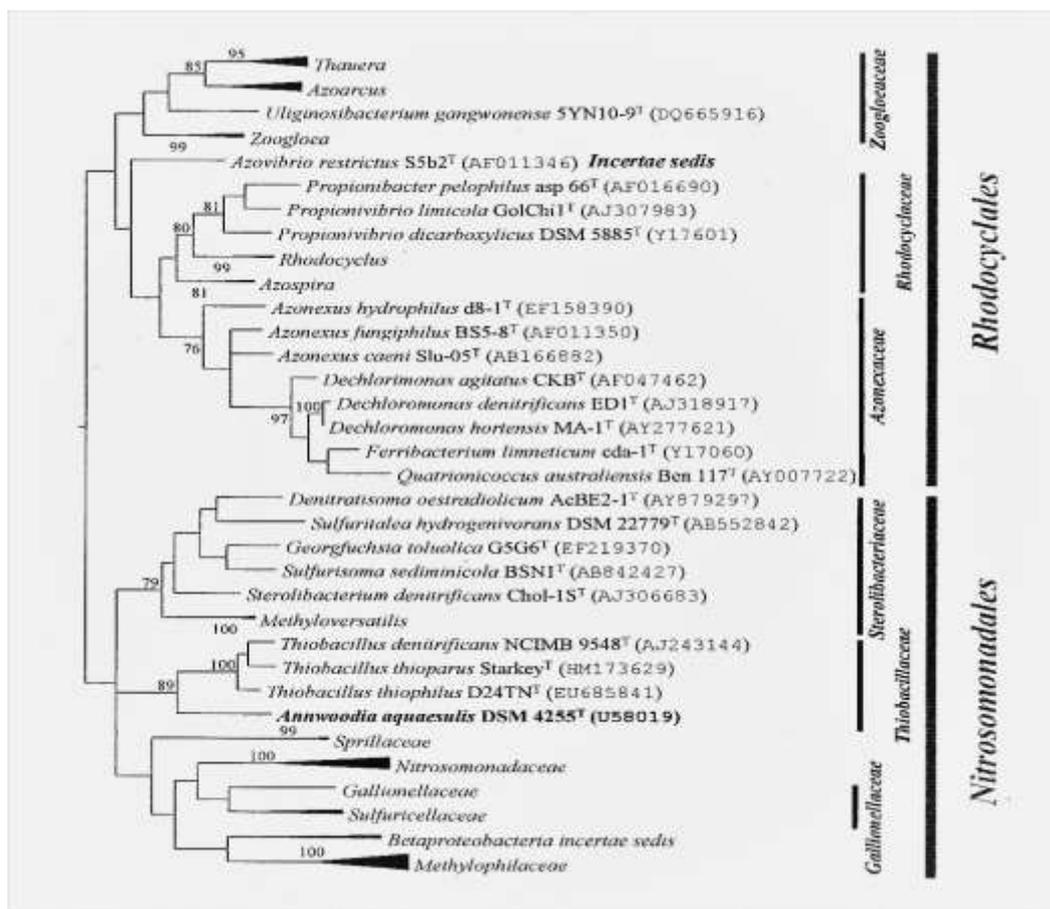
Particulièrement abondant dans l'eau de source de la grotte de Sulzbrunn avec 59 % de l'analyse des eaux avec 44% de la flore totale de l'eau de mélange et 25 % du total du biofilm « submersed ».

### Généralités

*Betaproteobacteria* (-*Proteobacteria* ou -Protéobactéries) de Gram (-). Se composent de plusieurs groupes de bactéries, aérobies ou aérobies facultatifs, souvent très polyvalentes par leurs capacités de dégradation ; contiennent des genres chimio-lithotrophes (oxydation de l'ammoniac) comme le (genre *Nitrosomonas*)<sup>293</sup> ; certaines sont filamenteuses (genres *Rhodocyclus* et *Rubrivivax*). Les bêta-proteobacteria jouent un rôle dans la fixation de l'azote dans le sol. Beaucoup de germes de cet embranchement se trouvent dans l'environnement, tels que les eaux usées ou le sol. Dans cette classe nous pouvons noter aussi les genres pathogènes des familles *Neisseriaceae* et *Burkholderiaceae*.

## Proteobacteria aérobies

### Taxonomie



### Fonctions

Les *Betaproteobacteria* ont une fonction fermentaire, saprophyte, nitrifiante, dénitrifiante, méthylophile, fixateur d'azote, pathogène.

### Morphologie

Elles sont sous forme de coques, de bâtonnets ou de spirilles.

### Croissance

Elles ont une croissance aérobie, anaérobie facultative ou stricte, mésophile.

### Nutrition

Leurs caractéristiques sont chimio-organotrophes, lithotrophes.

### Habitat

Elles sont ubiquistes (présentes dans plusieurs endroits), pathogènes.

### Classification des ordres des *Betaproteobacteria*

- Ordre I *Burkholderiales*
- Ordre II *Hydrogenophilales*
- Ordre III *Methylophilales*
- Ordre IV *Neisseriales*
- Ordre V *Nitrosomonadales*
- Ordres VI *Rhodocyclales*
- Ordres VII *Procabacteriales*

## **Betaproteobacteria non classées**

- *Chitinovorax*

Dans cette classe nous avons les bactéries suivantes :

- Aérobie : *Hydrogenomonas, Alcaligenes, Ochrobactrum, Pseudomonas...*
- Aérobie facultatif : *Chromobacterium, Spirillum...*
- Bactéries avec morphologies cocci, coccobacilli et aérobie : *Morococcus, Neisseria, Thiobacilli...*

### **22.1.1 Ordre I Burkholderiales** (Grotte de Sulzbrunn & grotte de Magura)

Nom donné par Garrity, Bell & Lilburn, 2006.

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne des *Burkholderiales* par catégorie de prélèvement est la suivante :

Snottites	0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 4,2 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	≈ 3,5 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	≈ 11,3 %	du total de la flore de cette structure

### **Familles de l'ordre des Burkholderiales**

<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Alcaligenaceae</i> De Ley (1986)</li><li>• <i>Burkholderiaceae</i> Garrity (2006)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Comamonadaceae</i> Willems (1991)</li><li>• <i>Oxalobacteraceae</i> .... Garrity (2006)</li><li>• <i>Sutterellaceae</i></li></ul>
--	--

### **Caractéristiques**

Dans cet ordre il y a beaucoup de germes pathogènes parmi lesquels les espèces de *Burkholderia* et *Bordetella*. On a aussi des germes ayant la particularité d'utiliser l'acide oxalique comme source de carbone tel que les *Oxalobacter*<sup>294</sup>.

#### **22.1.1.1 Famille Comamonadaceae** (Grotte de Sulzbrunn et grotte de Magura)

Nom donné par Willems & al., 1991.

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne de la famille des *Comamonadaceae* par catégorie de prélèvement est la suivante :

Snottites	0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 4,2 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	≈ 2,5 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	≈ 8,2 %	du total de la flore de cette structure

### **Ordre Burkholderiales ; Famille Comamonadaceae**

#### **Les genres dans cette famille**

<i>Acidovorax</i>	<i>Giesbergeria</i>	<i>Polaromonas</i>
<i>Albidiferax</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Pseudoacidovorax</i>
<i>Alicyclophilus</i>	<i>Hylemonella</i>	<i>Pseudorhodoferrax</i>
<i>Brachymonas</i>	<i>Ideonella</i>	<i>Ramlibacter</i>
<i>Caenibacterium</i>	<i>Kinneretia</i>	<i>Rhodoferrax</i>
<i>Caenimonas</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Roseateles</i>
<i>Caldimonas</i>	<i>Limnohabitans</i>	<i>Shlegelella</i>
<i>Comamonas</i>	<i>Macromonas</i>	<i>Simplicispira</i>
<i>Curvibacter</i>	<i>Malikia</i>	<i>Tepidicella</i>
<i>Delffia</i>	<i>Oryzisolibacter</i>	<i>Variovorax</i>
<i>Diaphorobacter</i>	<i>Ottowia</i>	<i>Verminephrobacter</i>
<i>Extensimonas</i>	<i>Pelomonas</i>	<i>Xenophilus</i>

## Espèces de la famille *Psudomonaceae* étant mis dans la famille *Comamonadaceae*

Hétérotrophes	Autotrophes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Ps terrigena</i></li> <li>• <i>Ps acidovorans</i></li> <li>• <i>Ps andropogonis</i></li> <li>• <i>Ps avenae</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Ps delafieldii</i></li> <li>• <i>Ps saccharophila</i></li> <li>• <i>Ps facilis</i></li> <li>• <i>Ps flava</i></li> <li>• <i>Ps pseudoflava</i></li> <li>• <i>Ps palleronii</i></li> <li>• <i>Ps taenispiralis</i></li> </ul>

### 22.1.1.1.2 Genre *Comamonas* (Grotte de Sulzbrunn et grotte de Magura)

Nom donné par : Willems & al., 1991.

Dans la grotte de Sulzbrunn ce genre se trouve dans :

Eau de source :  $\approx 0,8\%$  du total de la flore de cette structure

Ordre *Burkholderiales* ; Groupe ARN III<sup>ième</sup> ; Famille *Comamonadaceae*

Dans l'étude de la grotte de Sulzbrunn, il n'a pas été défini le genre et les espèces de la famille des *Comamonadaceae*. Afin d'avoir les caractéristiques de cette famille il sera retenu le genre *Comamonas* étant présent dans de nombreuses grottes en France et en Europe, notamment identifié dans la grotte ornée de Magura en Bulgarie.

**Espèce** : il a été mis en évidence la présence d'un *Comamonas sp.* (BM\_9\_6), sur 2,1% des échantillons prélevés.

Le *Comamonas acidovorans*, *C. testosteroni* ont des inclusions caractéristiques de PHB.



*Comamonas testosteroni*  
standardsingenomics.org

#### Comamonas

**Morphologie** : bactéries de Gram (-), (coloration rose), aérobies stricts, en bâtonnets droits ou légèrement courbés, longueurs moyennes (1,5 à 2,7  $\mu\text{m}$ ), avec un 0,25 à 0,37 ; mobiles avec flagelles polaires, asporulées. Se présentent seuls ou en couples.

**Physiologie** : ils accumulent les poly-bêta-hydroxybutyrate (PHB) dans la cellule. Le mode de clivage par oxydation des diphénols est un test de diagnostic : méta clivage, spécifique de *C. acidovorans* et *C. testosteroni* ; non clivage en ortho et méta *C. terrigena* et *C. avenae*. Le *C. Testosteroni*

Il a la possibilité d'absorber la testostérone, et utilise le phénylacétate ou les maléate comme sources de carbone.

**Milieu** : culture peu exigeante, facile voir le milieu du *Pseudomonas* sans les antibiotiques.

Le genre *Comamonas* comprend :

Pathogénicité non connue	Pathogénicité connue
<p><i>C. terrigena</i></p> <p><i>C. avenae</i></p>	<p><i>C. acidovorans</i> aussi <i>delftia acidovorans</i> (humaine)</p> <p><i>C. testosteroni</i> (humaine)</p> <p><i>C. kerstersii</i> (humaine)</p> <p><i>C. andropogonis</i> (plantes et animaux)</p>

#### Environnement

<p><i>Leptothrix</i>, Lightmicroscopy, chaîne de cellules</p>	<p>Les bactéries de la famille des <i>Comamonadaceae</i> sont présentes dans :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• le sol, les eaux, les boues, les dépôts miniers</li> </ul> <p>On les trouve fréquemment dans les grottes. Exemple : grotte Magura (Bulgarie Maryara)</p>
---	--

Espèce *Comamonas Terrigena*. (nom donné par De Vos & coll., 1985) : elle a été isolée des sols contaminés en Slovaqui

### **Espèce *Comamonas testosteroni***

Identification différentielle galerie : API 20 NE

Noms	No <sub>3</sub>	Man	Gtn	Cap	Adi	Mlt	Cit	Pac	Ox
<i>C. testosteroni</i>	80	4	42	55	36	90	32	2	98
<i>C. acidovorans</i>	97	75	99	53	91	98	53	81	99

NO<sub>3</sub> : NO<sub>3</sub>K ; MAN : mannitol ; GNT : glucose ; CAP : caproate ; ADI : adipate ; MLT : malate ; CIT : citrate ; PAC : phényl-acétate ; OX : tétraméthyl p phénylène diamine.

 <p><b><i>Comamonas testosteroni</i></b> CNB-2 bacmap.wishartlab.com</p>	<p><b>Propriétés particulières de <i>Comamonas testosteroni</i></b></p> <p>Dégradent des produits chimiques polluants, des déchets organiques, des pesticides. Possède une oxygénase (+) et une 3-hydroxystéroïde déshydrogénase catalysant la réduction réversible de l'androgène actif, la dihydrotestostérone en 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 bêta-diol. Il a également l'activité vers les autres 3-alpha-hydroxystéroïdes et sur 9, 11 et 15-hydroxyprostaglandins. L'enzyme est spécifique à B en référence à l'orientation de NAD réduit ou le NADPH.</p>
---	--

La famille *Comamonadaceae* incluant les espèces *Comamonas acidovorans* et *C. delftia*. Les *Pseudomonas testosteroni* et *Pseudomonas acidovorans* ont été reclassés, suivant des caractéristiques phénotypiques, des caractères chimio-taxonomiques et homologie de l'ADN, comme membres du genre *Comamonas* en 1987, dont *Comamonas terrigena* avait été une espèce unique depuis 1985. Le *Comamonas acidovorans* a depuis lors été reclassé comme *Delftia acidovorans*.

Le *C. testosteroni* reçut son nom car il décompose la testostérone, bien que cette même propriété ait été démontrée pour d'autres espèces de *Pseudomonas* et certains champignons<sup>295</sup>.

### **Symptomatologie du *Comamonas testosteroni***

On peut observer *Comamonas testosteroni* dans des pathologies abdominales surtout dans l'appendicite perforée. En Turquie et en Israël il y a eu 17 cas de bactériémie à cause de cette bactérie, chez des patients avec une appendicite aiguë perforée. Cette bactérie s'est avérée être sensible aux antibiotiques courants, et a été combattue facilement même après avoir provoqué une bactériémie<sup>296</sup>.

« C'est une bactériémie relativement rare et elle a été observée chez des personnes immunodéprimées ou sous traitement pour le cancer. À l'heure actuelle 27 cas ont été rapportés. La symptomatologie observée a été : fièvre entre 39 et 40° C, douleurs thoraciques, pression artérielle élevée et tachycardie. La respiration était peu profonde, et la saturation en oxygène était de 92 %. Diminution des bruits dans les deux apex. La radiographie a révélé un infiltrat du lobe moyen droit. Le nombre de globules blancs était de 22 500 cellules/mm<sup>3</sup> et le niveau de lactate était 1,7 unité.<sup>297</sup> »

### **Thérapeutique**

Les antibiotiques utilisés dans la thérapie sont : la Céfépime, ayant été remplacée par la suite par ciprofloxacine, vancomycine et azithromycine. Traitement de 16 jours.

### **Diagnostic**

L'hémoculture a démontré la présence de *C. testosteroni* et les analyses de crachats ont mis en évidence un *Ps aeruginosa*<sup>298</sup>.

### **Pathologie**

*Comamonas kerstersii* : le *C. kerstersii* est incriminé dans les bactériémies de diverticuloses duodénales.

### 22.1.2 Ordre II *Hydrogenophilales* (Grotte de Sulzbrunn)

Cet ordre des *Hydrogenophilales* est présent dans la grotte sur la flore totale de chacune des structures :

Snottites	< 0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	< 0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 1,4 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	≈ 27 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	≈ 5,6 %	du total de la flore de cette structure

La famille des *Hydrogenophilales* a pour origine l'eau de source, elle est présente dans le biofilm « submersed » due au passage des germes dans les parois du biofilm.

#### Ordre *Hydrogenophilales* ; Famille *Hydrogenophilaceae*

L'ordre des *Hydrogenophilales* ne comprend qu'une famille : *Hydrogenophilaceae*

#### Morphologie

Elles sont de Gram (-).

#### 22.1.2.1 Famille *Hydrogenophilaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

L'ordre des *Hydrogenophilales* ayant une seule famille, la distribution dans les différentes structures de la famille des *Hydrogenophilaceae* est identique à cet ordre.

La famille des *Hydrogenophilaceae* a pour origine l'eau de source et l'eau météorique avec une importance plus grande dans cette dernière.

#### Ordre *Hydrogenophilales* ; Famille *Hydrogenophilaceae*

#### Genre dans cette famille :

- *Hydrogenophilus*
- *Thiobacillus*

#### Caractéristiques de la famille

Gram (-) ; toutes les espèces sont thermorésistantes à 50°C ; Elles obtiennent leur énergie par l'oxydation de l'hydrogène ou des molécules organiques.

#### Composition de cette famille (voir ordre *Nitrosomonadales* pour les *Thiobacillus*).

Elle est représentée par deux genres :

- *Thiobacillus* : ayant été reclassé dans l'ordre des *Nitrosomonadales*.  
De nombreuses espèces de ce genre ont été reclassées dans les *Gammaproteobacteria*
  - *Thiobacillus thiooxydans* a été déplacé dans *Acidithiobacillus*.
  - *Thiobacillus neapolitanus* a été déplacé dans *Halothiobacillus*
  - *Thiobacillus tepidarius* a été déplacé dans *Thermithiobacillus*.
- *Hydrogenophilus* est le représentant de l'espèce *Hydrogenophilus thermoluteolus*

Les *Thiobacillus* peuvent être utilisés pour lutter contre les parasites comme les *Streptomyces* atteignant la pomme de terre. Si la zone touchée par le parasite est traitée avec du soufre et des *Thiobacillus*, ceux-ci oxydant le soufre en acide sulfurique, détruisant le *Streptomyces* ne pouvant résister à des conditions acides. *Thiobacillus thiooparus* peut contribuer à la formation de pluies acides en oxydant le dioxyde de soufre en acide sulfurique.

#### Environnement

De cette observation, nous pouvons en déduire que l'eau de la grotte de Sulzbrunn est une eau d'origine géothermique ou thermale, eaux provenant généralement de failles très profondes.

#### 22.1.2.1.1 Genre *Hydrogenophilus*

Nom donné par Garrity et al. , 2006.

Dans cette étude il n'a pas été identifié les genres ou les espèces d'*Hydrogenophilaceae* étant présents dans la grotte de Sulzbrunn. Étant donné la présence d'une source thermale nous avons retenu le genre *Hydrogenophilus* afin avoir les caractéristiques les plus probables pour la grotte de Sulzbrunn.

#### Ordre *Hydrogenophiales* ; Famille *Hydrogenophilaceae* ; Genre *Hydrogenophilus*

##### Morphologie

Les *Hydrogenophilus* sont des bactéries en forme de bâtonnet en tiges droites de 0,5-0,8 × longueur 1,0 – 3,0 µm au cours de la croissance exponentielle. Sa mobilité est mobile ou immobile ; elles sont Gram négatif. Elle est sporulée et elle est aérobie ou micro-aérophiles, pourvu d'un système respiratoire par métabolisme de l'oxygène comme accepteur terminal d'électron.

##### Caractéristiques

Ils sont facultativement chimio-litho-autotrophes ; peuvent utiliser l'hydrogène comme donneur d'électrons et le CO<sub>2</sub> comme source de carbone. Le cycle du CO<sub>2</sub> est fixé par l'intermédiaire de la Calvin-Benson. Les hydrates de carbone ne sont pas utilisés. Acétate, pyruvate, DL de lactate, le succinate et DL--malate peuvent être utilisés comme donneurs d'électrons et de sources de carbone. L'ammonium peut être utilisé comme source d'azote.

Respiration : système quinone majeur dans la respiration avec l'ubiquinone 8.

Ces bactéries ont été appelées « *Hydrogèophil* » car elles produisent de l'eau en présence d'hydrogène et d'oxygène.

##### Culture

Les *Hydrogenophilus* sont des colonies de couleur jaune. Ils sont thermophiles ; une espèce pousse optimale à 50-52° C et une deuxième, à 60-65° C.

##### Phylogénétique

La teneur en l'ADN-ADN en (C + G) est de : 61-65 mol %

##### Espèce *Hydrogenophilus thermoluteolus*

(Hayashi, Ishida, Yokota, Kodama et Igarashi, 1999).

##### Environnement

Isolés des sources chaudes et des sols environnants.

##### Espèce *Hydrogenophilus themolus* :

Nom donné par Hayashi et al., 1999.

C'est chimiotrophe facultatif ayant longtemps été trouvé uniquement dans les sources chaudes. Il fut cependant isolé en 2004 dans des échantillons de glace provenant d'une profondeur d'environ 3 km sous la couche de glace recouvrant le lac Vostok, en antarctique. La présence de cette bactérie thermophile dans la glace suggère qu'un système géothermique existe sous la couche de glace.

#### 22.1.3 Ordre *Rhodocyclales* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Boden et coll., 2017 (Garrity, et al. 2006).

Cet ordre des *Rhodocyclales* est présent dans la grotte de Sulzbrunn dans les différents prélèvements, valeurs données sur la flore totale de chacune des structures :

Snottites	< 0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	< 0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 3,2%	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	≈ 8,3 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	≈ 20 %	du total de la flore de cette structure

## Familles de cet ordre

- *Rhodocyclaceae*
- *Azonexaceae*
- *Zoogloeaceae*

Suite à une reclassification majeure de la classe en 2017, le précédemment ordre des *Rhodocyclales* a été divisé en trois familles :

- Les *Rhodocyclaceae* contiennent les genres suivants : *Rhodocyclus*, *Azospira*, et *Propionivibrio*. Les cellules sont incurvées, en bâtonnets, anneaux ou spiralées. Dominante respiratoire quinones sont ménaquinone-8, l'ubiquinone-8 et le rodoquinone-8. La teneur de l'ADN-ADN en (G + C) est de 61,6 à 65,3 mol%.
- Les *Azonexaceae* contiennent les genres *Azonexus*, *Dechloromonas*, *Ferribacterium* et *Quatrionococcus*. Les cellules sont des bâtonnets incurvés ou cocci. Quinones respiratoires dominante est l'ubiquinone-8. Fractions de G + C sont 63,5 à 67,0 mol%.
- Les *Zoogloeaceae* contiennent les genres *Zoogloea*, *Thauera*, *Uliginosibacterium* et *Azoarcus*. Les cellules sont en forme de tige. Quinones respiratoires dominantes sont l'ubiquinone-8 et rhodoquinone-8. Fractions de G + C sont 59,3 à 69,0 mol%.

Le genre *Azovibrio* est aussi inscrit dans l'ordre, mais il est incertain, se situant entre le *Zoogloeaceae* et *Azonexaceae*.

### 22.1.3.1 Famille *Rhodocyclaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

La répartition par structure de la famille de *Rhodocyclaceae* est la même que pour l'ordre de *Rhodocyclales*.

*Rhodocyclaceae* est une famille de bactéries Gram (-), comprenant leur propre ordre dans le sous-groupe des *Betaproteobacteria* et comprend de nombreux genres précédemment dévolus à la famille des *Pseudomonadaceae*.

Cette famille a été révisée en 2017 avec la création d'autres familles dans l'ordre *Rhodocyclales*.

Dans cette famille on trouve actuellement les genres suivants :

- *Rhodocyclus*
- *Propionivibrio*
- *Azospira*
- *Dechloromonas*
- *Sulfuritalea*

#### 22.1.3.1.1 Genre *Rhodocyclus*

La répartition par structure du genre *Rhodocyclus* est la même que pour l'ordre de *Rhodocyclales*.

#### Espèces du genre *Rhodocyclus*

- *Rhodocyclus gelatinosus*
- *Rhodocyclus purpureus*
- *Rhodocyclus tenuis*

## Morphologie

Les bactéries du genre *Rhodocyclus* ont des cellules en forme de bâtonnets, incurvées ou en anneaux. L'espèce *Rhodocyclus purpureus* s'écarte de la famille par la forme des cellules bactériennes en anneaux, étant la résultante de la jonction de deux cellules bactériennes par leurs parties polaires, transmettant le nom de *cyclus* et *purpureus* (nom donnée à la ressemblance à un anneau et aux érythrocytes).

### Caractéristiques métaboliques

Elles ont une caractéristique photohétérotrophe ou photoautotrophe et elles sont anaérobies facultatives. Elles utilisent comme donneur d'électron, l'hydrogène en anaérobiose et elles sont hétérotrophes en aérobiose en utilisant les acides gras comme donneur d'énergie. Les substrats respiratoires sont les quinones et la rhodoquinone- $\delta$ .

Dans sa phase aérobie elle est dénitrifiante et présente une capacité métabolique polyvalente. Dans cette famille le genre *Rhodocyclus* est plutôt atypique, étant le seul genre à être phototrophe. Elles effectuent la photosynthèse dans des conditions anoxiques semblables à certaines *Alphaproteobacteria*.

### Analyse phylogénétique

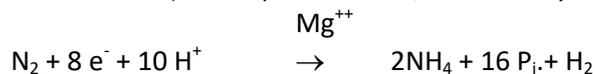
L'analyse de l'ARNr 16s a reclassé de nombreux genres et espèces de cette famille dans la famille *Pseudomonadaceae*.

### Environnement

La plupart des espèces vivent dans un milieu aquatique, marin et de préférence dans des conditions oligotrophes. Beaucoup d'espèces vivent dans les eaux usées et ont un rôle dans l'assainissement. Dans cette famille on peut citer des espèces fixant l'azote atmosphérique et pouvant être en associations symbiotiques comme les bryophytes et les ptéridophytes : *Rhodocyclus gelatinosus* et *Rhodocyclus tenuis*.

Cette caractéristique peut être prise comme hypothèse dans la formation et la fixation de la matière azotée des biofilms observés dans la grotte de Sulzbrunn. D'autant plus que cette famille est présente dans les biofilms de la grotte.

**Fixation de l'azote** (voir chapitre 6.1.3.2.1, Genre *Methylocella*)



16 ATP → 16 ADP

### Biotechnologie

Cette famille microbienne peut être utilisée dans le traitement des eaux usées et dans les stations d'épuration. Les genres *Zoogloea* et *Azoarcus* se reproduisent dans les eaux usées et jouent un grand rôle dans l'assainissement et la purification des eaux.

#### 22.1.3.1.2 Genre *Propionivibrio*

Ce sont des bactéries en formes de bâtonnets incurvés. Elles se développent en anaérobiose avec une fermentation d'hydrocarbures. Leur métabolisme produit des acides gras plus précisément des propionates.

La respiration se fait par des quinones dont la dominante respiratoire est l'ubiquinone- $\delta$ .

#### 22.1.3.1.3 Genre *Azospira*

Espèces à cellules spiralées ou en bâtonnets incurvés. Elles sont hétérotrophes et peuvent fixer l'azote moléculaire comme les diazotrophes (fixe l'azote de l'air) comme azote de croissance.

#### 22.1.3.1.4 Genre *Dechloromonas*

Bactéries en formes de bâtonnets, elles sont organisées en cellules individuelles ou en colonies sous formes de chaînettes mobiles. L'optimum de température de développement est de 30 °C, sa tolérance à la salinité est nulle.

Elles possèdent la capacité d'oxyder le benzène étant produit par les pollutions dans le sol et les eaux de surface.

La voie métabolique de la dégradation du benzène est encore mal connue. Elles sont aussi capables d'oxyder le fer<sup>++</sup> en fer<sup>+++</sup> et l'AHDS

### 22.1.3.2 Famille *Azonexaceae*

Dans cette famille il y a eu de grosses réorganisations ne semblant pas totalement mise à jour :

Les *Azonexaceae* sont des bactéries hétérotrophes ou mixotrophes, le reste est autotrophe obligatoire et possède un important métabolisme.

Différents genres ne fabriquent pas de tétra-thionate lors de l'oxydation du thiosulfate pendant la croissance autotrophe.

Elles ont une propriété différentielle chimio-taxonomique, l'identification par la PCR de ARNr 16 S a défini cette famille avec une similarité de 93,4 % à l'espèce type du *Thiobacillus thioparus* DSM 505T. Suite à cette observation, il a été proposé qu'il soit créé un nouveau genre : *Annwoodia* avec comme espèce *Annwoodia aquiesulis*.

Dans les Rhodocyclales, il a été proposé la famille *Azonexaceae* et *Zoogloeaceae*.

Il a été rejeté *Hydrogenophilales* des *Betaproteobacteria*

#### Genres de la famille *Azonexaceae*

- *Azonexus*
- *Dechloromonas*
- *Ferribacterium*

#### 22.1.3.2.1 Genre *Ferribacterium* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Cummings & coll., 2000.

Pour la grotte de Sulzbrunn, le genre *Ferribacterium* représentent les valeurs suivantes en pourcentage du total de chacune des structures :

Snottites	≈<1 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈<1 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈0,3 %	de la flore totale de cette structure
L'eau de source minérale	≈1,3 %	de la flore totale de cette structure
L'eau de mélange	≈13,8 %	de la flore totale de cette structure

Les *Ferribacterium* ont été renommés sous le nom de *Thiobacillus aquaesulis* puis de *Annwoodia aquaesulis*.

**Ordre Nitrosomonadales ; Famille Thiobacillaceae ; Genre Annwoodia**

**Ordre revu :**

**Ordre Rhodocyclales ; Famille Azonexaceae ; Genre Ferribacterium**

Une seule espèce : *Ferribacterium limneterium*

#### Espèce *Ferribacterium limneterium*

##### Morphologie

Le *Ferribacterium limneterium* est une bactérie de Gram (-) ; anaérobie stricte ; de mobilité (+) ; Ces cellules sont droites ou légèrement incurvées, des tiges se produisant individuellement, en couple et de courtes chaînes de trois ou quatre cellules.

##### Caractéristiques

Le *Ferribacterium limneterium* est une bactérie réduisant le fer (III) en fer (II), elle est résistante aux radiations nucléaires de faible intensité. Elle a été retrouvée dans les dépôts de produit radioactif. Le fumarate augmente la croissance.

##### Culture

Culture en anaérobiose stricte sous atmosphère stérile avec 80 % de H<sub>2</sub> et 20 % CO<sub>2</sub> pression 5 lb/po<sub>2</sub>. Inoculation en anaérobiose avec résarine B comme réducteur et possibilité 0,1 ml de cystéine à 3% pour 10 ml de milieu.

**Incubation :** 30 °C. Croissance en 5 ou 6 jours.

Les agents réducteurs communs sont le sulfure de sodium, cystéine, di-thiothréitol, citrate de titane et Coenzyme M. Aucune croissance n'a été détectée sur agar.

Des informations supplémentaires sur cette culture sont disponibles sur le site web de ATCC® à [www.atcc.org](http://www.atcc.org)... Références et autres informations sur les souches : [www.ATCC.org](http://www.ATCC.org)...

La publication actuelle de la *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* des États-Unis d'Amérique : *Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention* et instituts nationaux

## Environnement

*Ferribacterium limneticum* est une bactérie trouvée dans les sédiments profonds des lacs.

## Biotechnologie

Bactérie recherchée pour ses propriétés réductrices et sa résistance aux radiations.

### Analyses différentielles des propriétés bactériennes dans l'embranchement des *Betaproteobacteria*

Class	Hydrogenisphaeria	Betaproteobacteria										
Order	Hydrogenisphaeria	Rhodocyclales				Nitrospirales						
Family	Hydrogenisphaeraceae	Rhodocyclaceae	Atrocyanaceae	Zooploeaceae	Nitrospirillaceae	Methylophilaceae	Thiobacillaceae	Sterolibacteriaceae	Spirillaceae	Gallionellaceae	Rhodocyclales	Nitrospirales
Flagellation or other motility	Nonmotile	Motile (rod or spiral)	Motile (rod or spiral)	Motile (rod or spiral) or 'agonously peritrichous'	Atrichous*	Atrichous	Motile (rod)	N.D.	Amphitrichous	Motile (rod)	Atrichous, monotrichous, leptotrichous or amphitrichous.	Atrichous, monotrichous, leptotrichous or amphitrichous. Gliding motility in some genera.
Morphology	Rod	Curved rods, rings, spirilla	Curved rods or cocci	Rods	Rods or cocci	Rods	Rods	Rods	Spirilla	Rodiform or curved rods with stalks, or rods	Rods, curved rods, spirilla, multicellular 'ribbons' or filaments	Cocci, rods, spirilla, multicellular 'ribbons' or filaments
Metabolic mode	Heterotrophic or autotrophic	Photoheterotrophic or photolithotrophic	Heterotrophic	Heterotrophic or autotrophic	Autotrophic or mixotrophic†	Facultative methylotrophic	Autotrophic or restricted heterotrophic†	Autotrophic, heterotrophic, facultative methylotrophic	Heterotrophic	Autotrophic, heterotrophic or mixotrophic†	Heterotrophic and some facultative autotrophic and photoheterotrophic	Heterotrophic, facultative methylotrophic and chemolitho-heterotrophic
Oxidase	+	-	±	+	+	±	-	+	±	±	±	±
Catalase	+	-	+	+	+	+	-	±	±	±	±	±
Energy sources (if autotrophic)	Molecular hydrogen	Molecular hydrogen	N/A	Molecular hydrogen	Ammonium, nitrite, molecular hydrogen	N/A	Reduced sulfur species	Reduced sulfur, molecular hydrogen	N/A	Fe(II), molecular hydrogen, reduced sulfur	Molecular hydrogen, reduced sulfur	N/A
Carbon sources (if heterotrophic or mixotrophic)	Fatty acids, amino acids, succinate, complex media	Fatty acids	Fatty acids, alcohols, amino acids, sugars	Krebs' cycle intermediates, amino acids, alcohols, sugars	Fatty acids†	C <sub>1</sub> compounds, sugars, complex media	Complex media†	Serine, fatty acids, C <sub>1</sub> compounds, Krebs' cycle intermediates, aromatics	Krebs' cycle intermediates	Sugars, Krebs' cycle intermediates, carbohydrates, alcohols	Complex media, sugars, amino acids, Krebs' cycle intermediates etc. Acetone	Complex media, sugars, amino acids, Krebs' cycle intermediates etc. Methanol in methylotrophs.
Electron acceptors	Oxygen, nitrate	Oxygen, fermentation	Oxygen, (pyruvate, nitrate, Fe(III))	Oxygen, nitrate, nitrite, nitrous oxide, nitrate	Oxygen, nitrate	Oxygen	Oxygen, nitrate	Oxygen, nitrate, Fe(III), Mn(IV)	Oxygen	Oxygen, nitrate	Oxygen, fermentation	Oxygen, fermentation, nitrate, elemental sulfur, Fe(III)
Carbohydrases	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Dominant fatty acids	C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> cyclo, C <sub>19</sub> cyclo	C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>21</sub>	C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>21</sub>	C <sub>16</sub> 3-OH, C <sub>18</sub> , C <sub>19</sub> , C <sub>21</sub> , C <sub>22</sub>	C <sub>16</sub> , C <sub>21</sub>	C <sub>16</sub> , C <sub>21</sub>	C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>21</sub> , C <sub>22</sub> , C <sub>24</sub> , C <sub>25</sub>	C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>19</sub> 2-OH, C <sub>21</sub> 3-OH, C <sub>21</sub> 2-OH	C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>21</sub>	C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>21</sub> , C <sub>22</sub> 3-OH, C <sub>21</sub> 2-OH	C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>21</sub> , C <sub>22</sub> , C <sub>24</sub> , C <sub>25</sub> 2-OH, C <sub>25</sub> 3-OH, C <sub>25</sub> 1-OH, C <sub>27</sub> cyclo†	C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>21</sub> , C <sub>22</sub> , C <sub>24</sub> 3-OH
Respiratory quinone	UQ-4	UQ-8, MK-8	UQ-4	UQ-8, BQ-4	UQ-8	UQ-8	UQ-4	UQ-4	N.D.	N.D.	UQ-8 (BQ-4)	UQ-8
G+C content (mol%)	58.6-65.0	61.6-65.3	63.3-67.8	59.3-69.8	65.6-66.3	62.6-57.8	61.5-66.8	63.5-67.0	36.0-38.8	51.8-66.0	38.7-72.6	48.8-68.8
Temperature profile	Thermophiles	Mesophiles**										

### 22.1.3.3 Famille *Sterolibacteriaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Boden & coll., 2017.

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne de la famille des *Sterolibacteriaceae* dans les différentes structures % sur le total de chacune des structures :

Dans les Snottites

Nd de la flore totale de cette structure

Dans les biofilms « subaerial »

Nd de la flore totale de cette structure

Dans les biofilms « submersed » ≈ 0,7 % de la flore totale de cette structure  
 Dans l'eau de source minérale ≈ 5,0 % de la flore totale de cette structure  
 Dans l'eau de mélange ≈ 7,5 % de la flore totale de cette structure  
 Cette famille a été reclassée dans l'ordre *Nitrosomonadales* et elle est représentée par la famille des *Nitrosomonadaceae*.

### Genres dans cette famille

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sterolibacterium</i></li> <li>• <i>Denitratisoma</i></li> <li>• <i>Sulfuritalea</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Georpfuchisa</i></li> <li>• <i>Sulfurisoma</i></li> <li>• <i>Methyloversatilis</i></li> </ul>
--	---

### Morphologie

La famille des *Sterolibacteriaceae* ou *Nitrosomonadaceae* sont des bactéries en forme arrondie (cocci).

### Caractéristiques

Bactéries autotrophes, hétérotrophes et facultativement méthylophes ; la réduction des sulfures et l'hydrogène ; Oxydase (+) ; catalase (+) ; Source de carbone comme les stérols, les graisses en C1 ; utilisation du cycle de Krebs et des cycles intermédiaires aromatiques ; Utilise comme donneur d'électrons : l'oxygène, les nitrates, Fer (III) ; Mn (IV).  
 Bactéries avec absence de carboxysome ;  
 Composition moyenne des graisses cellulaires :  
 C16 :1 ; C16 :0 ; C15 :0,2-OH ; C10 : 0,3-OH  
**Respiration** : respiration par les quinones (Ubiquinone 8).

### Phylogénétique

La famille des *Sterolibacteriaceae* ou *Nitrosomonadaceae* a un ADN-ADN avec une valeur de (C+G) entre 63,5 à 67,0 mol%

#### 22.1.3.3.1 Genre *Sulfuritalea* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par : Kojima et Fukui, 2011.

Dans la grotte de Sulzbrunn les pourcentages de la famille des *Sulfuritalea* dans l'embranchement des *Betaproteobacteria* sont les suivants :

Dans les Snottites		Nd de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « subaerial »		Nd de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « submersed »	≈ 0,7 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de source minérale	≈ 5 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de mélange	≈ 7,5 %	de la flore totale de cette structure

Dans cette grotte ce genre a été identifié dans les eaux de la source thermale profonde avec 5 % de sa flore totale, mais non décelable dans les biofilms « subaerial » et les snottites. Elles sont en plus petite quantité dans le biofilm « submersed » ≈ 0,7 % de sa flore totale. On peut soupçonner un faible apport par les eaux météoriques.

**Taxonomie** : Classification donnée par Syst Appl Microbiol 37 : 387-95 (2014)

**Classe *Betaproteobacteria* ; Ordre *Nitrosomonadales* ; Famille *Sterolibacteriaceae***

Reclassification donnée par Simon Jon Mclroy, Takanori Awat, Marta Nierychlo<sup>299</sup>.

**Classe *Betaproteobacteria* ; Ordre *Rhodocyclales* ; Famille *Rhodocyclaceae* ;**

**Espèce ayant été cultivée : *Sulfuritalea hydrogenivorans*<sup>300</sup>**

### Morphologie

*Sulfuritalea hydrogenivorans* présente des cellules isolées en forme de bâtonnets incurvés (1,0 à 3.5 µm de longueur et 0.3 à 0.5 µm de largeur), elles sont mobiles et de Gram (-).

La souche Sk43HT est anaérobie facultative, avec une croissance autotrophe, qui à ce jour, a été observée seulement dans des conditions anaérobies. La morphologie cellulaire est observée au microscope à contraste de phase. La formation de spores n'a pas été observée.

### Caractéristiques biochimiques

***Sulfuritalea hydrogenivorans*** oxyde le thiosulfate, le soufre élémentaire et le sulfure d'hydrogène comme sources d'énergie uniques pour la croissance autotrophe et pourrait utiliser le nitrate comme un accepteur d'électrons. Elle est anaérobie stricte. L'isolat est catalase-négative et oxydase positive. Le profil des acides gras de la souche sk43HT, cultivée sur acétate dans des conditions aérobies, a été caractérisé par des concentrations élevées :

- C16 : 0 (33,7 %)
- C16 : 1v7c et/ou iso-C15 : 0 2-OH pour 61,2 %

Autres acides gras détectés : C14 : 0, C18 : 1v7c, C16 : 1v7c alcool, C16 : 0 alcool N et C16 : 1v5c.

Les deux principales composantes en acide gras étant (C16 : 0) et (C16 : 1v7c et/ou iso-C15 : 0 2-OH), ces deux principales fractions ont également été signalées dans les acides gras liées à la souche ***Denitratisoma oestradiolicum AcBE2-1 t*** cultivée sur acétate sous conditions de dénitrification.

Contrairement à la souche ***Denitratisoma oestradiolicum AcBE2-1 t***, la souche ***S. hydrogenivorans sk43HT*** ne contient pas de l'acide gras C18 : 1v7c. Cette différence au niveau des acides gras entre ces deux souches confirme le nom de ***Sulfuritalea hydrogenivorans sk43HT*** donnée à cette bactérie.

En outre, ses caractéristiques physiologiques, y compris chimio-litho-trophique, différencie la souche ***Sulfuritalea hydrogenivorans sk43HT*** de la souche ***Denitratisoma oestradiolicum AcBE2-1 t***, ces deux taxons sont apparentés, sur la base de ces propriétés phénotypiques.

Les activités enzymatiques de la souche sk43HT sont : la catalase (-) ; l'oxydase (+). Elle dégrade les composés aromatiques en réduisant le Fe<sup>+++</sup> ou le nitrate comme accepteurs d'électrons (Weelink et coll., 2009).

La souche ***S hydrogenivorans sk43HT*** peut pousser sur acétates, benzoates, butyrates, fumarates, iso-butyrate, lactates, malates, propionates, pyruvates et succinates.

Cette bactérie consomme de l'hydrogène d'où son nom.

### Caractéristiques différentielles<sup>301</sup>

Codification des genres du tableau ci-dessous

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Rhodoferrax</i></li> <li>• <i>Sulfuritalea</i></li> <li>• <i>Dechloromonas</i></li> <li>• <i>A21b</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Thermomonas</i></li> <li>• <i>Haliangium</i></li> <li>• <i>AKB1-Halophagae</i></li> <li>• <i>B45-Caldineae</i></li> <li>•</li> </ul>
--	--

L'analyse différentielle sur les possibilités métaboliques et nutritionnelles des genres suivants :

SUBSTRATS	1	2	3	4	5	6	7	8
Pyruvates	+	+	+	+	N. D.	N.	-	-
Acétates	+	+	+	-	+	-	-	-
Propionates	+	±	N.D.	-	N. D.	N. D.	-	-
Butyrates	+	-	N. D.	-	N. D.	N. D.	-	-
Oléates	-	-	-	-	N. D.	N. D.	-	-
Aminoacides	+	+	+	-	+	+	-	-
Glucose	±	±	-	-	N. D.	N. D.	-	+
Glycérol	±	-	N. D.	-	N. D.	N. D.	-	-
Éthanol	-	-	-	-	N. D.	N. D.	-	-
N-Acétyleglucosamine		-	N. D.	-	N. D.	N. D.	-	-
Catabolisme Anaérobie du Carbone	±	+	+	+	±	-	-	±
Dénitrification	+	+	+	-	+	+	-	N. D.
Autotrophie Oxydation : $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_2^-$ , $\text{H}_2$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	N.D.	-	N. D.	-	+	+	-	N. D.
Stockage des Polyphosphates	-	N. D.	±	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	-

+ positive ; - négatif ; ± plus ou moins

*Sulfuritalea* métabolise les substances suivantes : les pyruvates ; les acétates ; les aminoacides. Il catabolise le carbone et facultativement le glucose et les propionates.

#### Classification des éléments présentés

Classes	Ordres	Familles	Genres
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rhodoferax</i>
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Sulfuritalea</i>
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Dechloromonas</i>
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>SC1 B4</i>	<i>SC1 BA</i>	<i>A21b</i>
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Thermoononas</i>
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	<i>Halianglanceae</i>	<i>Haliangium</i>
<i>Holophagae</i>	<i>Sub-goupe 10</i>	<i>43F_1404R</i>	<i>AKB1</i>
<i>Chloroflexi</i>	<i>Caldineales</i>	<i>Caldineae (CCD21)</i>	<i>B45</i>

#### Culture

La croissance de *Sulfuritalea hydrogenivorans* a été observée de 6 à 8 jours ; incubation jusqu'à 32 °C (optimal 25,6 °C) avec un pH de développement compris de 6,4 à 7,6 (pH optimum de 6,7 à 6,9).

Une croissance optimale est obtenue dans des milieux contenant 0 à 50 mmol/l de NaCl, par contre une croissance très faible a été observée dans un milieu contenant 230 mmol/l NaCl. Récemment, il a été démontré que le toluène peut servir comme donneur d'électrons pour la réduction du Fe (III) par une *Betaproteobacteria* de la souche G5G6T (Weelink et coll., 2009). Cette souche est étroitement liée à la dominante phyllo-type dans une culture dénitrifiante et croissance enrichie par le p-xylène (Otaru et al., 2010).

#### Milieux de culture<sup>302</sup>

**Prélèvements d'échantillons** : il faut préserver l'anaérobiose totale.

**Milieu d'enrichissement** : inoculer 0,2 ml d'eau de l'échantillon dans un flacon contenant 20 ml dans le bouillon de base — inoculation faite en anaérobiose —, le bouillon de base contient du  $\text{NaNO}_3$  pour obtenir une concentration finale de 25 mmol/l.

**Milieu d'identification :** pour utiliser le bouillon de culture de base mettre un milieu tamponné au bicarbonate en respectant une faible teneur en sel du milieu (Kojima & Fukui, 2010)<sup>303</sup> ; le tampon minéral proposé contient 0,25 g de NaCl + 0,2 g de MgCl<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O + 0,1 g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O+ 0,1 g , NH<sub>4</sub>Cl + 0,1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+ 0,1 g de KCl + 1 ml de solution d'oligo-éléments + 1 ml sélénite avec solution de tungstate ; 1 ml de solution de mélange de vitamines : vitamine B12 soit 1 ml de solution , 1 ml de solution de thiamine. Solution minérale de 30 ml de NaHCO<sub>3</sub> et 1,5 ml Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de solution pour un litre de milieu (Widdel & Bak, 1992).

L'utilisation de nitrite à la dose comprise de 5 à 10 mmol/l dans le milieu, a permis d'appuyer le développement de la souche bactérienne. L'utilisation d'accepteur électronique comme le SO<sub>2</sub> a donné les mêmes résultats sur le développement.

**Incubation :** la culture est incubée à 25 °C sans agitation.

**Atmosphère de culture et de prélèvement :** la croissance a été étudiée à différentes concentration en O<sub>2</sub> (20, 10, 2 %) dans l'atmosphère de culture le développement à 20 % a été plus lente qu'aux autres concentrations. La croissance sous N<sub>2</sub>O est très diminuée.

### Phylogénétique

Chez *Sulfuritalea hydrogenivorans* Sk43HT, la teneur en (G+C) de l'ADN-ADN génomique est d'environ 67 mole %, elle est déterminée par l'HPLC de fluorescence (Gonzalez & SaizJimenez, 2002).

### Caractères génétiques

Chromosome circulaire, longueur en base 3 802 648 pb.

**Statistiques** (Watanabe T et coll., 2015) :

Nombre de nucléotides : 3 802 648 pb.

Nombre de gènes de protéines : 3 587 pb

Nombre de gènes d'ARN : 50 pb

L'analyse phylogénétique basée sur les séquences génétiques de l'ARNr 16s, ainsi que les propriétés phénotypiques et phylogénétiques, ont défini un nouveau genre du nom de *Sulfuritalea* avec pour espèce le *S. hydrogenivorans* Gen. Nov, SP., dont la souche principale est sk43HT (5DSM 22779T 5NBRC 105852T). Cette souche est membre de la classe *Betaproteobacteria* et montre une similitude avec *Georgfuchsia toluolica* G5G6T (94,7 %) et *Denitratisoma oestradiolicum* AcBE2-1 t (94,3 %).

Elle appartient à la famille *Rhodocyclaceae* et n'appartient pas à aucune lignée connue de bactéries oxydant le soufre. Les analyses phylogénétiques ont aussi été réalisées à l'aide de gènes impliqués dans l'oxydation de soufre, comme Soxb et AprA.

Les membres de la classe *Betaproteobacteria* ont des propriétés physiologiques très diverses utilisant de nombreuses combinaisons de donneurs et accepteurs d'électrons pour soutenir leurs croissances. L'isolat de la souche *S. hydrogenivorans*, désignée la souche sk43HT, était facultativement chimio-lithotrophe et capable de croître sur les composés de soufre et en présence d'hydrogène sous conditions de dénitrification.

### Sensibilité aux antibiotiques

Sensibilité positive aux antibiotiques avec la kanamycine et l'ampicilline à 100 mg ml.

### Niches écologiques

La souche *Sulfuritalea hydrogenivorans* Sk43HT a été obtenue auprès d'un échantillon d'eau provenant du lac Mizugaki, lac artificiel d'eau douce stratifiée, situé au centre du Japon (Kojima et al., 2009). L'échantillon a été obtenu à une profondeur de 30 m, correspondant à la limite supérieure de l'hypolimnion.<sup>8888</sup>

### Écologie

Ce genre nous montre la possibilité d'utilisation de cette flore microbienne pour résoudre les problèmes de pollution atmosphérique, hydrique et du traitement des déchets organiques devenant

---

<sup>9999</sup> **Hypolimnion :** résultat de la stratification thermique des eaux d'une mare, d'un lac ou d'une mer fermée. C'est la couche thermique la plus profonde et de température stable ; elle apparaît, selon la saison, entre 15 et 30 m de profondeur. Elle est recouverte par une couche dite « métalimnion », en dessous de la thermocline.

de plus en plus un problème majeur de notre société.

La souche *Sulfuritalea hydrogenivorans* Sk43HT permet d'oxyder les dérivés sulfureux et soufrés, étant des composés volatiles et odorants dans la dégradation des matières organiques. Les dérivés soufrés peuvent nuire aux conditions sanitaires de notre environnement.

Cette souche a aussi la propriété d'éliminer les nitrites et nitrates sous forme d'azote évitant la pollution des sols et des nappes phréatiques. Mais pour bien comprendre et mettre en place l'élimination biologique des boues activées des usines d'épuration, il faut connaître les besoins en nutriments étant nécessaires à ces souches bactériennes, ainsi que définir les activités métaboliques bactériennes incluses dans ces boues. Des enquêtes récentes faites au Danemark, par la technique *Amplicon* sur les gènes par l'analyse PCR sur l'ARNr 16 s, ont permis de définir les souches utilisables en vue de la transformation et la dépollution des déchets organiques.

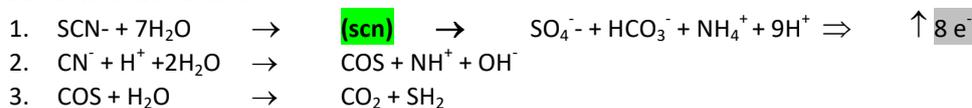
### Biotechnologie

*Sulfuritalea hydrogenivorans*<sup>304</sup> est capable d'être utilisé pour obtenir une pile microbiologique. Les thiocyanates sont des composés toxiques produits par les industries minières et métallurgiques et devant être remis en état avant leur rejet dans l'environnement.

Dans les études pour créer du courant électrique à partir de la dégradation des thiocyanates, il a été démontré que le transfert d'électrons extracellulaires à l'anode s'est produit par captation anodique d'une population de *Thiobacillus*.

Le soufre généré par les bactéries est métabolisé par l'intermédiaire des sulfites finalement devenant des sulfates par l'inversion de la sulfite réductase d'APS et les sulfates transformés par d'adénylyltransferase et les électrons libérés étant potentiellement transférés à l'anode *via* une solution dite navette de transport des électrons. Enfin l'ammonium de la dégradation des thiocyanates a été assimilé au glutamate comme source d'azote et de dioxyde de carbone s'absorbant comme source de carbone<sup>305</sup>. Cette étude montre que le soufre inorganique à basse température, utilisé dans une pile à combustible est une voie d'utilisation du transfert d'électron pour produire de l'électricité par une source microbienne<sup>306</sup>.

### Production d'électricité



### *Sulfuritalea hydrogenivorans* dans le karst

Le faible nombre d'études microbiologiques effectuées sur les cavités karstiques nous apporte la révélation d'une présence d'une diversité microbienne, ayant un potentiel important de catabolisme et de métabolisme et pouvant être exploités pour modifier notre environnement et nous permettre de résoudre des problèmes cruciaux dans l'élimination des déchets anthropiques.

Le problème principal dans la mise en place d'une production biotechnologique microbienne est la connaissance des conditions optimales et nutritionnelles de la flore étudiée, pour pouvoir entretenir les fermenteurs, pourront produire des bactéries à des fins d'utilisation industrielle.

Le problème des germes autotrophes est de définir leurs besoins et trouver les conditions optimales de production.

L'anaérobiose stricte ou partielle est plus dure à obtenir et à gérer que l'aérobiose. Mais les évolutions dans les systèmes biotechnologiques et le génie génétique peuvent évoluer et nous permettre de pouvoir maîtriser les problèmes d'industrialisation et la production de germes.

La biotechnologie concerne les productions pharmaceutiques, les productions d'enzymes médicales, agro-alimentaires et industrielles (détergents). La production, de bactéries, a une place importante dans la lutte contre la pollution pour les ensemencements et le traitement des eaux et des déchets alimentaires anthropiques de notre société.

Les souches *Sulfuritalea hydrogenivorans* et *Sulfuricella denitrificans* étant autotrophes et anaérobies posent des problèmes de production. Mais la connaissance de ces souches nous permet d'avancer dans la possibilité de leur production et de leur utilisation.

### 22.1.3.4 Famille *Thiobacillaceae*

Nom donné par Robert Starkey, 1930.

#### Taxonomie

#### Ordre *Nitrosomonadales* ; Famille *Thiobacillaceae*

Cette famille est en voie de reclassification.

#### Genres dans la famille *Thiobacillaceae* :

- *Thiobacillus*
- *Annvoodia*
- *Sulfuritortus*

#### 22.1.3.4.1 Genre *Thiobacillus*

Reclassification des *Thiobacillus*

L'analyse par PCR sur ARNr 16 S a recentré les noms des *Thiobacillus* sur d'autres genres.

- *Th. versutus* en *Paracoccus*
- *Th. acidophilus* en *Acidiphilium*
- *Th. intermedius*, *Th. perometabolis*, *Th. thermosulfatus* et *Th. cuprinus* en *Thiomonas*
- *Th. thiooxidans*, *Th. ferrooxidans*, *Th. caldus* et *Th. albertensis* en *Acidithiobacillus*
- *Th. aquaesulis* en *Annwoodia aquaesulis*<sup>307</sup>
- *Th. neapolitanus* en *Halothiobacillus*
- *Th. thyasiris* en *Thiomicrospira thyasirae*
- *Th. hydrothermales* et *Th. halophilus* d'abord *Halothiobacillus* et plus tard *Guyparkeria*
- *Th. tepidaruius* en *Th. themithiobacillus*

Caractéristiques différentielles

Characteristic	DSM 4255 <sup>T</sup>	<i>Thiobacillus thioparus</i> DSM 505 <sup>T</sup>	<i>Thiobacillus denitrificans</i> DSM 12475 <sup>T</sup>	<i>Thiobacillus thiophilus</i> DSM 19892 <sup>T</sup>
<i>16S rRNA gene identity (%) to:</i>				
<i>T. thioparus</i> DSM 505 <sup>T</sup>	93.1	100	97.6	97.6
<i>T. denitrificans</i> DSM 12475 <sup>T</sup>	93.4	97.6	100	97.6
<i>T. thiophilus</i> DSM 19892 <sup>T</sup>	93.1	97.6	97.6	100
DSM 4255 <sup>T</sup>	100	93.1	93.4	93.1
Cell length (µm)	0.9	1.7	1.0-3.0	1.8-2.5
Cell width (µm)	0.3	0.5	0.5	0.5-0.8
Source of type strain	Thermal sulfur spring	Agricultural soil	Sewage	Aquifer
Colony colour on thiosulfate-agar, under air	White, yellow with age	White, pink or brown with age	Clear, white with age	White, yellow with age
Metabolic mode	Facultative heterotroph	Obligate autotroph	Obligate autotroph	Obligate autotroph
<i>Use of nitrate as:</i>				
Nitrogen source	-	+	±	<i>N.D.</i>
Electron acceptor	+	-	+	+
Temperature range	30-55	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	-2-30
Temperature optimum	45	25-30	28-32	25-30
pH range	7.0-9.0	5.0-9.0	<i>N.D.</i>	6.3-8.7
pH optimum	7.6	6.0-8.0	6.8-7.4	7.5-8.3
Tetrathionate accumulation in thiosulfate batch culture	-	+	+	+
<i>Energy sources for autotrophic growth (all grow on thiosulfate and tetrathionate)</i>				
Trithionate	+	+	<i>N.D.</i>	-
Elementary sulfur	+	-	+	-
Thiocyanate	-	+	+	-
Sulfide	+	+	+	-
Dimethylsulfide	-	+	-	<i>N.D.</i>
Dimethyldisulfide	-	+	-	<i>N.D.</i>
Carbon disulfide	-	w	-	<i>N.D.</i>
G+C content (mol%)	65.7*	62.3**	66.0**	61.5*

Espèces de *Thiobacillus* incolore utilisant le soufre

Sous- groupe n°1

*T dentificans*, *T thioparus*, *T intermedius*, *T perometabolis*

Sous-groupe n°2

*T tepidarius*, *T ferrooxidans*, *T albertis*, *T thiooxidans*

### Espèce *Thiobacillus aquaesulis*<sup>308</sup> renommée Espèce *Annwoodia aquaesulis*

*Thiobacillus aquaesulis* comprend 4 espèces avec des noms publiés, dont *Thiobacillus aquaesulis* DSM 4255T (= ATCC 43788T) est la seule espèce pouvant se développer sous le type hétérotrophe ou mixotrophes, le reste étant des autotrophes obligatoires et a une différence significative de métabolisme étant de ne pas produire des tétra-thionates lors de l'oxydation du thiosulfate pendant la croissance autotrophe.

Suivant les propriétés différentielles chimio-taxonomiques et la recherche d'une identité par les gènes ARNr 16 s, il y a une similarité de 93,4 % entre l'espèce *Thiobacillus aquaesulis* et l'espèce *Thiobacillus thioparus* DSM 505T<sup>309</sup>.

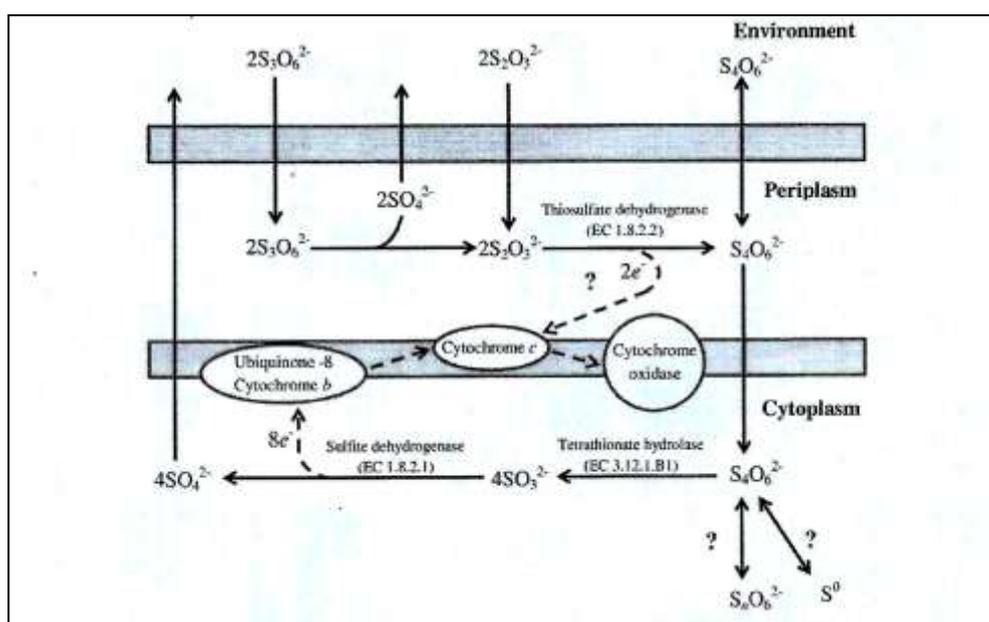
Pour l'espèce *Thiobacillus thioparus*, la souche de type est la souche appelée StarkeyT, isolée par Robert Starkey dans les années 1930.

Alors que plus de 30 « espèces » ont été nommées dans le genre *Thiobacillus*, (la première souche a été observée par l'océanographe biologique Alexander Nathansohn en 1902), la plupart des noms n'ont jamais été valablement publiés. Les autres ont été reclassés.

*Thiobacillus trautweinii* était très vaguement défini « espèce » oxydantes du soufre ; hétérotrophes ou chimio-litho-hétérotrophe. Elles ont été dénommées dans les années 1910-1960, mais la plupart était probablement des *Pseudomonas*. Plusieurs espèces nommées dans ce genre n'ont jamais été déposées dans les collections ou ont été perdues.

Toutes les autres espèces sont autotrophes obligatoires, elles utilisent le soufre pour leur respiration, et les thiosulfates ou poly-thionates comme sources d'énergie (en utilisant les enzymes trans-aldolase du cycle de Calvin – Benson BEM).

Le *Thiobacillus aquaesulis* peut croître faiblement sur des milieux complexes comme un hétérotrophe, mais a été reclassifié comme *Annwoodia aquaesulis*. Certaines souches (E6 et Tk-m) de l'espèce type *Thiobacillus thioparus* peuvent utiliser du soufre du sulfure de diméthyle, le diméthyl-disulfite ou le disulfure de carbone pour soutenir la croissance autotrophe - ils oxydent le carbone de ces espèces en dioxyde de carbone et il l'assimile. L'oxydation de soufre est obtenue par la voie de Kelly-Trudinger.



Oxydation et réduction des dérivés inorganiques sulfurés par la voie de Kelly-Trudinger

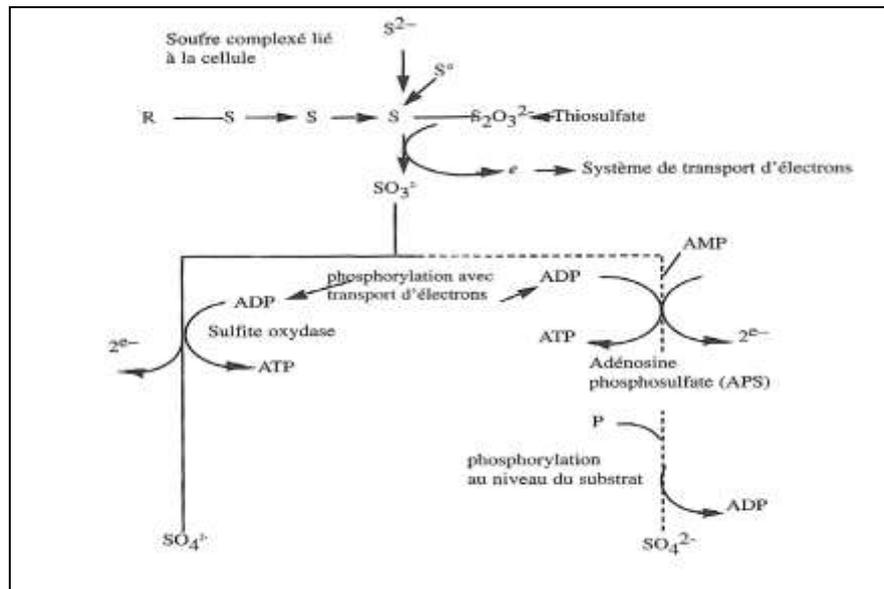
Enzymes utilisées :

- $2S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-}$  (Thiosulfate déshydrogénase)
- $S_4O_6^{2-} \rightarrow 4SO_3^{2-}$  (Tetra-thionate hydrolase)
- $4SO_3^{2-} \rightarrow 4SO_4^{2-}$  (Sulfite déshydrogénase)

À la fin des années 1960, plusieurs enzymes avaient été impliqués dans le métabolisme des thionates :

- Rhodanase
- Déshydrogénase de thiosulfate (synthèse tétra-thionate)
- Déshydrogénase de sulfite et soufre oxygénase.

Aujourd'hui, nous commençons à comprendre l'arrangement moléculaire de certains de ces enzymes, on a établi le nombre total d'enzymes nécessaire à l'oxydation de soufre inorganique y compris le complexe oxydant le thiosulfate de *Versutus P.* et *Paracoccus pantotrophus* (Kelly et Wood, 1994 ; Friedrich 1998 ; Kelly et al., 2001)<sup>310</sup>.

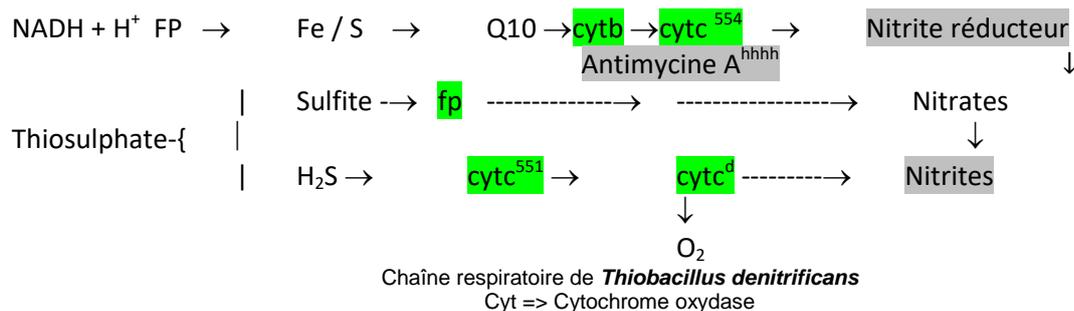


Étape de l'oxydation du soufre par les *Thiobacilli*

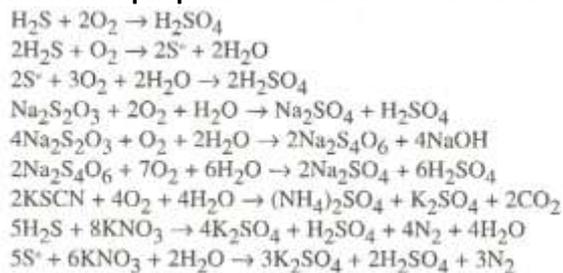
Les dernières étapes de l'oxydation des sulfites sont connues. Elle fait intervenir une APS-réductase, une ADP – sulfurylase et régénère une mole d'ATP pour deux moles de sulfite oxydé en sulfate.

Les étapes décrites dans cette voie identifiée dans le *Thermithiobacillus tepidarius* décrite par Lu & Kelly (1988) et par la suite reprises pour l'*Acidithiobacillus caldus* par Hallberg et al., 1996 et *Advenella kashmirensis* (Barrage et al., 2007).

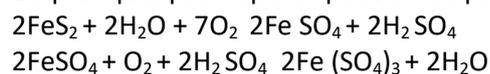
L'étude ultérieure a révélé que le sulfate inhibe l'oxydation du tétra-thionate, mais on ne sait pas combien d'enzymes ont été impliquées dans la production de sulfates ou de tétra-thionates, à l'instar de précédentes études sur les organismes de Kelly-Trudinger.



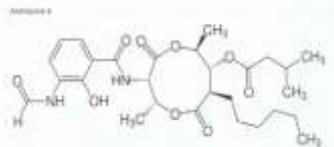
### Réactions que peuvent réaliser les Thiobacillus :



De plus quelques espèces peuvent se procurer leur énergie à partir de l'oxydation du fer ferreux



<sup>hhhh</sup> **Antimycine A** : composé chimique, possédant des propriétés inhibitrices de la chaîne respiratoire des mitochondries au niveau du complexe III, ou de l'ubiquinol – cytochrome C oxydoréductase.



## Caractéristiques des thiobactéries

Espèce	Autotrophe		Dénitrification	
	Obligatoire	Facultatif	Vers NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Vers N <sub>2</sub>
<i>Thiobacillus thioparus</i>	+	-	+	-
<i>T. neapolitanus</i>	+	-	-	-
<i>T. denitrificans</i>	+	-	+	+
<i>T. novellus</i>	-	+	-	-
<i>T. versutus</i>	-	+	+	+
<i>T. intermedius</i>	-	+	-	-
<i>T. perometabolis</i>	-	+	-	-
<i>T. delicatus</i>	-	+	+	-
<i>T. thyasiris</i>	-	+	+	+
<i>Thiomicrospira pelophila</i>	+	-	-	-
<i>Tms. denitrificans</i>	+	-	+	+
<i>Tms. crunogena</i>	+	-	-	-
<i>Thiosphaera pantotropha</i>	-	+	+	+
<i>Beggiatoa</i> sp. (marine)	-	+	-	-
<i>Beggiatoa</i> sp. (eau douce)	-	+	+	+

## Caractéristiques différentielles entre les espèces suivantes

Espèces	Autotrophe		Utilise le	
	obligatoire	facultatif	Soufre	Fer
<i>T ferrooxidans</i>	+	-	+	+
<i>T thiooxidans</i>	+	-	+	-
<i>T albertis</i>	+	-	+	-
<i>T acidophilus</i>	-	+	+	-

## Culture

### Milieux de culture

#### Milieu de Lieske (isolement de *Thiobacillus denitrificans*)

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O 5 g, KNO<sub>3</sub> 5 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.2 g, MgCl<sub>2</sub> 0.1 g, CaCl<sub>2</sub> traces, FeCl<sub>3</sub> traces, au distillé QSP 1 000 ml.

#### Milieu de Starkey (isolement de *Thiobacillus thioparus*)

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-5H<sub>2</sub>O 5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g, CaCl<sub>2</sub> 0.25 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g ; pH 7.0 ; QSP d'eau distillée 1 000 ml.

#### Milieu de Waksman et de Starkey (isolement de *Thiobacillus thiooxidans*)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.1 à 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, CaCl<sub>2</sub> 0.25 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.5 g, soufre en poudre 10 g ; QSP d'eau distillée 1 000 ml.

#### Milieu de waksman et Starkey (isolement du *Thiobacillus thio-oxydans*) :

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.1 à 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, CaCl<sub>2</sub> 0.25 g, KHPO<sub>4</sub> 3.5 g, soufre en poudre 10 g. QSP 1 000 ml.

**Milieu pour le *Thiobacillus denitrificans*** en g/l : KNO<sub>3</sub> 2 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, NaHCO<sub>3</sub> 2g, MgS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5 g, oligoélément 1ml. QSP 1 000 ml.

- **Solution d'oligoéléments** : Na<sub>2</sub>-EDTA 50 g, ZnSO<sub>4</sub> 2.2 g, CaCl<sub>2</sub> 7.34 g, MnCl<sub>2</sub> 2.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 5 g, CuSO<sub>4</sub> 0.2 g, amener à pH 6 avec de NaOH, QSP 1 000 ml d'eau distillée.

**Milieu pour *Thiobacillus ferroxydans* en g/l :**

Solution 1 : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N, 5 ml ; QSP 1 000 ml d'eau distillée.

Solution 2 : FeSO<sub>4</sub> 167 g, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N, 50 ml ; QSP 1 000 ml d'eau distillée.

**Mélange des solutions** : Stériliser 1 et 2 séparément. Mélanger 4 parties de 1 et une partie de 2.  
Solution 3 : solution à 1 % agar dans d'eau distillée.

**Milieu solide** : mélanger 40 ml de solution 1,20 ml de solution 2 et 40 ml de solution 3.

**Milieu pour *Thiobacillus thio-oxydans* en g/l :**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 g, MgSO<sub>4</sub> 0.01 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, CaCl<sub>2</sub> 0.25 g ; fleur de soufre 5 g ; pH 4.5, QSP 1 000 ml d'eau distillée.

**Milieu pour *Thiobacillus thioparus* en g/l :**

Hyposulfite de sodium 10 g, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, MgSO<sub>4</sub> 0.1 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.1 g, FeCl<sub>3</sub> 0.02 g, MnSO<sub>4</sub> 0.02 g, , QSP 1 000 ml d'eau distillée.

### 22.1.4 Ordre *Nitrosomonadales* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Vinogradki, 1892.

Dans la grotte de Sulzbrunn les pourcentages de l'ordre des *Nitrosomonadales* dans l'embranchement des *Betaproteobacteria* sont les suivants :

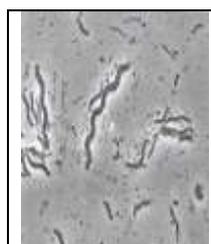
Dans les Snottites	Nd de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « subaerial »	Nd de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « submersed »	≈ 1,4 % de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de source minérale	≈ 16 % de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de mélange	≈ 5 % de la flore totale de cette structure

Donc l'eau météorique n'apporte pas de *Nitrosomonadales*.

### Taxonomie

**Familles de cet ordre :**

- *Nitrosomonadaceae*  
Elle comprend les genres *Nitrosomas*, *Nitrosolobus* et *Nitrosospira*.
- *Methylophilaceae*  
Elle comprend les genres : *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus*.
- *Spirillaceae*  
Elle comprend le genre : *Spirillum*.
- *Thiobacillaceae*  
Elle comprend les genres : *Thiobacillus*, *Annwoodia*, *Sulfuritortus*.
- *Gallionellaceae*  
Elle comprend les genres : *Gallionella*, *Ferriphaselus*, *Suluriferula*, *Sulfurirhabdus* et *Sulfuricella*.
- *Sterolibacteraceae*  
Elle comprend les genres : *Sterolibacterium*, *Denitratisoma*, *Sulfuritalea*, *Georpfuchisa*, *Sulfurisoma* et *Methyloversatilis*



**Bactéries de nitrification**

*Bactéries oxydant l'ammoniaque (ou gaz ammoniac) en nitrite : dans lesquelles on trouve Nitrosococcus, Nitrosolobus, Nitrosovibrio.*

*Bactéries oxydant les nitrites en nitrates avec multiplication par bourgeonnement : Nitrospina, Nitrococcus, Nitrospira.*

### Caractéristiques

Les membres du genre *Nitrosomonadales* oxydent les ions d'ammonium en nitrites, cette action est appelée processus de nitrification. Cette transformation entre dans le cycle de l'azote.

Autres genres autotrophes tels que *Annwoodia* et *Thiobacillus* oxydant par la réduction d'ions inorganique en soufre, tels que thiosulfates en sulfure, puis en soufre et ayant un rôle important dans le cycle du soufre.

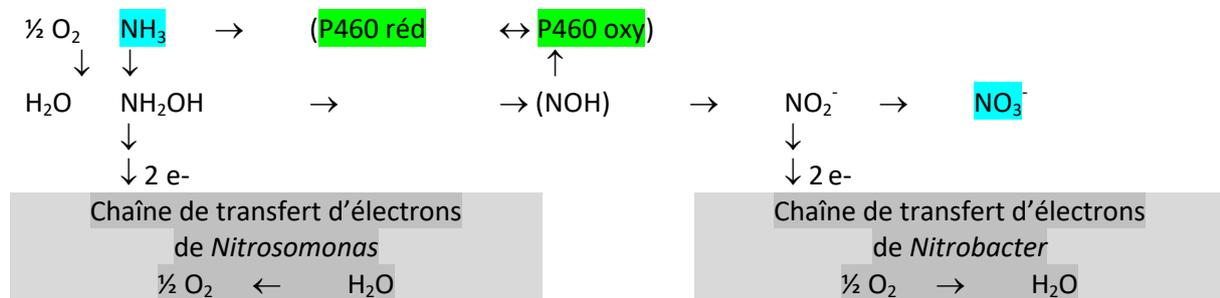
Les méthylophiles comme le *Methylophilus* oxydent des composés tels que le méthanol en dioxyde de carbone et sont cruciaux pour le cycle du carbone.

Le *Gallionella* et le *Ferriphaselus* oxyde le fer ferreux ( $Fe^{++}$ ) en fer ferrique ( $Fe^{+++}$ ) par échange d'un électron ( $e^-$ ) en formant de l'hydroxyde ferrique ( $Fe(OH)_3$ ) permettant dans la croissance autotrophe d'avoir un rôle dans le cycle du carbone et le cycle du fer.

Par conséquent les *Nitrosomonadales* sont essentiels pour la bio-géochimie des cycles élémentaires et de nombreuses espèces ont un rôle important dans les principes des processus biochimiques.

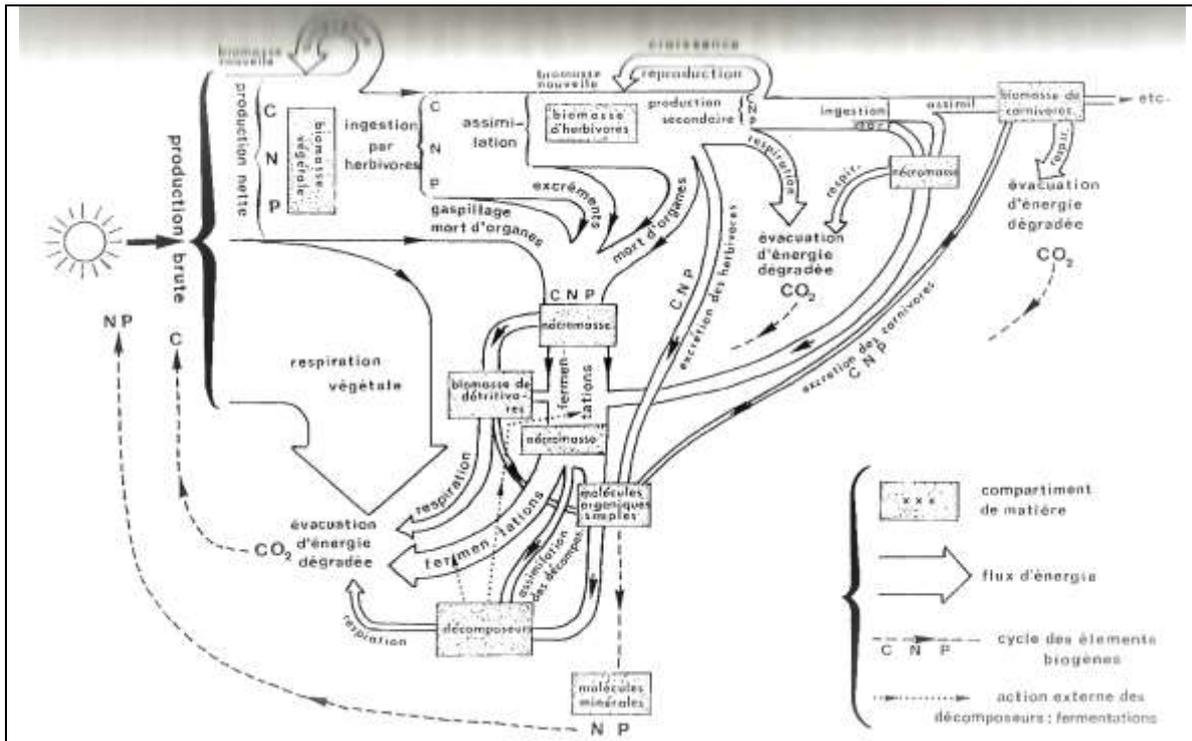
### Bactéries de la nitrification

Les bactéries oxydant l'ammonium en nitrite sont les suivantes : *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*



Réduction de transfert des électrons dans la nitrification : Oxydation des nitrites en nitrates dans les *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*.

## Les cycles du carbone, de l'azote, du phosphore.



« Schématisation des chaînes trophiques et des chaînes de biodégradation, réalisant un cycle (flux fermé) de matière et un flux ouvert d'énergie. Les divers flux par lesquels transite simultanément la matière et l'énergie sont symbolisés par des rubans orientés, de large proportionnelle à l'importance de ces flux ; le flux global d'énergie est ouvert, allant du rayonnement solaire impactant la biomasse chlorophyllienne, à l'évacuation d'énergie sous forme de chaleur. Les cheminements des éléments, C, N, P, sont symbolisés par des lignes en tirets. Ils sont fermés sur eux-mêmes : les molécules évacuées au terme des nombreux catabolismes sont disponibles pour le cycle. »

Extrait : Serge FRONTIER, Denise PICHOD-VIALE, Alain LEPRETRE, Dominique DAVOULT, Christophe LUCZAK, *Écosystèmes, structure, fonctionnement, évolution* ; éd. DUNOD, 2008, page 147

### Milieus de culture

Milieus liquides pour les bactéries autotrophes ou chimio-autotrophes.

Milieus pour les bactéries oxydant les nitrites pour 1000 ml d'eau distillée : HNO<sub>3</sub> 300 mg ; MgSO<sub>4</sub> 187,5 ; CaCl<sub>2</sub> 12,5 mg ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 500mg ; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mg ; FeSO<sub>4</sub>, 10mg ; KHCO<sub>3</sub>, 1500 mg.

**Milieus pour les bactéries marines** : pour 300 ml d'eau distillée + eau de mer 700 ml : NaNO<sub>2</sub>, 69 mg ; MgSO<sub>4</sub> 100 mg ; CaCl<sub>2</sub>, 6mg ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,74 mg ; fer chélaté 1mg ; Na<sub>2</sub>Mo O<sub>4</sub>, 30µg ; MnCl<sub>2</sub>, 66µg ; CuSO<sub>4</sub>, 6g ; ZnSO<sub>4</sub>, 30 µg.

**Milieu pour les bactéries du sol** : HNO<sub>3</sub> 300mg, MgSO<sub>4</sub> 187,5mg, CaCl<sub>2</sub> 12.5mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 500mg, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 500mg, FeSO<sub>4</sub> 10mg, KHCO<sub>3</sub> 1500mg, QSP 1000ml d'eau distillée.

#### Milieu pour *Nitrosomonas* :

NaCl 0.3g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.14g, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.03g, H<sub>2</sub>O QSP 90ml ;

0.1 mol de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10ml, amenés à ébullition 30 mn, refroidir et ramenés au volume de départ. Mettre en plus (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pour les *Nitrosomonas*) 0.66g, avec NaNO<sub>2</sub> (pour les *Nitrobacter*), 0.5g.

Diluer à une QSP de 1000ml et ajouter 10g de CaCO<sub>3</sub> en poudre et 0.4 ml de solution d'oligo-élément, contenant : Mn 22µg, B 21µg, Cu 17µg, Zn 16µg, Co 14µg. Répartir en Erlenmeyer sur une couche de 1 cm. Stériliser 15 mn à 121°C.

#### 22.1.4.1 Généralités sur les ferrobactéries

*Ferribacteria* (ou ferrobactéries) désigne un super-embranchement de bactéries, étant un groupe taxonomique encore relativement mal connu. Elles utilisent le fer et Magannées comme des cofacteurs pour leur métalloenzyme respiratoire.

#### Classification de Cavalier-Smith 2002, ils créent quatre embranchements

- Déferrobactéries

- *Chrysiogenetes*
- *Synergistetes*
- *Nitospira*

### Classification phénotypique

- *Ferrobacteries engainée*
- *Ferrobactéries bourgenantes*
- *Ferrobactéries chimiohétérotrophes*

### Cofacteurs et les ions métalliques

De nombreuses enzymes ont besoin pour exercer leur activité catalytique d'un cofacteur. Il existe plusieurs sortes de cofacteurs.

#### Ions métalliques

Un nombre considérable d'enzymes requièrent un cation métallique pour leur activité. On les appelle des métalloenzymes. Le cation métallique est un oligoélément fourni par l'alimentation à la cellule où fonctionne la métalloenzyme. Les ions ainsi fixés participe à la fois à la reconnaissance du substrat et à la catalyse, mais il joue aussi un rôle de structuration en stabilisant la conformation spéciale efficace du site actif. Il existe un très grand nombre de métalloenzymes utilisant divers cations tels que le :

$Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ .

Les métalloenzymes contenant du fer ou du cuivre dans leur centre actif sont le plus souvent utilisées dans le processus d'oxydoréduction comme les cytochromes :

$Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  (cytochromes) et  $Cu^+$ ,  $Cu^{2+}$

### Genres des ferrobactéries

Ferrobactéries communes	Autres ferrobacteries du sud de la France
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sphaerotilus</i></li> <li>• <i>Crenothrix</i></li> <li>• <i>Clonothrix</i></li> <li>• <i>Siderococcus</i></li> <li>• <i>Siderosphaera</i></li> <li>• <i>Naumaniella</i></li> <li>• <i>Gallionella</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sphaerotitus e</i></li> <li>• <i>Clonothrix fusca</i></li> <li>• <i>Siderococcus communis</i></li> <li>• <i>Siderosphaera conglomerata</i></li> <li>• <i>Naumaniella neustonica</i></li> </ul>

### Environnement

Certaines de ces bactéries peuvent pulluler dans des eaux industrielles très polluées. Avec les manganobactéries et d'autres bactéries productrices de biofilms, elles peuvent contribuer, en présence d'ion  $Cl^-$  à une corrosion (bio-corrosion) accélérée de certains tuyaux ou matériaux, y compris en inox (ex : tuyau de 3 mm en AISI 304L présentant des fuites après un mois d'exposition dans une eau contenant 200 ppm de  $Cl^-$ ).

Ce sont des bactéries hétérotrophes (les plus nombreuses) pouvant croître dans des milieux ne contenant que des traces de fer ferreux et leur rôle déborde largement le cadre du cycle du fer : C'est le cas de *Sphaerotilus natans*, l'infection de cette bactérie entraîne de nombreux dommages au niveau de la faune benthique<sup>iii</sup> (altération de son habitat par la boue formée) avec une action sur les

<sup>iii</sup> **Faune benthique** : Les macro-invertébrés benthiques, ou benthos, sont des organismes sans colonne vertébrale et visibles à l'œil nu, tels que les insectes, les mollusques, les crustacés et les vers qui habitent le fond des cours d'eau et des lacs. Comme ils sont une source de nourriture pour plusieurs espèces de poissons, d'amphibiens et d'oiseaux, ils constituent un important maillon de la chaîne alimentaire des milieux aquatiques.

Les insectes représentent une bonne partie des macro-invertébrés benthiques. Certains, tel cet éphéméroptère, habitent le cours d'eau pendant leur vie larvaire. D'autres, comme ce coléoptère de la famille des *Halplidae*, passent toute leur vie larvaire et adulte en milieu aquatique. Enfin, une bonne partie de cette faune appartient à d'autres groupes qu'à celui des insectes. Ce mollusque gastéropode en est un exemple

Les macro-invertébrés benthiques sont reconnus pour être de bons indicateurs de la santé des écosystèmes aquatiques. Ils intègrent les effets cumulatifs et synergiques des perturbations physiques, biologiques et chimiques des cours d'eau, ce qui

poissons la consommant, elle entraîne un pourrissement des œufs. Le *Sphaerotilus natans* peut intervenir au niveau de la nitrification. Ainsi que l'a noté Reinheimer (1959J in Dondero, 1975) : la forte croissance de cette bactérie entraîne une augmentation de DBO (demande biologique en oxygène) et entraîne une anoxie du milieu. Ayant pour effet de retarder la nitrification et donc d'augmenter la teneur en  $\text{NH}_4^+$  de l'eau<sup>311</sup>.

Le genre *Crenothrix* a une répartition large, dans les eaux courantes, mais aussi stagnantes contenant des matières organiques et, quelquefois, des sels de fer.

La bactérie est souvent fixée, sur des algues vertes (comme le genre *Clonothrix*). On remarque, de même, qu'il n'y a que quelques genres d'algues comme les *Vaucheria* portant ces bactéries.

Chez les *Siderocapsaceae*<sup>iii</sup>, le genre *Siderococcus* est largement représenté dans les eaux douces ; on le trouve généralement dans les sédiments, mais aussi dans les boues de fossés où il a été isolé. Il est fréquent dans les eaux neutres et peut supporter des eaux alcalines (isolé dans des boues).

### **Ferribactéries dans l'environnement**

Les espèces les plus citées dans les cas de colmatage ferrique sont : *Leptothrix*, *Gallionella*, *Sphaerotilus*, *Siderocapsa*<sup>iiii</sup>.

Dans une moindre mesure : *Toxothrix*, *Crenothrix*, *Clonothrix*, *Siderococcus*, *Naumaniella*, *Sideroxydans*, *Ferriphaselus*.

Ces bactéries (*Sidérocapsacées*, *Gallionella*, *Thiobacillus*) pourraient être impliquées dans l'initiation de « nodules » ferriques et donc dans la genèse des gisements de fer.

Il est possible de différencier ces bactéries en deux groupes distincts :

- **Celles oxydant le fer ferreux (quelques espèces).** Telles *Gallionella ferruginea*, ayant à priori, une action spécifique d'oxydation du fer<sup>++</sup>. Elles vivent dans des milieux aquatiques riches en fer soluble dans lesquels le fer ferreux est relativement stable en solution (pH acides, milieux relativement anoxiques). La présence de la bactérie dans de tels milieux peut provoquer d'importants dépôts d'hydroxyde ferrique, alors que les conditions physico-chimiques du milieu ne le permettraient pas. Ces bactéries jouent donc un rôle important dans l'environnement et dans l'aménagement (colmatage ferrique des drains).
- **Celles précipitant en dégradant les constituants organiques** (un grand nombre de bactéries des sols et des eaux).

### **Écologie des Ferrobactéries**

Les ferrobactéries peuvent être des indicateurs de pollution organique comme *Sphaerotilus natans*. Il faut noter, que la fixation et la présence de la gaine permettent à la bactérie de vivre dans des eaux courantes, peu riches en matières organiques. Mais c'est surtout dans les cours d'eau où il y a des rejets organiques (laiteries, raffineries, papeteries, brasseries, égouts) que l'on rencontre le plus fréquemment cette bactérie. En aval de tels rejets, *Sphaerotilus natans* peut avoir une croissance explosive et devenir dominante. Les études de Curtiss et Curds (1971) et Dondero (1975), montrent qu'elle est souvent associée à d'autres organismes comme *Beggiatoa* (grand procaryote du milieu marin), *Leptomitus*, *Fusarium* (eucaryote fongique), *Flavobacterium* (procaryote), *Ch. romatium*, *Spirillum*, *Lamprocytis*, *Azotobacter*, *Chlorelia*, *Euglena*, etc.

---

permet d'évaluer les répercussions réelles de la pollution et de l'altération des habitats aquatiques et riverains sur les écosystèmes. Plus précisément, le suivi des macro-invertébrés benthiques est utile pour :

- Évaluer l'état de santé des écosystèmes aquatiques ;
- Suivre l'évolution de l'état de santé d'un cours d'eau au fil du temps ;
- Évaluer et vérifier l'impact d'une source de pollution connue sur l'intégrité de l'écosystème ;

<sup>iiii</sup> *Siderocapsaceae* : Les faciès calcaires rouges du Dévonien Moyen et Supérieur de la Montagne Noire (Sud de la France) se sont déposés dans un système de rampe distale à sédimentation héli-pélagique, sous la zone d'action des tempêtes, par plus d'une centaine de mètres d'eau, dans des milieux à faibles teneurs en oxygène. La pigmentation rouge de ces calcaires est probablement liée à l'activité de ferrobactéries apparentées au groupe des *Siderocapsaceae*. Ces communautés bactériennes constituaient des tapis et des micro-buissons benthiques piégeant le fer présent sous forme réduite. C'est la destruction *in situ* de ces structures minéralo-microbiennes qui a permis la dissémination de l'hématite submicronique dans les matrices micritiques. D'autres matrices carbonatées rougeâtres du Paléozoïques d'Europe sont également analysées à la lumière de ces résultats. L'origine de leur pigmentation est également rapportée à l'activité de ferrobactéries apparentées aux groupes des *Beggiatoales* et des *Siderocapsaceae*.

## Présence de *Ferribactéries* dans le sol (J.L. Gouy, L. Labroue)

Les bactéries pédonculées : le genre *Gallionella* fut décrite la première fois par Ehrenberg, en 1836, dans des dépôts fossiles ; mais ce furent Cholodny (1923) et Perfil'ev (1926) réalisant une description de sa morphologie complète et de son cycle de développement.

Elles sont connues comme des bactéries formant des tiges torsadées-rubanées (Vatter & Wolfe, 1956). Ce fut Van Iterson (1958) suggérant, la première, que le « pédoncule bactérien » contenait des éléments vivants et était l'élément principal de la bactérie. Ce pédoncule est en fait une bande torsadée constituée de nombreuses fibrilles recouvertes d'hydroxyde ferrique.

L'une des premières bactéries décrites dans l'oxydation du fer est *Gallionella ferruginea*, étant une bactérie neutrophile, micro-aérophiles appartenant à la classe *Betaproteobacteria* (Hallbeck et coll., 1993)<sup>312</sup>.

## Présence dans le karst

<p>Eisenoxidation durch <i>Gallionella</i></p> $4 \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 10 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{Fe}(\text{OH})_3 + 8 \text{H}^+$  <p>Vererter Biofilm von <i>Gallionella ferruginea</i> im Korrosionsprodukt einer Graugussleitung für Trinkwasser. Bildmaßstab: 1,7 x 2,5 mm</p>	<p>La formation de structure filamenteuse ou autres précipités d'hydroxyde de fer, tels que ceux du parc Jasper (à la frontière avec la Colombie-Britannique. Hinton est la ville de à la frontière du parc Jasper) où se trouvent des restes des champs de reliques hydrothermaux sous-marins ayant des structures indiquant l'origine bactérienne de ces formations (voir grotte du Rideau de fer).</p>
--	---

Beaucoup de bactéries sont chimio-litho-autotrophes et jouent un rôle dans le cycle du carbone et le cycle du fer dans ces environnements

Certaines bactéries sont oxydantes du fer, tels que le *Gallionella capsiferiformans* ES-2, les souches du *Siderooxydans lithotrophicus* ES-1 et LD-1, de la souche *Siderooxydans paludicola* BrT et de la souche *Siderooxydans CL21* ; ces souches ont été découvertes depuis 1956 et elles ont été rattachées au *Gallionella ferruginea*, bien qu'aucune preuve de production de tiges de ces bactéries n'ait été rapportée (Emerson et Moyer, 1997 ; Lu Decke et coll., 2010 ; Weiss et al., 2007).

*Gallionella ferruginea* est une bactérie formant des tiges d'oxyde de fer, le *Mariprofundus ferrooxydans*, a été isolée d'un tapis microbien ferrugineuse dans une cheminée hydrothermale en eau profonde (Emerson et Moyer, 2002) et il a été affilié avec la catégorie *Candidatus Zetaproteobacteria* (Emerson et al., 2007).

### 22.1.4.2 Famille *Gallionellaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par : Henrici et Johnson, 1935.

Dans la grotte de Sulzbrunn les pourcentages de la famille des *Gallionellaceae* dans l'embranchement des *Betaproteobacteria* sont les suivants :

Dans les Snottites		Nd de la flore totale de cette structure.
Dans les biofilms « subaerial »		Nd de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « submersed »	≈ 1 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de source minérale	14 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de mélange	≈ 1,6 %	de la flore totale de cette structure

Les eaux météoriques n'apportent pas de *Gallionellaceae*, le bilan négatif entre l'apport des eaux de source et l'eau de mélange peut provenir de la fixation ou l'insolubilisation des bactéries par les précipités de fer.

Cette famille comprend seulement quatre genres :

- *Ferriphaseilus*
- *Gallionella*
- *Siderooxydans*
- *Sulfuricella*

Nous ne pouvons pas parler de la famille des *Gallionellaceae* sans faire état des ferrobactéries étant l'une des premières caractéristiques de cette famille.

## Relations bactériennes avec le fer

Dans les relations des bactéries avec le fer II, que l'on nomme les ferrobactéries, il faut distinguer deux classes principales :

Les bactéries autotrophes employant le fer comme source d'énergie. Dans ce cas, la bactérie ne croît pas sans le fer ferreux et ces genres représentent des ferrobactéries *sensu stricto*. On a les genres suivants :

- *Gallionella*
- *Thiobacillus (ferrooxidans)*
- *Siderooxydans*
- ...

Les bactéries hétérotrophes n'utilisant pas le fer ferreux comme source d'énergie. Cependant, pour certains genres, en particulier *Leptothrix*, il faut souligner que les eaux dans lesquelles on les rencontre sont pauvres en matières organiques et la teneur en métal réduit n'est pas négligeable.

Comme les genres :

- *Leptothrix*
- *Sphaerotilus*
- *Clonothrix*

Enfin il existe un groupe de bactéries, les *Sidérocapsacées*, encore mal connues car non cultivées, que l'on rencontre dans des conditions limites de stabilité du fer ferreux (faible pression d'O<sub>2</sub> en particulier) et, dans ce cas, il serait possible que quelques genres puissent tirer une partie de leur énergie de l'oxydation du fer ferreux.

La position phylogénétique des *Gallionellaceae*, telle qu'elle est déterminée par comparaisons des séquences des ADNr 16 s, a été incluse parmi les *Betaproteobacteria*.

Ses voisins phylogénétiques sont :

- *Methylophilaceae*
- *Nitrosomonadaceae*
- *Spirillaceae*

La famille contient des Gram (-), chimio-lithotrophes, autotrophes, neutrophiles et ce sont des bactéries semi-anaérobies oxydant le fer ferreux en aérobiose, avec la propriété de sécréter une tige extracellulaire torsadée composée de nombreuses fibres ferriques.

Les *Gallionellaceae* se trouvent dans les eaux souterraines contenant du fer ferreux lorsque l'eau atteint un environnement contenant de l'oxygène. Ces bactéries provoquent la formation de fer ferrique (hydroxyde de fer) se condensant en une forme de tiges métalliques torsadées. Lorsque l'on a une grande quantité de tiges produites, ce matériau attire les oxydes de nombreux métaux sous forme de traces, donnant à l'eau un aspect macroscopique marron. Les masses de tiges d'hydroxyde de fer formées peuvent être éventuellement la cause de graves obstructions dans les fossés, puits d'eau potable et toutes autres installations utilisant des matières ferreuses dans les eaux souterraines.

La famille relève de procédés biotechnologiques, car elle peut être utilisée pour éliminer le fer ferreux lors de la production d'eau potable à partir des eaux souterraines.

Dans les sites actifs hydrothermaux et en mer profonde, la plupart des minéralisations de fer sont sous la forme de sulfures massifs, étant émis par les eaux chaudes. Dans la zone de Jasper (parc national canadien, comportant une rivière aux eaux troubles), on a un précipité d'hydroxyde de fer comportant des structures filamenteuses indiquant son origine bactérienne et l'origine de la rivière dans les champs hydrothermaux sous-marins

## Analyse phylogénétique

L'analyse PCR sur l'ARNr 16s a permis de classer de la famille des *Gallionellaceae* dans la classe des *Betaproteobacteria*. Cette famille est très proche phylogénétiquement de la famille *Methylophilaceae*.

## Caractéristiques

La famille *Gallionellaceae* est en anaérobiose dans les eaux souterraines contenant du fer ferreux.

Les tiges formées en grande quantités contiennent des traces de minéraux créant des dépôts de couleur marron. La masse des tiges formées peut provoquer des obstructions de fossés, de puits dans toutes les installations utilisant les eaux souterraines.

### Environnement

La présence de cette famille dans l'eau de source et son absence dans les autres échantillons de la grotte de Sulzbrunn, nous montrent que cette eau de source minérale vient bien d'un réseau profond étant sûrement chargé en élément ferreux.

### Biotechnologie

Cette famille peut être utilisée pour purifier les eaux riches en fer par un moyen biotechnologique à des fins de déferrisation des eaux potables.

#### 22.1.4.2.1 Genre *Gallionella* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par : Henrici et Johnson, 1935.

Dans la grotte de Sulzbrunn les pourcentages de la famille des *Gallionellaceae* dans l'embranchement des *Betaproteobacteria* sont les suivants :

Dans les Snottites		Nd de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « subaerial »		Nd de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « submersed »	≈ 1 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de source minérale	≈ 3,3 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de mélange	≈ 1,6 %	de la flore totale de cette structure

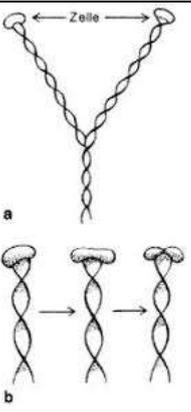
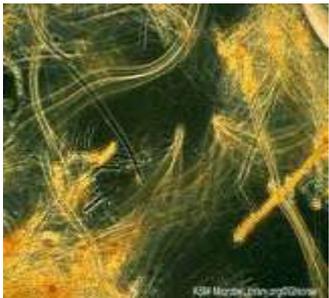
Dans cette cavité la *Gallionella spp* a été signalée comme produisant des traces d'oxydes de fer.

### Embranchement *Betaproteobacteria* ; Ordre *Nitrosomonadales* ; Famille *Gallionellaceae* ; Genre *Gallionella*

À l'heure actuelle, le genre *Gallionella* compte deux espèces :

- *Gallionella ferruginea*
- *Gallionella filamenta*

### Morphologie et structure cellulaire particulière

	<p style="text-align: center;"><b><i>Gallionella ferruginea</i></b></p> <p>La bactérie <i>Gallionella ferruginea</i> est une bactérie Gram (-), avec des cellules en formes de haricot incurvées avec un flagellum polaire (plusieurs flagelles) ; poussant bien dans les eaux ferreuses, et peut produire une tige torsadée. Les cellules sont difficiles à observer, car elles sont généralement mélangées avec une grande quantité de fer précipité et de tiges (Kucera &amp; Wolfe, 1957 ; Wolfe, 1964).</p> <p>C'est une bactérie pédonculée (à prosthecae) chimio-lithotrophe oxydant le fer. Elle vit dans des conditions de faible teneur en oxygène (micro-aérobie). Les bactéries oxydent et fixent le fer, mais afin d'obtenir l'énergie hors de ce processus, elles doivent vivre dans un environnement relativement spécifique contenant « du fer réduit, une bonne quantité d'oxygène et de carbone, du phosphore et de l'azote en quantité suffisante » (Halbach, Koschinsky et Halbach, 2001).</p> <p>La cellule du <i>Gallionella ferruginea</i> a un corps cellulaire mycoplasmodial réniforme ne possédant pas de peptidoglycane dans sa paroi cellulaire. Peptidoglycane conférant normalement la rigidité cellulaire particulière aux bactéries.</p> <p>Cette bactérie, sécrète des fibres oxydes de fer s'organisant en une forme de tiges allongées et sont constituées de « nombreuses fibrilles spirales enroulés, particulièrement bien minéralisées vers l'extérieur du côté convexe » (Ridgeway, moyens et Olson, 1981). Cette structure de tige en saillie du côté concave de la cellule est tributaire du pH et des conditions d'oxydo-redox. Ces tiges sont généralement couvertes de précipité d'oxyde de fer bactériogénique, leur donnant une couleur brun-rougeâtre (Anderson et Pedersen, 2003).</p>
	

Des analyses faites par microscopie photonique et électronique à balayage montrent que les *Gallionellales* dominent au début du printemps, avec *Leptothrix ichraca* et elles se regroupent selon une structure communautaire observée par une forme FeOB dominantes.

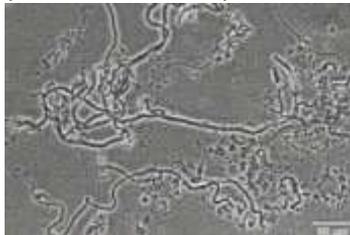
La bactérie *Gallionella* peut présenter deux sortes micro fibrilles soit de 2,5 à 4 µm et des microfibrilles de 30 à 45 µm. Ces fibrilles sont vraisemblablement des stades de développement différents.

Il peut y avoir sur la cellule bactérienne en forme de rein la présence constante de nombreux « bourgeons » fixés. Ces bourgeons se présentent soit isolés, soit en amas, et leur taille pouvait atteindre 0,5 µm de diamètre. Il semble qu'ils jouent un rôle dans l'adhérence ou la flottaison bactérienne.

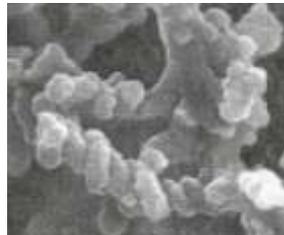
La structure de la membrane bactérienne présente plusieurs particularités : outre l'absence de peptidoglycane (Balashova 1969), la bactérie possède une relation très étroite avec le fer. Celui-ci peut être mis en évidence par la coloration de « Meyer » mais cette coloration est moins nette qu'avec des dépôts d'hydroxyde ferrique, laissant supposer que le fer est engagé dans une liaison forte avec les fibrilles de la bactérie<sup>313</sup>.

Les deux *Gallionella* actuellement les plus étudiés sont :

- ***Gallionella ferruginea*** : fibrilles très fines, nombre supérieur à 40. Cellule terminale 1,1 à 1,5 µm sur 0,5 à 0,7 µm. C'est une bactérie ayant un corps de cellules mycoplasmodiales en forme de rein manquant de peptidoglycane dans sa paroi cellulaire, ceci donnant normalement à la paroi sa rigidité particulière. Ce corps a une seule tige allongée faisant de nombreuses formations hélicoïdales de fibrilles minéralisée s'étendant vers l'extérieur du côté convexe (Ridgeway, Means, et Olson 1981). Cette structure particulière dépend du développement de la population microbienne, du Ph et des conditions d'oxydo-réduction. Les tiges sont couvertes de précipité d'oxyde de fer.
- ***Gallionella filamenta*** : fibrilles plus épaisses, nombre inférieur à 12. Cellule terminale 0,7 à 1,25 µm sur 0,4 à 0,65 µm



Gallionella microscopie optique de l'institut d'astrobiologie



Microscopie électronique du Gallionella, faite par De Halbach, Koschinsky

### Caractéristiques métaboliques

Les *Gallionella* sont des bactéries soit autotrophes comme *Gallionella ferruginea* soit hétérotrophes comme les *Gallionella sphaeroillus*, *Crenothrix*, *Siderocapsa*, etc.

Elles fixent le CO<sub>2</sub>, contiennent du PHB (Poly-β-hydroxybutyrate) et du glycogène. Sa reproduction se fait par bourgeonnement.

Les caractéristiques phénotypiques de *Gallionella ferruginea* ont été analysées sur une culture enrichie en fer ferreux, de thiosulfate et de sulfures comme donneur d'électrons et le nitrate comme source d'azote. Leurs croissances sont mixotrophes (autotrophe et hétérotrophe) et autotrophe (avec utilisation de CO<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub>), car elles utilisent aussi les sources de glucose, fructose et saccharose pour donner le carbone cellulaire et le fer<sup>++</sup> comme donneur d'électrons et d'ammonium ou nitrate comme sources d'azote. C'est une bactérie chimiolithotrophe oxydante du fer.

### Dénitrification chez les *Gallionellaceae*

Les *Gallionellaceae* possèdent par ailleurs le pouvoir, dans certaines conditions, d'utiliser l'ion nitrate à la place de l'oxygène (oxydation anoxique) comme accepteur terminal d'électron. Compte tenu du

milieu dans lequel elle vit (présence d'ion ferreux), le nitrite est rapidement réduit conduisant à de l'azote gazeux (Gouy et al. 1983).

Ce phénomène de dénitrification est propre aux espèces autotrophes oxydantes. Cette dénitrification autotrophe contribue peut-être à l'épuration des horizons profonds des sols et des nappes souterraines de la contamination azotée anthropique et agricole.

### Phylogénétique *Gallionella*

Le gène de l'ARNr 16 s de *Gallionella ferruginea* a été analysé par PCR et séquencé par séquençage double brin direct. L'analyse phylogénétique place *G. ferruginea* dans le  $\beta$ -groupe des *Proteobacteria*, avec 90 % de similarité avec *Nitrosolobus multiformis* et 88,6 % pour *Rhodocyclus purpureus*. Deux sondes oligo- nucléotidiques spécifiques de *Gallionella ferruginea* sont proposées. L'analyse par ARNr 16s, a montré qu'il existait un « sérovar » de la bactérie de *Gallionella ferruginea*, n'ayant pas la possibilité de fixer le fer sur son flagellum. Cela nous montre que la fixation du fer n'est pas indispensable à la croissance de cette bactérie.

### Culture bactérienne

La culture de *Gallionella ferruginea* est laborieuse, relativement difficile et lente à cultiver ; elle demande une atmosphère riche en CO<sub>2</sub> et un milieu minéral pour une flore autotrophe.

La croissance des *Gallionella ferruginea* se fait dans un milieu liquide d'enrichissement avec des sels inorganiques et une atmosphère d'oxyde de carbone, oxygène, fer ferreux et sulfure (Hanert, 1989).

### Milieus de culture

Milieu sulfite ferreux solution 1 : est préparé en faisant bouillir des quantités molaires égales de sulfate ferreux et d'ammonium et de sulfite de sodium dans de l'eau distillée. Le précipité FeS est lavé quatre fois avec de l'eau distillée bouillante en évitant l'oxydation du fer.

Le milieu va comprendre : NH<sub>4</sub>Cl 1g, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>- H<sub>2</sub>O 0.2g, eau distillée QSP 1000ml. Le milieu est stérilisé aseptiquement les ingrédients sont mélangés. Faire dégager du CO<sub>2</sub> pendant 5 sec. Ajouter le FeS solution 1.

### Autres milieux :

La culture de la bactérie s'effectue dans le milieu proposé par Kucera & Wolf (1957). La source d'énergie étant un précipité de FeS.

- La vitesse de développement du *Gallionella ferruginea* est passée à  $2 \times 10^6$  cellules ml, avec un temps de génération de 8,3 h gradient en conditions aérobies.
- La température d'incubation optimale de croissance était de 20 °C. Aucune croissance n'a été obtenue dans des conditions anaérobies, ou sans dioxyde de carbone.

La vitesse de formation des tiges a une croissance exponentielle. Une production nette de tiges par cellule se produit quand le nombre de cellules a dépassé  $6 \times 10^5$  cell/ml et si le pH dépasse 6.

Il n'y a aucune formation de la tige dans des conditions de croissance où le fer ferreux est stable, ceci suggérant que la formation de tiges est un mécanisme de résistance et de protection de la bactérie contre une réduction de croissance.

Les conditions de croissance favorables pour *Gallionella ferruginea* peuvent être les conditions des eaux souterraines réduites, plutôt que ceux des fossés, les tubes de drainage, puits, etc., où la formation de tiges du *Gallionella ferruginea* se produit généralement.

La croissance des tiges est plus élevée après une semaine de culture, puis elle atteint un arrêt de croissance. Une culture d'une semaine est le meilleur moment pour le repiquage.

Kucera & Wolfe (1957), trouvent que *Gallionella ferruginea* ne forme pas de colonies de tiges dans une atmosphère d'azote et de dioxyde de carbone.

Les températures de culture pour *Gallionella ferruginea* peuvent être basses (5 à 10° C) ayant caractérisé cette bactérie comme psychrotrophe (peut vivre à -5 °C).

### Caractéristiques de culture

L'analyse se fait habituellement par la détermination du nombre total de cellules par la méthode de

comptage AODC,<sup>kkkk</sup> Le pH en cours de croissance passe de 4,6 à 5,2 dans un premier temps, puis augmente, pour atteindre pH 7 en fin de culture ; dans cette période la longueur de la tige augmente avec le pH. L'oxydo-redox atteint un potentiel de 40 mV, pendant un temps de 12 à 23 heures, lorsque l'indicateur de l'azurine tourne du rose à l'incolore.

## Habitat

Le *Gallionella ferruginea* a été trouvé dans de nombreux type d'habitats tels que les sources minérales ferrugineuses d'eau douce, les eaux saumâtres peu profondes, et les sites d'évent hydrothermal actif et profond ainsi que dans les environnement du sol associé avec du fer (Halbach, Koschinsky, et halbach, 2001). Ils forment des biofilms en interagissant dans un réseau de bactéries<sup>314</sup>.

## Niche écologique

La majorité des travaux effectués sur *Gallionella ferruginea* consistent en des études de cas indiquant la présence de la bactérie dans les eaux souterraines naturelles (p. ex. Barbic et coll., 1974 ; Cullimore & McCann, 1977 ; Hannert, 1970,1974 ; Hirsch & Pankratz, 1970 ; Hasselbarth & Ludeman, 1972 ; Ivarson & Sojak, 1978 ; Pedersen et Hallbeck, 1985 ; Ridgeway et coll., 1981 ; Wheatley, 1988). Des études ont été faites dans des niches écologiques dans des marais d'eau douce. Il a été observé entre les *Gallionellales* (ex : *Gallionella ferruginea*) et du *Leptothrix ichraca* que le premier formait des tiges hélicoïdales et le second des gaines tubulaires

Chez des bactéries du fer isolées des eaux et des sédiments du sud-ouest de la France, les premières sont inféodées à la présence de fer ferreux, alors que les secondes occupent des niches écologiques plus variées, quoique toujours aux limites de stabilité du fer ferreux dans les eaux. Ce dernier point, joint à leur exigence en matière organique, facteur de mobilisation du fer, explique leur rôle dans le colmatage biologique des drains. De plus, il est probable que l'influence des ferrobactéries déborde largement le cadre du cycle du fer.

Dans les analyses recueillies dans le tapis bactériens aux cours des saisons, il a été relevé des discordances imprévues dans les observations microscopiques et les paramètres physico-chimiques en fonction des saisons.

Sur la base de ces relations, il a été conclu que la niche écologique des *Gallionellales* formant des tiges se trouve dans les eaux à faible teneur en carbone organique. Alors que la formation de la gaine du *Leptothrix ichraca* est plus abondante dans les eaux contenant de hautes concentrations de carbone organique avec une haute teneur en Fe et Mn. Enfin, ces résultats identifient une relation très peu explorée entre hydroxyde de fer et du carbone organique. (E. J. Fleming, Yvonne Cetinic, Cl. S Chan, D. Whitney King and David Emerson, 2013). La qualité de l'eau joue un rôle déterminant sur l'implantation de la flore ferro-oxydante.

## Biotechnologie

---

<sup>kkkk</sup> **Méthode de comptage AODC** : pour étudier les contaminations bactériennes des réseaux de distribution de l'eau, trois méthodes d'estimation de la biomasse bactérienne ont été comparées :

- Le comptage sur gélose, selon la norme française d'examen bactériologique des eaux de consommation, Les comptages sur gélose, tout comme en milieu aquatique naturel, sous-estiment très largement le nombre de bactéries ; ceci semble principalement lié à la présence de bactéries viables mais non cultivables
- Le dosage de l'ADN contenu dans les particules retenues sur une membrane de porosité de 0.2 µm. Le dosage de l'ADN et les comptages directs carrelent assez bien avec en moyenne un contenu en ADN par bactérie de  $4,1 \times 10^{-15}$  g d'ADN, mais la première méthode semble moins précise.
- Le comptage direct au microscope à épifluorescence après coloration des bactéries à l'acridine orange. Le comptage direct semble donc la méthode la plus adaptée à l'estimation du nombre total de bactéries dans ce type de milieu.

Afin d'estimer l'activité bactérienne, les protocoles expérimentaux de deux méthodes utilisées en écologie bactérienne ont été adaptés aux conditions particulières de l'eau de distribution : l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN bactérien et l'incorporation de leucine tritiée dans les protéines. La comparaison des deux méthodes sur une série d'échantillons montre une bonne corrélation, avec un rapport molaire entre incorporation de leucine et de thymidine compatible avec les facteurs de conversion des deux méthodes citées dans la littérature et établis pour les milieux aquatiques naturels. Les deux méthodes sont utilisables pour mesurer l'activité bactérienne dans l'eau potable, néanmoins l'incorporation de thymidine est plus aisée à mettre en œuvre, car elle ne nécessite de travailler qu'à une seule concentration en traceur radioactif.

*Gallionella ferruginea* peut être une bactérie intéressante dans la déferrisation des eaux riches en fer.

#### 22.1.4.2.2 Genre *Ferriphaselus* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Kato & coll., 2014

Dans la grotte de Sulzbrunn les pourcentages du genre *Ferriphaselus* sur le total de chacune des structures sont les suivants :

Dans les Snottites	Nd	de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « subaerial »	Nd	de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « submersed »	Nd	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de source minérale	≈ 1,6 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de mélange	Nd	de la flore totale de cette structure

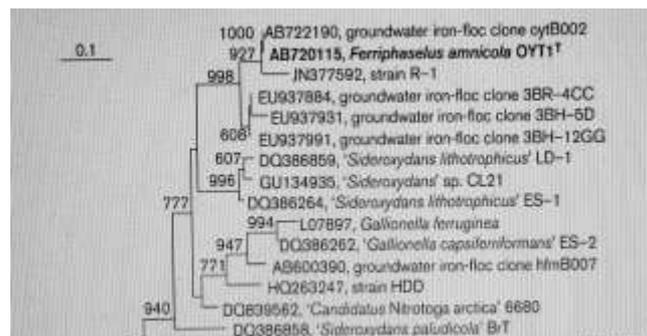
Dans la grotte de Sulzbrunn le genre *Ferriphaselus* est seulement présent dans l'eau de source pour une valeur de 1.6 %.

Dans la grotte de Sulzbrunn, cette bactérie n'a été identifiée dans ni l'eau de la source minérale, ni dans l'eau de mélange.

**Ordre : Gallionellales ; Famille Gallionellaceae ; Genre *Ferriphaselus***

#### Espèce la plus étudiée : *Ferriphaselus amnicola* is OYT1T

##### Taxonomie



##### Morphologie

Le *Ferriphaselus amnicola* is OYT1T est une bactérie micro-aérobie, neutrophile, de Gram (-), elle est autotrophe. Les cellules de *F. amnicola* is OYT1T sont des bâtonnets courts légèrement incurvés (0,8 à 1.96 µm et 0.7 à 0,9 µm). Aucune formation de spore n'a été observée dans l'une des conditions de croissances examinées. Cette bactérie est ferro-oxydante en formant des tiges spiralées, la cellule est en forme de haricot, elle est mobile avec une ou des flagelles polaires en fuseaux, tel qu'on les observe dans le milieu liquide, servant à la fixation du fer ferrique (pour la formation des tiges).

##### Caractéristiques métaboliques

La souche *Ferriphaselus amnicola* is OYT1T est neutrophile, micro-aérophiles, formant des tiges, chimio-litho-autotrophes, bactéries ferro-oxydantes, et a probablement pour sa croissance autotrophe un cycle de Calvin-Benson – BEM, car la souche possède un gène codant une enzyme clé du cycle la ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Kato et al., 2013).

Les acides gras cellulaires majeurs détectés étaient C16 :1v7c / C16 :1v6c et C16 : 0.

Comme les *Gallionella*, les *Ferriphaselus* oxydent le fer ferreux pour faire des fibres torsadées. Les tiges se composaient de filaments fins (20-200 nm de large), déterminées par microscopie électronique à transmission (Fig. 1 ; Kato et al., 2013), ressemblant à ceux produits par *Gallionella ferruginea* (Vatter & Wolfe, 1956) et *Mariprofundus ferrooxydans* (Chan et al., 2011). Toutes les tiges représentaient une structure hélicoïdale de Gaucher (type S). Comme avec les tiges produites par la souche R-1 (Krepski et al., 2012) et *Mariprofundus ferrooxydans* (Chan et al., 2011). Les tiges de *Ferriphaselus amnicola* is OYT1T contiennent des polysaccharides, cela par coloration nous

permet de déterminer la présence de lectine avec comme colorant la concanavaline A (ou lipoprotéine de la famille des lectines) (Chan et al., 2011).

Dans le *Ferriphaselus aminicola* is OYT1T, des esters méthyliques d'acides gras ont été identifiés (MIDI ; Sherlock Microbial Identification System version 4.0).

Les cultures de cellules sur des plaques avec gradients (Emerson & Merrill Floyd, 2005), composés de liquide sans agarose MWMM (350 ml au total) et d'un gradient de FeS (sulfure de fer).

Ces plaques ont été incubées dans une jarre anaérobie avec un mélange de gaz O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (79 % / 20 % / 1 %).

Après purification cellulaire sur plaque à gradient (Emerson & Merrill Floyd, 2005), les cellules ont été concentrées par centrifugation, rincées dans un tampon stérile et soumises aux analyses CPG (chromatographie en phase gaz) par les laboratoires de MIDI (Newark, DE, États-Unis d'Amérique) pour l'analyse des acides gras.

#### Profil d'acides gras du *Ferriphaselus aminicola* is OYT1T

Constitution en acide gras de la cellule de <i>Ferriphaselus aminicola</i> is OYT1T			
C10 : 0 3-OH (3,4 %),	C16 : 0 N-Alcool (0,9 %)	C17 : 1v6c (0,7 %),	C18 : 3v6c (6,9,12) (0,8 %),
C12 : 0 (2,2 %),	C16 : 1v7c ou C16 : 1v6c (59,9 %)		C18 : 1v9c (1,4 %),
C14 : 0 (1,6 %),	C16 : 1v5c (1,2 %),		C18 : 1v7c (2,2 %),
C15 : 0 (1,2 %),	C16 : 0 (22,2 %),		C18 : 0 (2,3 %).

#### Caractéristiques différentielles du *Ferriphaselus aminicola* OYT1T

Comparativement aux autres ferrobactères (codification pour le tableau)

- *Ferriphaelus aminicola* OYT1T (Kato et al, 2013)
- *Ferriphaselus aminicola* -R-1 (Krepeski et al., 2012)
- *Siderooxydans paludicola* BrT (Weiss et al., 2007)
- *Siderooxydans lithotrophicus* LD-1 (Weiss et al, 2007)
- *Siderooxydans lithotrophicus* ES-1 (Emerson & Moyer, 1997 ; Emerson et al., 1993)
- *Gallionella capsiferiformans* ES-2 (Emerson et Moyer, 1997 ; Emerson et al., 2013)
- *Gallionella ferruginea* (Hallbeck et Pedersen, 1990, 1991 ; Halbeck et al., 1993)

#### Caractéristiques différentielles

Caractéristiques	1	2	3	4	5	6	7
Temps pour doubler la croissance	10,9 h	15 h	15,8 h	9,5 h	8 h	12,5 h	8,3 h
Température de Développement En C°	8 à 30	10 à 35	19 à 37	12 à 26	21 à 30	6 à 12	5 à 25
T° optimum	25 à 30	N. D.	N. D.	N. D.	N.D.	N. D.	20
pH de croissance	5,6 à 7,3	5,6 à 7	4,5 à 7	4,5 à 7	5,5 à 7	5,5 à 7	5 à 6,5
pH Optimum	6,1 à 6,5	5,6 à 6,1	N.D	N.D.	6,0 à 6,5	6,0 à 6,5	N.D.
Source d'énergie							
E. Thiosulfate	-	-	-	-	+	-	-
E. Glucose	-	-	-	-	-	-	+
Acides gras majeurs	C16 : 17c C16 : 16c C16 : 0	N. D	C16 : 17c C16 : 16c C16 : 0	ND	C16 : 17c C15 : 0 C16 : 0-2 OH	C16 : 17/iso C15 : 0-2 OH C16 : 0 C18 : 0 C18 : 1 9c	N. D.
Formation de tiges	+	+	-	-	-	-	+

Les caractéristiques phénotypiques et le profil global des acides gras d'OYT1T se distinguent de celles de *Gallionella ferruginea*. Bien qu'OYT1T produise des tiges comme ceux de *Gallionella ferruginea*.

## Métabolites, enzymes et protéines entrant dans le métabolisme des ferrobactéries

Enzymes et protéines actives	<i>Ferriphaselus</i>		<i>Siderooxydans</i>	<i>Gallionella</i>
	OYT1T	R1	ESI	ES2
Cyc2	+	+	+	+
MtoA	N.D.	N.D.	+	+
Cyc 1	N. D	N.D.	+	+
Alternatif complexe III	+	+	+	+
Cytochrome-bc1 Complexe	+	+	-	+
Cytochrome- bd Quinone oxydase	+	N.D.	+	+
Cytochrome oxydase - Cbb3-type	+	+	+	+
NADH déshydrogénase	+	+	+	+
Auteurs			Enerson and al (2013)	Singer and al. (2011)

### Phylogénétique

La composition de base de l'ADN de *Ferriphaselus amnicola* is OYT1T a été déterminée par la méthode HPLC telle que décrite par Tamaoka (1994).

La teneur en G + C de l'ADN total a été de  $57.6 \pm 0.4$  mol%.

Le *Ferriphaselus amnicola* is OYT1T est affilié au groupe *Gallionella* lié au sein de la classe *Betaproteobacteria*, comme en témoigne l'analyse phylogénétique en utilisant la séquence du gène ARNr 16 s de OYT1T (Kato et al., 2013). L'analyse des séquences de l'ARNr 16 s a confirmé que la souche OYT1T a été affiliée à la classe *Betaproteobacteria* et selon cette analyse, les résultats de ces études ont fait proposer une nouvelle espèce dans un nouveau genre, dont le nom *Ferriphaselus amnicola* Genn. nov., SP. La souche type de cette espèce a été nommée du nom *Ferriphaselus amnicola* OYT1T (5JCM 18545T5DSM 26810T).

L'analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant la séquence du gène ARNr 16 s de OYT1T (Kato et al., 2013). Les résultats sur l'analyse PCR du *Ferriphaselus amnicola* OYT1T ont été éloignés des membres du genre *Gallionella* et *Siderooxydans* avec 92,9 à 94,0 % de similarité. Ceci fait que *Ferriphaselus amnicola* OYT1T forme une lignée distincte avec la souche R-1 et les clones environnementaux. Cette analyse nous montre que le *Ferriphaselus amnicola* OYT1T ne devrait pas être affilié aux genres *Gallionella*, *Siderooxydans* ou *Nitrotoga*.

### Culture

*Ferriphaselus amnicola* is OYT1T est capable de croître de 8 à 30,6° C (optimale pour 25 à 30,6° C) ; le pH de croissance est de 5,6 à 7,3 (optimale à pH 6.1 à 6.5). Aucune croissance n'a été observée en-dessous 4° C et au-dessus de 35°C.

*Ferriphaselus amnicola* is OYT1T se développe sur les milieux contenant du fer avec FeS ou FeCl<sub>2</sub> comme source de fer, mais pas sur support de fer libre avec les autres substrats organiques.

La croissance le *F. amnicola* peut supporter une valeur en sel entre 0 à 0,8 % (p/v) NaCl. Il ne pousse pas en anaérobiose avec nitrate, comme un accepteur d'électrons. Le temps de dédoublement de la flore est de 11 h.

Formation de tiges : *Ferriphaselus amnicola* is OYT1T produit des tiges dans un milieu HM-agarose stabilisé à un pH 7.1 à 7.3, mais n'en produit pas à un pH de 6,5 et au-dessous (Kato et al., 2013), dans ce cas il produit une poudre fine d'oxyde de fer.

Le *Ferriphaselus* est cultivé à l'aide d'une technique de culture de gradient d'agarose stabilisé comme décrit plus haut (Emerson & Merrill Floyd, 2005). Dans cette méthode des concentrations d'oxygène et de Fer (II) ont été mesurées dans les tubes de culture.

**Milieu** : Milieu minéral de Wolfe moyen, composé de 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,2 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,05 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,42 g NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml de solution d'oligo-élément et 10 ml de solution de vitamine par litre d'eau distillée. Ce milieu est tamponné avec un tampon pH 6.2.

Le gradient de culture : la couche supérieure, consistant en de l'agarose- [0,15 % (v/v) d'agarose et la couche inférieure, consistant en de l'agarose-avec FeS (1 % v/v) comme source de Fer (II), cette couche a été préparée séparément.

**Atmosphère de la culture** : mélange de gaz de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (79 : 20 : 1, 0.1 MPa).

**Description des colonies** : la culture à un stade précoce (environ 12 h) a un pH de 6,2, est semblable à des cultures de *Gallionella ferruginea* (Kucera & Wolfe, 1957)<sup>315305</sup>.

Une bande blanche apparaît dans les cultures L M-agarose-stabilisé et stabilisé par HM agarose après 1 ou 2 jours, comme les cultures de *Gallionella capsiferriformans*, *Siderooxydans lithotrophicus* et *S. paludicola* (Emerson et Moyer, 1997 ; Weiss et al., 2007). La colonie et la bande se composaient de tiges et contenaient des particules d'oxydes de fer. La couleur de la colonie et de la bande a changé à l'orange ou ocre (couleur rouille) après deux à trois jours.

#### **Autres milieux : milieux d'enrichissements et sélectifs**

- **Solution A** : NH<sub>4</sub>Cl 1,00 g ; de MgSO<sub>4</sub> (7 H<sub>2</sub>O) 0,20 g ; CaCl<sub>2</sub> (2 H<sub>2</sub>O) 0,10 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 g ; oligo-éléments 1,00 ml MES (SIGMA, pour la couche supérieure) ; 1,95 g NaHCO<sub>3</sub> (pour la couche supérieure), 0,50 g agarose couche bas fonte et 1,50 g pour la couche supérieure, mettre le volume à 1l avec ml 900,00d'eau distillée.
- **Solution B** : solution de vitamine (voir moyenne 141) 10 ml stérilisée par filtration et conservée à 4° C dans l'obscurité.
- **Solution C** : FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 15,40 g ; Na<sub>2</sub>S (9 H<sub>2</sub>O) 12,30 g dans 100 ml d'eau distillée de chaleur de 50°C. En agitant rapidement l'eau, ajouter le sulfate ferreux, suivi immédiatement par le sulfure de sodium. La boue formée de FeS noir est décantée. Cette procédure est répétée au moins cinq fois pour laver le FeS. Après le lavage, le pH de la solution de FeS doit être à proximité de la neutralité. La suspension de FeS peut être conservée dans des bouteilles fermées ou tubes sous atmosphère d'azote pendant au moins trois mois.

#### **Méthodologie**

- **La couche inférieure** : mélanger 1 volume de solution A et 1 volume de solution C et ajouter l'agarose à 1 % (p/v). Après la stérilisation, aseptiquement remplir 1 ml de la suspension dans des tubes stériles de type Hungate (volume total 15 ml). La couche inférieure se solidifie dans environ 30 min.
- **La couche supérieure** : Ajouter MES tampon bicarbonate et faible fondent agarose à solution A et autoclave. Laissez refroidir la solution stérile à 40° C et ajoutez 10 ml/l de solution de B. Sparge avec gaz CO<sub>2</sub> stérile jusqu'à un pH de 6.1 à 6.4. Ensuite, aseptiquement on prélève une fraction aliquote de 5 ml est pipetée et introduite au-dessus de la couche du fond de chaque tube. Mettre l'atmosphère de gaz à 100 % N<sub>2</sub>, puis laisser reposer pendant au moins trois heures pour obtenir un équilibre, mais pas plus de 12 heures. Cette solution peut êtreensemencée sur solution C pour la culture sous gaz de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>.

#### **Niche écologique**

*Ferriphaselus amnicola* is OYT1T a été isolé d'un suintement d'eau souterraine au *Ohyato Park*, Tokyo, Japon, regroupé avec des bactéries oxydant le fer et a été isolé des eaux souterraines d'infiltration et de zones humides ; cette souche a été détectée dans des eaux douces environnantes riches en fer.

Cette bactérie est largement distribuée dans les milieux dulcicoles (environnement pollué, abritant une flore microbienne importante, comme celle des lacs, celui de Chilika en Inde et celui de Songkhla en Thaïlande) et dans les milieux marins riches en fer, tels que des suintements d'eau souterraine, les zones humides et les cheminées hydrothermales en eau profonde (Emerson et al., 2010).

Plus récemment, il a été isolé d'un suintement d'eau souterraine sur une tige de fer oxydée, une bactérie *Betaproteobacterium*, souche R-1, (Krepski et al., 2012).

La microscopie photonique et électronique à balayage permet d'avoir des indications de la présence de bactéries fer-oxydantes. Les tiges d'oxyde de fer contiennent des polysaccharides, sont riches en carboxyles et peuvent empêcher les incrustations de l'oxyde de fer sur la cellule (Chan et al., 2009, 2011).

### **Rôle des ferrobactéries dans l'environnement**

Le colmatage ferrique des puits, des canalisations et des drains est un phénomène connu depuis l'antiquité, mais c'est seulement depuis 150 ans, environ, que le rôle prépondérant de certaines bactéries dans le processus fut décrit.

**Le fer dans les sols hydromorphes :** les *Gleys* sont des sols se formant lorsqu'il y a émergence de l'aquifère jusqu'à la surface, ou encore si le terrain est mal drainé et situé au-dessus d'une couche imperméable. Dans ces sols on observe une migration du fer vers le haut. En milieu anoxique et réducteur, le fer se trouve sous la forme réduite d'hydroxyde-ferreux gris-vert, soluble. Si le niveau de l'aquifère subit des oscillations (variation saisonnière du niveau hydrique du sol), une partie de ce fer peut être oxydé en fer ferrique rouge ou jaune soluble, immobilisé pour un temps plus ou moins long. Il s'ensuit un aspect marbré bien caractéristique des parties supérieures du *Gleys*. La coloration des tranches donne un aspect de la régularité des niveaux d'eau.

La coloration en forme de strie dans les couches peut être la résultante d'oxydation microbienne par des bactéries micro-aérobies comme le *Ferriphaselus*, cette formation d'oxydation modifie la capillarité du sol et la remontée d'ions ferreux à la surface du sol.

### **Ferriphaselus dans le karst**

Dans les cavités nous pouvons observer des strates similaires, soit rouge (fer ferrique), soit noir (manganèse manganique), ces marques peuvent nous informer sur les différents modes de structures hydriques que la cavité a subi dans son évolution.

### **Pathologie**

Aucune information n'est donnée sur les risques pathologiques du *Ferriphaselus* dans la littérature.

#### **22.1.4.2.3 Genre *Siderooxydans* (Grotte de Sulzbrunn)**

Nom donné par Kucera & Wolfe, 1957.

Dans la grotte de Sulzbrunn les pourcentages des genres *Siderooxydans* dans l'embranchement des *Betaproteobacteria* sont les suivants :

Dans les Snottites	Nd	de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « subaerial »	Nd	de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « submersed »	≈ 0,1 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de source minérale	≈ 1.6 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de mélange	≈ 5 %	de la flore totale de cette structure

Cité dans l'analyse de la grotte comme des bactéries de l'oxydation du fer.

### **Embranchement *Betaproteobacteria* ; Ordre *Nitrosomonadales* ; Famille *Gallionellaceae* ; Genre *Siderooxydans***

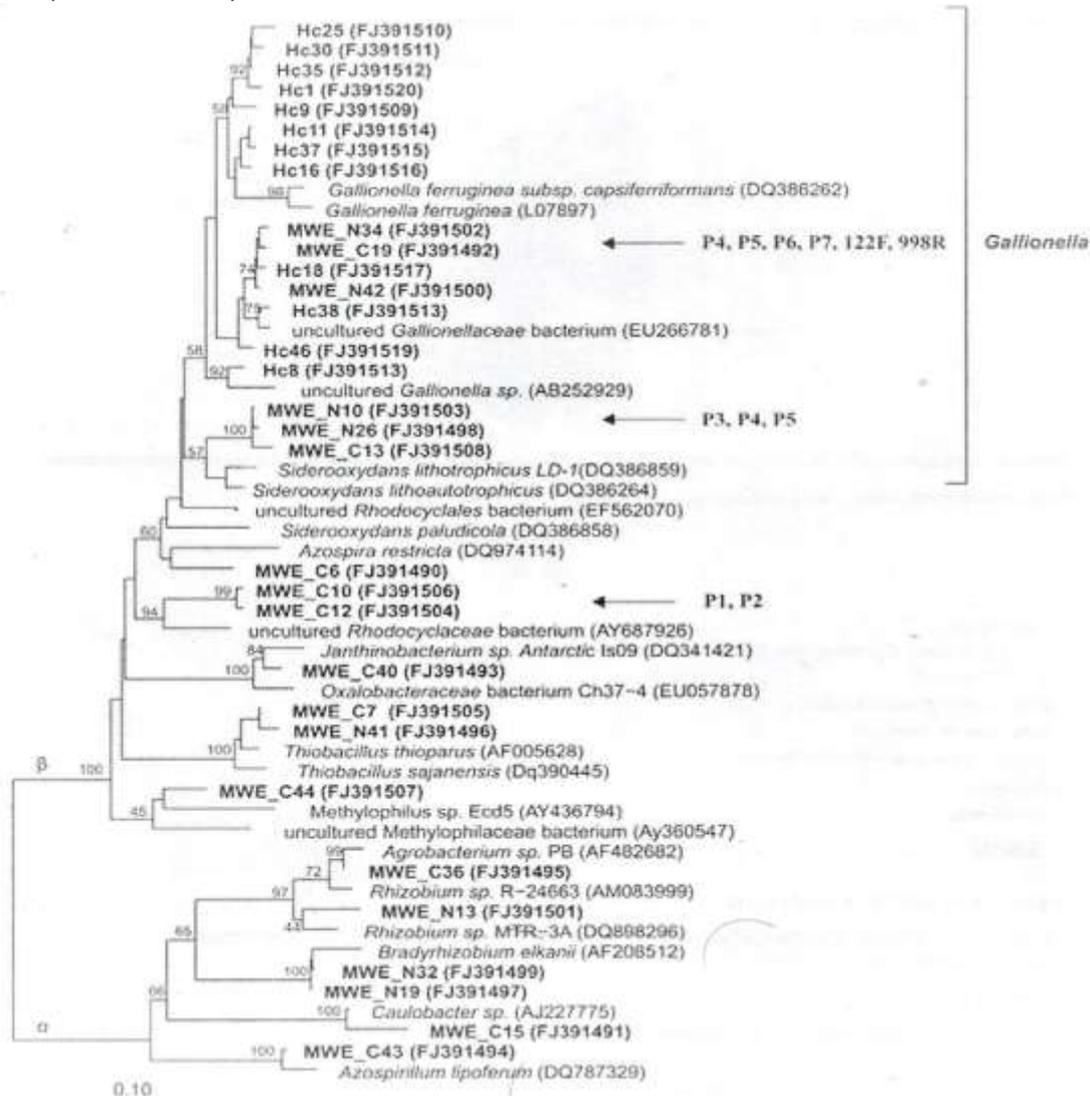
Il y a deux façons d'écrire suivant les auteurs et les pays de publication, soit avec deux « oo » comme (*Siderooxydans*) soit avec un seul « o » (*Sideroxydans*).

**Espèces *Siderooxydans* les plus connus**

- *Siderooxydans lithotrophicus*
- *Siderooxydans lithoautrophicus*
- *Siderooxydans paludicola*
- *Siderooxydans oneidensis*

## Taxonomie

Le regroupement par les caractères enzymatiques bactériens par l'analyses génomique et méta génomique donne la répartition suivante :



Dans cette représentation nous pouvons voir que *Siderooxydans lithotrophicus* possède 92 % de similarité avec *Gallionella ferruginea* et *G. capsiferiformans*.

### Espèce *Siderooxydans lithotrophicus*

#### Historique

Le grand nombre des bactéries utilisant le fer comme source d'énergie a été largement reconnu ces dernières années (Bird et al., 2011 ; Konhauser et al., 2011). Plusieurs familles de bactéries vivent à l'interface de fer ferreux/micro-oxyde où ils peuvent survivre en couplant l'oxydation du fer ferreux à la réduction de l'oxygène (Hedrich et al., 2011).

Ces bactéries sont généralement autotrophes et produisent suffisamment d'énergie dans la réaction de fixation du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et du diazote (N<sub>2</sub>).

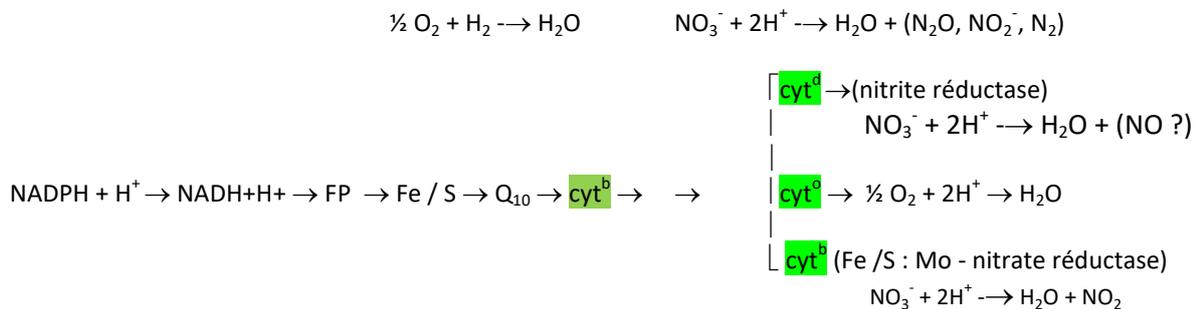
Leurs croissances de chimio-litho-autotrophe englobent les espèces suivantes :

- Les bactéries acidophiles impliquées dans le drainage acide comme *Acidothiobacillus ferrooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans* (Rawlings et coll., 1999 ; Ferguson et Ingledew, 2008 ; Mishra et Rhee, 2014).
- Les bactéries marines formant des tiges comme *Gallionella ferruginea*.
- Les bactéries d'eau douce *Gallionella capsiferiformans* ES-2 et *Siderooxydans lithotrophicus* ES-1 (Hallbeck et coll., 1993 ; Emerson et Moyer, 1997).

## Morphologie

**Sideroxydans lithotrophicus** : cellules sans appendices en forme de bâtonnet, faisant un dépôt de fer ou de manganèse dans une couche de glycocalyx ou à la surface de la cellule ; Gram (-).

### Transport des électrons en anaérobiose (*Paracoccus denitrificans*)



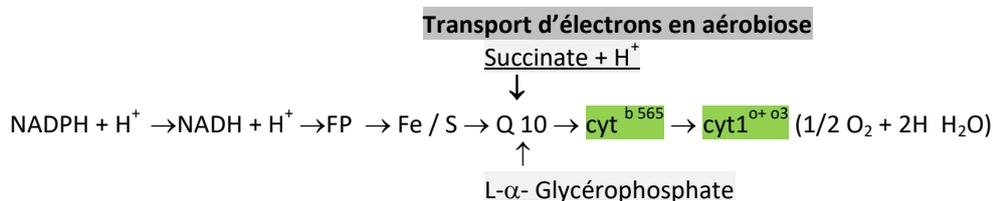
- $\text{Cyt}^d$  = gènes pour cytochrome oxydase
- $\text{Cyt}^i$  = gènes pour cytochrome complex <sup>i = index</sup>

## Observation

Au niveau morphologique certaines cellules peuvent être en forme de haricot et attachées à l'extrémité des tiges hélicoïdales (comme le ***Gallionella ferruginea***), tandis que les autres cellules marquées peuvent être en forme de bâtonnet, conformément à la morphologie des ***Sideroxydans spp.***, associées avec des particules Fe (III)-hydroxydes (Weiss and al., 2007). Il est important de noter que plusieurs des cultures pures de FeOB liées à *Gallionellales* ne forment pas de tiges ou identifiable Fe (III)-structures hydroxydes (Emerson and Moyer, 1997, Weiss and al. 2007, Lüdecke and al., 2010).

## Caractéristiques métaboliques

Les autotrophes ***Sideroxydans lithotrophicus ES-1*** sont des bactéries aérobies chimio-lithotrophes pouvant se développer en utilisant l'oxydation du fer ferreux par la réduction de l'oxygène  $\text{O}_2$  (passage de  $2\text{Fe}^{++}$  en  $2\text{Fe}^{+++}$   $2\text{e}^- + \text{O}_2$  soit  $2\text{O}^{2-}$ )



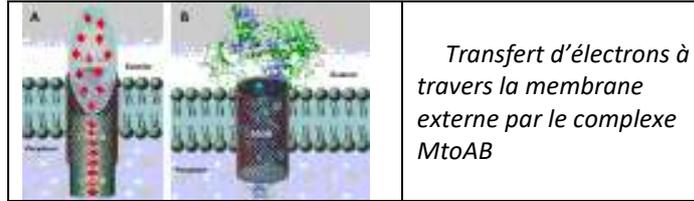
***Sideroxydans lithotrophicus ES-1*** est une bactérie oxydant du fer<sup>++</sup> par la voie autotrophe. Face à un défi bioénergétique important elle génère la réduction du (NADPH) en équivalents (NADH), cette réaction chimique est nécessaire à la fixation du carbone avec d'autres réactions anabolisantes essentielles pour la survie des cellules.

Les souches, ***Gallionella capsiferiformans*** et ***Sidérooxydans paludicola*** produisent également de l'oxyde ferrique avec des tiges et des particules d'oxydes (Emerson et Moyer, 1997 ; Krepski et al., 2012 ; Weiss et al., 2007). Le fer ferreux soluble est oxydé à la surface de la cellule par un complexe protéique de porine<sup>III</sup>-cytochrome MtoAB (pore cellulaire) fonctionnant comme un conduit d'électrons à travers la membrane externe.

Les électrons sont ensuite transportés à la membrane cytoplasmique où ils sont utilisés pour générer la force motrice de proton (PMF) (pour la synthèse de l'ATP) et le NADH, processus autotrophes entrant dans la fixation du carbone atmosphérique ( $\text{CO}_2$ ).

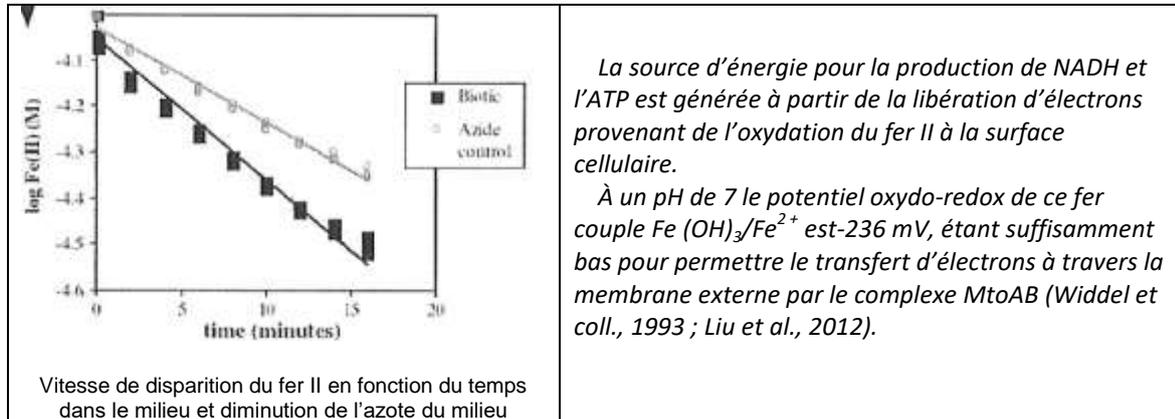
<sup>III</sup> **Porines** : protéines membranaires formant des canaux permettant la diffusion de petites molécules hydrophiles à travers la membrane de cellulaire. Elles sont composées de feuillettes  $\beta$  (structure  $\beta$ =en feuille) formant une structure cylindrique ou tonneau  $\beta$ . Les porines sont des trimères, constituées de trois canaux cylindriques accolés. On les trouve dans la membrane externe des bactéries à Gram(-), mais également dans celle des mitochondries et des chloroplastes.

## Passage actif des électrons au travers de la membrane bactérienne



Transfert d'électrons à travers la membrane externe par le complexe MtoAB

## Mécanisme d'oxydation du fer II



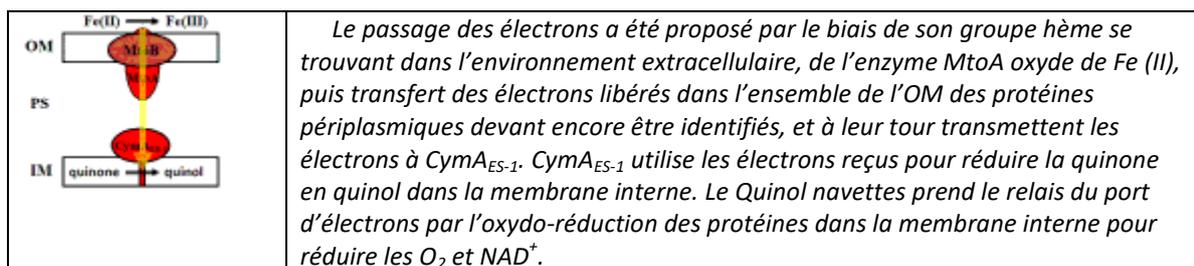
La source d'énergie pour la production de NADH et l'ATP est générée à partir de la libération d'électrons provenant de l'oxydation du fer II à la surface cellulaire.

À un pH de 7 le potentiel oxydo-redox de ce fer couple  $Fe(OH)_3/Fe^{2+}$  est -236 mV, étant suffisamment bas pour permettre le transfert d'électrons à travers la membrane externe par le complexe MtoAB (Widdel et coll., 1993 ; Liu et al., 2012).

Columbia University Superfund Research Program ;2017 Seminar/Webinar Series,  
Auteur: Owen W. Duckworth ; ed. March 20, 2017

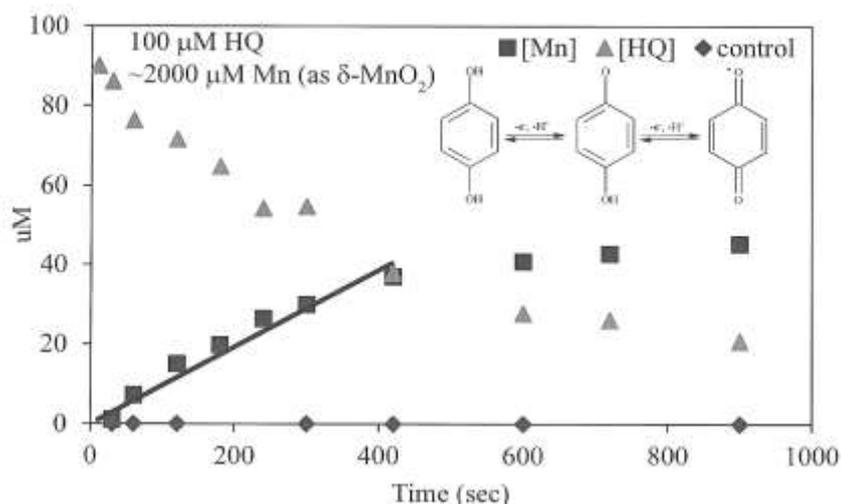
Les électrons provenant de l'oxydation du fer II sont nécessaires pour la réduction de l'oxygène couplé PMF (Motif de Proton Force) et la réduction du NADH à la membrane cytoplasmique. À un potentiel initial autour  $-236$  mV l'énergie associée à ces électrons serait suffisante pour catalyser la réduction de l'oxygène ( $+816$  mV), mais ils ne pourraient pas être en mesure de réduire  $NAD^+$  en NADH ( $-320$  mV). En conséquence les électrons destinés à la formation de NADH devront être augmentés par le biais de différents transporteurs avant de réduire le NADH. La source d'énergie pour ce transfert d'électrons augmenté est plus susceptible d'être obtenue par le gradient de proton. Chez *Acidithiobacillus ferrooxidans*, deux fonctions di-hèmes périplasmiques du cytochrome avec les protéines **Cyc1** et **CycA1** prennent des électrons :

- Soit le cytochrome oxydase,
- Soit le cytochrome c.-b.<sub>1</sub> complexe, allant en sens inverse pour réduire l'ubiquinone.



Le passage des électrons a été proposé par le biais de son groupe hème se trouvant dans l'environnement extracellulaire, de l'enzyme MtoA oxyde de Fe (II), puis transfert des électrons libérés dans l'ensemble de l'OM des protéines périplasmiques devant encore être identifiés, et à leur tour transmettent les électrons à  $CymA_{ES-1}$ .  $CymA_{ES-1}$  utilise les électrons reçus pour réduire la quinone en quinol dans la membrane interne. Le Quinol navettes prend le relais du port d'électrons par l'oxydo-réduction des protéines dans la membrane interne pour réduire les  $O_2$  et  $NAD^+$ .

**Évolution de la forme quinone en  $\mu\text{M}$  en fonction du temps dans l'oxydoréduction des quinones avec l'intermédiaire du manganèse.**



Columbia University Superfund Research Program ;2017 Seminar/Webinar Series  
Auteur : Owen W . Duckworth ; ed. March 20, 2017

### Description des modes d'oxydo-réduction du fer II par les bactéries

Les bactéries capables d'une croissance de chimio-litho-autotrophe comprennent les acidophiles impliquées dans les problèmes de drainage comme *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans* (Rawlings et al., 1999 ; Ferguson et Ingledew, 2008 ; Mishra et Rhee, 2014). En milieu marin on trouve la formation de tiges du *Gallionella ferruginea* et en eau douce celle du *Gallionella capsiferiformans* ES-2 et les dépôts ferriques en surface du *Siderooxydans lithotrophicus* ES-1 (Hallbeck et coll., 1993 ; Emerson et Moyer, 1997)<sup>316</sup>.

Chez *Acidithiobacillus ferrooxidans* les cytochromes sont situés dans deux opérons distincts ; l'opéron *rus* contient les gènes *Cyc1* ainsi que *Cyc2*, l'opéron *rusA* et les gènes pour un cytochrome oxydase *c*, tandis que l'opéron *MEPFT* contient les gènes pour un cytochrome et les gènes *CycA1* complexe pris comme amorce (amorce portion de gène représentatif de l'espèce) (Roger et al., 2012).

En revanche, dans le *Siderooxydans lithotrophicus* le groupe de gènes de *mto* ne contient qu'un seul gène du cytochrome mono-hème gène *mtoD*, tandis que les autres groupes de gènes contiennent des gènes de cytochrome *bc<sub>1</sub>* et cytochrome *bb<sub>3</sub>* et ne contiennent pas les cytochromes de mono-hème soluble.

### Phylogénétique

**Méthodologie :** le séquençage a été effectué par l'utilisation de plusieurs séquences de sondes de *Gallionellales* spécifiques ayant été sélectionnées à l'aide du logiciel de l'ARB (Ludwig and al. 2004) en combinaison avec la base de données de *Silva 102* (Pruesse and al., 2007). Ces sondes ont été conçues pour intégrer les membres de l'ordre de *Gallionellales* y compris *Gallionella* et *Siderooxydans*. La sonde *Gal221* (5'-CTTTCGGAGTGGCCGAT-3' (Eurofins MWG opéron, Huntsville, Alabama, États-Unis d'Amérique) a décelé la présence de *Siderooxydans*.

### Génome du *Siderooxydans lithotrophicus*

Le génome a été effectué en sep 2017 sur un échantillon de fer contaminé par les eaux souterraines dans le Michigan (États-Unis d'Amérique).

**Carte génétique du *Siderooxydans lithotrophicus* ES1<sup>317</sup>**

T. des gènes	Gènes protéines	Gènes ARN	Pseudogènes	Taille (bp)
2984	2929	54	23	3003656

### Définition des gènes <sup>318</sup>

Sentiers	Réactions enzymatiques	Réaction de transport
165	1187	50

Polypeptides	Complexes protéiques	Enzymes	Transports
2929	10	820	75

### Composés : 999 <sup>319</sup>

Unités de transcription	ARNt	Caractéristiques de la protéine	Allez termes
1583	45	2340	4

### Analyse des gènes spécifiques de l'oxydo-réduction du *Sideroxydans lithotrophicus*

Les génomes de ces organismes ont été séquencés, révélant un éventail des voies métaboliques putatives (Emerson et al., 2013) et l'analyse de ces voies posent une série de questions intéressantes : « Comment les bactéries peuvent extraire les électrons du fer ferreux et comment sont utilisés ces électrons en bout de chaîne métabolique produit par la transformation du NADPH en NADH avec une production ( $H^+$ ) étant un motif de proton force PMF (Motif de Proton Force). »

### Informations récentes sur le transfert d'électron entre la membrane externe et le cytoplasme cellulaire

La bactérie la plus étudiée sur l'oxydation du fer II est l'acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ayant une membrane externe contenant un mono-hème cytochrome *cyc2*, prélevant des électrons provenant de l'oxydation de Fe (II) et les transfère vers un « rusticyanine » périplasmique, ensuite les transfère à deux navettes di-hème possibles, les cytochromes de *Cyc1* et *CycA1*.

Puis ces cytochromes, di-hème de transfert, transfèrent les électrons vers des voies divergentes :

- Soit à une voie où les électrons entrent dans l'emprise des quinols pour finalement produire NADH cytochrome *bc1* complexe ou une oxydase *aa<sub>3</sub>*.
- Soit à une voie où l'oxygène de l'eau est réduit avec le transport des protons à travers la membrane (Bonnefoy et Holmes, 2012 ; Roger et coll., 2012).

Les neutrophiles comme *Sideroxydans lithotrophicus ES-1* ne contiennent pas de gènes importants pour cytochrome *Cyc2*, mais contiennent les gènes *Mota* (*Slit\_2397*) et *mob* (*Slit\_2396*) (Liu et al., 2012).

Ce sont des homologues de la bactérie *Shewanella oneidensis* contenant le gène *Mtra* et le complexe de gènes *BETMM*, codant la protéine cytochrome deca-hème *MtrA* et la protéine transmembranaire porine *BETMM*. Ces deux protéines forment un complexe de porine-cytochrome dans la membrane externe de *Sideroxydans oneidensis* permettant le transport efficace des électrons à travers la membrane externe via une chaîne de hèmes (Hartshorne et al., 2009 ; Blanc et coll., 2013).

Il a été proposé que les protéines *MtoA* et *MtoB* remplissent une fonction similaire dans *Sideroxydans lithotrophicus ES-1*, en formant un conduit d'électrons permettant aux électrons d'être transporté de l'oxydation des métaux ferreux fer à la surface de la cellule à l'intérieur de celle-ci par le biais de la périplasme (Liu et al., 2012).

Les gènes *Mtoa* et *Mtob* se trouvent dans un groupe de gènes du génome du *Sideroxydans lithotrophicus ES-1* contenant également deux autres *c-cytochromes* codés par le gène *Slit\_2398* encodant la protéine *MtoD*, étant un petit mono-hème cytochrome et le gène *Slit\_2395* encodant la protéine *CymA<sub>ES-1</sub>*, une tétra-hème de la quinol oxydoréductase.

Dans le cadre du même cluster (accumulation de gènes), il est possible que tous ces gènes soient conjointement transcrits et exprimés dans le cadre d'un opéron. Cela fournirait un complexe protéique porine-cytochrome (*MtoAB*), un cytochrome soluble périplasmique (*MtoD*) et une oxydoréductase par le quinol dans la membrane cytoplasmique (*CymA<sub>ES-1</sub>*) (Emerson et al., 2013).

**Sideroxydans lithotrophicus ES-1** contient aussi les gènes nécessaires pour exprimer deux oxygénases distinctes, une cytochrome-oxydase  $bb_3$  ( $CBB_3$ ) et une cytochrome-oxydase  $bd_1$  ( $CDB_1$ ). Celles-ci ont été caractérisées chez d'autres bactéries, semblent avoir une constante d'équilibre

$K_M$ -valeurs identique pour l'oxygène :

- **CDB<sub>1</sub>** : est un couple réducteur protéique fonctionnant dans la gamme micro-molaire tandis que cytochrome-oxydase  $cbb_3$  fonctionne dans la gamme sub micro-molaire.
- **CBB<sub>3</sub>** : est un couple réducteur de l'oxygène atmosphérique  $O_2$  servant de pompage de proton et acquérant des électrons d'un cytochrome c, contrairement au couple  $CDB_1$  n'ayant aucun mécanisme de pompage de la protonique et recevant des électrons directement à partir du pool de quinol (Pichet et Watmough, 2004).

Quels sont les mécanismes bioénergétique et biochimique précis permettant à des bactéries oxydant du fer II une oxydation de Fe II couplée à la réduction de  $O_2$ , question étant encore incertaine et comment les électrons du complexe *MtoAB* interviennent-ils dans le cytochrome oxydase ?

Il a été suggéré précédemment que le complexe *CymA<sub>ES-1</sub>* ait été le partenaire d'oxydo-réduction du fer II, cependant, cela se traduirait par la perte de la force protomotrice.

Dans les investigations dans une forme recombinante, afin de mieux comprendre les rôles possibles de l'oxydo-rédox périplasmique dans **Sideroxydans lithotrophicus ES-1**, le cytochrome *MtoD* a été étudié à l'aide d'une gamme de techniques biochimiques, spectroscopiques et cristallographiques dans des formes purifiées et caractérisées.

### Mécanisme membranaire externe cytochrome dans le cas des *Geobacter*

L'hème multiple, membrane externe cytochrome de type c (*C-Cyt*) gène *OmcB* du ***Geobacter sulfurreducens*** avait été annoncé comme une médiation de transfert d'électrons à travers la membrane externe. Cependant, le mécanisme sous-jacent est resté indéterminé.

Dans ***G. sulfurreducens***, le gène de l'*OmcB* fait partie de deux groupes de quatre en tandem-gènes (groupe de deux gènes définissant un élément cellulaire), chacun est prédit pour coder un facteur de transcription (*OrfR/ORF*), étant une protéine de membrane externe comme la porine codée par les gènes (*OmbB/OmbC*), étant un cytochrome-c périplasmique protéine notée (*OmaB/AMCA*) et respectivement une membrane externe cytochrome-c protéines (*OmcB/OmcC*). Il a été montré que les protéines *OmbB/OmbC*, *OmaB/AMCA* et *OmcB/OmcC* de ***G. sulfurreducens PCA*** forment les complexes de protéines porine-cytochromes (*Pcc*), ayant été impliquées dans le transfert des électrons à travers la membrane externe.

Les grappes de protéines *Pcc* ont été trouvés dans les huit *Geobacter* séquencés et 11 autres génomes bactériens de six phylums différents, démontrant une distribution généralisée de complexes protéiques (*Pcc*) chez des bactéries phylogénétiquement diverses.

**Suppression de groupes des gènes *Ombb-OmaB-OmcB-Orfs-Ombc-Omac-OmcC*** : ces gènes n'ont aucune incidence sur la croissance de ***G. sulfurreducens PCA*** avec le fumarate, mais cela a diminué la capacité de ***G. sulfurreducens PCA*** à réduire le Fe (III)-citrate et la ferrihydrite. Il a été remarqué que l'apport du groupe de gènes d'*ombB-omaB-omcB* est restauré la capacité de ***G. sulfurreducens PCA*** de réduire de Fe (III)-citrate et ferrihydrite<sup>320</sup>.

### L'étude sur "Charatérization of *Mto* from *Sideroxydans lithotrophicus*"

Le gène *Mtoab*, du ***S. lithotrophicus*** contient également le gène *Mtod* étant proposé pour coder une protéine du cytochrome c.

Les auteurs ont isolé dans la bactérie ***Shewanella oneidensis*** le gène *Mtod*, où ce gène a été exprimé sur un vecteur plasmidique *pBAD*

La protéine *MtoD* a été purifiée puis caractérisée biochimiquement, bio-physiquement et cristallographiquement, elle a révélé une protéine de 11 kDa monomère contenant un hème unique. L'alignement de séquence et de la structure a indiqué que la protéine *MtoD* appartenait à la famille des cytochromes -c classe 1 et avait un pli semblable au ferricytochrome de la famille c552, toutefois l'hème *MtoD* ayant une bis-histidine coordonnée est nettement plus présente que les hèmes d'autres membres de la famille.

Le potentiel de réduction de l'hème *MtoD* à pH 7 est de +155 mV (vs électrode), alors que le standard de l'hydrogène est d'environ 100 mV inférieur à celui de mitochondrial du cytochrome-c.

L'examen des propriétés du gène *MtoD*, dans le contexte des éventuels partenaires respiratoires, implique qu'il peut exister dans le génome, une association de gènes partenaires multiples de transfert des électrons comme la navette des électrons pour compenser cet écart d'électro-tension entre hydrogène et le cytochrome-c en périplasmique primaire.

Le cytochrome *MtoD* a un certain nombre de caractéristiques inhabituelles : l'analyse comparative de la séquence d'acides aminés du cytochrome *MtoD* avec les séquences d'autres cytochromes définis structurellement de classe 1 a révélé que le cytochrome *MtoD* a la particularité d'avoir une bis-histidine de coordination avec un lien de l'histidine / Met et la séquence des gènes autour du ligand<sup>mmmm</sup> distal ne code pas la proline /Rich, tel que cela est observé pour autres cytochromes.

Le potentiel redox mesuré de +155 mV pour l'hème *MtoD* est élevé pour un bis-His hème coordonnée et le groupe hème est significativement plus adapté que dans le cytochrome mono-hème. Il est possible que ces facteurs inhabituels du groupe hème *MtoD* permettraient de fonctionner comme un donneur d'électron au cytochrome *bb<sub>3</sub>*, cytochrome *bc<sub>1</sub>* et/ou *CymA<sub>ES-1</sub>*.

### Culture et extraction de l'hème *MtoD*

Incubation minimale 4 à 6 heures (turbidité généralisée dans le milieu) ; température de culture 30° C.

**Enrichissement pour la PCR :** les *Sideroxydans* sont cultivés en aérobiose à 30 C dans 20 l de milieux LB. Les protéines du milieu sont déduites par spectroscopie (OD<sub>600</sub> : 0,5) et par l'addition du L-arabinose, à une concentration de travail de 2 mM.

Les cultures ont été incubées aux environs de 5 heures et récoltées par centrifugation à 6 000 g pour obtenir une pastille cellulaire.

La pastille cellulaire *MR-1* a été remise en suspension dans un tampon *HEPES* pH 7 à une concentration molaire de 20 mM, afin de détruire les parois cellulaires (lyse cellulaire), il est pratiqué trois passages à une pression de 1 000 lb/po<sup>2</sup> (6,89 MPa).

La fraction cellulaire soluble a été isolée par ultracentrifugation du lysat à 205 000 g pendant 2 heures. Le surnageant a été retenu pour la purification de *MtoD*. La *MtoD* a été isolé à l'aide de la colonne d'affinité de Strep-Tactin 5 mL (GE healthcare).

**Milieux pour les analyses conventionnelles :** le milieu de culture pour l'enrichissement est l'eau de fer-peptone (Rodina, 1965), Winodgrasky (Rodina, 1965) et des tubes de gel gradient stabilisé, simulant une aérobiose jusqu'à une anoxie (anaérobiose) ou les bactéries *Sideroxydans lithotrophicus* (ATCC® 700298), *Sphaerotilus natans* (ATCC® 13338), *Dechloromonas aromatica* (ATCC® BAA-1848) se développent très bien (Emerson et Merrill, 2005).

Un autre milieu peut être proposé : hydrolysate d'amidon de 20 à 1 g + carbonate de Mn en suspension 0,5 g pour litre d'eau distillée (l'amidon peut être remplacé par de la gomme arabique et du carbonate de Mn et par le chlorure de Mn).

### Écologie

Le *Sideroxydans lithotrophicus*, bactérie ferrugineuse, fait partie des premiers micro-organismes apparus sur terre et ont fait l'objet d'un corpus considérable de recherche microbiologique fondamentale et appliquée. Les genres bactériens ferro-oxydant se trouvent dans de nombreux phylums différents.

La plupart affiliés avec les protéobactéries, ces dernières peuvent être divisées en quatre subdivisions physiologiques :

- Oxydants du fer, acidophiles, aérobies.

---

<sup>mmmm</sup> **Ligand :** en biologie, un ligand (du latin *ligandum*, liant) est une molécule se liant de manière réversible à une macromolécule ciblée, protéine ou acide nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal. Ce terme, très utilisé pour l'étude de protéines, désigne les molécules qui interagissent avec la protéine de manière non-covalente et spécifique et qui jouent un rôle dans ses fonctions. Dans les systèmes vivants, une véritable liaison covalente irréversible entre un ligand et sa molécule-cible est rare. Contrairement à sa signification dans la chimie inorganique et l'étude des métaux, peu importe que le ligand se lie à un site de liaison métallique ou pas.

- Oxydants du fer, neutrophiles, aérobies.
- Oxydants du fer, neutrophiles anaérobies (nitrate dépendant).
- Oxydants du fer, photosynthétiques anaérobies.

Certaines espèces peuvent dans un environnement adapté réduire le fer III en fer II.

Les ferrobactéries, comme l'espèce *Siderooxydans lithotrophicus*, sont neutrophiles, aérobies et provoquent des dépôts d'oxyde de fer étant une pollution naturelle occasionnant de gros problèmes dans les réseaux de distribution d'eau. Ceci est l'une des raisons de son étude particulière.

La deuxième raison vient du fait que ces bactéries sont des chimio-litho-autotrophes, cette autonomie de croissance nous pose de nombreux problèmes dans la maîtrise de cette flore microbienne. Il est donc difficile d'influencer sur le développement ou sur la culture si nous n'approfondissons pas nos connaissances sur leurs méthodes de subsistances.

### **Le karst et les *Siderooxydans***

Les oxydes de fer microbiens sont très fréquents dans les cavités, ils donnent aux concrétions des couleurs variées en fonction du taux d'oxydation des dépôts ferreux, provenant des flux d'infiltration tectonique que les eaux pluviales ont pu drainer dans le sol de l'épi karst. Dans les eaux résiduaire d'infiltration le fer se trouve sous une forme réduite par l'action anoxique du sol, c'est au contact de l'air de la cavité que l'oxydation se produit. Ce phénomène est si spontané qu'il peut être d'origine microbienne.

### **Biotechnologie**

Les bactéries oxydant le fer ont eu une influence majeure sur l'évolution géochimique de notre planète et continuent d'avoir un impact significatif dans les environnements terrestres et aquatiques. Plus récemment, l'humanité a commencé à apprendre à exploiter leurs activités dans les procédés biotechnologiques. Les *Bifs* sont le minerai de fer primaire majeur utilisé par la société moderne, alors que les minerais de fer de tourbière (dépôts de goethite riches en fer trouvés dans les tourbières, les marécages, étant associés à des gradients d'oxydation du fer neutrophilique) ont été une source importante de fer plus tôt dans l'histoire humaine.

### **Pathogénicité**

La littérature sur cette bactérie ne donne pas d'information sur leur pathogénicité.

#### **22.1.4.2.4 Genre *Sulfuricella*<sup>321</sup> (Grotte de Sulzbrunn)**

Nom donné par Kojima et Fukui, 2010.

Ce genre *Sulfuricella* est présent dans la grotte sur la flore totale de chacune des structures :

Snottites	< 0,2 %	du total de la flore de cette structure
Biofilms « subaerial »	< 0,2 %	du total de la flore de cette structure.
Biofilms « submersed »	≈ 0,4 %	du total de la flore de cette structure
Eau de source minérale	≈ 4.2 %	du total de la flore de cette structure
Eau de mélange	≈ 3.0 %	du total de la flore de cette structure

Cette bactérie a été trouvée dans l'eau de source de la grotte de Sulzbrunn et n'a pas été apportée par les eaux telluriques.

### **Phylum *Betaproteobacteria* ; Ordre *Nitrosomonadales* ; Famille *Gallionellaceae* ;**

#### **Genre *Sulfuricella***

Dans ce genre la seule espèce la plus étudiée à l'heure actuelle est *Sulfuricella denitrificans* gen, nov souche **skB26T**. Cette bactérie oxyde le soufre dans le milieu marin et dans les lacs.

#### **Espèce *Sulfuricella denitrificans* gen, nov souche skB26T.**

#### **Morphologie**

En forme de bâtonnets incurvés, Gram (-), mobile, anaérobie facultative ; longueur 0,8 à 2 µm, 0,4 à 0,6 µm.

## Caractéristiques

Elle oxyde en sulfates, les thiosulfates, le soufre élémentaire et le soufre hydrogéné. Elle peut utiliser la réduction des nitrites en azote comme accepteur d'électrons et comme seule source d'énergie. Elle est chimio-lithotrophe ; avec une activité oxydase (+).

L'oxydation du soufre organique décrite par Kelly-Trudinger (S4I) a été identifiée chez *Acidithiobacillus caldus* par Hallberg et al, 1996 et a été décrite sur le *Thermithiobacillus tepidarius* par LU & Kelly en 1988<sup>322</sup> et a été observée sur *Advenella Kashmirensis* (Dam et al., 2007).

Les études font état que les sulfates inhibent l'oxydation des tétra-thionates, mais on ne connaît pas les enzymes entrantes dans la production de sulfates à partir des tétra-thionates.

La bactérie *Sulfuricella* est psychrotolérante, se développant à des températures aussi basses que 0° C. Ces bactéries oxydent et fixent le fer, mais afin d'obtenir l'énergie, elles doivent vivre dans un environnement relativement spécifique contenant « du fer réduit, une bonne quantité d'oxygène et de carbone, de phosphore et d'azote en quantité suffisante » (Halbach, Koschinsky et Halbach, 2001).

L'azote et le soufre sont essentiels comme principaux composants des matériaux cellulaires. Elles exigent également une variété de composés inorganiques abondantes dans la biosphère, avec un large éventail d'états oxydo-rédox.

Ces espèces chimiques ont des propriétés spécifiques et les cycles biogéochimiques des éléments sont largement tributaires des activités de dissemblances et d'assimilations des procaryotes. Les composés d'azote et de soufre agissent comme accepteurs d'électrons ou des réserves oxydatives pour les divers types respiratoires des bactéries sulfuro-oxydantes, utilisant des formes oxydées de l'azote comme accepteurs d'électrons.

L'anaérobiose facultative montre une réduction de croissance considérable lorsque la teneur en oxygène atmosphérique atteint la valeur de 20 %.

L'indépendance du nitrate dans la respiration anaérobie et leur croissance ont été étudiées et démontrées expérimentalement par le biais de la respiration arséniate.

## Culture

La gamme de pH de développement est de 6 à 9 et l'optimum de développement est de 7,5 à 8 ; la température de développement est inférieure à 28,6° C, l'optimum observé est de 22,6° C. L'optimum de développement a été observé dans un milieu sans sel et le développement est inhibé pour une valeur saline de 220 mmol de NaCl.

## Milieu

Le milieu de culture de base utilisé pour l'enrichissement et l'isolement est un tampon carbonate de faible teneur moyenne en sel, comme le milieu d'enrichissement est fait par dilution au cinquième du milieu de *Shake d'agar* (Widdel & Bak, 1992).

Les modifications à apporter sont l'élimination des sulfates et le remplacement du sulfure par le thiosulfate comme source alternative de réduction en soufre. La composition du milieu était (l21) : 0,25 g de NaCl, 0,2 g de MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0,1 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0,1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 g de KCl, éléments traces de 1 ml.

La culture se fait sous atmosphère d'un mélange de (N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en proportion 80/20<sub>v/v</sub>) pour entretenir une anaérobiose. L'incubation est effectuée dans l'obscurité.

## Phylogénétique

La bactérie *Sulfuricella denitrificans* skB26T a un chromosome circulaire avec une longueur chromosomique de 3.130.594 pb. Elle contient un plasmide *pgcd* circulaire de longueur 86 619 pb. Ce plasmide est occupé par un gène *arxA*-comme, opéron codant l'oxydase anaérobie d'un clade d'arsénite.

Nombre de nucléotides : 3 217 213 pb ; nombre de gènes de protéines : 3073 ; nombre de gènes d'ARN : 51 (Watanabe T et coll.).

La teneur de l'ADN en C+G déterminée par la méthode de fluorescence et HPLC (Gonzalez and Saiz-Jimenez, 2002) donne pour la souche skB26T la valeur de 59,0 mol%.

L'analyse génomique *Multilocus* a montré que le gène de la souche skB26, n'a pas pu être assignée à un autre ordre, ainsi il a été défini un ordre nouveau, le *Sulfuricella*. Les génomes des souches skB26 et sk43H ont été examinés en concernant les gènes impliqués dans l'oxydation des composés soufrés inorganiques.

Les souches skB26 et sk43H ont une voie commune, se composant de la séquence de gènes de *Sqr*, *SoxEF*, *SoxXZAB*, *Dsr* (relatif aux protéines), *AprBA*, *Sam* et *SoeABC*. Cette observation place cet ordre dans les *Betaproteobacteria*.

Cette voie est également partagée avec les genres cultivés des plus proches parents oxydant le soufre le *Thiobacillus identifiens*, le *Thiobacillus plumbophilus* DSM 6690 (Drobner et coll., 1992), et le *Siderooxydans lithotrophicus*.

Ce sont des bactéries aérobies capables d'une croissance chimio-lithotrophe avec H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub> et PbS. L'analyse phylogénétique révèle la présence d'un groupe de gènes conservés, étant situé immédiatement en amont de l'opéron de *Dsr* dans les *Betaproteobacteria*.

La similarité de séquence entre *Sulfuricella denitrificans* skB26T et *Thiobacillus plumbophilus* DSM 6690 était de 93 %. Ces séquences forment un groupe phylogénétique distinct du groupe du genre *Thiobacillus*.

Plusieurs clones environnementaux étroitement liés à la nouvelle souche ont été signalés dans les sédiments froids d'un lac méromictique<sup>nnnn</sup> (Nelson et coll., 2007) ;

La ressemblance observée dans l'analyse phylogénétique est plus forte avec l'espèce *Thiobacillus plumbophilus* DSM 6690 ; cela vient de la présence des gènes *Soxb* et *d'Apra* entrant dans l'oxydation du soufre.

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées en utilisant des séquences de gènes impliqués dans l'oxydation du soufre, la fixation du carbone inorganique et la respiration par les nitrates. Sur la base de ses propriétés phénotypiques et phylogénétiques, la souche skB26T (5NBRC 105220T 5DSM 22764T) est proposée comme la souche d'une nouvelle espèce d'un genre nouveau, *Sulfuricella denitrificans* gen. nov., SP.

### Écosystème

*Sulfuricella denitrificans* souche skB26T est une nouvelle bactérie anaérobie facultative oxydant le soufre, ayant été isolée de l'eau d'un lac anoxique d'eau douce au Japon. Les *Sulfuricella* sont une composante majeure de la communauté bactérienne planctonique dans l'élaboration de l'appauvrissement de l'eau en nitrates hypoxiques où la respiration arséniate est l'un des métabolismes énergétiques possibles.

### Sensibilité aux antibiotiques

*Sulfuricella denitrificans* est sensible aux antibiotiques comme la kanamycine et l'ampicilline.

### Biotechnologie

Cette bactérie est utilisée pour extraire le fer des eaux thermales et dans la dénitrification des eaux riches en nitrates et nitrites.

## 22.1.5 Ordre *Methylophilales* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition des bactéries de l'ordre des *Methylophilaceae* pour chacune des structures :

Snottites	< 0,2 %	de la flore totale de cette structure
Biofilm « subaerial »	< 0,2 %	de la flore totale de cette structure
Biofilm « submersed »	14 %	de la flore totale de cette structure
L'eau de source	4 %	de la flore totale de cette structure
L'eau de mélange	8 %	de la flore totale de cette structure

**L'ordre des *Methylophilales* contient une seule famille *Methylophilaceae*.**

<sup>nnnn nnnn</sup> **Lac méromictique** : lac dont les eaux de surface et de profondeur se mélangent moins d'une fois par an (et pour certains moins d'une fois par décennie ou siècle voire plus).

### 22.1.5.1 Famille *Methylophilaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

La répartition de ces bactéries par structure est la même que pour l'ordre *Methylophilales*.

Dans cette famille on trouve les genres suivants :

- *Methylotenera*
- *Methylobacillus*
- *Methylovouset*
- *Methylophilus*

#### Morphologie

Bâtonnet, Gram (-). Multiplication par scissiparité.

#### Caractéristiques métaboliques

- Méthylotrophes facultatifs (peuvent utiliser le méthanol ou la méthylamine comme source de carbone et d'énergie).
- N'utilisent pas le méthane (comme les *Methylobacteria*).
- Ils assimilent les composés carbonés via le cycle de ribulose monophosphate (Quayle).
- Principaux acides gras C16 : 17c et C16 : 0.
- Cependant les caractères biochimiques pouvant être présents dans d'autres classes, ils ne sont pas suffisants pour définir la classification. Seules les analyses génomiques et phylogénétiques peuvent définir l'appartenance à cette famille.

En revanche, les membres de la famille sont définis par certaines caractéristiques : chimio-taxonomique et biochimiques ; la présence de phospholipides spécifiques et des enzymes pouvant être utilisées pour les délimitations des genres.

#### Environnement

Les genres de cette famille se retrouvent principalement dans les boues activées des rivières, lacs et étangs et plantes.

#### 22.1.5.1.1 Genre *Methylotenera* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Kalyurhaya et al. 2012

Dans la grotte de Sulzbrunn les pourcentages de bactéries du genre *Methylotenera* sont les suivants :

Dans les Snottites	≈< 0,2 %	de la flore totale de cette structure.
Dans les biofilms « subaerial »	≈< 0,2 %	de la flore totale de cette structure
Dans les biofilms « submersed »	≈ 13.3 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de source minérale	≈ 2.6 %	de la flore totale de cette structure
Dans l'eau de mélange	≈ 7.3 %	de la flore totale de cette structure

La présence importante de *Methylotenera* dans les eaux de mélange montre qu'une partie de la flore *Methylotenera* provient des eaux d'infiltration et de percolation et une autre partie de l'eau de la source minérale.

Sa présence dans les parties « subaerial » de la grotte est sûrement due au fait que cette bactérie est aérobie facultative. Elle utilise le méthane ambiant pour la formation de son carbone et de l'utilisation énergétique.

La biomasse microbienne de cette bactérie a un C/N de 5,54 (p/p) étant proche des valeurs habituellement considérées pour les organismes métazoaires vivants (valeur de 6).

#### Ordre *Methylophiliales* ; Famille *Methylophilaceae* ; Genre *Methylotenera*

Ce genre n'a été étudié que ces dernières années les publications sont relativement récentes et peu nombreuses. La seule espèce étudiée de ce genre est *Methylotenera mobilis JLW8*.

## Espèce *Methylothera mobilis*

### Morphologie

	<p style="text-align: center;"><b><i>Methylothera mobilis</i></b></p> <p><i>C'est une bactérie de Gram (-) ; en forme de bâtonnet ; mobilité au moyen d'une seule flagelle ; reproduction par scissiparité ; aérobic facultative.</i></p> <p><i>Taille longueur 2,5 µm et 0,9 µm</i></p>
<p><small>Scanning electron micrograph of cells of <i>Methylothera mobilis</i> JLW8 grown on methylamine. Photo: Dennis Kunkel, Dennis Kunkel Microscopy, Inc.</small></p>	

### Métabolisme

Le métabolisme des composés organiques de C1 (liaison avec un seul carbone et sans liaison C-C) est un élément important dans le cycle global du carbone.

Le *Methylothera mobilis* utilise la méthylamine comme seule source de carbone et d'azote à des fins énergétiques. La méthylamine est oxydée par l'intermédiaire de la méthylamine déshydrogénase, le formaldéhyde formé entre dans le cycle ribulose (cycle de Quayle).

Le profil des acides gras cellulaires est dominé par : C16 : 17c et C16 :0 avec un phospholipide majeur étant la phosphatidyl-éthyléthanolamine.

### Analyse phylogénétique

*Methylothera mobilis* JL W8 a une teneur de (G + C) de l'ADN-ADN est de 45,5 % mol. Le séquençage des gènes de l'ARNr 16s, a indiqué une particularité de la souche *Methylothera mobilis* étant d'être inclus dans les *Betaproteobacteria* avec 93-96 % de similarité. Inclus dans le groupe des méthylotrophes, étant un critère de la famille *Methylophilaceae*.

*Methylothera mobilis* gen nov SP : souche ayant été définie par l'analyse JLW8(T) =ATCC BAA-1282 (T) = DSM 17540 (T)<sup>323</sup>.

Les phénotypes mutants<sup>324</sup> de *Methylothera mobilis* JLW8 présentant dans les gènes prévus pour coder la voie de dénitrification, ainsi que des mutations structurales du gène de la déshydrogénase du méthanol codée par les gènes *xoxF1* et *xoxF2*, afin d'obtenir des aperçus du métabolisme de dénitrification et d'utilisation du méthanol par cette bactérie.

En surveillant l'accumulation d'oxyde nitreux, ils ont démontré qu'une réductase de nitrate périplasmique, réductase nitrite liaison-NAD P, contenant du cuivre et qu'une réductase de l'oxyde nitrique sont impliqués dans la voie de la dénitrification et que la voie doit être opérationnelle dans des conditions aérobies.

Toutefois, la croissance sur le méthanol utilise seulement la voie de la dénitrification et demande un milieu essentiellement additionné de nitrates.

Des mutations dans chacun des deux gènes *XoxF* maintiennent leur aptitude à croître sur le méthanol, mais pas le mutant *XoxF* double, suggérant que chez *M. mobilis* JLW8 la protéine issue du gène *XoxF* est l'une des enzymes de déshydrogénase du méthanol. Les niveaux réduits de protoxyde d'azote accumulés par les mutants de *XoxF* par rapport à la souche sauvage suggèrent que ces enzymes doivent être capables de faire un don d'électrons pour la dénitrification<sup>325</sup>.

### Culture

La croissance se situe dans une fourchette de pH 5 à 8,5 avec un optimum de pH 7,5.

### Origine géographique de la souche

L'espèce *Methylothera mobilis* a été isolée des sédiments du lac Washington.

### Écologie et climat

*Methylothera mobilis* a été retenu comme germe permettant l'oxydation du méthane pour lutter dans l'émission des gaz à effet de serre. Les bactéries méthylotrophes jouent un rôle majeur dans le maintien de l'équilibre des composés C1 (un seul carbone) dans le milieu aérobie.

## Environnement

Un phénomène bien décrit est la production du méthanol chez *Methylothera mobilis* par l'intermédiaire de la dénitrification<sup>87</sup> dans le cadre du traitement des eaux usées<sup>326</sup>, un certain nombre de méthylophiles produits par culture mixte ont été impliqués dans ce processus<sup>327,328</sup>. Cependant, le rôle de la dénitrification et de sa connexion méthylophile dans les systèmes naturels n'est pas bien compris, et les données provenant d'études portant sur des cultures pures de méthylophiles sont rares. Un des dénitrifiants les plus étudiés est *Paracoccus denitrificans*<sup>329</sup>.

Il y a plus de trois décennies, il a été proposé que la croissance anaérobie de cette bactérie sur méthanol avec du nitrate soit rendue possible par la réduction des nitrates en nitrites en utilisant des électrons provenant des déshydrogénations de nucléotides, liés de pyridine de formaldéhyde et de formiate. Les nitrites, ainsi produits, ont ensuite servi comme un accepteur d'électrons pour la déshydrogénase du méthanol par l'intermédiaire du cytochrome c et nitrite réductase<sup>330</sup>.

**B**actéries de l'embranchement des *Betaproteobacteria* présentes dans la cavité

<i>Methylococcales</i>	<i>Legionellales</i>
<i>Methylococcaceae</i>	<i>Legionellaceae</i>
<i>Crenothrichaceae</i>	<i>Pseudomonadales</i>
<i>Xanthomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>

### Répartition dans la cavité de Sulzbrunn

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne des *Gammaproteobacteria* dans les différentes structures est la suivante :

Snottites	20,9 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	26,5 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	38,2 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	10,9 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	40 %	sur la flore totale de cette structure

### Généralités des *Gammaproteobacteria*

Ils comprennent plusieurs groupes de bactéries médicalement et scientifiquement importants tels que les ordres *Enterobacteriales*, *Pseudomonadales*, *Vibrionales*. Cet embranchement comporte de nombreuses bactéries pathogènes comme *Salmonella spp* (fièvre typhoïde), *Yersinia pesti* (la peste), *Pseudomonas aeruginosa* (infections hospitalières), *Escherichia coli* (intoxications alimentaires). Il existe aussi des germes pathogènes pour les plantes : *Xanthomonas axonopodis* (chancre des agrumes), *Pseudomonas syringae pv actindiae* (pathogène du kiwi). Les membres des *Chromatium* (photosynthétique, oxydant le sulfure d'hydrogène en milieu aqueux, avec une production de soufre comme déchet). Certains *Gammaproteobacteria* sont des oxydants du méthane et beaucoup sont des symbiotes des animaux vivant dans l'environnement géothermique des océans.

### Morphologie

Les *Gammaproteobacteria* ont des formes de coques, de bâtonnets ou de spirilles

**Croissance** : aérobies, anaérobies facultatives ou strictes, mésophiles.

**Nutrition** : chimio-organotrophes, lithotrophes, photosynthétiques.

**Habitat** : ubiquistes, commensaux et pathogènes pour l'Homme et les animaux.

**Fonctions** : les *Gammaproteobacteria* sont fermentaires, saprophytes, nitrifiants, dénitrifiants, méthyloxydants, fixateurs d'azote, pathogènes.

**Classification** Les *Gammaproteobacteria* comportent 15 ordres et 42 familles.

#### Ordres et familles des *Gammaproteobacteria* (Ordres et Numéro de familles)

<p><b>Ordre I <i>Chromatiales</i></b>  <i>I Chromatiaceae</i>  <i>II Ectothirhodospiraceae</i>  <i>III Halothiobacillaceae</i>  <i>IV Granulosicoccaceae</i></p>	<p><b>Ordre VI <i>Legionella</i></b>  <i>I Legionellaceae</i>  <i>II Coxiellaceae</i></p>	<p><i>II Colwelliavceae</i>  <i>III Ferrimonadaceae</i>  <i>IV Idiomarinaceae</i>  <i>V Moritellaceae</i>  <i>VI Pseudoalteromonadaceae</i>  <i>VII Psychromonadaceae</i>  <i>VIII Shewanellaceae</i>  <i>IX Celerinatantimonadaceae</i></p>
<p><b>Ordre II <i>Acidithiobacillales</i></b>  <i>I Acidithiobacillaceae</i>  <i>II Thermithiobacillaceae</i></p>	<p><b>Ordre VII <i>Methylococcales</i></b>  <i>I Methylococcaceae</i>  <i>II Crenothricaceae</i></p>	<p><b>Ordre XI <i>Vibrionales</i></b>  <i>I Vibrionaceae</i></p>
<p><b>Ordre III <i>Xanthomonadales</i></b>  <i>I Xanthomonadaceae</i>  <i>II Sinobacteraceae</i></p>	<p><b>Ordre VIII <i>Oceanosprillales</i></b>  <i>I Oceanospirillaceae</i>  <i>II Halomonadaceae</i>  <i>III Hahellaceae</i>  <i>IV Alcanivoracaceae</i></p>	<p><b>Ordre XII <i>Aeromonadales</i></b>  <i>I Aeromonadaceae</i></p>

<p><b><u>Ordre IV Cardiobacteriales</u></b> I <i>Cardiobacteriaceae</i></p> <p><b><u>Ordre V Thiotrichales</u></b> I <i>Thiotrichaceae</i> II <i>Piscirickettsiaceae</i> III <i>Francisellaceae</i> (sera traité dans les parasitismes)</p>	<p>V <i>Oleiphilaceae</i> VI <i>Sacchrospirillaceae</i> VII <i>Litoricolaceae</i></p> <p><b><u>Ordre IX Pseudomonadales</u></b> I <i>Pseudomonadaceae</i> II <i>Moraxellaceae</i></p> <p><b><u>Ordre X Alteromonadales</u></b> I <i>Alteromonadaceae</i></p>	<p>II <i>Succinivibrionaceae</i></p> <p><b><u>Ordre XIII Enterobacteriales</u></b> I <i>Enterobacteriaceae</i></p> <p><b><u>Ordre XIV Pasteurellales</u></b> I <i>Pasteurellaceae</i></p> <p><b><u>Ordre XV : Salinisphaerales</u></b> I <i>Salinisphaeraceae</i></p>
---	--	---

Cette liste montre l'importance de l'embranchement des *Gammaproteobacteria* dans la classification microbiologique, ainsi que les difficultés pour aborder et maîtriser la pathologie microbienne de cette classe.

### 23.1.1 Ordre IX *Pseudomonadales* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Orla Jensen, 1921.

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne de l'ordre des *Pseudomonadales* dans les différentes structures est la suivante :

Snottites	≈ 8,3 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 6 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 1,1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	≈ 1,4 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	≈ Nd	sur la flore totale de cette structure

#### Familles de cet ordre :

- *Azotobacteraceae*
- *Branhamaceae*
- *Moraxellaceae*
- *Pseudomonadaceae*

#### Généralités

Les *Pseudomonadales* sont des bactéries très répandues dans la nature, elles sont omniprésentes dans les sols, les plantes avec une capacité de biorésistance et autres, elles provoquent la détérioration des produits laitiers. Les *Pseudomonadales* comprennent de nombreuses bactéries pathogènes opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa* pouvant provoquer des infections opportunistes chroniques.

#### 23.1.1.1 Famille *Pseudomonadaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Winslow et al. 1917.

Les membres des *Pseudomonadaceae* étaient également abondants dans les snottites et les biofilms subaériens (8 % et 6 %, respectivement).

De façon inattendue, les communautés aériennes sont apparues globalement plus diversifiées et moins clairement dominées par des taxons méthanotrophiques ou méthylotrophes, plus importantes pour les biofilms « submersed » et les eaux souterraines mixtes.

**Embranchement *Gammaproteobacteria* ; Ordre *Pseudomonadales* ; Famille *Pseudomonadaceae* a pour Synonyme *Azotobacteraceae***

Liste des genres de la famille des *Pseudomonadaceae* (Selon *Catalogue of Life* 30 mai 2013)

<i>Azomonas</i>	<i>Mesophilobacter</i>
<i>Azorhizophilus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Azobacter</i>	<i>Rhizobacter</i>
<i>Cellvibro</i>	<i>Rugamonas</i>
<i>Chryseomonas</i>	<i>Serpen</i>

## Étymologie du *Pseudomonas*

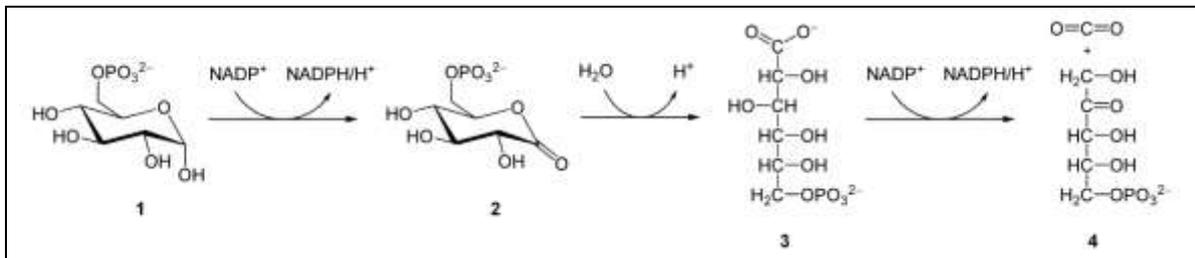
*Pseudomonas* signifie en grec *pseudo* (ψευδο - faux) et *monas* (μονος) une seule unité. Le nom générique de *Pseudomonas* créé pour ces organismes a été défini en des termes assez vagues en 1894 comme un genre de Gram (-), en forme de bâtonnet. Ils sont flagellés en position polaire. Un grand nombre d'espèces a été affecté à un genre. Les *Pseudomonadales* ont été isolées de nombreuses niches naturelles. La nouvelle méthodologie phylogénétique a reclassé de nombreuses espèces de la famille des *Pseudomonadaceae*. Le *Pseudomonas aeruginosa* est plus en plus reconnu comme un pathogène opportuniste émergeant de pertinence clinique. Il a été très étudié pour son antibiorésistance.

## Morphologie

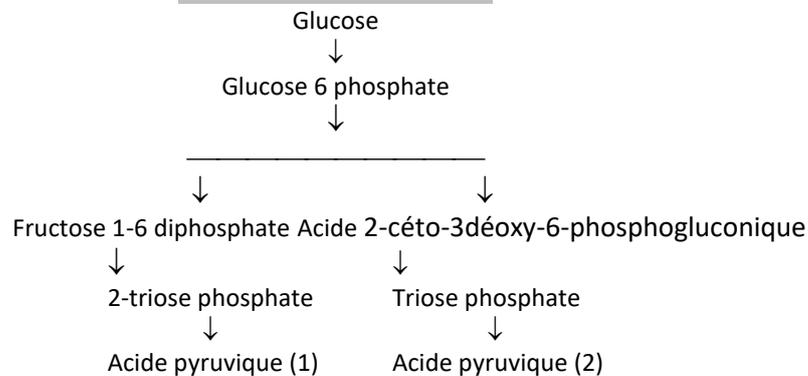
Les *Pseudomonadaceae* sont des bactéries en forme de bâtonnet, ils ont des flagelles polaires, permettant la motilité. De nombreux membres produisent des dérivés du pigment fluorescent pyoverdine.

## Caractéristiques distinctives

Oxydase positive en raison de la présence d'enzymes de cytochrome oxydase (c), fermentaires. Beaucoup métabolisent le glucose par la voie « d'Entner Doudoroff » (voie des pentoses phosphates) médiée par l'aldolase et 6-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase. Certains *Pseudomonas* sont lignolitiques et dégradent les hydrocarbures

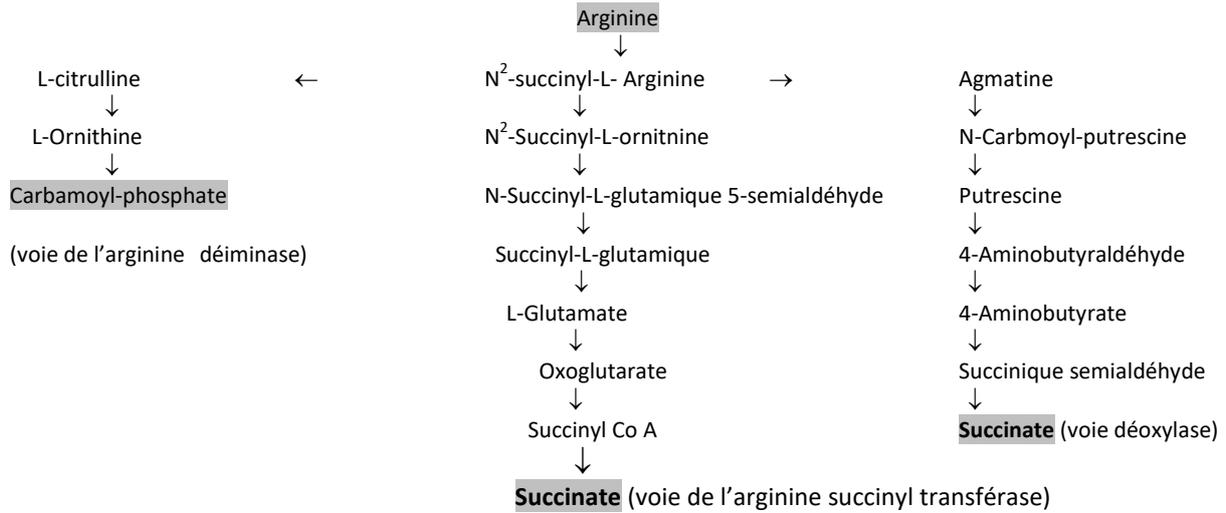


### Voie « d'Entner Doudoroff »

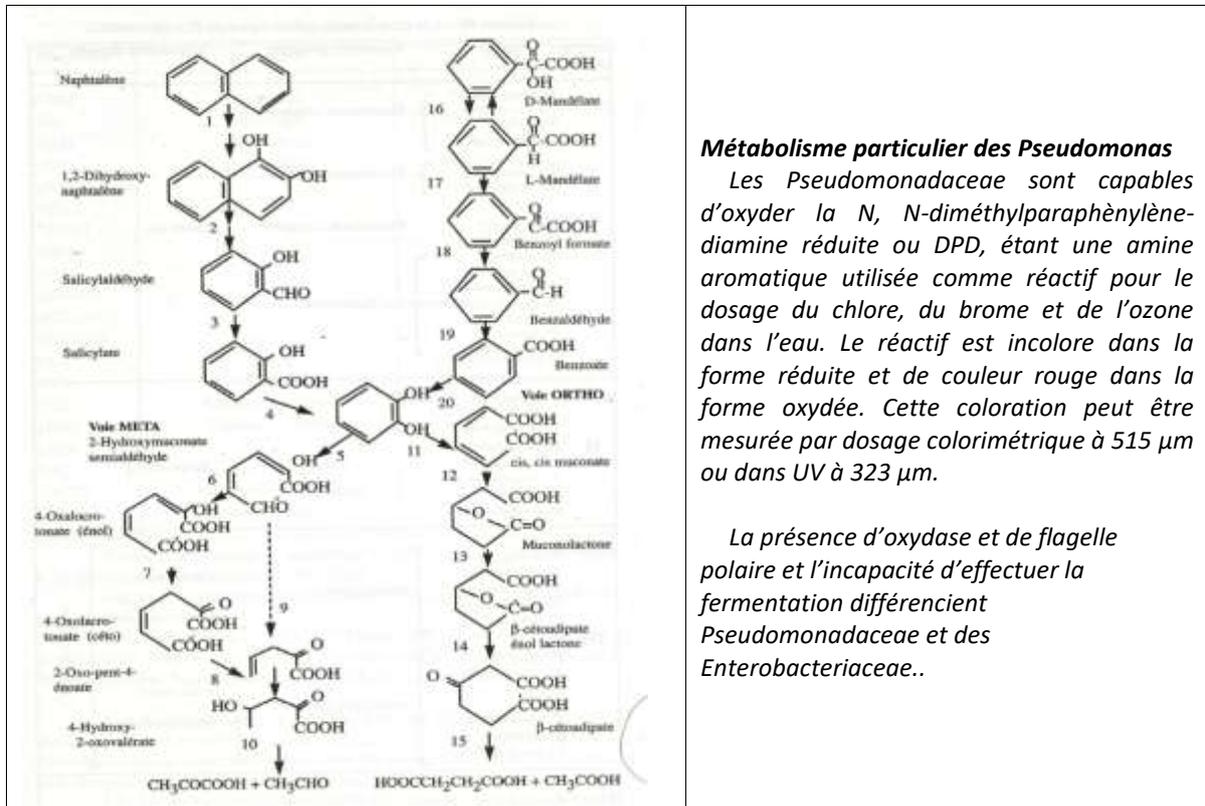


- (1)  $\text{Glucose} + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{P}_i \rightarrow 2\text{acide pyruvique} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$   
 (2)  $\text{Glucose} + \text{ADP} + \text{NAD}^+ + \text{NADH} + \text{P}_i \rightarrow 2\text{acide pyruvique} + \text{ATP} + \text{NADH} + \text{NADPH} + 2\text{H}^+$

**Voie de dégradation de l'arginine par les *Pseudomonas***



**Métabolisme des composés aromatiques par les *Pseudomonas***



**Métabolisme particulier des *Pseudomonas***  
 Les *Pseudomonadaceae* sont capables d'oxyder la N, N-diméthylparaphénylène-diamine réduite ou DPD, étant une amine aromatique utilisée comme réactif pour le dosage du chlore, du brome et de l'ozone dans l'eau. Le réactif est incolore dans la forme réduite et de couleur rouge dans la forme oxydée. Cette coloration peut être mesurée par dosage colorimétrique à 515 µm ou dans UV à 323 µm.

La présence d'oxydase et de flagelle polaire et l'incapacité d'effectuer la fermentation différentie *Pseudomonadaceae* et des *Enterobacteriaceae*.

Les *Pseudomonas* sont des bactéries autotrophes facultatives d'hydrogène les genres comportant ce caractères sont : *Ps carxydoflava*, *Ps saccharophila*, *Ps facilis*, *Ps hydrogenovorans*, *Ps hydrogenothermophila*, *Ps carboxydohydrogea*.

Les *Pseudomonas* peuvent vivre en symbiose avec les bryophytes ou les ptéridophytes comme : *Ps pseudoflava*, *Ps stutzeri*, *Ps saccharophila*, *Ps paucimobilis*<sup>331</sup>.

**Phylogénétique**

En 2000 le génome complet d'une espèce de *Pseudomonas* a été séquencé ; plus récemment, les génomes d'autres espèces ont été séquencés, notamment *Ps. aeruginosa* PAO1 (2000), *Ps. putida* KT2340 (2002), *Ps. fluorescens* Pf-5 (2005), *Ps. fluorescens* PfO-1 et *Ps. entomophila* L48. Plusieurs

« pathovars » de *Pseudomonas syringae* ont été séquencés, y compris le « pathovar » tomato DC3000 (2003), « pathovar » syringae B728a (2005) et « pathovar » phaseolica 1448A (2005)<sup>332</sup>.

### 23.1.1.1.1 Genre *Pseudomonas* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Winslow et al. 1917

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne du genre *Pseudomonas* dans les différentes structures est la suivante :

Snottites	≈ 3 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 1,7 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 0,2 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	≈ 1.4 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	≈ Nd	sur la flore totale de cette structure

Les *Pseudomonas* sont présents dans les snottites et le biofilm « subaerial » et très peu dans le biofilm « submersed ».

### Ordre *Pseudomonadales* ; Famille *Pseudomonadaceae* ; Genre *Pseudomonas*

#### Liste des espèces de ce genre :

<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<i>Pseudomonas otitidis</i>
<i>Pseudomonas agarici</i>	<i>Pseudomonas fulva</i>	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	<i>Pseudomonas palleroniana</i>
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	<i>Pseudomonas gelidicola</i>	<i>Pseudomonas panacis</i>
<i>Pseudomonas amygdali</i>	<i>Pseudomonas geniculata</i>	<i>Pseudomonas parafulva</i>
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	<i>Pseudomonas gessardii</i>	<i>Pseudomonas pertucinogena</i>
<i>Pseudomonas antarctica</i>	<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Pseudomonas pictorum</i>
<i>Pseudomonas argentinensis</i>	<i>Pseudomonas grimontii</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>
<i>Pseudomonas asplenii</i>	<i>Pseudomonas halodenitrificans</i>	<i>Pseudomonas poae</i>
<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	<i>Pseudomonas halophila</i>	<i>Pseudomonas proteolytica</i>
<i>Pseudomonas avellanae</i>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligene</i>
<i>Pseudomonas azotifigens</i>	<i>Pseudomonas indica</i>	<i>Pseudomonas psychrophila</i>
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	<i>Pseudomonas jessenii</i>	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
<i>Pseudomonas balearica</i>	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Pseudomonas beijerinckii</i>	<i>Pseudomonas kilanensis</i>	<i>Pseudomonas resinovorans</i>
<i>Pseudomonas beteli</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>
<i>Pseudomonas boreopolis</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>
<i>Pseudomonas brassicaeorum</i>	<i>Pseudomonas lini</i>	<i>Pseudomonas salomonii</i>
<i>Pseudomonas brenneri</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i>
<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Pseudomonas lutea</i>	<i>Pseudomonas straminea</i>
<i>Pseudomonas carboxydohydrogena</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Pseudomonas caricapapayae</i>	<i>Pseudomonas mandellii</i>	<i>Pseudomonas synxantha</i>
<i>Pseudomonas cedrina</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	<i>Pseudomonas taetiroiens</i>
<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Pseudomonas meliae</i>	<i>Pseudomonas thermotolerans</i>
<i>Pseudomonas cissicola</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	<i>Pseudomonas mephitica</i>	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
<i>Pseudomonas cingulans</i>	<i>Pseudomonas meridiana</i>	<i>Pseudomonas tremae</i>
<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas trivialis</i>
<i>Pseudomonas costantinii</i>	<i>Pseudomonas montellii</i>	<i>Pseudomonas umsongensis</i>
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	<i>Pseudomonas mosselii</i>	<i>Pseudomonas vancooverensis</i>
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>
<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	<i>Pseudomonas multiresinivorans</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
<i>Pseudomonas flavescens</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>
<i>Pseudomonas flectens</i>	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas orientalis</i>	

## Liste des espèces devant être exclues du genre des *Pseudomonas*

*Pseudomonas beijerinckii*  
*Pseudomonas beteli*  
*Pseudomonas boreopolis*  
*Pseudomonas carboxydohydrogena*  
*Pseudomonas cissicola*  
*Pseudomonas flectens*  
*Pseudomonas geniculata*  
*Pseudomonas halophila*  
*Pseudomonas hibiscicola*  
*Pseudomonas mephitica*  
*Pseudomonas pictorum*

Morphologie	Pseudomonas
 <p data-bbox="193 875 480 943"><b>Pseudomonas aeruginosa</b> Microscopie électronique à balayage</p>	<p data-bbox="531 719 1418 813">Ce sont des bacilles habituellement en bâtonnets fins, rectilignes ou plus ou moins incurvés ; mobiles grâce à une ciliature polaire, mais non latérale ; Gram (-).</p> <p data-bbox="563 819 1118 846">Bactéries asporulées, de longueur 2 <math>\mu\text{m}</math> ; <math>\varnothing</math> 0.7 <math>\mu\text{m}</math></p>

### Caractéristiques

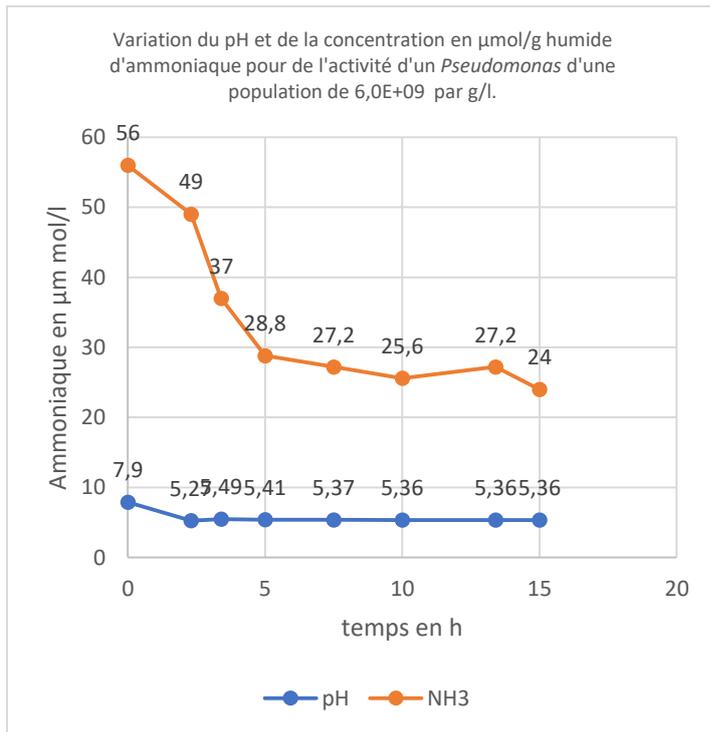
Les *Pseudomonas* sont des bactéries aérobies stricts, chimio-hétérotrophes avec quelques espèces qui sont chimio-lithotrophes et oligotrophes.

Le métabolisme est toujours respiratoire. Elles réduisent les nitrates. Elles possèdent un métabolisme glucidique de type oxydatif avec oxydase (+) (à l'exception *P. maltophilia*), dégradent le glucose par respiration, attaquent les sucres par voies oxydatives et non fermentatives. Généralement mobiles par ciliature polaire (monotriche ou lophotriche<sup>oooo</sup>). Indole (-) ; catalase (+) ; nitrate (+) ; lipase (+) ; oxydase ( $\pm$ ) à l'exception du *P. maltophilia* ; acétates (+) ; arginine-di-hydrolase (+) pour un grand nombre d'espèces (recherchée en milieu de Moeller) ; nitrogénase (-) ; teste de catalase (+) ; exige de l'eau de mer ( $\pm$ ) ; ont plus ou moins la présence de pigment fluorescent. En absence d'oxygène certaines font une respiration nitrate ; Elles utilisent très souvent la voie d'Entner-Doudoroff et dégrade l'arginine.

Les *Pseudomonas* oxydant l'hydrogène sont : *Ps hydrogenothermophila* et *Ps hydrogenovora*

<sup>oooo</sup> **Lophotriche** : cellule comportant deux flagelles

## Réduction de l'ammoniaque en azote gaz par les *Pseudomonas*



### Modification des protéines par les *Pseudomonas*.

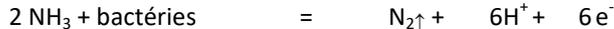
En général les protéines sont transformées par les bactéries afin de devenir leur propre constituant azoté.

La protéolyse réalisée par les microorganismes conduit à des peptides solubles. Les acides aminés sont désaminés en ammoniac, céto-acides, et en acide gras. Les acides aminés peuvent être décarboxylés en  $\text{CO}_2$ , donnant des amines comme la tyramine, la putrescine...

Certains acide aminés particuliers donnent de l' $\text{H}_2\text{S}$  et des mercaptants (cystéine et méthionine), de l'indol (tryptophane).

Dans le cas des *Pseudomonas* on va avoir une dénitrification avec transformation de l'ammoniac de désamination en diazote gaz. Cette synétique de transformation est la résultante du graphique ci-joint, montrant l'abaissement du taux d'ammoniac en fonction du temps.

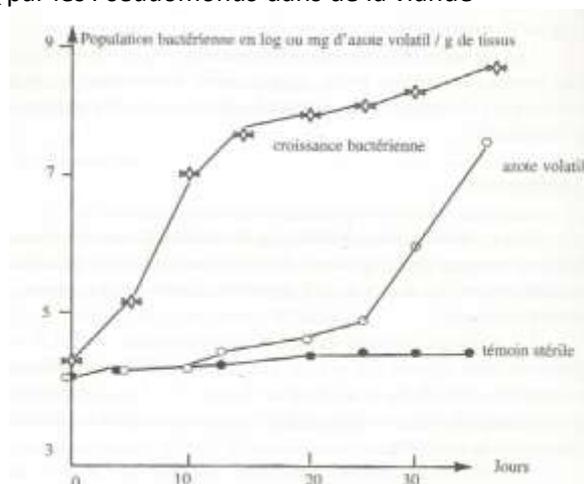
Réaction de la transformation de l'ammoniac en azote ( $\text{N}_2$ )



Si on applique la représentation de Lineweaver et Burk pour la détermination de la cinétique de la diminution de l'ammoniac, la valeur de la constante d'équilibre est :

Constante pour la diminution de $\text{NH}_3$ en fonction du temps	Population bactérienne		Rapport (B/S) dégradation de l'ion ammonium et vitesse d'hydrolyse	
$K_m = 8.6 * 10^{-5} \text{ mol}$ $1/v_0 = 105 \mu\text{mol/h}$	$2,8 * 10^9$	En log = 9,447	$1/s_1 = 0.023$	-10.9 $\mu\text{mol/h}$
	$6,0 * 10^8$	En log = 8,778	$1/s_2 = 0.037$	-0.64 $\mu\text{mol/h}$

Production de di-azote  $\text{N}_2$  par les *Pseudomonas* dans de la viande



« Changement dans l'azote non-protéique pendant la croissance de cultures bactériennes sur de la viande de bœuf »<sup>333</sup>

La production de l'azote gaz par les *Pseudomonas* commence lorsque la croissance ralentit. Ceci peut être interpréter comme un passage d'une activité hétérotrophe en activité chimio-litho-hétérotrophe.

La diminution de l'oxygénation du milieu due au développement de la flore, crée une anaérobiose. Dans une telle condition les *Pseudomonas* vont utiliser une respiration azoté en leur permettant de combler leur demande en électron par le passage de l'ammoniac en di-azote N<sub>2</sub> (respiration azoté)<sup>334</sup>.

### Pigments des *Pseudomonas*

**La pyoverdine** : pigment fluorescent jaune-vert diffusible secrété par : *Ps aeruginosa*, *Ps fluorescens* ; *Ps putida*. Ce pigment est soluble dans l'eau et dans le chloroforme.

Des pigments de nature caroténoïde non diffusibles peuvent être produits par *Ps stutzeri*, *Ps. Mendocina*, *Ps vesicularis*.

La majorité des souches de *Ps diminuta* produisent un pigment brun noir diffusible sur les géloses usuels, après quelques jours d'incubation de 20 à 30°C.

Pour diagnostiquer les *Pseudomonas* le clivage des diphénols par oxydation présentent également un intérêt pour le diagnostic : pour la différenciation entre la présence de *Comamonas* et *Pseudomonas* on a :

- Le méta-clivage : *C. acidovorans*, *C. testosteront*.
- Absence de clivage en « ortho » ou « méta » : *Ps alcaligenes*, *Ps pseudoalcaligenes* : mais pas pour les autres espèces de *Pseudomonas*.

#### Propriétés particulières physiques et visuelles de certains *Pseudomonas*

Structure des pigments des <i>Pseudomonas</i>	<i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ps. fluorescens</i> , <i>Ps. putida</i> , produisent un pigment fluorescent jaune-vert, la pyoverdine, diffusible, soluble dans l'eau et dans le chloroforme. Des pigments de nature caroténoïde non diffusibles peuvent être produits par : <i>Ps. stutzeri</i> , <i>Ps. mendocina</i> , <i>Ps vesicularis</i> . La majorité des souches de <i>Ps diminuta</i> produit un pigment noir diffusible sur les milieux gélosés après quelques jours à incubation de 20 à 30 °C. <u>Pigments des pseudomonas</u>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pyoverdine</li> <li>• Pyocyanine</li> </ul>

Ils produisent d'autres pigments phénaziques pyocyanique, sidérophores (pyoverdine, pyochéline).

### Caractéristiques différentielles :

**Métabolisme des composés en fonction des espèces (galerie API 20E)**

**ADH** : Arginine di-hydrolase ; **ODC** : Ornithine décarboxylase

#### Identification des *Pseudomonas* par galerie API 20 E réf. 20 100

Noms	ADH	GEL	GLU	MAN	IND0	OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
<i>Ps. aeruginosa</i>	87	74	57	0	0	97	12	66
<i>Ps. cepacia</i>	0	46	65	3	1	90	40	0
<i>Ps. Fluorescen</i> / <i>P. putrida</i>	74	27	41	0	0	87	26	0
<i>Ps. pseudomellei</i>	72	91	95	79	75	100	0	92
<i>Ps. spp</i>	10	10	10	0	0	93	46	35
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	0	89	2	0	0	4	28	1

ADH : Arginine (arginine di-hydrolase)  
 GEL : gélatine (gélatinase)  
 GLU : glucose (fermentation)  
 MAN : mannitol (fermentation)

IND : Indole  
 OX : filtre sur papier (cytochrome-oxydase)  
 NO<sub>2</sub> : Production de NO<sub>2</sub>  
 N<sub>2</sub> : production de N<sub>2</sub> avec Zn

## Principaux *Pseudomonas* isolés de la viande

Caractéristiques	<i>Ps Fragi</i>	<i>Ps Lundensis</i>	<i>Ps Fluorescens</i>	<i>Ps Putida</i>
Pigments fluorescents	-	±	+	+
Gélatinase	-	±	+	-
<b>Formation d'acides :</b> A partir du cellobiose Et maltose.	+	+	-	-
<b>Utilisation de :</b> Saccharose	+	-	±	+
Tréhalose	+	-	+	-
Méso-inositol	±	+	+	-
Benzylamine	-	-	-	+

### Identification différentielle des *Pseudomonas* sur les caractéristiques culturales s

N° Nom d'espèces	Groupe A						Groupe B		Groupe C		Groupe D
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nombre de flagelles	1	>1	>1	1	1	1	>1	0	>1	>1	>1
Culture à 4°C	-	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-
Culture à 41 °C	+	-	-	+	+	+	+	+	+(40°)	-	-
Pyoverdine	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyocyanine	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	- ou lente
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilisation respiratoire du NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	+	d	-	+	+	-	+	D	-	-	-
Métabolisme oxydatif du glucose	+	+	+	+	+	d	+	+	+	-	+
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine-di-hydrolase	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Gélatinase	+	+	-	+	-	-	+	D	-	-	-
Amylase	-	-	-	+	-	-	-	+	d	-	-
Lécithinase	-*	+	-	-	-	-	+	D	d	-	-
Esculine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tréhalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

d = différents biotypes ;

\* = positive en milieu liquide.

Groupe *Ps. fluorescens*

(A)

1 : *Ps. aeruginosa*

; 2 : *P. fluorescens* ;

3 : *P. putida*

Groupe *Ps. stutzeri*

(A)

4 : *Ps. stutzeri*

; 5 : *P. mendocina*

Groupe *Ps. Alcaligène*

(A)

6 : *Ps. Alcaligène*

Groupe *Pseudomallei*

(B)

7 : *Ps. Pseudomallei* ; 8 : *P. mallei* ; 9 : *P. cepacia* (multivorans)

Groupe *Ps. acidovorans*

(C)

10 : *Ps. acidovorans* ;

Groupe *Ps. maltophilia*

(D)

## Phylogénétique :

La PCR a permis de classer les *Pseudomonas* en cinq groupes homogènes tout à fait distincts.

Les *Pseudomonas* portent de nombreux plasmides (30 connus pour *Ps. aeruginosa*) et sécrètent des bactériocines (antibactérien).

## Les cinq groupes génomiques de *Pseudomonas*

Groupe ARN	Espèce	Caractère principal	Appellation actuelle	
I	<i>Ps aeruginosa</i> <i>Ps fluorescens</i> <i>Ps putida</i> <i>Ps chlororaphis</i>	Fluorescent oxydase (+)	<i>Pseudomonadaceae</i>	
	<i>Ps syringae</i> <i>Ps viridiflava</i>	Fluorescent oxydase (-)		
	<i>Ps cichorii</i> <i>Ps lundensis</i> <i>Ps stutzeri</i> <i>Ps mendocina</i> <i>Ps alcaligenes</i> <i>Ps pseudoalcaligenes</i> <i>Ps fragi</i> <i>Ps agarici</i> <i>Ps asplenii</i>	Fluorescent, oxydase (+)		
		Non fluorescent		
II	<i>Ps cepacia</i> <i>Ps mallei</i> <i>Ps pseudomallei</i> <i>Ps gladioli</i> <i>Ps caryophylli</i> <i>Ps solanacearum</i> <i>Ps picketti</i> <i>Ps pyrrocinia</i>		<i>Burkholderia</i>	
III	<i>Ps terrigena</i> <i>Ps acidovorans</i> <i>Ps testosteroni</i> <i>Ps andropogonis</i> <i>Ps avenae</i>	Hétérotrophe	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonadaceae</i>
	<i>Ps delafieldii</i> <i>Ps saccharophila</i> <i>Ps facilis</i> <i>Ps flava</i> <i>Ps pseudoflava</i> <i>Ps palleronii</i> <i>Ps taeniospiralis</i>	Autotrophe facultatif	<i>Acidovorans</i> <i>hydrogenophaga</i>	
IV	<i>Ps diminuta</i> <i>Ps vesicularis</i>		<i>Statu quo</i>	
V	<i>Ps maltophilia</i>		<i>Stenotrophomonas</i>	

### Culture

La croissance des *Pseudomonas* est possible dans la zones de la psychrotrophie, seul la ***Ps. Aeruginosa*** se développe à >34 °C. Cette espèce produit de la pyoverdine et de la pyocyanine, pigment diffusibles hydrosolubles.

### Milieux de culture et d'identification du *Pseudomonas*

Agar A, Mk, Me ; agar B, Mk, Me ; agar cétrimide, Mk, O, D, Me, BBL ; agar citrate, lactose, saccharose, désoxycholate (DCLS), Mk ; agar glutamate, amidon, rouge de phénol (GSP), Mk ; Agar Hugh et Leifson, D, M ; agar King A, M, P, Mk ; agar de Leifson ;

**Agars sélectifs :**

*Ps. Aeromonas* (Kielwein), Mk, D ; agar xylose, lysine, désoxycholate, Mk ;  
Bouillon d'enrichissement sélénite (cystine), Mk, Me, P.  
Gélose trypcase soja, Me ; milieu pour *Ps pseudomallei*, P, Acétamide agar, BBL ; Flo agar, BBL ;  
*Pseudomonas* agar, P, D ; *Pseudomonas* CFC agar O ; *Pseudomonas* CN agar O.

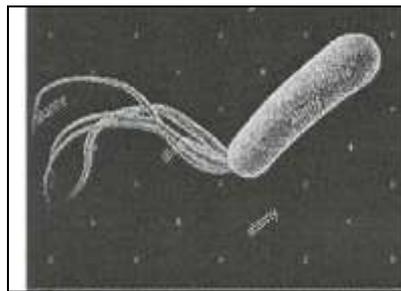
## Environnement

Les *Pseudomonas* ont peu d'exigences nutritives, ils ont comme habitat principal le sol, l'eau douce, l'eau de mer, les plantes et les denrées alimentaires variables. Les *Pseudomonas* se développent à des températures variant de 4 à 42 °C, l'optimum étant 30 °C mais supporte moins les variations de pH (de 6,5 à 7,5 avec un optimum de 7,2). Ils peuvent supporter l'anaérobiose en présence de nitrates. Ils occupent des niches écologiques variées, mais se retrouvent plus particulièrement dans le sol et les milieux humides tels que les eaux douces, les eaux de mer, les eaux thermales. Ils peuvent survivre dans de l'eau distillée, voire se développer dans certaines solutions antiseptiques ou antibiotiques. Ils se retrouvent en plus petite quantité dans les eaux riches en matières organiques (en particulier les eaux stagnantes), conséquence de la compétition entre microorganismes où les *Pseudomonas* ne sont pas les plus performants.

## Habitat

Les *Pseudomonas* sont des bactéries saprophytes de l'air, de l'eau et du sol. Commensaux des téguments et des muqueuses de l'Homme et des animaux ; malgré cela ils peuvent posséder un pouvoir pathogène étendu.

## Espèce *Pseudomonas aeruginosa*



### *Pseudomonas aeruginosa*

Le mot est composé des mots grecs ψεῦδος (*pseûdos*), 'simili' ou 'imitation', et μόνος (*mónas*), 'unité'. On l'a employé dans les débuts de la microbiologie pour désigner les « germes ». *Aeruginosa*, voulant dire vert-de gris en latin (le résultat de la corrosion du cuivre), réfère à un pigment que cette bactérie contient.

## Caractéristiques

Le *Pseudomonas aeruginosa* contient dans sa membrane externe contenant des glycocalyx (qui sont des alginates, présent dans la membrane cellulaire, de beaucoup eucaryotes), et des protéines étant des porines, et peut produire un pili (facteur d'échange de plasmide). Les molécules de surface interférant avec la phagocytose des bactéries ainsi produisant leur destruction sont pour le *Ps aeruginosa* sont un mucus polysaccharide.

## Épidémiologie

Les *Pseudomonas* ont une distribution mondiale. Ces bactéries sont largement répandues dans l'environnement, vivent dans le sol et l'eau. Elles se retrouvent sur les plantes, dans les matières organiques non vivantes (denrées alimentaires), entraînant parfois des altérations organoleptiques. Elles se rencontrent chez l'Homme ou l'animal au niveau des fosses nasales. Elles constituent pour la plupart une flore commensale. Certaines jouent un rôle pathogène. *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce la plus pathogène chez l'Homme et l'animal.

## Pathologie

*Pseudomonas aeruginosa* est aussi connu sous le nom de bacille pyocyanique, bacille du pus bleu ou « pyo ». Pour que *Pseudomonas aeruginosa* devienne pathogène, l'organisme doit présenter une rupture de la barrière de protection, autrement dit une plaie au niveau de la peau ou des muqueuses.

Sont également sensibles à une infection par *Pseudomonas aeruginosa*, les individus présentant une défense immunitaire affaiblie, une diminution des gammaglobulines ou encore les personnes âgées

ou présentant un diabète ou une autre pathologie (cancer, mucoviscidose). C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables ou immunodéprimés. Elle fait partie des germes couramment recherchés lorsque l'on procède à une analyse microbiologique d'un échantillon d'eau.

Le *Pseudomonas* est l'agent du pus bleu des infections cutanées post-chirurgicales. C'est une cause majeure d'infection nosocomiales : ingestion de la peau (cause majeure de mortalité chez les grands brûlés), de l'œil, des oreilles, du système nerveux. Cette bactérie est responsable d'infections urinaires, pulmonaires, digestives et ostéoarticulaires. *Ps aeruginosa* est également l'agent de septicémies et d'endocardites. C'est une bactérie pathogène de nombreux animaux d'élevage.

#### **Facteurs de virulence du *Ps aeruginosa* :**

Caractères morphologiques : glycocalyx (alginate), membrane externe, porines, pili.

#### **Propriétés physiologiques :**

Enzymes : protéases (élastase et protéase alcaline).

Il produit des exotoxines A et S ; des protéases (élastases et protéases alcalines) ; des hémolysines (phospholipide C et glycolipides) ; de la phosphatase alcaline et des endotoxines (LPS, lipide A).

#### **Symptomatologie**

**Voies aériennes inférieures :** elle apparaît essentiellement chez le patient immunodéprimé. On constate l'apparition d'une pneumonie primaire survenant chez les patients ayant déjà une maladie pulmonaire chronique, au cours d'une insuffisance cardiaque, d'un sida, chez les personnes hospitalisées dans une structure de réanimation (celles étant soumises à une ventilation artificielle, les malades traités pour un cancer du sang). *Pseudomonas aeruginosa* peut se développer également chez les patients présentant une mucoviscidose. On peut aussi observer des infections de l'œil et des oreilles.

**Septicémie :** ce germe est fréquemment responsable de septicémies mortelles surtout chez le patient immunodéprimé. Ce sont les infections urinaires, des poumons, du système digestif, de la peau, sont à l'origine de septicémies. Les symptômes en sont les suivants :

**Infections cutanées :** *ecthyma gangrenosum*. Ces lésions sont spécifiques, l'atteinte de la peau apparaissant chez certains patients septicémiques. Les lésions débutent par une vésicule de petite taille, de nature hémorragique, autour de laquelle s'organise une zone érythémateuse. L'évolution de cette lésion se fait vers une nécrose et une ulcération. L'*ecthyma gangrenosum* apparaît en petit nombre au niveau des fesses, du périnée, des extrémités du creux axillaire et moins souvent dans d'autres endroits. Les muqueuses pouvant être atteintes par cette pathologie sont celles de la bouche avec les gencives.

**Infection du système nerveux central :** ce sont généralement un traumatisme direct au niveau de la face, une intervention chirurgicale, une exploration à l'aide d'un instrument souillé, une infection des voies urinaires, des poumons, de l'endocarde, une maladie sous-jacente (cancer de la tête, du cou), etc. Ces pathologies surviennent chez les patients dans un état de faiblesse avancée et immunodéprimés.

**Infection auriculaire :** ce type d'infection est relativement fréquent et touche spécifiquement le conduit auditif externe, essentiellement chez les gens étant en contact fréquent avec l'eau. Cette bactérie est également à l'origine d'otite externe maligne apparaissant le plus souvent chez les personnes âgées et diabétiques. Elle a également été rapportée de façon occasionnelle chez des jeunes enfants présentant d'autres pathologies.

**Infection oculaire :** *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de kératite, d'ulcères de la cornée. Généralement, on retrouve un léger traumatisme de la cornée à l'origine d'une rupture de la membrane de protection de celle-ci, permettant la pénétration des germes envahissants les tissus sous-jacents et provoquent l'infection et les ulcères. Ces ulcères sont également retrouvés à la suite du port de lentilles, essentiellement de lentilles souples. Également les patients ayant eu un séjour en soins intensifs, ayant présenté un coma, ayant une irradiation oculaire ou une trachéotomie.

## Contagion

Cette bactérie semble pouvoir être facilement véhiculée par l'eau, par l'air et par des particules ou surfaces contaminées. La facilité de la contagion s'explique par son caractère omniprésent – par le fait qu'elle peut facilement transférer ou acquérir des gènes de « résistance antibiotique » à partir d'autres bactéries de souches proches, mais aussi d'espèces plus éloignées.

## Facteur de virulence du *Pseudomonas aeruginosa*

### Caractères morphologiques :

Présence de glycocalyx (alginate), membrane externe, porines, pili, ...

### Thérapeutique

*Pseudomonas aeruginosa* est résistant à un grand nombre d'antibiotiques. Il ne faut donc jamais les traiter en monothérapie. Les antibiotiques actifs contre *Pseudomonas aeruginosa* sont les carbapénèmes, certaines fluoroquinolones (la ciprofloxacine à forte dose en est un exemple) ainsi que des céphalosporines de troisième génération (par exemple la ceftazidime).

Étant donné cette résistance à un grand nombre d'antibiotiques et le caractère nosocomial des infections qu'elle détermine, la pratique d'un antibiogramme est fortement recommandée. Les tests par diffusion en milieu gélosé sont préférables aux techniques de micro-dilution.

### Autres espèces de *Pseudomonas*

Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Pseudomonas fluorescens*, *Ps putida*, *Ps cepacia*, *Xanthomonas maltophilia* et à un moindre degré *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudoalcaligenes* et *Ps acidovorans*. Certaines espèces ont un pouvoir pathogène ou des caractères particuliers. Les *Pseudomonas* sont réputés assez résistants aux antibiotiques avec toutefois de grandes disparités selon les espèces.

Sont assez sensibles : *Ps stutzeri*, *Ps pseudoalcaligenes*, *Ps testosteroni*, *Ps diminuta*, *Ps vesicularis*.

Sont polyrésistants : *Ps fluorescens*, *Ps putida*, *Ps cepacia*, *Ps pickettii*, *Ps acidovorans*, *Ps diminuta*.

L'antibiogramme constitue une aide au diagnostic d'espèce.

### Spécificité de la grotte de Sulzbrunn

La publication de l'*ISME journal*, ne définit pas l'espèce de *Pseudomonas* présent dans la cavité, mais signale que le taux d'iode de la grotte risque d'être un facteur limitant du développement microbien. Cette publication propose que les *Pseudomonas* présent puissent être des *Pseudomonas iodooxidans* (Gozlan and Margalith, 1974).

### Espèce *Pseudomonas iodooxidans*

Les snottites contiennent une certaine quantité d'iode ( $482,1 \pm 197,6 \mu\text{g/g}$ ) et ils ont une proportion de *Pseudomonas* de 30 % des *Gammaproteobacteria* de cette structure.

L'oxydation de l'iode est catalysée par un système de peroxydase hémoprotéine produit par la bactérie marine *Pseudomonas iodooxidans*. La présence d'amidon est essentielle pour l'oxydation de l'iode et son influence n'était pas due à ses propriétés d'indicateur. Le glycogène de polysaccharides et cellulose, mais pas de pectine, pourrait remplacer l'amidon dans la réaction. Dextrine, de maltose et de glucose n'ont pas été efficaces. Aucune explication ne peut être donnée à ce stade pour l'exigence d'un polysaccharide élevé pour l'oxydation de l'iode bactérienne.

Cette bactérie a été trouvée dans des eaux souterraines et dans des milieux marins.

### Observation de *Pseudomonas* atmosphériques

Une étude faite sur les nuages par l'équipe de Bruce Moffett, de l'université d'East London, a montré que la vapeur d'eau se condense ou se cristallise à la surface des aérosols ; des particules diverses s'agglomèrent parmi lesquelles figurent des micro-organismes et les molécules qu'ils synthétisent. L'efficacité de ces processus dépend des conditions aérologiques et des propriétés de ces aérosols. Il a été montré que des bactéries du genre *Pseudomonas* produisent des biosurfactants, sorte de détergent naturels diminuant la tension de surface des gouttelettes et accélèrent ainsi leur

croissance, donc la survenue de la pluie. Dans ces gouttelettes une souche de *Pseudomonas syringae* a été isolée<sup>335</sup>.

### 23.1.2 Ordre IV *Methylococcales* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par : J.P. Euzéby<sup>336</sup> début de la nomenclature.

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne dans l'ordre des *Methylococcales* dans les différentes structures est la suivante :

Snottites	≈ 9,8 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 4,9 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 16,9 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	≈ 8.1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	≈ 36 %	sur la flore totale de cette structure

Dans ces résultats les *Crenothrix* ont été mis dans les *Methylococcales*.

### Morphologie

Les *Methylococcales* ont des cellules sphériques ou elliptiques, 0,8 - 1.5 et L 1.2 - 3.0 µm. Généralement se produisent individuellement ou en couple ou occasionnellement en chaînes ; Gram négatifs ; motiles (±); ils sont formés d'un unique flagelle polaire (±), mais pas de flagelles latéraux ; ils forment une phase de kystes de glucane au repos, conférant habituellement une résistance à la dessiccation ; ils peuvent avoir des Cystes ; Dans leur cellule il y a présence de granules constitués de poly-hydroxybutyrate. Ils sont aérobies stricts. Ils ne sont pas des parasites et donc pas parasites pour l'homme.

### Caractéristiques

Les *Methylococcales* : Ils sont des méthanotrophe de type II ; ont un métabolisme respiratoire avec l'oxygène comme accepteur d'électrons. Ils utilisent pour leur constitution le carbone en 1C comme le méthane pour leur énergie (utilise aussi CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>). Ils n'oxydent pas le méthanol en acide acétique ; Ils peuvent avoir une nitrogénase ; Ils ont une oxydase et une catalase positive. Ils utilisent la voie de monophosphate de ribulose pour fixer le formaldéhyde pour le carbone cellulaire.

L'enzyme de la voie transhydrométhylase de sérine<sup>337</sup> et la fixation de l'azote sont absentes.

Ils sont non sensibles à la lyse par le dodécylsulfate de sodium 0,2 %.

Le principal acide gras est C16 : 1,7 c.

Les quinones respiratoires sont l'ubiquinone-8 (Q-8) est le lipo-quinone prédominant.

### Phylogénétique :

Le teneur de l'ADN-ADN en C+G est de 29 à 34 môle %

### Culture

Les *Methylococcales* sont mésophiles, avec une croissance optimale entre 30 C et 35 C.

Une espèce des *Methylococcales* nécessite des ions sodium et autres facteurs de croissance.

Ils n'ont pas de croissance dans une solution de NaCl de > à 12 %

### Habitat

Les *Methylococcales* ont été isolées dans des sédiments de lacs d'eau douce et rivières, les boues humides, les boues activées et des eaux usées.

### Taxonomie

Les *Methylococcales* appartiennent à l'embranchement des *Gammaproteobacteria* :

### Ordre des *Methylococcales* ; Famille *Methylococcaceae*

Auteurs ayant étudié cet ordre : (Romanovskaya, Malashenko et Bogachenko, 1978) Bowman, Sly, Nichols et Hayward, 1993 b, 749 (*Methylococcus luteus* Romanovskaya, Malashenko et Bogachenko 1978, 123 ; Bovis de *Methylococcus* Romanovskaya, Malashenko et Bogachenko 1978, 123)<sup>338</sup>.

### Familles de cet ordre :

- *Methylococcaceae* nom donné par (Whittenburg and krieg, 1984)
- *Methylothermaceae* nom donné par (Heryama et al., 2014)
- Selon les auteurs : *Crenotrichaceae* ?

#### 23.1.2.1 Famille *Crenotrichaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne dans la famille des *Crenotrichaceae* dans les différentes structures est la suivante :

Snottites	≈ 2,3 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 0,4 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 14,3 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	≈ 4,1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	≈ 1,6 %	sur la flore totale de cette structure

### Ordre des *Methylococcales* ; Famille *Crenotrichaceae*

Certains auteurs mettent cette famille dans l'ordre des *Sphingobacteriales*

#### Genres dans la famille des *Crenotrichaceae*

- *Balnella* : (bactérie marine isolée des eaux de surface en méditerranée nord-occidentale)
- *Chitinophaga* : (peut être mis dans l'ordre des *Sphingobacteriales*)
- *Rhodothermus* : (peut être mis dans l'embranchement des *Bacteroidetes*), bactéries halophiles, thermophiles.
- *Salinibacter* : (embranchement des *Bacteroidetes* de l'Ordre II, *Rhodothermaceae*, *Salinibacter* « Anton et al. 2002 »), bactérie halophile la bactérie ***Salinibacter***, elle a une concentration en sel idéale entre 20 à 30 % de sel.
- *Terrimonas* : (peut être classée dans les *Chitinophagaceae* dans l'ordre des *Sphingobacteriales*) bactérie aérobie.
- *Toxothrix* : (*Gammaproteobacteria*, Ordre des *Toxothrichales* ; Famille *Toxothrichaceae*), bactérie sulfuro-oxydante, filamenteuse.
- *Crenothrix* :

#### 23.1.2.1.1. Genre *Crenothrix* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne du genre *Crenothrix* dans les différentes structures est la suivante :

Snottites	≈ 2,5 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 0,3 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	13 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	≈ 4,1 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	≈ 1,2 %	sur la flore totale de cette structure

Les espèces du genre *Crenothrix* n'étant pas spécifiée dans l'étude de la grotte de Sulzbrunn, les espèces prises en référence seront les plus connues ou les plus étudiées.

#### Espèce *Crenothrix polyspora*

#### Ordre *Sphingobacteriales* ; Famille *Crenotrichaceae* ; Genre *Crenothrix*

*Crenothrix polyspora* a été découvert et décrit par Cohn en 1870 alors qu'il étudiait les précipités floconneux marron ayant rendus l'eau non potable.

#### Morphologie

*Crenothrix polyspora* est une bactérie Gram (-), non flagellée, donnant des amas filamenteux effilés avec parfois de fausses ramifications, pouvant atteindre 1 à 2 cm de longueur. Ces filaments gainés ont présenté un cloisonnement par la séparation longitudinale des cellules. Ils sont souvent attachés à une substance solide. Ils sont formés de cellules cylindriques immobiles formées de disques de 0,6 à 5 µm ; Ils n'ont pas de cellules en forme de disque ; aux extrémités libres du filament, étant

incrustés d'oxyde de fer ou de manganèse, on a des cellules de propagation sphériques que l'on appelle macro-gonidia (cellules en formes de bâtonnet) cette partie se libère par l'extrémité de la gaine et forme un nouveau filament. Elle comporte de fausses ramifications ; les cellules ont une séparation longitudinale ;

De nombreuses petites cellules cubiques se décollent et forment les multiples micro-gonidia se dispersant par l'extrémité du filament. Les analyses structurales révèlent que le ***Crenothrix polyspora*** a plusieurs couches de gaines complexes protéines-polysaccharides-lipides entourant les filaments. Les coupes minces des cellules individuelles montrent que ces bactéries possèdent des systèmes de membranes élaborées sous forme d'empilements lamellaires.

Cette structure ressemble à des thylakoïdes des cellules photosynthétiques. L'analyse spectrophotométrique n'a donné aucune indication sur la présence de pigments photosynthétiques.

### Caractéristiques

***Crenothrix polyspora*** est une bactérie aérobie facultative, chimio-hétérotrophe, Elle utilise les acides organiques et les glucides comme source de carbone. Elle oxyde le fer et le manganèse sans que cette oxydation entre dans le système de production d'énergie (provoquant des accumulations de Fe et Mn), qu'elle dépose dans ses gaines. Elle possède une enzyme méthane mono-oxydase très inhabituelle la différenciant des autres bactéries méthanotrophes. ***Crenothrix polyspora*** est une bactérie oxydante du fer ferreux et produit des dépôts gélatineux. L'oxyde de fer en résultant est insoluble et apparaît comme une boue gélatineuse.

### Analyse Phylogénétique

L'analyse phylogénétique a été faite sur le ***Crenothrix polyspora*** car il a la possibilité de produire une oxydation en aérobiose sur le méthane, étant une étape clef dans l'élimination du carbone atmosphérique.

L'avantage de cette bactérie sur les autres méthanotrophes est d'assimiler des substances ayant des liaisons carbone-carbones.

De plus c'est le premier oxydant méthanique ayant une structure filamenteuse avec un cycle complexe avec plusieurs stades de développement morphologiques distincts. Son analyse génomique permet de mieux comprendre les cycles complexes de cet organisme et d'identifier les causes de son développement massif occasionnel.

Les caractères de l'oxydation du méthane du ***Crenothrix*** ont été assignés d'un enzyme appelé monooxygénase de méthane (MMO) particulière ayant été apparenté à un MMO « classique » de *Gammaproteobacteria* méthanotrophes.

Cette affectation montre que ***Crenothrix*** a dans son ADN un gène *PmoA* typique *Gammaproteobacteria*<sup>339</sup>.

L'imagerie spectrométrique de masse des isotopes stables a révélé une croissance cellulaire en présence d'oxygène pour le ***Crenothrix*** dépendant de méthane lacustre (des lacs), ainsi que dans des conditions de manque d'oxygène le ***Crenothrix*** a un génome encodé pour utilisation des voies de respiration utilisant l'oxygène produit par la réduction des nitrates en nitrites.

La croissance planctonique des ***Crenothrix*** suggère que ces méthanotrophes peuvent agir comme un puits biologique pertinent pour l'élimination du méthane stratifié au fond des lacs. Ils devraient être examinés dans le contexte d'élimination du méthane environnemental.

### Culture

***Crenothrix polyspora*** pousse de 10 à 40 °C, tolère un pH de 5 à 10.

**Enrichissement** : peptone, glucose, sulfate de magnésium, chlorure de calcium, chlorure de fer (milieu liquide) à pH 7

**Milieu d'isolement** : extrait de viande, extrait de levure, citrate de sodium, vitamine B12, agar, à pH7 SIM Médium Difco + 0,5 % extrait de levure.

### Environnement

Ces bactéries filamenteuses sont connues comme des contaminants de l'eau potable depuis 1870, mais leur rôle dans l'élimination du méthane environnemental est resté incertain.

Bactérie présente dans l'eau, on peut la trouver dans des puits et d'autres installations hydrauliques où des dépôts de substances organiques peuvent produire un microbisme induit par la corrosion (MIC). Ces bactéries forment des amas en formes de tubercules.

Cette bactérie peut causer de graves problèmes opérationnels, d'entretien et de corrosion des métaux. Ces organismes ont tendance à s'accumuler dans les canalisations et réservoir pendant les périodes de faible débit en créant des problèmes de coloration et d'odeur.

Principaux problèmes causés par cette bactérie :

- Équipement et tuyauterie corrodée.
- Teneur accrue en matière organique favorisant la multiplication microbienne.
- Coloration de l'eau et des parties humides.
- Attaque de l'acier inoxydable.

***Crenothrix polyspora*** par son caractère hétérotrophe peut s'adapter aux différents milieux et conditions climatiques. Il présente donc un intérêt pour ses propriétés méthanotrophes étant moins dépendantes des conditions du biotope que les autres méthanotrophes dans la purification méthanique de l'atmosphère.

### Biotechnologie

Le ***Crenothrix polyspora***, bactérie oxydant le méthane, représentant un atout biologique majeur dans la protection naturelle de notre planète contre ce gaz à effet de serre.

Dans deux des lacs d'eau douce, où a été accumulé une partie substantielle de méthane diffusant par des fermentations naturelles, la présence de *Gammaproteobactéria* filamenteuses associées à ***Crenothrix polyspora*** a réduit cet amoncellement par l'oxydation du méthane produit.

Ses propriétés culturales permettent de produire cette bactérie avec plus de facilité que les autres méthanotrophes. Elle s'adapte mieux aux biotechnologies actuelles.

### ***Crenothrix* dans le karst**

Dans la grotte de Sulzbrunn, ***Crenothrix*** se trouve en majorité dans le biofilm « submersed » pour 8,4 % du total de la flore méthylotrophe. Cette bactérie étant recouverte d'une gaine faite de protéines-polysaccharides-lipides, pourrait peut-être jouer un rôle dans la formation de la structure des biofilms et des snottites de cette grotte.

### Composition élémentaire des snottites

(ISME Journal)

<b>Carbone :</b>	<b>37 %</b>	C/P : 4727
<b>Azote :</b>	<b>0,6 %</b>	N/P : 82
<b>Phosphore :</b>	<b>0,01 %</b>	lode : 482,1 ± 197,6 µg /g
Le fer et les sulfures sont abondants dans ce biofilm		

Le potentiel d'oxydation du méthane dans ce biofilm est important. Les teneurs examinées dans les nitrates minéraux des échantillons prélevés ont donné 16 000 ppm de CH<sub>4</sub>.

Les teneurs en CH<sub>4</sub> transformées par le biofilm « subaerial » par jour sont de 3 µg/g de biofilm/J et dans les snottites, mais elle est de 26 µmol/g de biofilm/j pour le biofilm « submersed ».

La microscopie laser effectuée sur les biofilms a montré dans ce biofilm la présence de globules glycoconjugués étant en partie des cellules bactériennes en amas et dispersées.

Nous pouvons supposer que le ***Crenothrix*** est à la fois une bactérie fer oxydante, oxydante du méthane et productrice d'une gaine polysaccharidique. Cette bactérie a dû jouer un rôle important dans la composition des biofilms et des snottites.

### Pathologie

La littérature scientifique ne signale pas de pathologie humaine pour cette espèce.

### 23.1.2.2 Famille *Methylococcaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Pribram, en 1929.

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne dans la famille des *Methylococcaceae* dans les différentes structures est la suivante :

Snottites	≈ 8,4 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 4,5 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 16,9 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	≈ 3,9 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	≈ 36 %	sur la flore totale de cette structure

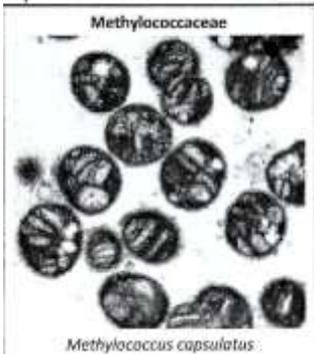
Dans ces résultats les *Crenothrix* ont été mis dans les *Methylococcales*.

### Embranchement *Gammaproteobacteria* ; Ordre *Methylococcales* ; Famille *Methylococcaceae*

#### Genres appartenant à cette famille

<i>Methylobacter</i> (Bowmann and al. 1993)	<i>Methylomagnum</i> (Khalifa and al. 2015)	<i>Methylosarcina</i> (Wise and al. 2001)
<i>Methylocaldum</i> (Bodrossy and al. 1998)	<i>Methylomarinum</i> (Hirayama and al. 2013)	<i>Methylosoma</i> (Rahalkar and al. 2007)
<i>Methylococcus</i> (Forster and Davis 1966)	<i>Methylomicrobium</i> (Bowmann and al. 1995)	<i>Methylophaera</i> (Bowman and al. 1998)
<i>Methylogaea</i> (Geymonat and al. 2001)	<i>Methylomonas</i> (Leadleter 1974)	<i>Methylothermus</i> (Tsubota and 2005)
<i>Methyloglobulus</i> (Deutzmann and al. 2015)	<i>Methyloparacoccus</i> (Hoefiman and al.2014)	<i>Methylovulum</i>
<i>Methylohalobus</i> (Heyer and al. 2005)	<i>Methyloprofundus</i> (Tavormina and al. 2015)	

### Morphologie

	<p style="text-align: center;"><b>Methylococcaceae</b></p> <p><i>Bactéries Gram (-)</i> <i>Ils sont de forme :</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Soit batonnets ;</li><li>• Soit des coccobacilles de diamètre inférieur à 2 µm.</li><li>• Ils comportent des Cystes</li></ul> <p><i>Mobilité ± ; flagelles polaires ± ; pas de flagelles latéraux ; pas de croissance dans l'eau à 12 % de NaCl ; n'exige pas de l'eau de mer ; n'a pas de pigment fluorescent ;</i></p> <p><i>Membrane intracytoplasmique contenant des faisceaux sous forme de disques vésiculaires aplatis perpendiculaires à la paroi cellulaire.</i></p>
---	--

### Caractéristiques biochimiques

Les *Methylococcaceae* sont des bactéries formant leur carbone cellulaire et leur énergie à partir du méthane avec une activité méthanotrophe de type II (cycle ribulose monophosphate, RuMP) ; Elles utilisent le méthane, le méthanol, les aminés méthylées (diméthyl-sulfoxyde et le diméthyl-sulfure) comme source d'énergie, grâce à une méthane-monooxygénase (MMO), des bactéries méthanotrophes incapables d'utiliser les molécules à liaison carbone-carbone. Elles produisent du formaldéhyde, le formaldéhyde se combinant avec le sucre ribulose produit de l'hexose (6C) et autres acides organiques ; Cette production va donner des glycéraldéhydes entrant dans le cycle de l'acide citrique.

Elles fixent le gaz carbonique. Il existe dans cette famille des genres pouvant se développer sur des composés à plusieurs carbones. Elles sont souvent appelées méthanotrophes.

Bactéries susceptibles d'utiliser le méthane	Germes utilisant seulement le méthanol
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Methylobacterium</i></li> <li>• <i>Methylomonas</i></li> <li>• <i>Methylococcus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Methylobacillus</i></li> <li>• <i>Methylophaga</i></li> <li>• <i>Methylophilus</i>.</li> </ul>

#### Méthylotrophes facultatifs (qui utilisent à la fois les liaisons C1 et les liaisons C-C)

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acaricomes</i></li> <li>• <i>Arthrobacter</i></li> <li>• <i>Auriticoccus</i></li> <li>• <i>Enteroactinococcus</i></li> <li>• <i>Hyphomicrobium</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Kocuria</i></li> <li>• <i>Micrococcus</i></li> <li>• <i>Nesterenkonia</i></li> <li>• <i>Renibacterium</i></li> <li>• <i>Rothia</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sinomonas</i></li> <li>• <i>Tersicoccus</i></li> <li>• <i>Yaniella</i></li> <li>• <i>Zhierrgliuella</i></li> </ul>
---	---	--

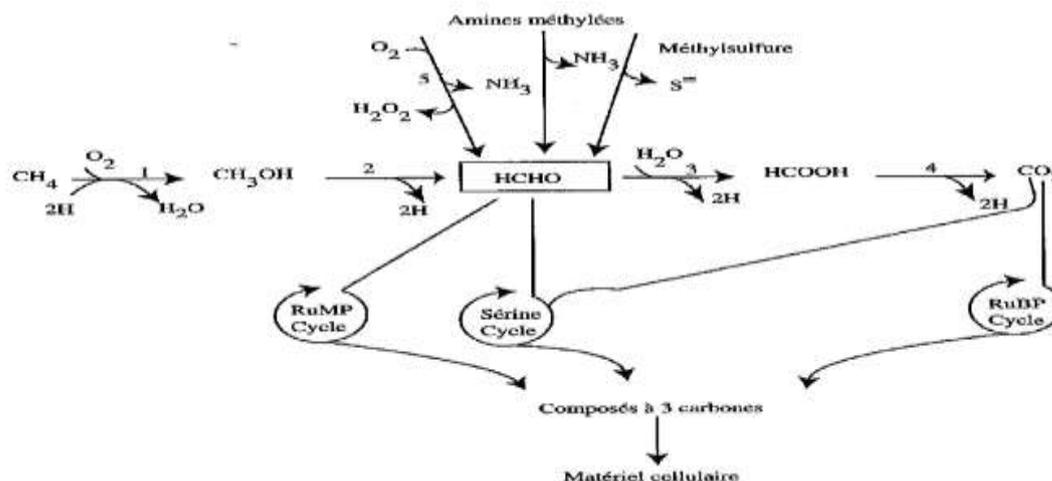
Certains genres de cette famille peuvent avoir une nitrogénase (+), le cycle (TCA) d'acides tricarboxyliques (-), mobilité (-) et une croissance à 45 °C (ex : *Methylococcus capsulatus*).

#### Généralité du Type II

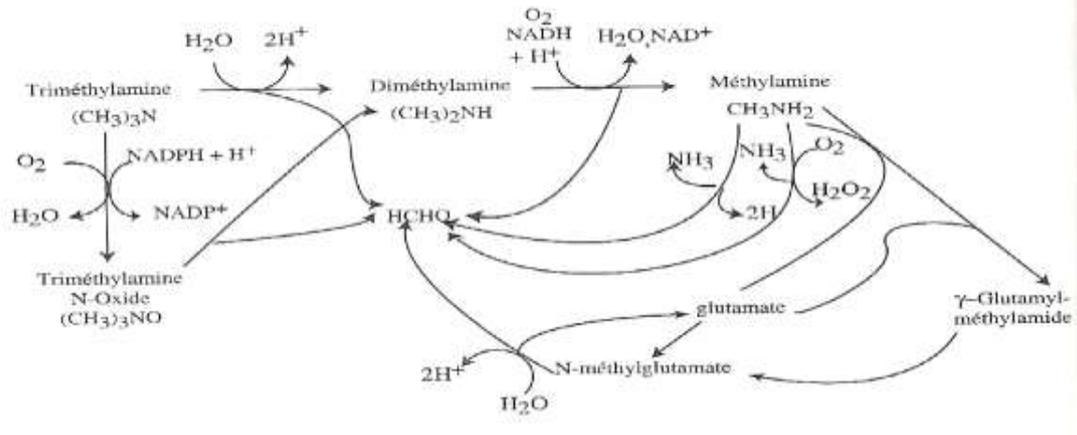
Elles oxydent le méthane grâce à l'enzyme méthane monoxygénase (MMO) en donnant du formaldéhyde par le cycle ribulose. Ici le formaldéhyde est fixé au groupe cyclique ribulose mono phosphate donnant un glycéraldéhyde, servant à produire du ribulose et autres composés organiques, entrant dans le cycle énergétique appelé Cycle de Krebs. Le catabolisme n'implique pas un Cycle de Krebs complet.

L'assimilation du carbone (HCHO/aldéhyde formique) se fait par la voie du RBP. La conversion des amines méthylées et des soufres méthylés (voir page 223)

En conditions aérobies, il se produit un arrangement entre l'oxygène et le méthane pour former le formaldéhyde, étant ensuite incorporé dans le cycle organique de la voie de la sérine ou la voie ribulose monophosphate.



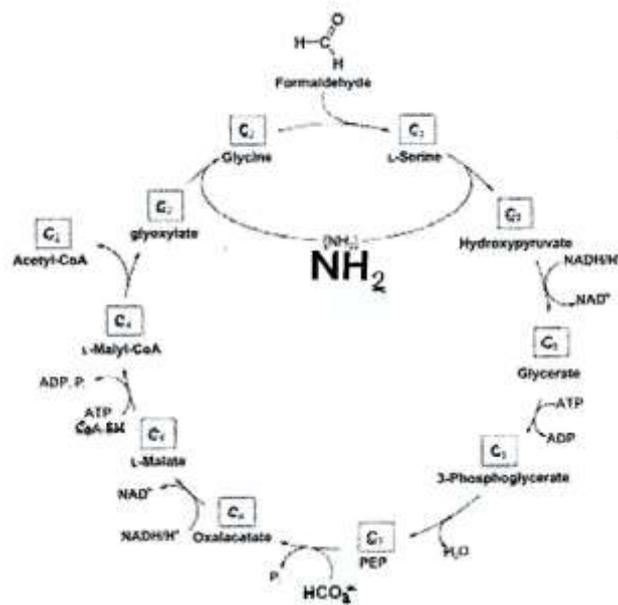
Métabolisme des composés à 1 carbone par les bactéries aérobies méthylotrophes



Voie de conversion des amines méthylées en formaldéhyde

Il y a différents systèmes d'utilisation et de fixation du formaldéhyde divisant les méthanotrophes en plusieurs groupes.

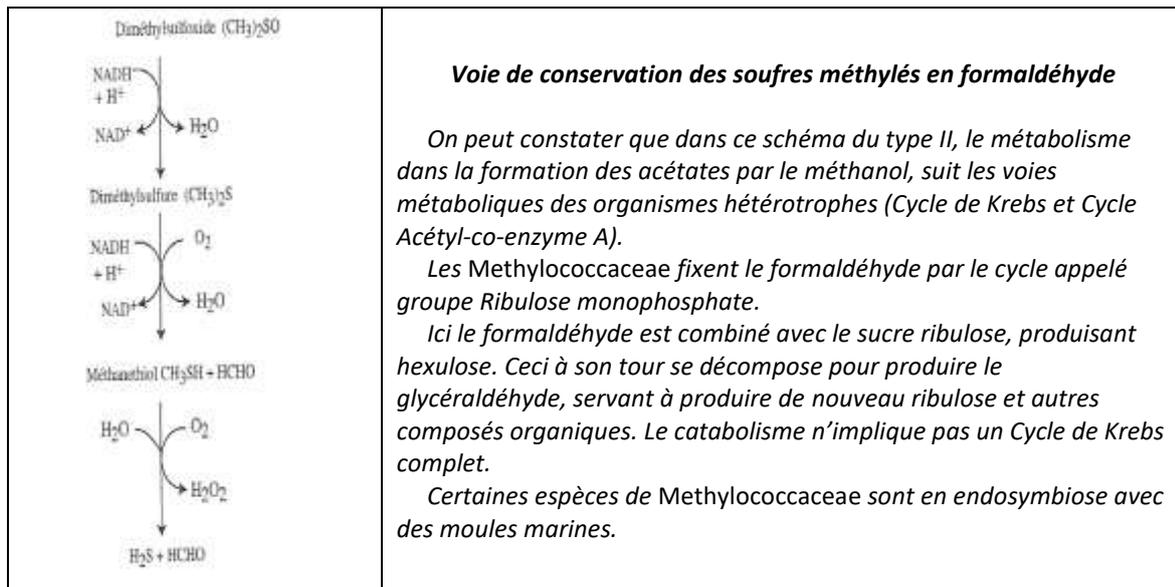
Les méthanotrophiques sont un cas particulier des méthylotrophiques, car ils utilisent des composés de carbone unique étant réduit aux substrats composés d'un seul carbone (méthane, gaz carbonique...), n'étant pas le cas des méthylotrophes.



Voie du ribulose monophosphate pour l'assimilation du formaldéhyde par les bactéries du type II (Voir aussi p 222)

Les différents systèmes et voies métaboliques des méthanotrophes ont pour des raisons systématiques fait diviser en quatre sous-groupes l'ensemble des méthanotrophes :

- Deux groupes (MAB) de bactéries assimilant le méthane (méthanotrophes).
- Deux groupes de bactéries autotrophes, oxydant le méthane et l'ammoniaque (AAOB).



### Autres caractéristiques de la famille des *Methylococcaceae*

Les *Methylococcaceae* ne sont pas autotrophes facultatifs pour l'hydrogène ; Ils n'oxydent pas systématiquement le méthanol.

### Phylogénétique

L'analyse des valeurs (G+C) contenu dans l'ADN-ADN sont de 46 à 51 mol%, faisant mettre la famille de *Methylococcaceae* dans les *Gammaproteobacteria*.

Cette famille est polyphylétique et comprend trois classes distinctes. Néanmoins les trois classes ont toutes des caractéristiques typiques des méthanotrophes, comprenant des membranes intercellulaires en piles lamellaires n'étant pas habituel des types bactériens, comportant une mono oxygénase de type I et de l'utilisation de la voie mono-phosphate ribulose assimilant une seule unité carbone<sup>340</sup>.

### Culture

Le milieu retenu est le milieu pour le genre *Methylophaga*.

#### Milieu :

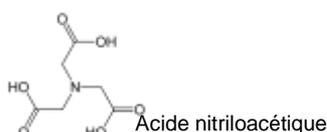
- Solution agar : agar 30g, eau distillée QSP 1000ml avec stérilisation.
- Base Minérale 2x : NaCl 24g, MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 3g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 2g, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 1g, KCl 0.5g, Bis-Tris tampon (bis [hydroxyéthyl] imino tris [hydroxyméthyl]-méthane 0.5g. Solution minérale de Wolfe 10ml. Amener le pH à 7.3 ; Stériliser.

**Solution minérale de Wolfe :** MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 3g, acide nitriloacétique<sup>pppp</sup> 1.5g, NaCl 1g, MnSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O 0.5g, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.1g, CoCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.01g, CaCl<sub>2</sub> 0.1g, ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.1g, CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O 0.01g, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-12H<sub>2</sub>O 0.01g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.01g, ajouter l'acide nitrilo-acétique à 500ml d'eau distillée. Dissoudre et ajuster le pH à 6.5 avec KOH 6N amener à QSP 1000ml.

**Solution tampon (T) :** NH<sub>4</sub>Cl 10g, Bis-Tris tampon (bis[2-hydroxyéthyl] imino-tris [hydroxyméthyl]-méthane 10g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7g, citrate ferrique et d'ammonium 0.3g, amener à QSP 100ml ; ajuster le pH à 7.3.

**Solution de vitamines :** Vitamine B12 1µg, eau distillée QSP 10ml, stériliser par filtration.

<sup>pppp</sup> **Acide nitriloacétique :** L'acide nitrilotriacétique (noté aussi NTA) est un acide tricarboxylique de formule brute C 6 H 9 N 1 O 6. Le NTA peut se lier avec les ions métalliques, par réaction chimique de complexation, et forme ainsi des complexes hydrosolubles.



## Environnement

Les *Methylococcaceae* sont des germes méthanotrophes se reproduisant principalement dans les sols et sont particulièrement fréquents dans les endroits où le méthane est produit (sol, rizières et les décharges). Leur habitat est variable, il comprend les océans, les boues, les marais, les environnements souterrains, les sols...

L'oxydation du méthane par les communautés microbiennes des salines et des lacs a été prouvée par l'action des *Gammaproteobacteria* méthanotrophes (type I) (Trostschenko & Khmelenina, 2002 ; Lin et al., 2004). Plusieurs espèces de bactéries méthanotrophes halophiles tolérantes de type I ont été isolées en culture pure et caractérisées (Khmelenina et al., 1997 ; Kalyuznaya et al., 1999 ; Heyer et al., 2005).

Les *Methylococcaceae* se trouvent dans n'importe quel environnement où le méthane et l'oxygène coexistent y compris dans les zones froides. Dans cette famille, certains genres peuvent entrer en endosymbiose avec les espèces de la faune et de la flore marine. Sur le plan écologique, les *Methylococcaceae* sont reconnus comme jouant un rôle essentiel par leur activité méthanotrophe interceptant une grande partie du méthane généré par les catabolismes naturels. Cette famille a donc une grande importance dans le cycle du carbone et dans les processus homéostatiques naturels de la Terre.

## Biotechnologie

Les genres de la famille des *Methylococcaceae* offrent un intérêt particulier pour les chercheurs étudiant le réchauffement climatique, par le fait qu'ils peuvent réduire le budget global du méthane. Les méthanotrophes anaérobies (AOM) se reproduisent dans les habitats marins anoxiques et les sédiments d'eau douce.

Les genres de la famille des *Methylococcaceae* sont appréciés pour leur efficacité dans les filtres industriels par leur activité méthanotrophe type I comme dans les stations d'assainissement.

Plus précisément elles contrôlent les émissions de méthane provenant des diffusions variées dans l'environnement (Higgins et al., 1980 ; Hanson, 1996)<sup>341</sup>. L'intérêt croissant des méthanotrophes pour le recyclage dans l'environnement devient un atout majeur dans la protection de la couche d'ozone. Dans les dernières décennies, notre savoir de la diversité et la distribution des bactéries méthanotrophes dans l'environnement a été exacerbée.

### 23.1.2.2.1 Genre *Methylovulum* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Iguhi & coll., 2011.

Dans la cavité de Sulzbrunn le genre *Methylovulum* est représenté sur la flore totale de chacune des structures :

Snottite	0,9 %	du total des méthylootrophes de la structure
Biofilm « subaerial »	0,4 %	du total des méthylootrophes de la structure
Biofilm « submersed »	7,4 %	du total des méthylootrophes de la structure
Eaux de source minérale	1,4 %	du total des méthylootrophes de la structure
Eaux de mélange	27,6 %	du total des méthylootrophes de la structure

Dans la grotte de Sulzbrunn cette bactérie représente 28 % de la flore totale des eaux de mélange.

### Ordre *Methylococcales* ; Famille *Methylococcaceae* ; Genre *Methylovulum*

Étymologie : *ovulum* = petit œuf (morphologie en forme de petits œufs)

**Espèce la plus connue : *Methylovulum miyakonense iguchi***, (Yurmoto and Sakai, 2011).

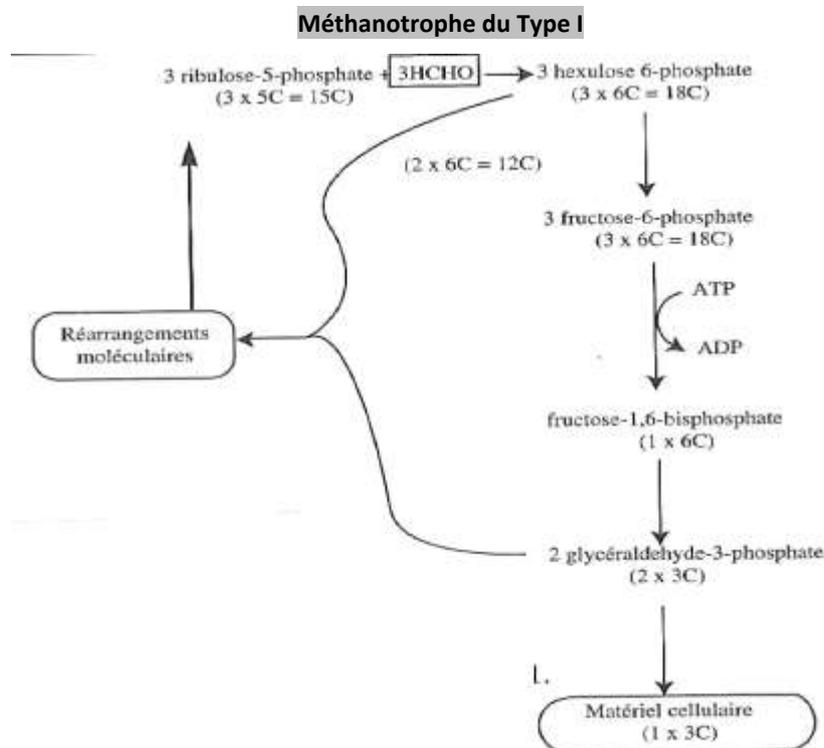
### Morphologie

Les bactéries du genre *Methylovulum* sont de Gram (-), elles ont une forme de grand cocci contenant des lamelles en formes de disques perpendiculaires à la paroi, elles sont immobiles. Les cellules sont à la lumière de coloration rose pigmenté, encapsulé, elles contiennent un système de membrane intracytoplasmique typique des méthanotrophes de type I.

## Caractéristiques

Les *Methylovulum* utilisent le méthane et le méthanol comme source de carbone et d'énergie. Bactéries aérobies strictes, elles sont méthanotrophes obligatoires. Les *Methylovulum* utilisent deux formes de méthane mono-oxydase, *pMMO* et *sMMO* pour l'oxydation du méthane.

Des études récentes sur des bactéries ont montré l'importance de la méthane mono-oxydantes (*MOBs*) utilisant seulement le méthane et le méthanol pour le recyclage de ce gaz sous forme de carbone (Dedysh et coll. 2001). Mais très peu d'informations ont été recueillies sur l'écologie de ces microorganismes sur le plan climatique : la régulation atmosphérique demande un long gradient de régulation (Artz et coll. 2007). Des études sur la relation des paramètres climatiques et des étapes types (Type I, Type II, AcidM181) de régulation ont été étudiées sur quatre types de tourbières européennes, étant (CH, F, UK, Eire). Les analyses ont été effectuées sur ces quatre tourbières européennes par la méthode PCR sur ARNr 16s avec sonde fluorescent, suivie d'une analyse statistique par la méthode linéaire multifactorielle pour définir les axes principaux, expliquée et comparée au dégagement du méthane. Il a été montré qu'il y a une forte relation entre les gènes étant du type *MOBs* microbien. Cette observation montre que les enzymes de Type I (voie ribulose mono phosphate) ont eu une influence négative contrairement au Type II (voie de la sérine pour l'assimilation bactérienne du formaldéhyde) semblant plus efficace.



Voie du ribulose monophosphate pour l'assimilation du formaldéhyde par les bactéries du type I  
Jean Paul Larpent *Méthode technique de microbiologie*, ed Lavoisier, 1999, p.316

Les principaux acides gras cellulaires sont C16 :1 $\omega$ 5c ; C16 :1 $\omega$ 6c ; C16:1 $\omega$ 7c ; C16 :1 $\omega$ 8c ; C16 :0 et C14 :0.

## Phylogénétique

L'analyse de séquençage par l'ARNr 16s montre que le genre *Methylovulum* diffère de 7 % du genre *Methylosoma*. La teneur en base de l'ADN de l'espèce *Methylovulum miyakonense* en G + C mol% est de 49,3 (par HPLC). Pour les *Methylovulum* de souche Sph1, Sph2 et OZ2 la teneur de l'ADN-ADN en (G+C) est de 51,4- 51,9 mol %.

Ces souches sont presque identiques avec une similarité de (99,1 à 99,7%) le séquençage révèle une appartenance à la famille des *Methylococcaceae* de la classe des *Gammaproteobacteria*. La souche la plus apparentée est *Methylovulum miyakonense* HT12 (96,0 – 96,5 % de similarité). Le séquençage révèle que le gène *pmoA* a une similarité dans les souches de 90 %.

Les isolats cependant diffèrent des souches Sph1, Sph2 et OZ2 avec la souche *Methylovulum miyakonense* par son phénotype : morphologie cellulaire et pigmentation, avec absence de méthane monooxygénase soluble et une croissance plus large, dans la gamme de pH, elle montre une teneur de l'ADN-ADN en (G+C) plus élevée dans les souches Sph1, Sph2 et OZ2.

Sur les bases de cette différence l'auteur de ces recherches – Svetlana N. Dedysh – propose une nouvelle espèce de *Methylovulum* souche Sph1 sous le nom *Methylovulum psychrotolerans* pour les souches Sph1 (LMG 29227 = VKM B-3018).

### Culture

La température de croissance est de 25 à 30 °C, en milieu neutre avec un pH (6,5) et en présence de méthane comme source d'énergie. Les souches de *Methylovulum Sph1, Sph2 et OZ2* sont capables de se développer à un pH de 4 à 8,9 (optimum pH 6 à 7). Leur température de développement entre 20 et 25 °C, mais peut se développer jusqu'à des températures de 4 °C.

**Milieu de culture** : voir page 336 *Methylophaga*.

### Environnement

Deux isolats de bactéries de *Methylovulum* aérobies méthanotrophe, souches Sph1 et Sph2, proviennent de suintements de méthane froid dans une plaine inondable de la rivière Mukhrinskaya, bassin de l'Irtych, en Sibérie occidentale. Une autre souche morphologiquement et phénotypiquement semblable étant la souche OZ2, ayant été isolée dans un sédiment d'un lac d'eau douce subarctique, région d'Archangelsk, Nord de la Russie.

Les *Methylovulum* se trouvent dans les sols des forêts humides et dans les sédiments lacustres. Dans les tourbières du Sud du Brésil, il a été identifié 1 % de bactéries méthanogènes étant la cause de production du méthane. Après abandon, la régénération spontanée des tourbières peut devenir une source importante de méthane atmosphérique (Basiliko and al., 2007).

Une autre étude sur les incidences climatiques sur le dégagement du méthane des sols de la forêt boréale montre que la limitation, des précipitations estivales, augmente généralement l'absorption du méthane par le sol.

### Pathologie

La littérature ne donne aucune information à ce sujet.

#### 23.1.2.2.2 Genre *Methylobacter* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Bowman & coll., 1993.

Dans cette grotte les *Methylobacter* représentent environ 10 % du total de la flore du biofilm « submersed » et de plus faibles pourcentages dans les snottites et les biofilms « subaerial ».

Dans la cavité de Sulzbrunn, au sein des méthylophages, le genre *Methylobacter* représente :

Snottite	Nd	du total des méthylophages de la structure
Biofilm « subaerial »	Nd	du total des méthylophages de la structure
Biofilm « submersed »	10 %	du total des méthylophages de la structure
Eaux de source minérale	1,9 %	du total des méthylophages de la structure
Eaux de mélange	0,5 %	du total des méthylophages de la structure

**Ordre *Methylococcales* ; Famille *Methylococcaceae* ; Genre *Methylobacter***

#### Espèce *Methylobacter luteus*

##### Morphologie

Les *Methylobacter* ont une forme soit sphérique, soit en bâtonnet ellipsoïde, de dimensions pouvant varier de 0,8 à 1,5 µm et 1,2 à 3 µm de longueur, se produisant habituellement par deux ou par chaînes. Ils sont de Gram (-), certains sont mobiles, d'autres sont immobiles ; ils ont un flagelle unique et polaire ; Ils comportent des cystes ; En stade de repos, pour résister aux conditions de la déshydratation, la bactérie forme un kyste avec une morphologie comprenant une région nucléaire, entourée d'un manteau de kystes, étant l'exocystorium (extra-structure des végétaux) et de deux

couches de l'exine<sup>qqq</sup> en glucane, Il se forme une accumulation de granules de poly-hydro butyrates s'accumulant dans l'interstice des parois. Il y a une corrélation entre l'étendue du kyste et la quantité de granules. Le kyste est rompu au moment de la division cellulaire. Ces bactéries sont non-sporulées.

### Caractéristiques

Les *Methylobacter* sont aérobies stricts, avec un métabolisme respiratoire utilisant l'oxygène comme donneur d'électrons. Comme source d'énergie ils ne peuvent pas utiliser la liaison C-C donc ils ne sont pas réellement hétérotrophes. Ils ont une oxydase (+) et une catalase (+), ne fixent pas l'azote de l'air.

La source principale d'énergie pour la formation cellulaire est le cycle ribulose- monophosphate par voie formaldéhyde (type I)<sup>342</sup>.

Ils n'ont pas d'activité enzymatique par la voie trans-hydro-méthylase de la serine ; ils sont non sensibles à la lyse par le dodécylsulfate de sodium 0,2 (le DS est un détergent) ;

L'acide gras membranaire la plus importante est C16 :1 -7c avec prédominance de l'ubiquinone-8 (Q8) étant la lipo-quinone.

### Culture

Les *Methylobacter* sont neutrophiles à pH optimal observé entre 6,5 et 7,5. La majorité des espèces sont mésophiles, avec une croissance optimale de 23 à 35 °C ; Certains sont psychrotolérants et psychrophiles. Deux espèces nécessitent l'ion sodium pour leur croissance, la composition en acide gras membranaires va dépendre de la salinité, du pH et de la température du milieu. Quelque soient leurs tolérances en sel les souches cultivées en faible salinité ont un pH compris entre 6,8 et 7,2 à 30 °C.

**Milieu de culture** : voir page 336 *Methylophaga*.

### Analyse phylogénétique

La taille du génome des *Methylobacter* varie légèrement en fonction des espèces entre 4,7 et 5,3 mégabases. La teneur de l'ADN-ADN en bases G + C est de 49 – 52 moles %.

### Habitat

Les *Methylobacter* sont des souches ayant un habitat aquatique typique des sédiments des lacs et des rivières, dans les sols humides, ou les boues actives ou les boues résiduelles des eaux usées. Elles sont aussi présentes dans le sol arctique et la toundra.

### Écologie

Ce sont des bactéries méthanotrophes jouant un rôle dans l'élimination du méthane atmosphérique dû à l'activité microbienne.

### Pathologie

Nous n'avons pas trouvé de littérature de pathologie sur cette classe de bactérie.

### Remarques particulières sur les espèces

- *Methylobacter tundripaludum* (Wartiainen and al., 2006) a une forme en bâtonnet, non-mobile. C'est une bactérie oxydante du méthane dans les sols de l'Arctique et des terres humides des îles Svalbard, en Norvège.
- *Methylobacter luteus* (Romanovskaya, Malashenko and Bogachenko, 1978) : pas de particularités sur les caractéristiques générales ; germe mobile et flagellé.

---

<sup>qqq</sup> **Exine** : paroi externe du grain de pollen. Ce dernier présente une double enveloppe : la couche interne (intine) mince est surtout cellulosique alors que la couche externe plus épaisse est constituée de sporopollénine et de protéines (glycoprotéines). De même, l'exine est double, constituée d'exotoxine à l'extérieur, et d'endexine sur la face interne. Elle possède des ouvertures (zones d'amincissement) qui permettront la germination du grain, c'est-à-dire la sortie du tube pollinique.

### 23.1.2.2.3 Genre *Methylomicrobium* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Bowman & coll., 1995.

Dans la cavité de Sulzbrunn, au sein des méthyliotrophes, le *Methylomicrobium* représente :

Snottite	3,8 %	du total des méthyliotrophes
Biofilm « subaerial »	4 %	du total des méthyliotrophes
Biofilm « submersed »	Nd %	du total des méthyliotrophes
Eaux de source minérale	Nd %	du total des méthyliotrophes
Eaux de mélange	1,4 %	du total des méthyliotrophes

Dans la grotte de Sulzbrunn, cette bactérie a été trouvée à un taux de 4 % dans le biofilm « submersed ».

*Methylomicrobium* n'a pas été signalée dans l'eau de source minérale, mais faiblement dans les eaux de mélange (3 % des méthyliotrophe de cette eau), Elle provient sûrement des eaux de percolation et d'infiltration.

Sa présence dans les parties « subaerial » de la grotte est sûrement due au fait que cette bactérie est aérobic facultative. Elle utilise le méthane ambiant pour la formation de son carbone et de l'utilisation énergétique.

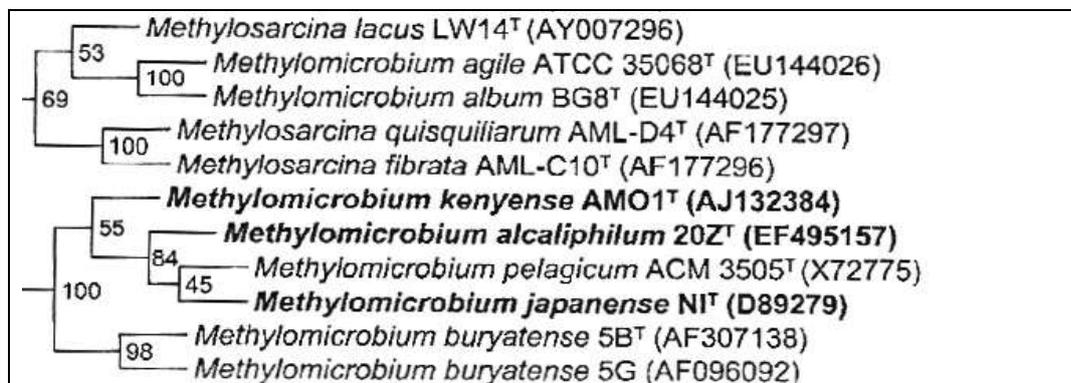
La biomasse microbienne de cette bactérie a un C/N de 5,54 (p/p) étant proche des valeurs habituellement rencontrées pour les organismes métazoaires vivants (valeur de 6).

Les *Gammaproteobacteria* sont réparties dans les différentes structures (biofilms, snottites, et les eaux) avec une diversité et une quantité inférieure pour les eaux de source.

### Ordre *Methylococcales* ; Famille *Methylococcaceae* ; Genre *Methylomicrobium*

**Taxonomie** : analyses réalisées par Miller and al., 2005 ; Higgins and al., 1996 ; Felsenstein, 2004.

#### **Espèces les plus étudiées de ce genre**



#### **Morphologie**

Les *Methylomicrobium* sont de Gram (-), avec des cellules en bâtonnets ou elliptiques de 0,5 à 1,5 µm de large et 1,5 à 3 µm de longueur. Les cellules sont mobiles par un ou trois flagelles. Elles se reproduisent par fission et non par cystes ou spores.

Les cellules sont de Type I (ICM) et leurs membranes stockent des disques vésiculeux. Les cellules possèdent des capsules en forme de vases constitués de glycoprotéines formant des couches en (S) arrangées en forme symétrique avec des axes p2 ou p6.

#### **Caractéristiques**

Les bactéries *Methylomicrobium* sont aérobies, méthanotrophes, elles utilisent le méthane ou le méthanol comme source de carbone et d'énergie mais pas d'autres carbones C<sub>2</sub> ou C<sub>n</sub> comme source. (Whittenbury and al., 1970). Elle a une assimilation du formaldéhyde par le chemin du cycle ribulose monophosphate. Elles utilisent les nitrates, l'ammonium et les sources des sels nitrates. Les souches possèdent des particules pMMO (enzyme d'oxydation du méthane), mais certaines souches peuvent avoir la MMOs soluble.

Acides gras : C16 :1 7c ; C16 : 1 ; C16 :0 ; C14 :0 et C16 :18c.

**Methylococcoides burtonii et Methylococcoides burtonii**

Souches	Croissance opt.	C oxydation	G+C <sub>ADN</sub>	Ref.
<b>Halophiles/neutrophiles</b>				
<i>Methylococcoides burtonii</i>	pH 6,8-0,5 à 2 % NaCl	pMMO	49,1	Siburth 1987
<i>Methylococcoides sp NI</i>	pH 8,1 3 à 5 % NaCl	pMMO, sMMO	49,9	Fuse 1998
<b>Halo (alkali) philes</b>				
<i>Methylobacter alcaliphilum</i>	pH 9,1 1 à 3 % NaCl	pMMO	47,8	Khmelenina 1997
<i>Methylococcoides burtonii</i> Souche 4G, 5G, 6G, 7 G et 5B	pH 7,5 à 9,5 0,75 % NaCl	pMMO, sMMO	49 à 51	Kaluzhaya 1997
<i>Methylococcoides sp AMO1</i>	pH 10 3 % Na <sup>+</sup>	pMMO	51	Sorokin 2000

pMMO particule méthane mono-oxygénase ; sMMO soluble méthane mono-oxygénase.

### Phylogénétique

La teneur en G + C de l'ADN-ADN du *Methylococcoides sp NI* a été déterminée par la séparation HPLC, tel que décrit par Katayama - Fujimura et al., 1984. Elle a été de 49,9 mol % (n = 3).

Espèces analysées par séquençage de ARNr 16s basé sur la distance de l'étalement de fractions dans le dendrogramme<sup>\*\*\*\*</sup> phylogénétique des gènes *AMO1*, *20Z* et *NI* en relation avec tous les autres types de méthanotrophes de Types I à X pris pour référence dans cette analyse.

*Escherichia coli* K-12 a été utilisé pour définir les autres groupes n'appartenant pas aux méthanotrophes (témoin externe).

Le séquençage a donné les fractions électrophorétiques des gènes *AMO1*, *20Z*, et *NI* ; elles ont une haute similarité comprise entre (96 à 97 %) avec les espèces de *Methylobacterium*, de souches suivantes :

- *Methylococcoides burtonii* ACM 3505 (96 à 98 %), espèce halophile alcalin (Sieburth and al. ; Bowman and al., 1995).
- *Methylococcoides burtonii* 5B (97 %), espèce halophile alcalin (Kaluzhnaya and al., 2001), Les souches 5 G et 20Z, 5Z, *AMO1* ont été cultivées sur milieu NMS auquel ont été ajoutés 0,1 mol NaHCO<sub>3</sub>, 0,01 mol Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 0,3 mol de NaCl.

Sur l'arbre phylogénétique toutes les séquences regroupent ensemble un groupe monophylétique, avec des valeurs de similarité élevées : *Methylobacterium marinus* A45 (< 96 %) souche HF : de référence (souche N1, *AMO1*, souche NCIMB 13566). La souche de *Methylobacter marinus* A45 a été cultivée sur milieu de NMS avec un ajout 0,3 mol de NaCl.

Les autres ont été séquencés par Bowmann and al., 1995.

- *Methylophaera hansonii* AM11 (< 89 %)
- *Methylohalobium crimeensis* 10Ki (< 91 %)

Il est à noter deux séquençages :

- *Methylococcoides agile* ATCC 35068
- *Methylococcoides album* BG8
- *Methylococcoides album* ATCC 33003
- *Methylococcoides sp N1* a été cultivé sur un milieu de l'eau de mer artificielle (Cho & Giavannoni, 2003).

Dans l'ensemble les caractérisations des propriétés morphologiques, phénotypiques et physiologiques de ces méthanotrophes halophiles démontrent qu'elles seraient liées les uns aux autres (Trosenko et Khmelenina, 2002).

La restriction des espèces *Methylococcoides* aux souches halophiles (alkali) avec résistance aux pH élevés, avec une tolérance en sel a diminué le nombre des souches du genre *Methylococcoides* en

<sup>\*\*\*\*</sup> Dendrogramme phylogénétique : en analyse électrophorétique c'est la distance parcourue entre les gènes.

termes ARNr 16s par séquences (élimination des souches non-résistantes dans le genre *Methylobacterium*).

### Reclassification des espèces *Methylobacterium*<sup>343</sup>

L'analyse différentielle fait par le séquençage de ARNr 16s et par hybridation de l'ADN-ADN des gènes de CenBankK a redistribué les cartes génétiques pour :

- ***Methylobacterium album* ACM 3314** (GenBank donne l'appellation du nom : X 72777).
- ***Methylobacterium agile* ACM 3308** (X 72767)

Ces souches ont plusieurs bases manquantes, cette observation a permis d'amplifier et reséquencer par ARNr 16 s, les fragments de gènes pour ces types de souches. Les analyses phylogénétiques ont été faites en utilisant le paquet PHYLIP (Felsenstein, 2004).

Les séquences ont montré une diminution de la similarité avec des séquences d'autres bactéries halophiles méthanotrophes, telles-que :

- ***Methylobacter marinus* A45** (< 95 %).
- ***Methylosphaera hansonii* AM11** (< 89 %)
- ***Methylohalobium crimeensis* 10 K** (< 91 %).

Il est à noter, que le séquençage des deux souches classées actuellement, un ***Methylobacterium agile* (ATCC 35068)** et ***Methylobacterium album* (BG8)** (Bowman et al., 1995) ont été séparés par des critères d'halophiles (alcali) diminuant la représentativité de ces espèces comparativement au ***Methylobacterium pelagicum* ACM 3505** (Sieburth et al., 1987).

En termes de différenciation, les relations étroites entre les espèces de *Methylosarcina*, et les espèces du genre non-halophile de *Methylobacterium*, rendent les différences difficiles à l'analyse ; mais les critères phylogénétiques semblent révéler une différenciation, comme la présence d'enzyme méthane mono-oxygénase (*pmA*) dans les *Methylobacterium* pouvant servir de critère de distinction de ces deux genres (Wise et al., 2001).

L'analyse phylogénétique a divisé les *Methylobacter* et fait ressortir trois groupes principaux d'espèces :

- Un premier groupe comportant ***Methylobacter psychrophilus*** et ***Methylobacter tundripaludum***.
- Un deuxième groupe comprenant ***Methylobacter luteus***, ***Methylobacter marinus*** et ***Methylobacter vinelandii* 87**.
- Un troisième groupe comprenant le ***Methylobacter whittenburyi*** s'inscrivant dans un groupe ***Methylobacterium* / *Methylosarcina***.

Ces données indiquent qu'une reclassification des espèces non-halophiles du genre *Methylobacterium*, ainsi qu'une révision importante des genres *Methylobacter* et *Methylosarcina*, est nécessaire.

Pour clarifier le statut taxonomique des souches en question, il a été effectué des analyses d'hybridation ADN-ADN. L'ADN a été extrait comme décrit plus haut (Kalyuzhnaya et al., 1999) et les expériences d'hybridation ADN-ADN ont été effectuées telles que décrites par Johnson (1994).

**Hybridation ADN - ADN relation en pourcentage entre les souches 20Z, AMO1 et NI**  
**Références des souches**

Souches	11	22	33	44	55	66	
<b><i>Methylobacterium album</i> ATCC 3303</b>	100						11
<b><i>Methylobacterium agile</i> ATCC 3506</b>	21	100					22
<b><i>Methylobacterium</i> sp NI</b>	45	40	100				33
<b><i>Methylobacterium buryatense</i> 5G</b>	55	29	54	100			44
<b><i>Methylobacterium album</i> ATCC 33003</b>	18	17	15	17	100		55
<b><i>Methylobacterium agile</i> ATCC 35068</b>	16	17	17	19	45	100	66

Dans cette analyse ***Methylobacterium buryatense*** semble être plus proche du ***Methylobacter* sp 20Z** et du ***Methylobacterium* sp NI**.

## Culture

Les bactéries *Methylobacterium* sont mésophiles avec un optimum de croissance demandant une présence de sel et une source de nitrogène. La température de croissance est comprise entre 25 et 30 °C. Quelques souches sont alkali-tolérantes ou alcaliphiles, la croissance se fait entre pH 9 à 10 et demande la présence d'ion sodium.

Elles ont été cultivées sur une base moyenne de sels minéraux nitrates (NMS) (Whittenbury et al., 1970). Toutes les souches sont cultivées sous un mélange d'air et de méthane (50/50).

## Biotope

Les souches 20Z et 5Z, halophiles et alcalinophiles, (Khmelenina et al., 1997) et AMO1 (Sorokin et al., 2000) ont été respectivement isolées dans les lacs sodiques et très alcalin de Touva (Fédération de Russie) et au Kenya, La souche NI a été isolée dans des boues marines (Hiroshima, Japon) (Fusible et al., 1998).

Beaucoup d'informations concernant la structure, les mécanismes biochimiques et moléculaires de l'adaptation de ces isolats méthanotrophes au pH et à la salinité ont fait l'objet de publications (Khmelenina et al., 1999 ; Reshetnikov et al., 2006).

## Biotechnologie

Le modèle attrayant de ces méthanotrophes extrêmophiles pour la production commerciale des produits de chimie fine<sup>ssss</sup> du méthane, comme l'éctoïne, ayant une multifonction naturelle stabilisante (Trotsenko et al., 2005)<sup>344</sup>, ont aussi un « potentiel » pour des applications biotechnologiques comme la biorestauration et la dégradation du trichloréthylène, des diméthyl-sulfides<sup>345</sup> (Fusible et al., 1998 ; Sorokin et al., 2000).

**Espèce *Methylobacterium alcaliphilum* sp nov** (nom donné par Kalyuzhnaya et al., 2008)

**Ordre *Methylococcales* ; Famille *Methylococcaceae* ; Genre *Methylobacterium***

## Morphologie

Le genre *Methylobacterium* contient des bactéries aérobies de Gram (-) avec des cellules courtes de longueur 2,5 à 3 µm et de diamètre entre 1,25 à 1,3 µm, de forme coccidies et ellipsoïdes ; elles sont mobiles par un seul flagelle polaire ou plusieurs flagelles en péritriche ; elles se reproduisent par fission. Les cellules ont des membranes intra cytoplasmiques (ICM) de type I pour assimiler le méthane et le méthanol par la voie monophosphate de ribulose. Les membranes de ses cellules forment la surface (S)-couches consistant en coupe-façonner 38 nm (nanomètre) en hauteur et 33 nm de diamètre, disposées en sous-unités symétrique<sup>346</sup>.

## Caractéristiques

*Methylobacterium alcaliphilum* est Gram (-), alcalinophile, halotolérant<sup>347</sup>, méthanotrophe obligatoire. Elle est capable d'utiliser le méthane comme seule source d'énergie, elle joue un grand rôle dans le cycle naturel du carbone.

L'accumulation de l'éctoïne joue un rôle de soluté au cours de la croissance dans des milieux salins.

Le métabolisme du méthane est plus rapide lorsque le pH est près de 9.

L'acide gras principal phospholipide sont iso-C16 : 0, C16 : 0 et C14 : 0.

Il a été observé des changements dans la structure phospholipidique et des acides gras en fonction de la variation de salinité et de pH du milieu suggérant une fonction d'osmo-adaptation. La mobilité des cellules est légèrement dépendante de la teneur en sodium, découplant l'énergie et les ionophores.

Deux enzymes clés du ribulose monophosphate, cycle de fixation de formaldéhyde, 3-hexulose-6-phosphate utilisant l'enzyme synthase (HPS) et le 6-phospho-3-hexulose isomérase (PHI), dans le cycle méthanotrophe halotolérant aérobie<sup>348</sup>.

## Phylogénétique

*M. alcaliphilum* possède un chromosome circulaire relativement important de 4,67 Mo ; trois ARNr

---

<sup>ssss</sup> **Chimie fine** : chimie aromatique et esthétique

opéron complets, 44 ARNt et 4 083 séquences codant les protéines.

Le génome comporte également un plasmide circulaire de 128 Ko, le dosage de l'ADN-ADN donne une valeur de G+C de 48,75 mol%, avec un codage système de protéine de transfert pour les répliquons. *M. alcaliphilum* est la première bactérie méthanotrophe pour laquelle un génome du plasmide a été séquencé. Elle peut se classer dans les *Alphaproteobacteria*, les *Gammaproteobacteria* et les *Verrucomicrobia*.

*M. alcaliphilum* 20Z se présente comme un groupe bactérien méthanotrophe adapté aux écosystèmes à pH élevé et forte salinité. Le séquençage peut être fait par la technique *Génoscope*, avec une bibliothèque 454 GSfrix.

*Methylomicrobium alcalinophilum* 20Z est codé par les gènes *HPS* et *phi* et le gène fusionné *hps-phi*. Le recombinant de l'enzyme *HPS-His* et l'enzyme *PHI-son* et les deux protéines *HSP-PHI* d'expression hétérologue ont été obtenues par modification génétique d'un *Escherichia coli* et les protéines obtenues ont été purifiées par chromatographie d'affinité.

Ces protéines *PHI-HPS-His* de poids moléculaires de (2x 20 KDa) et la protéine fusionnée de la fusion des gènes *HPS-PHI* ont donné des protéines de poids moléculaires de (2 x 40 K Da). Ces protéines catalysent la formation du fructose 6-phosphate à partir du formaldéhyde et du ribulose 5-phosphate avec respectivement une activité de 172 et 22 U/mg.

Le rapport des vitesses cinétiques  $K_{cat}/K_m$  de cette enzyme *HPS-His* a une grande affinité catalytique. Mais il a été montré que le couple de gènes codant les protéines *HPS-PHI*, *AMP* et *ADP* sont des inhibiteurs puissants des deux gènes *HPS* et gènes *PHI* lorsqu'ils s'expriment séparément.

L'analyse des génomes a révélé, que les gènes *HPS* et *Phi* situés séparément dans tous les méthanotrophes du groupe type II, sont fusionnés<sup>349</sup>.

#### Inventaire des gènes du métabolisme du *M. alcaliphilum*

Groupe de gènes associés aux membranes	Associé au cytochrome et assemblé à la biosynthèse
Méthane-mono-oxygénase ( <i>pmoCAB</i> ) Pyrroloquinoline quinone (PQQ) <sup>83</sup> Méthanol dépendant déshydrogénase ( <i>mxoA</i> ) Quino-protéine formaldéhyde déshydrogénase ( <i>adh</i> ) Deux formiates déshydrogénases Monophosphate du groupe ribulose.	Tétrahydrométhanoptérine transférase Tétrahydrofolate lié-C transférase Oxydoréductase ferrédoxine aldéhyde ( <i>aorAB</i> )

Bien que l'activité enzymatique du cycle de la sérine ne soit pas détectée chez la souche 20Z, les gènes codants : *glyA*, *sga*, *hpr...* du *gck mclA* et *mtAB* sont présents. Les enzymes du Cycle de Calvin-BEM sont manquantes. Ensemble complet de gènes pour la fonction de la voie d'Embden-Meyerhof-, la voie d'Entner-Doudoroff et la voie des pentoses phosphates ont été identifiées.

Le *Methylomicrobium alcalinophilum* 20Z est semblable aux autres méthanotrophes, son génome encode toutes les enzymes du cycle citrique. Le métabolisme de l'azote implique l'inventaire des gènes pour l'absorption de l'urée, de son hydrolyse, et de sa réduction en nitrates et en nitrites, pour l'absorption directe de l'ammonium. Ainsi la formation de la glutamine et glutamate synthétase, des glutamates et de l'alanine déshydrogénase sont importantes pour l'assimilation de l'ammonium. Il faut aussi un gène homologue de réductase de l'hydroxylamine (*hao*), pouvant être éventuellement un inhibiteur de la toxicité résultante de l'hydroxylamine due à l'oxydation de l'ammoniac par la présence du gène *pMMO*<sup>350</sup>.

Le séquençage confirme que *M. alcaliphilum* 20Z a une biosynthèse de l'éctoïne que représente l'opéron (*ectABCask*). L'accumulation de saccharose est codée par un gène cluster *sps-spp-fruK-amy*, correspondant respectivement au sucrose phosphate synthétase / phosphatase, fructokinase et amylo-sucrase spécifique.

La disponibilité du génome du *M. alcaliphilum* 20Z, élargit considérablement l'utilisation des méthodes moléculaires dans les enquêtes expérimentales et pour l'application de la biotechnologie de cette souche<sup>351</sup>.

## Culture

Les colonies sont uniformes, légèrement crèmes, blanches, régulièrement convexes avec des bords réguliers dans l'ensemble. Elles poussent bien dans la gamme de pH 7,2 à 9,5. Elles se développent rapidement à pH 9 à 9,5 et beaucoup plus lentement à pH 7 avec absence de croissance à pH 6,8.

Ne pousse pas au-dessous pH 7. Les ions de sodium (à 0,05 M) sont nécessaires pour la croissance. Elles supportent jusqu'à 1,5 mol de NaCl. Elles requièrent la présence de NaHCO<sub>3</sub> ou de NaCl pour leur croissance en milieu alcalin<sup>352</sup>.

## Environnement

La souche *Methylobacterium alcaliphilum* est de type 20Z (= VKM B-2133 = NCIMB 14123), elle a été isolée la première fois des sédiments de surface sodique du lac Shara-Nur, Touva (Asie centrale/Fédération de Russie). La souche de référence (= VKM B-2180) a été isolée dans la surface sodique de lac Khadyn.

L'accumulation d'ectoïne<sup>tttt</sup> est compatible avec une croissance dans un milieu très salin<sup>353</sup>.

**Espèce *Methylobacterium kenyense* sp. nov.** (Grotte de Sulzbrunn)

## Morphologie

*Methylobacterium kenyense* est une bactérie de Gram (-), très ovoïde, quelquefois en forme de coccidé, de 1 à 1,5 µm de largeur et 2 à 3 µm de longueur, elle est mobile, une petite fraction possède trois flagelles péritriches, mais la majorité possède un seul flagelle ; reproduction par fission mais sont incapables de former des cystes ou des spores

Les cellules sont de Type I (ICM), forment une sous-unité additionnée de couches S, vaguement associées à la paroi cellulaire. La couche S consiste en de petites sous-unités, 1,8 µm de diamètre et 1,5 µm haute, disposées sur la surface des cellules dans une symétrie hexagonale.

## Phylogénétique

La teneur en G + C de l'ADN-ADN de la souche *Methylobacterium kenyans* sp nov est de 50,9 mol % La souche a été identifiée sous le type souche AMO1 (= ONCC 97157 = VKM B 2364 = NCIMB 13 566)

## Culture

*Methylobacterium kenyans* pousse bien dans la gamme de pH 9 à 10,5. Les ions sodium sont nécessaires pour la croissance. Tolère une concentration jusqu'à une valeur totale de 1,1 mol d'ion sodium et de nitrate d'ammonium. Les nitrates peuvent être utilisés comme source d'azote. Cette bactérie oxyde l'ammonium en nitrite à un pH 10. Dans un pH supérieur on va avoir l'oxydation du méthane ainsi que de l'ion ammonium. L'activité maximale de cette bactérie est à un pH de près de 10.

**Milieu :** température de croissance 25 à 30 °C ; milieu NMS avec 0.1 Mol/l NaHCO<sub>3</sub>, 0,01 Mol/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 0,3 Mol/l NaCl.

## Environnement

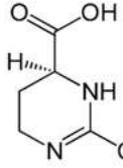
La souche du *Methylobacterium kenyans* sp nov a été isolée de sédiments de surface d'un lac du Kenya.

## Biotechnologie

*Methylobacterium alcaliphilum* 20Z peut être utilisé en biotechnologie pour la production d'ectoïne, étant un produit très utilisé en cosmétique comme osmo-protecteur. Il est produit par la réduction du méthane par la culture d'une biomasse microbienne alimentée par un mélange de méthane et d'air (50/50) avec un brassage de la suspension aqueuse ou alcoolique (méthanoïque).

---

<sup>tttt</sup> L'ectoïne (acide 1,4,5,6-tétrahydro-2-méthyl-4-pyrimidinecarboxylique) est un composé chimique osmoprotecteur découvert dans plusieurs espèces de bactéries extrémophiles.

<p>L'ectoïne est aussi appelée l'IUPAC Acide (S) -2- méthyl-3-4-5-6- tétrahydro-</p>  <p>pyrimidine - 4 carboxyliques</p>	<p><u>Propriétés</u> Formule chimique : C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Masse moléculaire : 142,16 mol Le standard : Température à 25 °C Pression 100 Kpascal</p>
--	---

C'est un composé naturel que l'on trouve chez plusieurs espèces de bactéries. Ce composé formant un soluté compatible servant de substances protectrices en agissant comme osmolyte et aide les organismes à survivre dans les milieux extrêmes, ce que l'on a appelé le stress osmotique.

L'ectoïne est utilisée comme un ingrédient actif dans les soins et la protection de la peau, ainsi que pour la protection solaire. Il stabilise les protéines et autres structures cellulaires et protège la peau des contraintes comme l'irradiation aux rayons UV et la régulation hydrique de la peau.

L'ectoïne se trouve en grande concentration dans les micro-organismes halophiles leur conférant une résistance à certains sels. Les premières fabrications industrielles ont produit de l'ectoïne à partir d'*Ectothiorhodospira halochloris*<sup>354</sup>, mais depuis de nombreuses autres souches ont été trouvées aussi bien chez les Gram (-) que chez les Gram (+). Dans ces bactéries nous pouvons citer :

<p><i>Brevibacterium linens</i> <i>Halomonas elongata</i> <i>Marinococcus halophilus</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i></p>	<p><i>Halomonas titanicae</i> <i>Halorhodospira halophila</i> <i>Halomonas ventosae</i> <i>Methylobacterium alcaliphilum 20Z</i></p>
--	--

L'ectoïne est synthétisée dans les trois réactions enzymatiques successives à partir de -semi-aldéhyde aspartique. Les gènes impliqués dans la biosynthèse sont appelés *EctA*, *EstB* et *EctC* et ils codent pour les enzymes L-aspartokinase (*Ask*) ; L-2, 4 - diaminobutyrique acétyltransférase acide (*EctA*) ; L-2, 4 diaminobutyrique acide transaminase (*EctB*) et L-ectoïne synthase (*EctC*), respectivement.

L'analyse phylogénétique a révélé des séquences identiques de protéines (34 à 63 %) d'*EctC* similaire à celles des bactéries halophiles hétérotrophes avec une identité d'acides aminées plus élevées comparativement aux enzymes de la bactérie *Vibro cholerae*. Un fragment d'ADN de *Methylobacterium alcaliphilum 2Z* contient les gènes *cab* et une région du promoteur présumé s'exprimant chez *Escherichia coli*.

### Fermentation

La production d'ectoïne par le *Methylobacterium alcaliphilum 20Z*, a été étudiée dans un réacteur agité dans des conditions non-stériles. Les variables de production ont été définies par la variation de la teneur en sel avec une variation de 3 à 6 %, vitesse d'agitation de 300 tr/mn à 600 tr/mn, teneurs en oligo-élément tel que la teneur en Cu<sup>++</sup> pour une variation de concentration de 0,05 à 25 µMol.

Il a été établi qu'une agitation de 300 tr/mn étant suffisante et qu'une teneur en cuivre de 25 µMol a amélioré la réduction de l'émission du méthane.

Cette recherche a étudié l'optimisation de la production *Methylobacterium alcaliphilum 20Z* en réacteur agité et en continu par le contrôle de l'émission de CH<sub>4</sub> et la production d'ectoïne.

L'ectoïne produite en biotechnologie est un produit à haute valeur marchande. On a obtenu un ratio de 20 % d'ectoïne intracellulaire totale synthétisée dans un réacteur en continu alimenté en méthane / air avec une biomasse enrichie en Cu<sup>++</sup>.

### Biotechnologie pharmaceutique et médicale du *Methylobacterium*

L'étude sur la production d'enzymes réductases et transaminases par le *Methylobacterium* à des fins médicales a été réalisé. Les stéroïdes sont des molécules biologiques essentielles dans la plupart des formes de vie. Les réductases des stéroïdes étant connues :

- 14-stérol (C14SR également connue sous le nom TM7SF2)

- 7 déhydrocholestérol réductase (DHCR7)
- 23 - déhydrocholestérol réductase (DHCR23)

Ces trois enzymes réduisent les liaisons doubles carbone-carbone étant spécifiques de la fraction stérolyque, en utilisant une réduction avec un cofacteur au cours de la biosynthèse des stérols. Un film récepteur B(LBR), protéine intégrale de la membrane interne, contient également un domaine fonctionnel de la C14SR. La structure cristalline d'une réductase 14 stérol (MaSR1) du *Methylophilum alcaliphilum* 20Z ayant une activité méthanotrophique 20Z (un homologue du C14 SR humain, LBR et DHCR7) a été étudiée avec pour cofacteur NADPH. L'enzyme contient dix segments transmembranaires (TM1-10). Son domaine catalytique comprend la moitié de la carboxyle-terminal (contenant TM6-10) et une enveloppe contenant deux poches interconnectées. L'une fait face au cytoplasme et abrite NADPH, tandis que l'autre est accessible à partir de la bicouche lipidique. La comparaison avec une structure soluble de stéroïde 5 réductase suggère que l'extrémité de NADPH répand le substrat de stérol à la jonction des deux poches. Une analyse de l'activité de la stérol réductase prouve que *MaSR1* peut réduire la double liaison d'un intermédiaire de la biosynthèse du cholestérol, démontrant une conservation fonctionnelle de C14SR intermédiaire dans la biosynthèse du cholestérol, et prouvant une conversion fonctionnelle de la C14SR humaine. Par conséquent, cette structure peut servir comme prototype de stérol réductase membranaire intégré donnant un aperçu moléculaire des mutations DHCR7 et elle peut donner l'espoir de traitement soit par production des cholestérols réductases soit par hybridation génétique dans la maladie de Smith-Lemli-Opitz (maladie génétique).

### 23.1.2.2.5 Genre *Methylosoma* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Rahalkar & coll., 2007

Répartition microbienne des *Methylosoma* dans le groupe des bactéries méthylophiles dans la grotte de Sulzbrunn :

Snottites	2,8 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 0,9 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ Nd	de la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	≈ 0,5 %	de la flore totale de cette structure
Eau de mélange	≈ 1 %	de la flore totale de cette structure

**Embranchement *Gammaproteobacteria* ; Ordre *Methylococcales* ;  
 Famille *Methylococcaceae* ; Genre *Methylosoma* ;**

### Espèce *Methylosoma difficile* gen. nov., sp. nov., souche LC 2<sup>T</sup>

#### Morphologie

*Methylosoma* sont des bactéries de Gram (-), non-motiles, couleur rose-pâle montrant typiquement des membranes intracytoplasmiques disposées en piles. Les cellules sont coccoïdes, elliptiques ou en formes de bâtonnets et se présentent souvent en paires.

#### Caractéristiques

*Methylosoma* souche LC 2<sup>T</sup> se développe sur le méthane ou le méthanol comme sa seule source de carbone et d'énergie. Cette souche est micro-aérobie.

**Acide gras** : le principal acide gras cellulaire est C 16 : 1 $\omega$ 7c (60 % des corps gras).

#### Phylogénétique

D'un point de vue phylogénétique, il est plus étroitement lié au genre *Methylobacter*, avec les souches de *Methylobacter tundripaludum* et *Methylobacter psychrophilus* montrant une similarité de séquence de gènes respectivement de 94 et 93,4 %

En outre, la séquence du gène *pmoA* de souche LC 2<sup>T</sup> est plus apparentée au *pmoA* des séquences de gènes de souches *Methylobacter* (avec une similarité de 92 % de gènes semblables à la souche *Methylobacter* sp LW 12 étant déduites par l'identité des séquences d'acides aminés).

La teneur en ADN G + C est de 49,9 % de mol. (60 %).

La souche ***Methylosoma LC 2<sup>T</sup>*** (= JCM 14076<sup>T</sup>= DSM 18750<sup>T</sup>) est décrite comme la souche d'une nouvelle espèce au sein d'un nouveau genre *Methylosoma*, espèce ***Methylosoma difficile* gen. nov.sp.**

La souche *Methylosoma* possède le gène *nifH* et fixe l'azote atmosphérique à pression d'oxygène faible. Gène relativement proche du *Methyloglobulus* et *Methylovulum*<sup>355</sup>.

### Culture

La souche ***Methylosoma LC 2<sup>T</sup>*** pousse dans le milieu 1132 de DSMZ sous une atmosphère de faible concentration d'oxygène et couplée avec un gradient de méthane (20 % méthane+ 2 à 5 % CO<sub>2</sub>). Il peut se développer sur un milieu contenant de l'azote ou sous atmosphère azoté. Cette bactérie croît à un pH neutre et à une température entre 10 et 30° C, température d'incubation 20 °C.

Milieu : température de croissance 25 à 30 °C ; milieu NMS avec 0.1 Mol/l NaHCO<sub>3</sub>, 0,01 Mol/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

### Habitat

La bactérie ***Methylosoma difficile*** a été isolée dans des sédiments littoraux du lac de Constance, par une technique d'enrichissement avec une culture sur une atmosphère d'un gradient oxygène et méthane suivant une méthode traditionnelle d'enrichissement.

#### 23.1.2.3 Famille *Methylomonadaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne de la famille des *Methylomonadaceae* par catégorie de prélèvement est la suivante :

Snottites	0,5 %	total de la flore méthyloprophile
Biofilms « subaerial »	Nd	total de la flore méthyloprophile
Biofilms « submersed »	Nd	total de la flore méthyloprophile
Eau de source minérale	Nd	total de la flore méthyloprophile
Eau de mélange	3,2 %	total de la flore méthyloprophile

Selon les auteurs, cette famille a été introduite dans la famille des *Methylococcaceae*.

**Dans cette famille on trouve les genres suivants :**

- *Methylococcus*
- *Methylomonas*
- *Ancylobacter*

Cette famille vit en association symbiotique avec les bryophytes (*Anthoceros*) et les ptéridophytes (*Anabaena* avec *Azolla*)

#### 23.1.2.3.1 Genre *Methylomonas* (Grotte de Sulzbrunn)

Pour le genre ***Methylomonas*** seulement la famille ayant été citée dans l'étude Allemande de cette grotte, la répartition bactérienne du genre *Methylomonas* par structure est la même que la répartition de la famille des *Methylomonadaceae*.

Dans la grotte de Sulzbrunn cette bactérie semble provenir des eaux d'infiltration et de la percolation tellurique. Elle est très peu présente dans les snottites et les biofilms.

**Embranchement *Gammaproteobacteria* ; Ordre *Methylococcales* ;**

**Famille *Methylomonadaceae* ayant été renommée *Methylococcaceae* ; Genre *Methylomonas***

#### Espèces connues du genre *Methylomonas*

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Methylomonas methanica</i></li> <li>• <i>M. aurantiaca</i></li> <li>• <i>M. fodinarum</i><sup>356,357</sup></li> <li>• <i>M. scandinavica</i> de la</li> <li>• <i>M. clara</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. rubra</i></li> <li>• <i>M. capsulatus</i></li> <li>• <i>M. luteus</i></li> <li>• <i>M. thermophilus</i></li> <li>• <i>M. pelagica</i><sup>358</sup></li> </ul>
---	---

## Espèce *Methylomonas methanica*

### Morphologie

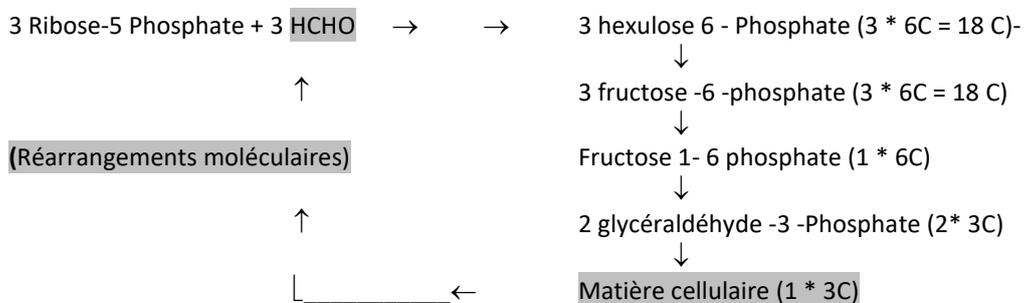
Les *Methylomonas* sont des bactéries de Gram (-) en forme de bâtonnet incurvée ou de tige de longueur 0,5 à 1 µm de diamètre 0,4 µm, comportant une membrane intracytoplasmique avec un faisceau de disques vésiculaires servant à assimiler le méthane. Elles ne comportent pas de membranes en paires périphériques. Elles comportent des cystes (cellule de repos) étant protégés par une exine et un exocystorium, leur permettant de résister à la dessiccation.

Les *Methylomonas* sont Mobilité (+), par un seul flagelle polaire. Bactéries pigmentées en rose.

### Caractéristiques

La bactérie *Methylomonas methanica* MC09 est une mésophile, halotolérante, aérobie, méthanotrophe de type I. Cette souche est une méthanotrophe marine aérobie<sup>359</sup>. Le méthane, le méthanol et le formaldéhyde sont les seules sources connues en énergie et comme apport de carbone pour la cellule<sup>360</sup>. Les facteurs de croissance organique ne sont pas nécessaires.

Voie d'assimilation du carbone RMP, fixation du CO<sub>2</sub> (-), Cycle TCA (-), nitrogénase (-). Elle assimile le méthane par la voie métabolique du monophosphate de ribulose et possède un cycle des acides tricarboxyliques incomplet en usant des phosphatidylglycérols, du méthylène ubiquinone (pour la respiration) et du cytochrome C<sup>361</sup>.



Voie ribulose monophosphate pour l'assimilation du formaldéhyde par les bactéries de type I

### Morphologie et caractéristiques différentielles

Groupes

1 – *Methylomonas*, *Methylobacterium*

2 – *Methylococcus capsulatus*.

3 – *Methylosinus*, *Methylocystis*

Caractéristiques	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Morphologie	Bâtonnet	Coque	Bâtonnet droit incurvé, pyriforme
Membranes intracytoplasmiques			
- Faisceau de disques vésiculaires	+	+	-
- Membranes en paires périphériques	-	-	+
Mobilité	±	-	±
Cellule de repos	Cyste	Cyste	Exospore
Voie d'assimilation du C	RMP	RMP	Sérine
Fixation du CO <sub>2</sub>	-	+	-
Cycle TCA complet	-	-	+
Nitrogénase	-	+	+
Croissance à 45 °C	±	+	-
G + C %	50-54	62,5	61,7-63,1

Diverses catégories de bactéries méthylothropes

## Phylogénétique

La teneur en ADN – ADN des *Methylomonas* en C + G a donné la valeur de 53 à 52,1 % de mol. Les analyses génétiques, enzymatiques et physiologiques de la *Methylomonas candinavica* SR – 5 ont révélé des différences significatives par rapport aux autres représentants de ce type des méthanotrophes pour l'utilisation des phénols.

## Culture

*Methylomonas* se développe entre 5 et 35 °C avec un optimum de 15 °C. Milieu : éventuellement agar 50 ml, base minérale 100 ml, solution T 20 ml, solution de vitamine 1 ml, méthanol 0.3 ml, pH 7.3.

Base minérale : NaCl 23 g ; MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O 3g ; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 2g ; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O 1g ; KCl 0.5 g ;

Tampon pH 7.3 + 30 g Agar ; QSP 1000 ml d'eau.

Ou milieu : solution minérale de Wolf 10 ml, amener à 500 ml et pH 7.3.

## Environnement

*Methylomonas* a été isolée de l'eau de mer côtière à des profondeurs d'environ 400 m. Cette bactérie se trouve souvent en symbiose avec les bryophytes (*Anthocéros*) et les ptéridophytes (*Anabaena* avec *Azolla*)<sup>362</sup>.

### 23.1.3 Ordre VI Legionellales (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Brenner et al., 1979.

Répartition microbienne de l'ordre *Legionellales* sur la flore totale de chacune des structures de la grotte de Sulzbrunn :

Snottites	≈ 0,6 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 7,7 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 1,2 %	de la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	≈ 0,2 %	de la flore totale de cette structure
Eau de mélange	≈ 1,1 %	de la flore totale de cette structure

## Généralités

Les Legionellales comprennent deux familles :

- *Legionellaceae*
- *Coxiellaceae*

Qui comprennent dans leurs genres des souches pathogènes, comme le *Coxiella burnetii* (fièvre Q) ou le *Legionella disease* et le *Pontiac fever*.

### 23.1.3.1 Famille Legionellaceae (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Brenner et al., 1979.

Répartition microbienne de la famille *Legionellaceae* sur la flore totale de chacune des structures de la grotte de Sulzbrunn :

Snottites	≈ 0,6 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 5,9 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 3 %	de la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	≈ 0,2 %	de la flore totale de cette structure
Eau de mélange	≈ 0,5 %	de la flore totale de cette structure

Dans la grotte de Sulzbrunn la famille des *Legionellaceae* représente 3 % des bactéries du biofilms « subaerial ». Ce sont des bactéries naturellement présentes dans l'eau et dans les boues, responsables d'une maladie respiratoire, la légionellose. Elles colonisent fréquemment les réseaux d'eau, notamment les réseaux d'eau chaude sanitaire, les installations de climatisation ainsi que les tours aэрoréfrigérantes (TAR).

## Taxonomie

Embranchement *Gammaproteobacteria* ; Ordre *Legionellales* ; Famille *Legionellaceae*

### Les genres de cette famille :

- *Fluoribacter*
- *Legionella*
- *Sarcobium*

## Morphologie

Ces bactéries sont en forme de bâtonnets, de diamètre < 2 µm (0.3 à 0.9 µm Ø et 2 à 20 longueur); Elles n'ont pas de cystes ; mobilité (+) ; elles ont des flagelles dont une polaire et une subpolaire ainsi que des flagelles latéraux ; elles sont de Gram (-).

## Caractéristiques

Dans cette classe les *Legionella* ont une nitrogénase (-) ; il réduit le fer (III) en fer(II) ; ils ne sont pas autotrophes et n'utilisent pas H<sub>2</sub> comme énergie ; le méthane n'est pas leur seule source de carbone ; elles ne croissent pas dans les eaux à 12 % de NaCl ; elles n'oxydent pas le méthanol en acide acétique ; elles ont une oxydase (±), test catalase (+), n'utilisent pas les glucides, elles n'exigent pas de l'eau de mer, elles n'ont pas de pigmentation jaune, ni pigmentations fluorescentes.

## Caractéristiques différentielles

Caractéristiques morphologiques et métaboliques	Codes des groupes microbiens						
	1	2	3	4	5	6	7
Bâtonnets	+	+	+	±	+	+	±
Cocci	-	-	-	±	-	-	±
Diamètre 2µm ou >	-	+	-	-	-	-	-
Nitrogénase	-	+	±	±	-	-	-
Autotrophie facultative (H <sub>2</sub> )	±	-	±	-	-	-	-
Méthane seul source de C	-	-	-	+	-	-	-
Croissance 12-15% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
Cystes	-	±	-	±	-	-	-
Parasites	-	-	-	-	-	-	±
Pathogènes (homme)	±	-	-	-	-	+	±
Ethanol oxydé en acide acétique	-	-	-	-	+	-	-
Mobilité	±	±	±	±	±	±	+
Flagelles polaires	±	±	±	±	±	+	-
Flagelles latéraux	-	±	±	-	±	+	±
Pathogènes (plante)	±	-	±	-	±	-	-
Nodules sur les plantes	-	-	±	-	-	-	-
Oxydase	±	±			-	±	±
Test catalase	+	+			+	+	±
Utilisation des glucides	+	+	+		+	-	±
Zooglé	±	-	-	-	-	-	-
Exige de l'eau de mer	±	-	-	-	-	-	-
Colonies jaunes	±	±	-	-	-	-	±
Pigment fluorescent	±	±	-	-	-	-	-

## Code des familles

<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Pseudomonadaceae</i></li><li>• <i>Azotobacteraceae</i></li><li>• <i>Rhizobiaceae</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Methylococcaceae</i></li><li>• <i>Acetobacteraceae</i></li><li>• <i>Legionellaceae</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Neisseriaceae</i></li><li>• <i>Branhamaceae</i></li></ul>
---	---	--

## Toxine bactérienne :

Le *Legionella* a deux toxines bactériennes : la cytotoxine et la cytolysine.

## Phylogénétique

De nombreuses sondes nucléiques sont actuellement commercialisées pour le *Legionella* et *Neisseria*.

## Culture

### Milieu :

- BCYE agar BBL ; BCYE différentiel agar, BBL ; BCYE sélectif agar with GVPC,O ; BCYE sélective agar with PAC, BBL ; BCYE sélective agar with PAV, BBL ; BMPA- $\alpha$  médium, O ; CCVC médium, BBL ; *Legionella* agar Base, D ; *Legionella* sélective agar, BBL ; BPPA- $\alpha$  médium, O ; GCII agar, BBL.

Autre : CYE de *Legionella*, besoin en acides aminés soufrés pour son métabolisme car le *Legionella* comme le *Francisella* et le *Neisseria* sont incapables de réduire les sulfates.

## Pathogénicité

Elles sont pathogènes pour l'Homme, mais pas pour les plantes.

### 23.1.3.1.1 Genre *Legionella* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Brenner et al., 1979.

Dans la grotte de Sulzbrunn les *Legionella* sont en faible nombre dans les snottites et les biofilms, ils sont plus abondants dans l'eau de mélange. La répartition de la flore par structure est la même que pour la famille des *Legionellaceae*.

## Ordre *Legionellales* ; Famille *Legionellaceae* ; Genre *Legionella*

Un seul genre *Legionella* a été défini par Brenner et al., en 1979.

## Morphologie :

Le genre *Legionella* est un bacilles de 0.3 à 0.9  $\mu\text{m}$   $\varnothing$  et 2 à 20 de longueur, mobile par flagelles polaires et subpolaires.

## Caractéristiques

Les *Legionella* ont une oxydase (-) ou faiblement (+), ils sont nitrate négative, uréase et gélatinase négative. Ces bactéries exigent de la L-cystine et du fer pour leur croissance stimulée par le  $\text{CO}_2$ , elles utilisent les acides aminés comme source d'énergie ainsi que du carbone.

Les glucides ne sont pas fermentés, ni oxydés.

**Métabolisme** : chez le *Legionella* les acides aminés sont métabolisés selon deux voies principales, la désamination et la décarboxylation ; ces deux voies sont utilisées pour le *Legionella*, *Francisella*, et le *Neisseria*. Les *Legionella* réduisent le fer III en fer II pour leur production d'antibiotique ; les *Legionella* sont susceptibles de produire des toxines, dont une cytotoxine et une cytolysine.

## Symbiose

Par ailleurs, les protozoaires d'eau douce (dont les amibes) représentent l'hôte naturel de la légionelle à l'intérieur duquel elle réalise une étape de son cycle de vie. La bactérie et son hôte ont connu une évolution convergente permettant à la bactérie l'acquisition, au sein de son patrimoine génétique, de gènes codant la majeure partie des facteurs de virulence de la légionelle. Le comportement et la virulence des légionelles dans leur environnement microbien est encore mal connu (par exemple celui de leurs capacités à envahir certains protozoaires) et amibes. De même que leur environnement lui-même : comme les écosystèmes, les biofilms notamment, les interactions avec d'autres espèces, les turbulences de l'eau dans les réseaux, etc. ne sont pas encore mis en évidence.

L'ANSES a estimé en 2011 que « le suivi des protozoaires (amibes et ciliés) dans les installations et leur contribution à la dangerosité en tant-que vecteur est trop largement négligé ».

## Culture

La méthode (officielle et réglementaire) pour la culture du *Legionella pneumophila* : après filtration

d'un échantillon d'eau sur un filtre de porosité de 0,3 µ, le filtrat va être cultivé sur différentes géloses avec plusieurs types de traitement puis elles vont être conservées pendant une dizaine de jours à 37 °C.

**Milieux** : enrichissement par BCYE agar ; BBL : BCYE différent agar BBL...

**Sélectif** : agar avec PAV, BBL ; BNPA -medium, O ; CCVC medium, BBL, *Legionella sélectif agar*, BBL ; BPPA - médium, O ; GCCII agar BBL.

La méthode PCR donne les résultats de 23 à 48 h avec plus de sécurité sur le plan qualitatif.

## Environnement

Les *Legionella* sont des bactéries isolées des eaux potables, des eaux chaudes, de la boue et des systèmes de climatisation. Ce sont des bactéries d'origine hydrotellurique. Leur habitat naturel est représenté par les milieux aquatiques naturels ou artificiels. Elles y résident, entre autres, dans les biofilms (résidus organiques et micro-organiques formés dans les canalisations et à la surface des eaux stagnantes), la protégeant de la chloration et semble jouer un rôle important pour sa survie dans les installations.

On en trouve y compris dans les biofilms de réseaux d'eau domestiques, parfois associée à *Pseudomonas aeruginosa*. Outre la nature de l'eau (acidité, minéralisation, teneur en matières organiques et nutriments), la température et le type de matériaux utilisés en plomberie jouent aussi un rôle important dans la formation des biofilms.

Les *Legionella* sont isolés des eaux potables, des eaux chaudes, des boues et des systèmes de climatisation.

## Espèce la plus connue : *Legionella pneumophila*.

### Morphologie

*Legionella pneumophila* est une bactérie de Gram (-) ; Elle est aérobic stricte ; elle se colore mal et peut apparaître sous différentes formes. Dans les échantillons de tissus pulmonaires ou les expectorations le *L. pneumophila* apparaît sous la forme d'un court bâtonnet de 3 à 5 µm de longueur. En culture elle apparaît sous la forme d'un long bacille filamenteux de 10 à 25 µm de longueur. Le nombre de sérogroupes reconnus varie, chiffre le plus élevé étant de 16.

### Environnement

*Legionella pneumophila* se trouve naturellement dans la plupart des sources d'eau douce, y compris les lacs, les étangs et les rivières. On trouve aussi la bactérie dans les tours de réfrigération, la plomberie des chauffe-eaux et les bains thermaux. Le *L. pneumophila* peut survivre jusqu'à 139 jours dans de l'eau distillée et jusqu'à 415 jours dans l'eau du robinet. Elle peut survivre hors de l'hôte plus de 98 jours dans des biofilms, comme ceux qui se forment dans les réseaux d'alimentation en eau potable et dans les eaux d'alimentation des établissements de santé. Les échantillons cliniques favorisent habituellement la survie de *Legionella pneumophila* pendant 1 semaine au maximum.

### Pathogénicité et toxicité.

*Legionella pneumophila* peut provoquer la maladie du légionnaire, engendrant des infections pulmonaires aiguës dont la durée d'incubation est de 2 à 10 jours. Une forme plus bénigne est la fièvre de Pontiac.

Elle se transmet surtout par les aérosols, l'air humide chargé de germes bactériens.

Par ailleurs, des facteurs de susceptibilité liés à l'hôte humain sont requis pour le développement de la maladie, bien qu'incomplètement compris actuellement.

Les facteurs de risque sur les personnes sont toutefois individualisables : âge avancé, déficit de l'immunité (cancer/hémopathie, diabète) mais surtout tabagisme. L'infection est exceptionnellement décrite chez l'enfant. Le *Legionella* le plus pathogène est *L. pneumophila*.

Les symptômes de la maladie du légionnaire comprennent une confusion, des céphalées, une diarrhée, des douleurs abdominales, une fièvre, des frissons et une myalgies, ainsi qu'une taux séché. Le taux de mortalité signalé est de 15 à 25 %.

***Legionella pneumophila*** utilise son principal facteur de virulence, son système de sécrétion de type IV Dot/Icm. Ce système va permettre à la bactérie d'injecter directement dans le cytoplasme de son hôte plus de 300 protéines bactériennes appelées effecteurs. Ces protéines vont permettre à la bactérie de détourner différentes machineries cellulaires de son hôte à son avantage.

La fièvre de Pontiac est une forme non pneumonique de l'infection par le *L. pneumophila*. Les symptômes sont de nature grippale, soit une fièvre, de la fatigue, une myalgie, des céphalées, un mal de gorge et des nausées ; une toux peut être présente ou non. La fièvre de Pontiac est autolimitant et ne requiert aucune hospitalisation ni aucun traitement antibiotique. Aucun décès n'a été signalé en lien avec la fièvre de Pontiac.

Même si 85 à 90 % des cas peuvent être attribués à ***Legionella pneumophila***, environ la moitié des 49% autres espèces appartenant à ce genre ont entraîné des maladies chez l'humain. Une hypothèse a été avancée selon laquelle jusqu'à 40% des cas associés à ces pathologies rares, attribuées à des espèces et à des groupes autres que le sérotype n°1 des ***Legionella pneumophila***, ne sont pas décelés correctement sur le plan clinique lorsque l'on utilise pour le diagnostic uniquement les trousseaux de dépistage des antigènes urinaires offertes sur le marché, les quelles ne ciblent que le sérotype 1.

### **Toxines de *Legionella pneumophila***

Il a été identifié par une équipe allemande 300 toxines et endotoxines chez cette bactérie. Ce grand nombre, de toxines, du ***Legionella pneumophila*** pose le problème de mettre en place une thérapie spécifique pour bloquer les toxines de cette bactérie.

### **Épidémiologie**

Le ***L. pneumophila*** est répandue dans le monde entier. Des infections ont été signalées en Amérique du Nord et du Sud, en Asie, en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Europe et en France.

Le *L. pneumophila* est à l'origine de 1 à 2% des cas de pneumonie chez les adultes (d'après Edelstein, P. H., 1988). Le nombre de cas signalés augmente en été et à l'automne. Pendant une épidémie de fièvre de Pontiac, 95 à 100 % des personnes exposées à la source présenteront une infection. En revanche, pendant une épidémie de la maladie du légionnaire, seulement 2 à 7 % des personnes exposées présenteront une infection.

La prévalence de la maladie du légionnaire au Canada est faible, soit environ 75 cas signalés chaque année, chiffre équivalant à 1.3 à 3.5 pour 1000 personnes. L'agent étiologique le plus courant de la maladie du légionnaire est le sérotype 1 de ***Legionella pneumophila*** (Lp1). Le Lp1 est à l'origine de 61 à 88 % des cas signalés.

### **Symbioses et les hôtes**

***Legionella pneumophila*** peut être l'hôte des humains, des aminés et peut aussi infecter expérimentalement les cobayes, les souris, les rats, les œufs de poule embryonnés et les cultures de lignées cellulaires humaines ou animales.

### **Mode de transmission**

***Legionella pneumophila*** peut-être transmis par les aérosols et par les eaux contaminées. La transmissibilité d'une personne à une autre n'a pas été démontrée, ni les cas de transmission zoonotique ou d'un animal à un autre.

### **Période d'incubation**

La période d'incubation est de 2 à 4 jours dans le cas de la maladie du légionnaire. La fièvre de Pontiac présente une période d'incubation de 30 à 90 heures (période la plus courante étant de 24 à 48 heures).

### **Antibiothérapie**

Sensibilité aux médicaments du ***Legionella pneumophila*** :

Il est sensible à la clarithromycine, à l'azithromycine, à la tétracycline, à la moxifloxacine et à la lévofloxacine. Les aminoglycosides comme la gentamicine, la kanamycine et la streptomycine sont efficaces contre le *L. pneumophila*. Il existe toutefois des souches mutantes résistantes à la

streptomycine. Les antibiotiques de type bêtalactamine (pénicilline, céphalosporines) ne sont pas efficaces. Par contre l'érythromycine, la spiramycine étant des antibiotiques macrolides ayant un spectre antimicrobien similaire ou légèrement plus large que celui des pénicillines sont efficaces. Ces antibiotiques sont souvent utilisés chez des personnes allergiques aux pénicillines.

#### Sensibilité aux désinfectants :

*Legionella pneumophila* peut être inactivé dans l'eau par la lumière UV, et par une exposition de 0.4 mn à des températures de 80°C dans son environnement aqueux. L'inactivation forte se fait à 121°C pendant 15mn.

### 23.1.4. Ordre X Alteromonadales

Nom donné par Bowman & Meekin, 2005

#### Familles de l'ordre des Alteromonadales

Alteromonadaceae	Pseudoalteromonadaceae
Celerinatantimonadaceae <sup>[2]</sup>	Psychromonadaceae
Colwelliaceae (Colwelliaceae)	Shewanellaceae
Ferrimonadaceae	Alteromonadales
Idiomarinaceae	<i>incertae sedis</i>
Moritellaceae	<i>Aestuariicella</i>
	<i>Motilimonas</i>

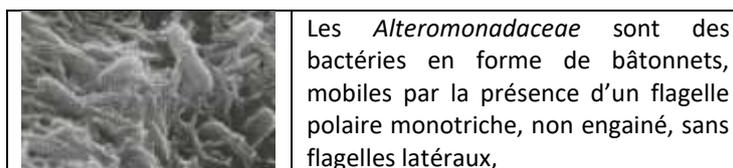
#### 23.1.4.1 Famille Alteromonadaceae

Classe *Gammaproteobacteria* ; Ordre *Alteromonadales* ; Famille *Alteromonadaceae*

#### Genres dans cette famille Alteromonadaceae

<i>Aestuariibacter</i>	<i>Bowmanella</i>	<i>Marinobacterium</i>
<i>Agaribacter</i>	<i>Catenovulum</i>	<i>Melitia</i>
<i>Agarivorans</i>	<i>Gayadomonas</i>	<i>Microbulbifer</i>
<i>Aliagarivorans</i>	<i>Glaciacola</i>	<i>Paraglaciocola</i>
<i>Aliiglaciocola</i>	<i>Haliea</i>	<i>Saccharophagus</i>
<i>Alishewanella</i>	<i>Marinimicrobium</i>	<i>Salinimonas</i>
<i>Alteromonas</i>	<i>Marinobacter</i> *	

#### Morphologie



#### Caractéristiques

*Alteromonadaceae* utilise les malates et D-Sorbitol, possèdent des enzymes agaroses et sulfatases dégradant les polysaccharides des algues ; ils ont : gélatinase ( $\pm$ ) ; Ils utilisent les malates ( $\pm$ ), D-sorbitol ( $\pm$ ) ; Ils ne sont pas inhibés par le NaCl à 3.5% ; ils exigent de l'eau de mer dans leur milieu de culture. Ils ont une nitrogénase (-) ; ils sont aérobies ou micro-aérophiles ; ils n'ont pas besoin d'hydrogène ou des formiates pour leur croissance<sup>363</sup>.

#### Analyses phylogénétiques

L'analyse de l'ADN-ADN global de la famille *Alteromonadaceae* à une valeur G + C de 38 à 50 mol%. Une fraction des bactéries de cette famille que l'on a nommé G7 a été séquencée par l'Office de développement Rural de la République de Corée avec l'aide de l'université Yonsei de 2012<sup>364</sup>.

Il résulte de cette étude que le génome de cette fraction est composé de 3 140 906 bp avec une valeur G + C de 41,44 mol% avec chromosome et plasmide assemblés. Dans ce génome on a :

- 3 439 séquences codant des protéines.
- De nombreux gènes codent des enzymes hydrolytiques pouvant jouer un rôle important dans la rupture totale des polysaccharides sulfatés et algues.

- 13 agarases,
- 50 sulfatases,
- 8 -galactosidases,
- 17 glycosidases hydrolases,
- Une cellulase.

Un grand nombre de ces enzymes se trouve sur le plasmide de la bactérie analysée (32 sulfatases et 11 agarases).

### Habitat

Dans les *Alteromonadaceae* il y a de nombreux genres étant halophiles et ayant pour écosystème le milieu aquatique eau douce et eau de mer. Ils sont principalement marines, on ne les trouve pas ou peu dans le sol, dans les eau douce, ou dans le règne animal ou humain.

#### 23.1.4.1.1 Genre *Marinobacter* (éventuel reclassement de *Arenibacter algicola*)

Dans le déclassement des *Arenibacter* en *Gammaproteobacteria* une confusion a pu se faire entre *Marinobacter* (*Gammaproteobacteria*) et *Arenibacter* (*Bacteroidetes*) sur l'espèce *Marinobacter algicola*. Dans ce cadre il est bon de définir les caractéristiques de genre *Marinobacter*.

### Classe *Gammaproteobacteria* ; Ordre *Alteromonadales* ; Famille *Alteromonadaceae* ; Genre *Marinobacter*

Ce genre se trouve dans les biofilms et les snottites.

#### Différentes espèces du genre *Marinobacter*

<i>M. Hydrocarboncliticus</i> (ATCC 49840)	<i>M. arcticus</i> (AF148811)	<i>M. sediminum</i> R65 (AJ609270)	<i>M. squalenivorans</i> 2Asq64 (AJ439500)
<i>M. aquaeolei</i> VT8 (AJ000726)	<i>M. lipolyticus</i> SM19 (AY147906)	<i>M. bryozoorum</i> 50-11 (AJ609271)	<i>M. maritimus</i> CK47 (AJ704395)
<i>M. daepoensis</i> SW 156 (AY517633)	<i>M. flavimaris</i> SW-145 (AY517632)	<i>M. lutaoensis</i> T505 (AF288157)	
<i>M. akaliphilus</i> ODP1200D-0.1 (AB125941)	<i>M. algicola</i> *		
<i>M. excellens</i> KMM 3809 (AF479689)	<i>M. algicola</i> DG1136 (AY258110)		
	<i>M. algicola</i> DG1136 (AY258116)		
	<i>M. algicola</i> 407-13 (AY294359)		

Les espèces *Marinobacter borkumensis* et *venustensis* ont été mises dans l'ordre des *Oceanospirillales* ; Famille : *Alcalinovoraceae* ; Genre : *Alcalinovorax* ; Espèces : *A. borkumensis* et *A. venustensis*.

#### Espèce *Marinobacter algicola*<sup>72</sup>

Dans la description faite par l'*ISME Journal*, il est précisé que le genre *Arenibacter* inclut de nombreuses populations.

Cette diversité implique à introduire dans notre analyse l'espèce *Arenibacter algicola* ayant été déclassée en *Gammaproteobacteria* sous le nom de *Marinobacter algicola* (Green et al. 2006).

### Morphologie

*Marinobacter algicola* a une structure bacillaire mono-flagellée dont les dimensions sont de 1,6 à 2,5 µm de longueur et 0,45 à 0,55 µm de diamètre ; Gram (-) ; aérobie ; modérément halophile ; non-sporulée. Elle forme de petites chaînes de cellules ou par paires, elle est mobile grâce à un flagelle polaire.

### Caractéristiques

*Marinobacter algicola* : catalase (+) ; oxydase (+) ; halotolérant de 0,8 à 3,5 mol ; utilisation du Tweens 40 et Tweens 80 ; l'hydrolyse de la caséine et de l'amidon ont été décrites seulement par

Smibert et Krieg. Elle n'est pas nitrate ou nitrite réducteur, glycérol (+), dextrine (+), glucose (+), méthyl-pyruvate (+), acétate (+), citrate (+), hydroxybutyrate (+), DL-lactate (+), propionate (+), succinate (+), bromo-succinate (+), D-alanine (+), L-glutamate (+), L-leucine (+), L-proline (+), L-pyroglytamate(+).

Les souches liées à cette espèce sont : DG 893 (T), DG 1136 et ATAM 407-13, elles peuvent utiliser le n-hexadécane et tétradécane comme source de carbone et d'énergie.

**Acides gras cellulaires :** C16 :0 (22 à 25%) ; C16 : 17c et C15 iso : 0 2-OH (19,5 à 20,5%) ; C18 :19c (9 à 11,5%) et C12 : 0 3-OH (8,7 à 10,0%) ; présence d'une isoprène quinone<sup>uuuu</sup>.

### Métabolisme

La production d'enzymes hydrolytiques pour les Tweens 40 et 80, de la caséine, et des amidons a été décrite par Smibert et Krieg (1994).

La réduction des nitrates, de l'indole avec production d'arginine dihydrolase de l'urée, la liquéfaction de la gélatine, l'activité de glucosidase et galactosidase ont été mise en évidence par la galerie API 20N et le kit (Vite- bio Mérieux).

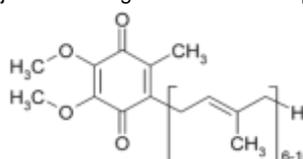
### Codes de l'analyse différentielle du métabolisme des espèces du genre *Marinobacter*

- **1 - *Marinobacter algicola* (DG 1136 ; DG 893 ; ATAM 407-13)**
- **2 - *M. flavimaris* SW-145**
- **3 - *M. lipolyticus* SM19**
- **4 - *M. bryozorum* 50-11**
- **5 - *M. sediminum* R65**
- **6 - *M. hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840**
- **7 - *M. aquolei* NCLMB 13596**

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
Nitrate reduced to nitrite	-	+	-	+	-	+	+
Growth:							
Minimum temperature (°C)	5	4	15	7	4	10	13
Maximum temperature (°C)	40	45	40	42	42	45	50
NaCl range (%)	1-12*	1-20	1-15	1-18	0.5-18	1-20	1-20
Enzyme activity:							
Amylase	+	-	-	-	-	-	-
Urease	v†	-	-	-	-	-	+
Arginine dihydrolase	+	-	-	-	-	-	-
Utilization of:							
Glycerol	+	-	-	+	+	-	-
D-Fructose	+	+	+	-	-	-	-
D-Glucose	+	-	+	-	+	-	-
Maltose	+	-	+	-	-	-	-
D-Mannitol	v‡	-	+	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	+	+	+	+
Citric acid	+	-	-	-	-	+	-\$
DL-Lactic acid	+	-	-	-	-	+	+
cis-Aconitic acid	+	-	-	-	-	+	+
D-Gluconic acid	+	+	+	-	-	-	-
L-Alanine	v†	-	-	-	-	-	+
L-Leucine	+	-	-	-	-	-	+
L-Phenylalanine	+	-	-	-	-	-	-
L-Proline	+	+	-	-	-	+	+
DNA G + C content (mol%)	54-55	58	57	59.6	56.5	53	56

\*Na Cl tolérance de 1 à 12% pour la souche DG893 et de 1 à 9 % pour la souche DG 1136 et ATAM 407 V+ DG 893 et DG1136 sont positive et ATAM 407 sont négatives. V†, DG893 est positive les autres DG 1136 et ATAM 407-13 sont négatives. \$ Huu et al. (1999) reporte pour le citrate une utilisation aussi positive.

<sup>uuuu</sup> **Isoprène quinone** : caroténoïdes, quinone à chaîne latérales... 1.2. Caroténoïdes et dérivés Carotènes: hydrocarbures de formule C<sub>40</sub>H<sub>50</sub>. Longue chaîne carbonée, possédant un grand nombre de doubles liaisons conjuguées, d'où leur coloration allant du jaune au rouge. Les extrémités peuvent être cyclisées.



Isoprène est une chaîne latérale aux quinones

Les *Marinobacter* dégradent les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques.

### Analyse phylogénétique

L'analyse de l'ARNr 16s de *Marinobacter algicola* montre que les souches, issues de cette espèce, ont une similarité de séquençage, correspondant à 94,2 à 94,3 % de la souche *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 27132 et une similarité de 97,5 à 97,8 % vers la souche type *Marinobacter flavimaris* DSM 16070.

L'hybridation ADN-ADN donne pour relation entre *M. flavimaris* et les autres *Marinobacter* une valeur de 42 %, Mais lorsque on réassocie les ADN-ADN avec les souches DG893, DG 1136 et ATAM407-13 on obtient une valeur de 83 %.

La teneur de l'ADN en G+C est de 54 à 55 mol%. L'hybridation ADN - ADN et l'analyse des bases phénotypiques démontrent que l'espèce *Marinobacter algicola* sp comporte trois souches : DG8993(T), DSM 16349 (T), NCIMB 14009 (T).

Le regroupement phylogénétique et la fréquence des cultures en laboratoire est évocatrice d'une association spécifique de la bactérie aux dinoflagellés. *M. algicola* est associée à l'affiliation phylogénétique du *M. hydrocarbonoclasticus* (Green et al. 2004).

### Culture

*Marinobacter algicola* croît dans un milieu contenant 3 à 6 % de NaCl et une température de 25 à 30 °C.

**Milieux :** les fait sur un milieu pour le *Gymnodinium*, isolats bactériens DG893 et DG1136 isolées de *Gymnodinium catenatum* YC499B15 (récupérée dans la mer jaune de Corée)<sup>365</sup> et *G. catenatum* GC21V (extraite de la Ria de Vigo, Espagne) ont respectivement été cultivés par dilution en série sur une gélose de bas-concentration marine ZM/10 Difco (Green et al. 2004) et la souche ATAM407 (extraite de Jéricho Beach, Vancouver, Canada) par culture sur gélose marine 2216 (Difco) température de 25 à 30 °C pendant 72 h. Les colonies ont un diamètre d'environ 2 mm entourées d'un pourtour crémeux. Les isolats ont été cultivés en aérobiose à 18-20 °C pendant 1 à 3 semaines, puis stockés en chambre froide à - 80 °C dans le bouillon marin (Difco) complété par de la glycérine pour la dose de 20 % (v/v).

**Milieu d'identification :** les galeries API 20NE et Vitek - BioMérieux ont été utilisées, elles sont inoculées à partir de colonies suspectes avec une solution stérile à 3 % NaCl (w/v). L'utilisation des hydrocarbures aliphatiques pour la croissance est déterminée dans de l'eau de mer synthétique agar (SMI ; Yakimov and al.).

**Incubation pour identification :** colonies cultivées pendant 48 à 72 h sur un milieu (2216 - marine agar Difco) et incubé de 25 à 30 °C ; en 72 h, on obtient des colonies d'environ 2 mm, de forme convexe avec des bords brillants.

### Habitat

En 1992, Gauthier et ses collaborateurs ont isolé le genre *Marinobacter* capable de dégrader des hydrocarbures dans les eaux côtières, lui donnant le nom de *M. hydrocarbonoclasticus*. Depuis plus de 12 espèces de *Marinobacter* ont été reconnues dans ce type d'activité. Celles-ci ont été isolées de divers endroits comme des têtes de puits de pétrole offshore (Huu et al., 1999), des sources thermales côtières (Shieh et al., 2003), des eaux tempérées (Yoon et al., 2004), de l'eau de mer de l'Antarctique (Shivaji et al., 2005), des sols salins (Martin et al.) et des sédiments marins Goerskova et al., 2003).

Mais seule l'espèce *M. bryozorum* 50-11 a une souche biologique identifiable, ayant été isolé des tissus de *Bryozoaire* comme les *Phylactolaemata* ou métazoaires étant constitués d'une mousse animale, vivant dans l'eau douce et l'eau de mer (Romanecko et al., 2005).

Cette espèce bactérienne associée avec les dinoflagellés *Gymnodinium catenatum* et *Alexandrium tamarense*, a été soupçonnée pour être impliquée dans la formation d'un puissant neurotoxique, les toxines paralysantes (PST), produites par les algues (Garcia et al., 1997). Dans le cadre des travaux pour comprendre la relation de la flore bactérienne et la production de PST dinoflagellés et PST production, nous avons identifié des isolats bactériens avec une affiliation phylogénétique à

***M. hydrocarbonoclasticus*** en laboratoire de culture de ces dinoflagellés formant un groupe phylogénétique discret (Green et al., 2004).

### Écologie

***Marinobacter algicola*** (dénommé également ***Arenibacter algicola***) possède la propriété de dégrader les hydrocarbures. Des essais ont été faits et ont démontré la dégradation des hydrocarbures aromatiques (Gauthier and al., 1992). Les études faites sous le nom de ***Arenibacter algicola sp*** ont révélé la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), c'est un caractère partagé par l'ensemble du genre pouvant être utilisé comme un marqueur taxonomique de ce genre.

Les données cinétiques sur le taux de minéralisation sont considérablement améliorées par la dispersion des parties hydrophobes de la masse d'hydrocarbure, par exemple par la présence de laine de verre (substitut pour les surfaces remplaçant les cellules de diatomée). Dans les études faites sur ce sujet les émulsifiants (tétradécane) ont permis une meilleure utilisation du pétrole brut par ces bactéries.

Ce travail montre qu'il existe dans les océans des bactéries étant susceptibles d'utiliser et de décontaminer les rejets pétroliers.

### Biotechnologie

L'espèce ***Marinobacter algicola*** ou ***Arenibacter algicola*** présente un grand intérêt dans la biotechnologie. La production de bactéries dégradant les hydrocarbures, ainsi que le pétrole lourd, présentent une grande utilité dans la lutte contre les marées noires. La pollution due au transport pétrolier est un gros problème de notre civilisation consommatrice d'énergie fossile. Nous pouvons imaginer une production et une utilisation de cultures microbiennes lyophilisées dans le cadre d'une dépollution maritime, pouvant être un marché important, aussi bien dans l'aspect écologique que dans l'aspect financier.

Ces bactéries produisant des enzymes hydrolysant les polysaccharides complexes (les algues, la paille, le bois) sont d'une grande utilité pour la transformation des déchets en énergie carburant, production d'alcool sans pour cela utiliser des produits agro-alimentaires à cet effet (production à des fins mercantiles, pour faire flamber les cours des productions alimentaires). La production industrielle d'enzyme permettant la transformation des déchets organiques est un marché potentiel important.

### Place dans le karst

Nous relevons que dans la publication du *Journal avance online publication du 26 septembre 2017*, la présence de *Arenibacter* a été retrouvée dans les biofilms subaerial et les snottites. La présence de cette bactérie dans ces éléments de la cavité, peut nous laisser supposer qu'il y a sûrement une symbiose entre les bactéries méthylophiles et méthanotrophiques et les *Marinobacter* ou *Arenibacter*, car ces premières produisent des acétates, étant une source d'énergie de ces bactéries marines. Le métabolisme de ces dernières a pu jouer un rôle de nutriments carbonés pour les *Methylococcales* étant aussi abondante dans le biofilm et les snottites.

L'origine marine de ces bactéries aussi bien des *Arenibacter* que des *Marinobacter* nous laissent supposer une origine très lointaine. Elles peuvent être là dans cette cavité depuis des millions d'années, montrant qu'il y a dû avoir adaptation et modifications de cette flore.

**Pathologie** : Non pathogène pour l'homme ou les animaux.

### 23.1.5 Ordre III *Xanthomonadales* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Saddler & Bradbury, 2005

La répartition microbienne des *Xanthomonadales* dans chacune des structures dans la grotte de Sulzbrunn, valeur sur le total de chacune des structures :

Snottites	≈ 1 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	≈ 2 %	de la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	≈ 3,7 %	de la flore totale de cette structure

Eau de source minérale  $\approx 0,1\%$  de la flore totale de cette structure  
 Eau de mélange  $\approx 0,2\%$  de la flore totale de cette structure  
 Dans cette grotte il n'a pas été déterminé les familles de l'ordre des *Xanthomonadales* présente dans cette cavité.

### Morphologie

Les *Xanthomonadales* sont des bactéries de Gram (-), elles sont non sporulées ; aérobies ; elles sont formées de bacilles en bâtonnets sans pédoncules. Elles sont plus ou moins mobiles en fonction des espèces par le biais de flagelles.

### Caractéristiques

Les *Xanthomonadales* sont des bactéries à catalase positive ; le genre *Stenotrophomonas* est le seul capable de produire la réduction de nitrites.

### Phylogénétique

Dans les analyses effectuées sur la grotte de Sulzbrunn, il n'a été déterminé ni la famille, ni les genres de l'ordre des *Xanthomonadales*.

Grottes étudiées à ce jour ayant fait ressortir la présence du genre : genre *Stenophomonas* dans la grotte de Magura (Bulgarie : MaryaTa) et dans la grotte du Rideau de fer dans la province de la Colombie-Britannique au Canada.

#### 23.1.5.1 Famille *Xanthomonadaceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Saddler & Bradbury en 2005

On trouve notamment dans ce groupe l'espèce *Xanthomonas campestris*, d'une importance vitale pour la production industrielle d'une exopolysaccharide, le xanthane, ainsi que l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia*.

#### Genres de la famille des *Xanthomonadaceae*

<i>Gynumella</i>	<i>Luteibacter</i>	<i>Rudaea</i>
<i>Aquimonas</i>	<i>Luteimonas</i>	<i>Silanimonas</i>
<i>Arenimonas</i>	<i>Lysobacter</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Dokdonella</i>	<i>Metallibacterium</i>	<i>Tahibacter</i>
<i>Dyella</i>	<i>Panacagrimonas</i>	<i>Thermomonas</i>
<i>Frateuria</i>	<i>Pseudofulvimonas</i>	<i>Wohlfahrtiimonas</i>
<i>Fulvimonas</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Xanthomonas</i>
<i>Ignatzschineria</i>	<i>Rehabacterium</i>	<i>Xylella</i>
<i>Kaistibacter</i>	<i>Rhodanobacter</i>	

### Caractéristiques

Les *Xanthomonas* sont des bactéries avec : oxydase (-) ; catalase (+) ; acétoïne et indole (-) ; H<sub>2</sub>S (+) ; gélatinase, amidon et tween 80 (+) ; Hippurate (-) ; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (-) ; Acétate, citrate, malate, propionate, succinate (+) ; benzoate, oxalate et tartrate (-).

### Culture

Les *Xanthomonas* donnent des colonies jaunes (aryloctane bromé).

Milieu de culture : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g, Extrait de levure 0.7 g, amidon soluble de pomme de terre 8 g, KBr 10 g, glucose 1g, agar 15 g ; eau distillée QSP 1 000 ml ; autoclaver, ajouter du

- Chloroethanolil 15 mg.
- Céphalexine 20 mg.
- Kasugamycine 20 mg
- Gentamicine 2 mg
- Méthyle violet 2B 30 µl de solution à 1 % dans de l'éthanol 20 %
- Vert de méthyle 60 µl de solution aqueuse à 1 %

**Milieu pour le *Xylella fastidiosa*** : Il exige des milieux de culture avec du charbon animal ou glutamine – peptone et sérum albumine. Avec pour milieu de culture de base le CYE des *Legionella*.

#### Identification Gallérie API 20 NE

nom	NO <sub>3</sub>	ESC	GEL	PNPG	GLU	MNE	NAG	MAL	MAT	CIT
<i>X. maltophilia</i>	37	99	99	87	84	93	95	98	98	99

NO<sub>3</sub> : nitrate de potassium ; ESC : Esculine ; GEL : gélatine ; PNPG : p-nitro-phényl 8D- galactopiranoside ;  
GLU : glucose ; MNE : mannose ; MAG : N-acetyl-glucosamine ; MAT : maltose ; CIT : Citrate.

#### Pathologie

Espèces phytopathogènes : *X. albicans* ; *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. Fragaria*.

#### 23.1.5.1.1 Genre *Stenotrophomonas* (Grotte ornée de Magura et du Rideau de fer)

Nom donné par Palleroni & Brodbury, 1993

Les espèces rencontrées dans ces grottes sont pour la grotte de Magura :

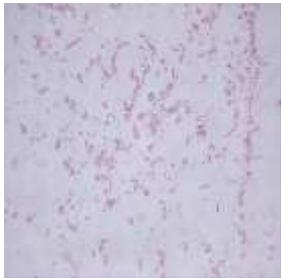
- *Stenotrophomonas* sp 2,1 % des échantillons
- *Stenotrophomonas* sp DIC6J 2,1 % des échantillons

L'espèce du genre *Stenotrophomonas* a été non identifiée pour la grotte du Rideau de fer.

Soit 4 % des échantillons observés dans la grotte de Magura et 9,23 % dans la grotte du Rideau de fer.

#### Ordre *Xanthomonadales* ; Famille *Xanthomonadaceae*

Le genre *Stenotrophomonas* a été aussi appelé *Xanthomonas*.

<b>Stenotrophomonas</b>	
	<p><b>Morphologie</b> : c'est une bactérie en forme de bâtonnet pléomorphe, formant des colonies jaunes (aryloctane bromé). Gram (-), aérobic, psychrophile.</p> <p>Les colonies sont rondes, à contour régulier, généralement mates avec une zone claire périphérique, non pigmentées ou pigmentées en jaune pâle.</p> <p>Leur diamètre atteint 1,5 à 2 mm après 48 heures d'incubation à 30-37 °C. Les colonies après 3 à 4 jours d'incubation ont généralement une odeur d'ammoniac. Les souches d'expectorations peuvent avoir un aspect muqueux. La plupart des souches nécessitent de la L-méthionine comme facteur de croissance.</p>

#### Caractéristiques

Le *Stenotrophomonas* a une catalase (+), acétoide et indole (-) ; Gélatinase (+), tween 80(+), amylase (+), cellulose (+). Ne fermente pas le glucose ; oxydase généralement (-) réaction trop faible pour être détectée ; réduction des nitrates en nitrites (-), Lysine décarboxylase (LDC) (+). ; dégrade la caséine, produit une lipase thermostable.

Le genre *Stenotrophomonas* est une bactérie psychrotrophe s'accompagnant d'une proportion augmentée d'acide gras insaturés dans la phase lipidique de la membrane externe. La conformation protéique est fonctionnelle à basse température et les enzymes sont thermolabiles. Les psychrotrophes dégradent les caséines des laits réfrigérés et produisent des enzymes souvent thermostables (lipases)<sup>366</sup>.

#### Culture

Le milieu pour la culture du *Stenotrophomonas* est Tampon KHPO<sub>4</sub> et K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + extrait de levure+ glucose+ amidon de pomme de terre+ KBr + agar => ajouter de l'eau distillée QSP 1000ml ; autoclaver après ajouter chlorothalonil (15 mg/l) + céphalexine (20mg/l) + kasugamycine (2mg/l) + gentamicine (2 mg/l) + méthyl violet (30 µg/l) + vert de méthyl (60µg/l).

## Environnement

Le genre *Stenotrophomonas* est très répandu dans l'environnement (par exemple dans l'eau et le sol), mais s'avère pathogène chez les patients immunodéprimés ou hospitalisés en soins intensifs. On le considère donc comme un pathogène nosocomial.

## Pouvoir pathogène

Le plus connu des *Stenotrophomonas* pour sa pathogénicité est le *Stenotrophomonas maltophilia* (Palleroni & Bradbury). Il est connu pour des infections nosocomiales principalement chez des patients immunodéprimés (cancers, infections par le virus HIV, neutropénies, traitements immunosuppresseurs...) et pour les personnes traitées à plusieurs reprises avec des antibiotiques à large spectre et hospitalisés durant une longue période dans des unités de soins intensifs.

## Espèce *Stenotrophomonas maltophilia* (Grotte ornée de Magura)

### Pathologie

La bactérie *Stenotrophomonas maltophilia* est connue pour provoquer diverses infections nosocomiales, c'est-à-dire des infections contractées lors d'un séjour dans un centre hospitalier. La bactérie *Stenotrophomonas maltophilia* peut entraîner, entre autres des méningites (des inflammations du cerveau et de la moëlle épinière) et des septicémies, chez les immunodépressifs, chez les patients atteints de pathologies chroniques comme la mucoviscidose, ou suivant des traitements lourds (dialyse). Le traitement d'une infection par la bactérie *Stenotrophomonas maltophilia* est difficile car cette bactérie est très résistante aux antibiotiques, le taux de mortalité est élevé.

### Contamination

Chez l'Homme sain, *S. maltophilia* peut être isolé dans les fèces ou les mains, mais le portage semble peu fréquent.

### Diagnostic

Le typage des souches peut être effectué par les techniques faisant appel à des approches moléculaires : ribotypage, électrophorèse en champ pulsé (PFGE), RAPD, ERIC-PCR...

### Résistance naturelle de *S. maltophilia*

*Stenotrophomonas* est très bien protégé contre les antibiotiques grâce à une membrane très peu perméable et à sa production d'enzymes de type  $\beta$  lactamase. Le *S. maltophilia* résiste naturellement aux antibiotiques, sauf aux moxolactames, par production d'une métallo- $\beta$ -lactamase (L1) de classe B et d'une  $\beta$  lactamase à sérine active (L2) de classe A hydrolysant les pénicillines et les céphalosporines, en particulier le céfotaxime.

La  $\beta$  lactamase L2 est inductible et inhibée par l'acide clavulanique, expliquant la sensibilité de *S. maltophilia* à l'association ticarcilline/acide clavulanique. Mais des résistances commencent à apparaître.

### Résistances acquises

Cette bactérie a la possibilité de former un pili par lequel elle peut échanger des plasmides associés à la résistance aux  $\beta$  lactamines. Leur rôle dans la résistance acquise n'a pas été clairement démontré et les enzymes correspondantes ne sont pas encore connues.

### Traitement antibiotique contre les *S. maltophilia*

Pour le traitement des mucoviscidoses, il a été observé que les infections chroniques pulmonaires étaient liées au *S. maltophilia*.

Toutefois, à l'heure actuelle, on ignore si les personnes atteintes de mucoviscidose doivent suivre un traitement contre cette bactérie. L'objectif présent est de déterminer si le traitement, associé à différentes combinaisons d'antibiotiques, pour le *Stenotrophomonas maltophilia* va améliorer la fonction pulmonaire ou diminuer la fréquence des admissions hospitalières des personnes atteintes de mucoviscidose.

### 23.1.5.2 Famille *Rhodanobacteraceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par (Naushad et al., 2015)

Ces bactéries sont chimioorganotrophes et photohétérotrophes. Elles vivent dans un milieu aquatique.

#### Taxonomie

**Embranchement : *Gammaproteobacteria* ; Ordre *Xanthomonadales***

Dans cet ordre il existe deux familles :

- *Xanthomonadaceae* (Naushad et al., 2015)
- *Rhodanobacteraceae* (Naushad et al., 2015)

Les *Xanthomonadales* se composent de 28 genres valablement nommés entre les deux familles : *Xanthomonadaceae* et *Rhodanobacteraceae*. Les *Xanthomonadaceae* se composent de 13 genres, tandis que les *Rhodanobacteraceae* comportent 14 genres.

Les familles se distinguent par les signatures phylogénétiques des variétés de protéines, étant spécifiques à chacune des familles. Ces indices sont en parallèles avec l'analyse phylogénétique révélant deux clades distincts, s'avérant être évolutifs et divergents.

Les dénominations anciennes de cet ordre ont été : *Lysobacterales* avec la famille *Lysobacteraceae*.

#### Genres des familles

<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>
○ " <i>Gynumella</i> "	○ <i>Arenimonas</i>
○ <i>Aquimonas</i>	○ <i>Denitratimonas</i>
○ <i>Chiayiivigra</i>	○ <i>Kaistibacter</i>
○ <i>Megamonas</i>	○ <i>Luteimonas</i>
○ <i>Dokdonella</i>	○ <i>Lysobacter</i>
○ <i>Dyella</i>	○ <i>Pseudoxanthomonas</i>
○ <i>Frateuria</i>	○ <i>Rehreibacterium</i>
○ <i>Fulvimonas</i>	○ <i>Silanimonas</i>
○ <i>Luteibacter</i>	○ <i>Stenotrophomonas</i>
○ <i>Metallibacterium</i>	○ <i>Thermomonas</i>
○ <i>Mizugakiibacter</i>	○ <i>Vulcaniibacterium</i>
○ <i>Oleigrimonas</i>	○ <i>Xanthomonas</i>
○ <i>Pseudofulvimonas</i>	
○ <i>Rhodanobacter</i>	
○ <i>Rudaea</i>	
○ <i>Tahibacter</i>	

Dans la publication de l'*ISME Journal* aucune précision n'a été donnée sur l'ordre, la famille ou le genre pour les bactéries de l'embranchement des *Deltaproteobacteria* présent dans la grotte de Sulzbrunn. Il sera donc retenu, les familles et les genres, ayant le plus de probabilité d'y être présents.

### 24.1 Classe *Deltaproteobacteria* (Grotte de Sulzbrunn)

Répartition microbienne de l'embranchement des *Deltaproteobacteria* par catégorie de prélèvement

Snottites	1,4 ± 1 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « subaerial »	2,2 ± 0,2 %	sur la flore totale de cette structure
Biofilms « submersed »	1,9 ± 0,2 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de source minérale	3,6 %	sur la flore totale de cette structure
Eau de mélange	1,3 ± 0,5 %	sur la flore totale de cette structure

Dans les analyses de la grotte de Sulzbrunn, il a été signalé des *Deltaproteobacteria* sans en définir les familles ou les genres ; afin de mieux connaître cet embranchement nous allons donner quelques informations sur les bactéries de ce groupe habituellement trouvées dans ce type de cavité.

Les genres suivant ont été identifiés dans le gouffre de la Sambuy (Haute-Savoie) à hauteur de 15 % de la flore totale analysée. Ils représentent donc une proportion non négligeable de cette flore.

Ordres connus dans l'embranchement des *Deltaproteobacteria* :

*Deltaproteobacteria* ou *-Proteobactéria*

Il comprend sept ordres :

• <i>Bdellovibrionales</i>	• <i>Desulfuromonadales</i>
• <i>Desulfobacterales</i>	• <i>Myxococcales</i>
• <i>Dessulfovibrionales</i>	• <i>Syntrophobacterales</i>
• <i>Desulfurellales</i>	

Genres les plus connus :

- *Bdellovibrio*
- *Geobacter*
- *Myxococcus*

#### 24.1.1 Ordre *Bdellovibrionales* (Gouffre de Sambuy)

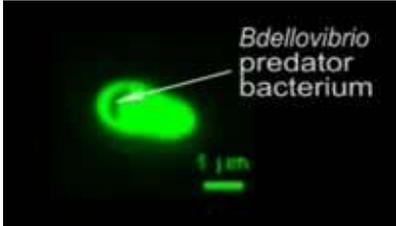
Nom donné par Stop et Starr, 1963.

##### 24.1.1.1 Famille *Bdellovibrionaceae* (Gouffre de Sambuy)

Un seul genre le *Bdellovibrio*

##### 24.1.1.1.1 Genre *Bdellovibrio* (Gouffre de Sambuy)

#### Ordre *Bdellovibrionales* ; Famille *Bdellovibrionaceae*

 <p><i>Bdellovibrio predator bacterium</i> 1 µm</p>	<p style="text-align: center;">Genre <b><i>Bdellovibrio</i></b></p> <p><b>Morphologie</b> : en forme de petits bâtonnets Gram (-) ; aérobies stricts. Ils sont flagellés, engainés, monotriches, très mobiles ; longueur 2.5 µm et 1.4 µm</p> <p><b>Culture</b> : pas de culture possible en laboratoire sur milieu ; ils sont inhibés par le NaCl à 3,5 % mais demandent des ions Na pour vivre. Nitrogénase (-).</p>
--	--

Les *Bdellovibrio* se rencontrent dans l'environnement aquatique (eaux douces, eaux de mer, eaux des égouts) et dans le sol. Ces bactéries sont aussi communément trouvées dans les habitats artificiels, la rhizosphère des racines des plantes et le sol<sup>367</sup>.

On l'observe également dans le tractus intestinal de certains mammifères où il réduit les agents pathogènes de l'intestin. Le *B. bacteriovorus* est utile dans l'épuration des eaux usées, car il diminue le nombre de bactéries Gram (-).

### Description et activité bactérienne

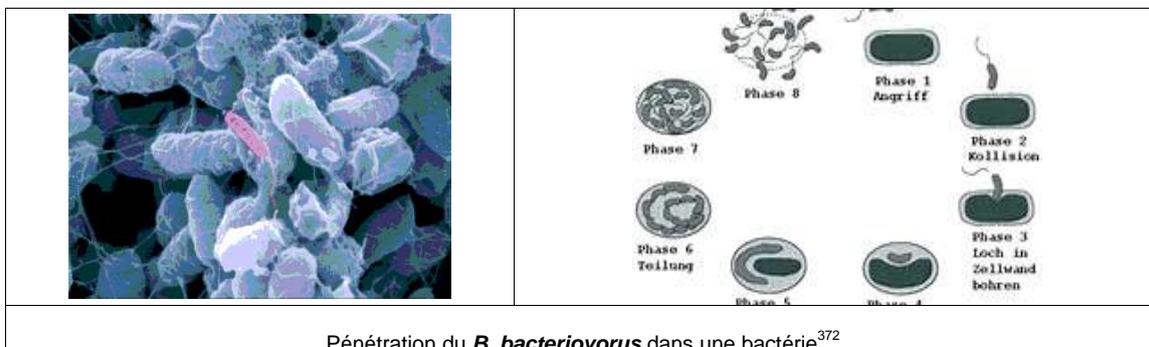
Les *Bdellovibrio* ont la capacité de parasiter et de tuer les autres bactéries Gram (-), telles que : *Alcaligenes*<sup>368</sup>, *Campylobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Legionella* et *Shigella*. *Bdellovibrio* ont ce que l'on appelle un mode de vie diphasique avec une phase de « chasse », motiles, libres et une croissance intracellulaire de parasite de phase. La phase intracellulaire de *Bdellovibrio* est limitée pour le périplasma, où la physiologie de la proie est modifiée en fonction du prédateur, formant un bdelloplast distinctif. De type sauvage, *Bdellovibrio* sont des parasites obligatoires et doivent vivre une partie de leur vie dans un hôte ou mourir<sup>369</sup>.

Toutefois, les chercheurs ont pu mettre en laboratoire la culture de certaines souches de *Bdellovibrio* sur des proies comme l'*Escherichia coli*, culture similaire aux cultures des bactériophages. L'espèce la plus répandue, *Bdellovibrio bacteriovorus*, vit dans un large éventail d'environnements (l'eau douce, les eaux saumâtres, l'eau de mer, les eaux usées, dans les conduites d'eau, les intestins d'animaux et les autres eaux de réservoirs).

Le cycle de vie de *B. bacteriovorus* comprend cinq étapes. Tout d'abord, la bactérie se fixe à l'aide d'une extension de crochet décomposant la paroi cellulaire externe par le biais de la libération de certaines enzymes dans la membrane externe de l'hôte. Ceci est suivi, par la pénétration dans le périplasma, avec la réparation des dommages causés à la membrane cellulaire. Une fois que la bactérie est à l'intérieur du périplasma, elle introduit des enzymes hydrolytiques dans le cytoplasme de l'hôte. Cela augmente l'approvisionnement en nourriture de la bactérie grâce à la membrane interne de la cellule hôte « fouillant ». La bactérie se développe ensuite et une fois qu'elle a épuisé toutes les ressources dans la cellule de l'hôte, elle se divise en 15 cellules mobiles. L'hôte est affaibli, il se produit une lyse cellulaire, libérant la progéniture *B. bacteriovorus*, sont alors prêts à trouver de nouvelles proies pour attaquer. Ce cycle de la vie dure 3 heures 57'...

### Lutte biologique et agents thérapeutiques

La capacité de *Bdellovibrio* à lyser les cellules bactériennes, a suggéré son utilisation dans le domaine médical, car elle semble cibler son action protéolytique dans le seul domaine bactérien et sur les bactéries Gram (-). Les récentes publications du génome de *B. bacteriovorus* par Rendulic et al. ont indiqué l'absence d'un type de système de sécrétion III, étant fortement associé à une infection pathogène des organismes eucaryotes, comme les humains. Il n'y a aucun signalement de *Bdellovibrio* envahissant les cellules de mammifères. Ce sont des éléments positifs pour l'utilisation éventuelle de *Bdellovibrio* comme agents thérapeutiques chez les animaux et peut-être chez les humains<sup>370,371</sup>.



Pénétration du *B. bacteriovorus* dans une bactérie<sup>372</sup>

## Culture

Milieu d'isolement : Mettre en suspension 50g de sol dans 500ml d'eau du robinet agiter pendant une heure et centrifuger 5 mn à 2000g. Réaliser des filtrations successives avec des filtres de porosité 3 ; 2 ; 1 soit 0.8, 0.65 et 0.45 µm. Prendre les deux et troisième des derniers filtrats et placer en double couche comme suit :

1. Recouvrir le fond d'une boîte de Pétri d'un milieu gélosé à 1.2 à 1.5% fondu.
2. À la couche supérieure ajouter à 5 ml de milieu gélosé à 0.6 % fondu à 42°C, contenant 0.5ml de la suspension de l'hôte ( $10^4$  cellules/ml bactériennes choisies pour être phagocyté) et 0.5 de la suspension de *Bdellivibrio*.

Le milieu du fond (YP) : 0.3% extrait de levure (Difco), 0.06% de peptone (Difco), 0.05 M tris tampon, pH 7.5. Les milieux sont stérilisés 15 minutes à 121°C.

## Pathogénicité

À ce jour aucune pathologie n'a été signalée.

### 24.1.2 Ordre *Desulfuromonadales* (Gouffre de Sambuy)

#### Familles de l'ordre des Ordre *Desulfuromonadales*

- *Desulfuromonadaceae* (Plennig et Biebl, 1977)
- *Pelobacteriaceae*
- *Geobacteriaceae*

#### 24.1.2.1 Famille *Geobacteraceae* (Gouffre de Sambuy)

Nom donné par Holmes et coll, 2005.

#### Genres de la famille *Geobacteriaceae*

- *Geothermobacterium*
- *Geobacter*
- *Geopsychrobacter*

#### 24.1.2.1.1 Genre *Geobacter* (Gouffre de Sambuy)

Isolé pour la première fois par Derck & Lovley en 1987

#### Ordre *Desulfuromonadales* ; Famille *Geobacteraceae*

	<p style="text-align: center;"><b>Genre <i>Geobacter</i></b></p> <p><b>Morphologie</b> : en forme de bâtonnets, anaérobie, Gram (-)</p> <p><b>Caractéristiques</b> : les <i>Geobacter</i> ont des propriétés les rendant utiles dans la biorestauration. Ils se sont avérés être les premiers organismes vivants ayant la capacité d'oxyder des composés organiques et des métaux, dont le fer et les métaux radioactifs, ainsi que les composés du pétrole en donnant du dioxyde de carbone par l'utilisation d'oxyde de fer ou d'autres métaux disponibles comme les accepteurs d'électrons.</p>
---	--

## Historique

La première espèce de *Geobacter* (initialement désignée souche GS-15) a été isolée à partir de sédiments de la rivière Potomac, juste en aval de Washington D.C. en 1987. Cet organisme, étant connu comme *Geobacter metallireducens*, a été le premier organisme vivant trouvé pouvant oxyder des composés organiques. En d'autres termes, *Geobacter metallireducens* gagne son énergie à l'aide d'oxyde de fer (minéral abondant dans les sols et les sédiments) de la même manière que les humains utilisent de l'oxygène.

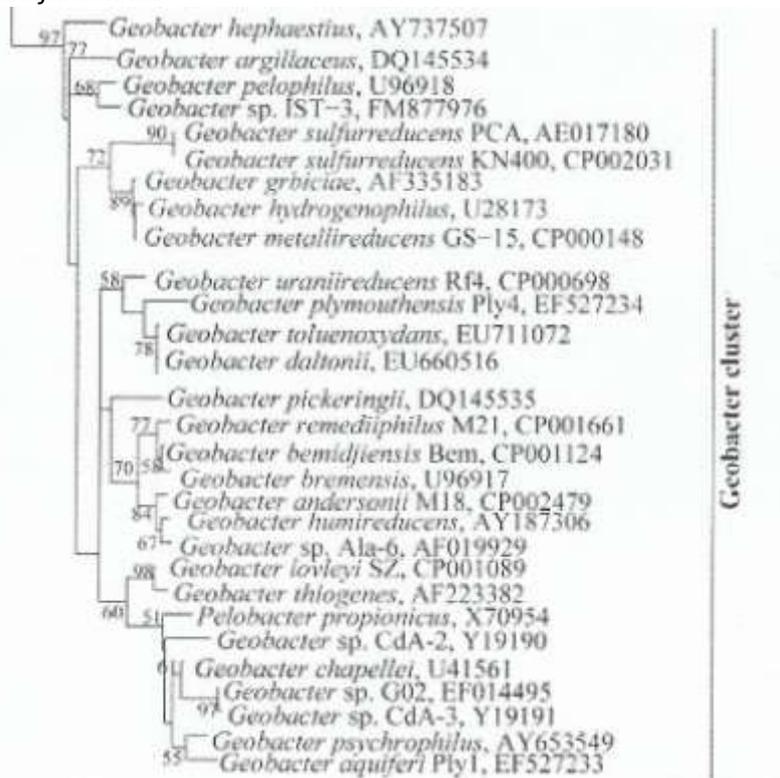
D'autres espèces de *Geobacter* ont par la suite été isolées dans une multitude d'environnements. Ils fournissent des modèles aidants à la compréhension des transformations du fer dans la biotechnologie moderne et peuvent expliquer des phénomènes géologiques, tels que l'accumulation massive de magnétite.

### Espèces de *Geobacter* connues

<i>G. argillaceus</i>	<i>G. grbiciae</i>	<i>G. pickeringii</i>
<i>G. bemidjiensis</i>	<i>G. hydrogenophilus</i>	<i>G. sulfurreducens</i>
<i>G. bremensis</i>	<i>G. metallireducens</i>	<i>G. thiogenes</i>
<i>G. chapellei</i>	<i>G. pleophilus</i>	<i>G. uraniireducens</i>

## Taxonomie

### *Desulfuromonas*



## Caractéristiques

### Bioélectronique

Les *Geobacter* ont de nouvelles propriétés électroniques pouvant avoir des applications pratiques. Par exemple, ils peuvent former des films conducteurs hautement cohésifs ayant des conductivités rivalisant avec ceux des polymères conducteurs synthétiques. La conductivité des films de *Geobacter* résulte d'un réseau de nano-fils microbiens, minces (environ 3 nm), filaments de protéines conduisant les électrons sur toute leur longueur de manière identique aux conducteurs métalliques. Ainsi, les *Geobacter* offrent la possibilité de réaliser des capteurs électroniques et autres dispositifs fonctionnant sous l'eau et pouvant facilement se coupler à des interfaces biologiques et abiotiques, à base de matière première peu onéreuse, comme l'acide acétique (le vinaigre, par exemple).

### Diversité métabolique dans la réduction du fer<sup>+++</sup> et du Manganèse<sup>++++</sup>

La capacité de réduction du fer<sup>3+</sup> et du manganèse<sup>4+</sup> est largement répartie entre les subdivisions des bactéries de toutes les sous-classes des *Proteobacteria* (Coates et al, 2001) et les hyperthermophiles. Les *Geobacteraceae* sont une famille bactérienne prédominante ou les bactéries ferro-réductrices réduisant le fer<sup>3+</sup> en fer<sup>2+</sup> et du manganèse<sup>4+</sup> en manganèse<sup>3+</sup>, y compris l'espèce du *Geobacter metallireducens* (Loveley et al, 1993). La réduction des métaux a été également signalée chez les hyperthermophiles dans le règne des *Archaea* (Vargas et al., 1998). Plus de 40 isolats ayant une croissance anaérobie avec un couple respiratoire utilisant le fer<sup>III</sup> et le manganèse<sup>IV</sup> ont été caractérisés

(Coates et coll. 2001). Les sources d'énergies utilisées par les Fe<sup>III</sup> et le Mn<sup>IV</sup> comprennent comme substrat primaire l'hydrogène H<sub>2</sub> et les acétates soutenant la méthanogenèse et la réduction des sulfates. Contrairement à certains microorganismes méthanogènes résistants à l'oxydation des

métaux les composés organiques multi-carbones tels que les lactates, les pyruvates, les acides gras à longue chaîne, les composés aromatiques ; les acides aminés et le glucose (ku et al., 1999 ; Loley, 2000). Ces composés peuvent être complètement oxydés en gaz carbonique (CO<sub>2</sub>), ou ils peuvent être fermentés.

L'oxydation complète du carbone organique en CO<sub>2</sub>, se produit dans trois des quatre genres de la famille *Geobacteraceae* (Lovley, 2000) étant des genres phylogénétiquement distincts tels que *Geovibrio* et *Deferribacter* (Greene et al., 1997). Les sous-classes *Gamma-* et des *Epsilon-protobactria* ont tendance à oxyder une gamme plus limitée d'acides organiques, avec souvent l'oxydation incomplète du carbone (Lovley, 2000). Relativement peu de bactéries Fe<sup>III</sup>-réducteur en dehors de ces groupes sont connus pour utiliser l'hydrogène H<sub>2</sub> (Coates et coll, 1994, 1996). Cependant certaines espèces de *Geobacter* peuvent utiliser à la fois H<sub>2</sub> et les acétates (Coates et coll., 1999).

La plupart des organismes réducteurs de fer<sup>(III)</sup> ont la capacité de réduire Mn<sup>(IV)</sup> et ont la possibilité comme le fait l'oxygène (O<sub>2</sub>) d'oxyder le soufre élémentaire ou des substances humiques (Thamdrup, 2000 ; Senko et Stolz, 2001). Les substances humiques peuvent s'avérer être l'accepteur alternatif d'électrons le plus commun pour les bactéries métal-réductrices, particulièrement dans les environnements d'eau douce où le soufre S<sup>0</sup> n'est pas abondante (Lovley et coll., 1996, 1998).

### **Habitat**

Les *Geobacter* sont omniprésents dans le sol, les sédiments et les environnements souterrains. Ils ont un rôle important dans la réduction des métaux.

Les tentatives de quantifier les bactéries réductrices du fer<sup>(III)</sup> dans les sédiments d'aquifères suggèrent qu'elles sont dominées par les genres *Geobacter* ou *Geothrix* (Anderson et al., 1998 ; Rooney-Varga et coll., 1999)<sup>373</sup>.

### **Biorestauration**

Certaines espèces de *Geobacter* sont également intéressantes en raison de leur rôle dans la restauration de l'environnement. Par exemple, l'élimination de pollutions par des dérivés du pétrole dans les eaux souterraines polluées par oxydation de ces composés organiques en dioxyde de carbone, ainsi que la captation de contaminants métalliques radioactifs dans les eaux souterraines.

### **Bioénergie**

Les *Geobacter* jouent un rôle important dans les digesteurs anaérobies des eaux usées, dégradant les contaminants organiques en produisant du méthane, un bio-carburant important.

### **Électrosynthèse microbienne**

La capacité des *Geobacter* à oxyder des composés organiques est prometteuse dans la stratégie de production de bioélectricité, surtout dans des zones éloignées de toute activité humaine et technologique.

#### **Application pour générer de l'électricité par voie biologique.**

En plus de transférer des électrons à des accepteurs d'électrons d'origine naturelle tels que les oxydes de fer et de manganèse, certains réducteurs peuvent transférer des électrons à des électrodes (Bond et al., 2002 ; Bond et Lovley, 2003). Les membres des *Geobacteraceae* ont la possibilité de conserver l'énergie pour soutenir la croissance cellulaire, en couplant l'oxydation des acétates ou des composés aromatiques, ou de transférer des électrons à des électrodes produisant de ce fait une conduction électrique (Bond et coll, 2002 ; Bond et Lovley, 2003)<sup>374</sup>. Le transfert d'électrons est essentiellement quantitatif avec un rendement d'électrons semblables à ceux obtenus pour le fer(III) réduit. Le *Geobacter* forme un biofilm sur la surface de l'électrode, étant extrêmement stable et peu continuer à produire de l'électricité pendant des semaines (Bond et Lovley, 2003).

Cette forme de respiration a une application dans la production de bioénergie à partir de divers déchets organiques. Par exemple, lorsqu'une électrode de graphite (l'anode) est placée dans des sédiments marins anaérobies et que celle-ci est reliée à une électrode de graphite dans de l'eau en aérobiose sus-jacente, il se produit un flux d'électrons entre ces deux électrodes (Bond et al., 2002).

L'analyse moléculaire de la surface de l'anode a démontré qu'elle était très riche en *Geobacteraceae* (Tender et coll., 2002). Ceci suggère que les *Geobacteraceae* colonisant l'anode sont l'intermédiaire

des acétates oxydant, dans la clé du métabolisme anaérobie de la matière organique des sédiments avec l'électrode jouant le rôle d'accepteur d'électron. Il devrait être possible de la même manière de récolter un potentiel électrique de la dégradation des déchets anthropiques.

**Bio-utilisation du dioxyde de carbone :** il s'agit d'un procédé convertissant le dioxyde de carbone en carburant et autres produits biologiques utiles. Piloté grâce à la technologie solaire utilisant la photo-électrosynthèse, cela offre la possibilité d'utiliser la lumière du soleil et le dioxyde de carbone afin d'obtenir des composés organiques bien plus utiles et durables que les procédés à base de biomasse.

### Étude du génome de *Geobacter*

Les génomes de plusieurs espèces de *Geobacter* ont été séquencés et incorporés dans un modèle informatique pouvant prédire le métabolisme de *Geobacter* dans différentes conditions environnementales. Il y a plusieurs bactéries réduisant le  $\text{SO}_4^-$  pouvant réduire le fer<sup>(III)</sup> et uranium U<sup>(IV)</sup> bien qu'elles ne puissent généralement pas soutenir la croissance seule sur les métaux de transition (Lovley et Phillip, 1992 ; Coleman et col, 1993).

### 24.1.2.2 Famille *Desulfuromonadaceae*

Nom donné par Plennig et Biebl, 1977.

L'utilisation des formiates par les genres de la famille des *Desulfuromonadaceae* ayant permis de retenir cette famille dont les genres peuvent utiliser les formiates, substrats formés par les bactéries méthanotrophes et méthylotrophes.

#### Les genres de cette famille :

- *Desulfotomaculum*
- *Desulfovibrio*
- *Desulfobulbus*
- *Desulfobacter*
- *Desulfobacterium*
- *Desulfococcus*,
- *Desulfurella*
- *Desulfomonile*
- *Desulfosarcina*
- *Desulfobulbus*.
- *Desulfoarcullus*
- *Desulfuromonas*
- *Thermodesulfobacterium*
- *Desulfosarcina*
- 

#### Morphologie

Les *Desulfuromonadaceae* sont des bactéries mobiles ou non ; de formes diverses selon le genre ; les genres sporulées peuvent être de Gram (+) ; quelques espèces contiennent des vacuoles renfermant de l'hydrogène ou des composés organiques servant de donneurs d'électrons. L'oxydation, des composés organiques, conduit à des acétates ou au  $\text{CO}_2$ . Les donneurs d'électrons sont souvent l' $\text{H}_2$ , le lactate, les acides gras, l'Éthanol ou les acides dicarboxyliques. La croissance autotrophique sur  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  et sulfate est possible. Les sulfato-réducteurs n'utilisent pas la voie de Calvin mais la voie du cycle tricarboxylique ou de l'acétyl-CoA pour le *Desulfobacterium autophicum*. Ces bactéries peuvent faire des corrosions importantes dans les industries.

#### Caractéristiques

Les *Desulfuromonadaceae* : sont des bactéries réduisant le soufre ou les sulfates.

Les matières organiques utilisées par cette famille sont :

- Les hydrocarbures : alcanes de  $\text{C}_{12}$  à  $\text{C}_{20}$ .
- Les acides organiques monocarboxyliques aliphatiques : Formiates, acétates, propionates, butyrates, acides gras supérieurs (jusqu'à  $\text{C}_{20}$ ), isobutyriques, 2-méthylbutyriques, 3-méthylvalérates, pyruvates, lactates.
- Les acides dicarboxyliques : succinates, fumarates, malates, oxalates, maléïnates, glutarates, pimélates.
- Les alcools : méthanol, éthanol, propanol-1, butanol-1, pentanol-1, isobutanol, propanol-2, butanol-2, éthylène glycol, 1,2-propanediol, 1,3 propanediol, glycérol.

- Acides aminés : glycine, sérine, alanine, cystéine, cystine, thréonine, valine, leucine, isoleucine, aspartate, glutamate, phénylalanine.
- Glucides : fructose, glucose, mannose, xylose, rhamnose.
- Composés aromatiques : benzoate, 2-3-4-hydroxybenzoate, phénol, p-crésol, catéchol, résorcinol, hydroquinone, phloroglucinol, pyrogallol, 2,4-dihydroxybenzoate, aminobenzène (aniline), hippurate, acide nicotinique, indole, quinoline, phénylacétate, 4-hydroxyacetate, indolylacétate, 3-phénylpropionate, triméthoxybenzoate, m-anisate, p-anisate, vanilate, 3-méthoxysalicylate, vaniline, syringaldehyde, n-anisaldéhyde, 2 et 3-hydroxybuzaldéhyde.
- Divers : Choline, bétaïne, oxamate, acétone, dihydroxyacétone, furfural, cyclohexanone, cyclohexanol, cyclohexane carboxylate.

**Composés inorganiques utilisés par cette famille :** H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>.

Échanges possibles des formes d'oxydo-réductions :

H <sub>2</sub> → H <sup>+</sup> + e <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ↓ S <sup>2-</sup> → S- composés organiques ↑ S <sup>0</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ← NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ↓ NH <sub>3</sub> → N-composés organiques ↑ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
CO ↓ C-composés organiques ↑ CO <sub>2</sub>	HO <sup>-</sup> ↓ O <sub>2</sub> ↓ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> O	Se <sup>0</sup> ↑ SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ↓ Séléno-méthionine
U <sup>6+</sup> → U <sup>4+</sup> Fe <sup>3+</sup> → Fe <sup>2+</sup>	Hg → Hg (méthyl) <sub>2</sub>	Cr <sup>6+</sup> → Cr <sup>3+</sup>

Les *Desulfovibrio* sont des chimolithotrophes (utilisant l'acétate et le CO<sub>2</sub>), deux espèces de ce genre comme le *D. multivorans* et le *D. baarsii* n'utilisent pas l'hydrogène, mais croissent avec le formiate comme seule source de Carbone. Le *Desulfotomaculum orientis* est autotrophe avec l'utilisation de H<sub>2</sub> et utilise la voie de l'acétyl-CoA.

Les sous-groupes 1 :

- Le *Desulfomaculum* : est sporulé ; il peut se colorer en Gram (+).

Le sous-groupe 2 :

- Les *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio*, *Thermodesulfobacterium* :  
Ces bactéries sont : Non sporulées ; oxydent les substrats acétates ;
- Les *Desulfovibrio* et *Desulfomicrobium* peuvent utiliser le soufre (S<sup>0</sup>).

Température optimum de développement (65° à 70°C).

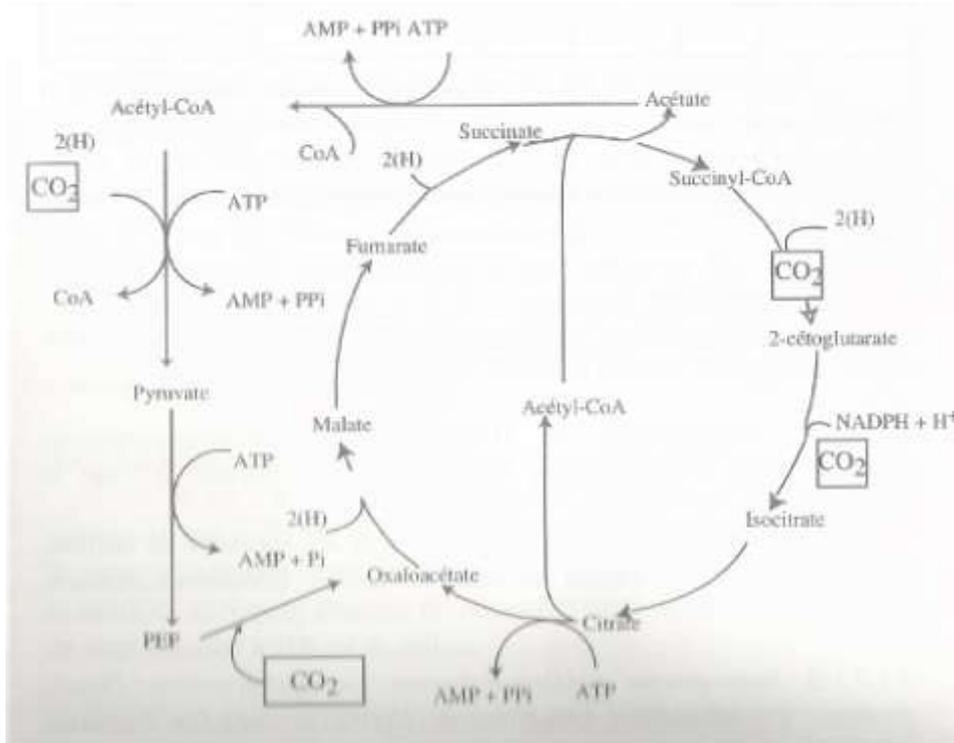
Le sous-groupe 3 :

- Les *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina* : ce sont des bactéries oxydant complètement les substrats.
- Le *Desulfobacter hydrogenophilus* est autotrophe avec le H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et le SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>
- Les *Desulfobacterium* sauf le *D. undolicum* et le *D. phenolicum* sont souvent autotrophe.
- Le *Desulfomonile* déshalogène le 3-chlorobenzoate.
- Le *Desulfonema* est filamenteux.
- Le *Desulfosarcina* est autotrophe

Le sous-groupe 4 :

- Les *Desulfurella* et *Desulfuromonas* réduisent le soufre<sup>375</sup>.

## Métabolisme avec fixation du CO<sub>2</sub>



Cycle réducteur des acides tricarboxyliques pour l'assimilation du CO<sub>2</sub> par le *Desulfobacter hydrogenophilus*  
(Jean LARPENT et col. « mémento de technique de microbiologie » ; Tec-DOC, 1990 ; page 401)

### Culture

#### Milieu de culture et d'identification.

Milieu en g/l : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, NH<sub>4</sub>Cl 1g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, CaCl<sub>2</sub> 1g, MgCl<sub>2</sub> 2g, sodium lactate 3.5g, Extrait de levure 1g, acide ascorbique 0.1g, acide thioglycolique 0.1g, FeSO<sub>4</sub> 0.5g, agar 15g ; amener le pH à 7.6 avec de NaOH 6N ; ajouter de l'eau distillée qsp 1000ml.

#### Milieu pour les *Desulfovibrio* :

Milieu en g/l :

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, CaCl<sub>2</sub> 1g, MgCl<sub>2</sub> 2 g, sodium lactate à 70 % 5 g ;
  - ; Ajouter l'eau distillée qsp 1 000 ml ; Stériliser 20 mn à 121°C.
  - Préparer séparément une solution de sulfater ferreux et d'ammonium à 1 % et stériliser en vapeur fluentes 60 minutes 3 jours de suite. Ajouter 5 ml de cette solution à 100 ml de milieux ci-dessus.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, CaCl<sub>2</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> 2 g, sodium lactate à 70% 5 g ;
  - Ajouter l'eau distillée qsp 1 000 ml ; Ajuster à pH 7 à 7.5 avec de NaOH 6N ; stériliser à l'autoclave 121°C ;
  - La solution de sulfate ferreux ci-dessus sera introduite 5ml pour 100 ml de milieu.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, CaCl<sub>2</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 2 g, sodium lactate à 1.6 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, Extrait de levure 1g, gélose 15 g ; Ajouter l'eau distillée qsp 1 000 ml ; Ajuster à pH 7 à 7.5 avec de NaOH 6N ; stériliser à l'autoclave 121°C ;

### Environnement

Les *Desulfobacterium* sont rependus dans les sédiments saumâtres et marins.

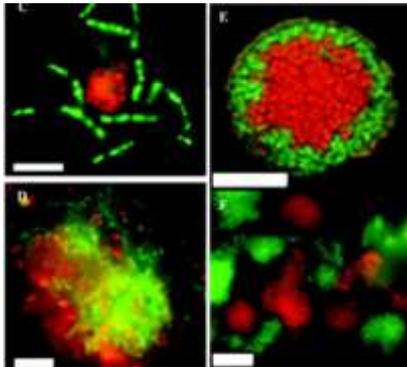
Les *Desulfotomaculum* sont présents dans les sols anoxiques (anaérobies). Les *Desulfovibrio* sont anaérobies, on les trouve dans les boues et le milieu marin et peut aussi se trouver dans le tube digestif humain. Les *Desulfuromonas* sont anaérobies, on les trouve dans les lacs salés. Les *Desulfobulbus* peuvent produire de l'énergie libre, ils sont donneurs d'électrons.

## La famille *Desulfuromonadaceae* dans le karst

Cette famille étant composée majoritairement des genres bactériens d'origines marines présentes dans les sédiments anoxiques, elle pourrait trouver refuge dans le biotope de la grotte de Sulzbrunn. La présence de fer et de soufre apportés par l'eau de source d'origine profonde, dans un équilibre en milliéquivalent de ( $Fe^{3+}/S^{2+}$ ) donne un rapport pour la cavité de Sulzbrunn de 0.85 (soit proche de 1 d'origine), ceci pourrait être une raison de supposer la présence de la famille des *Desulfuromonadaceae* dans cette cavité. Mais si la teneur en fer sont 10 fois la dose normale des eaux thermales (valeurs normales 0 à 0.12 mg/l), la teneur en soufre est relativement faible pour une eau thermale (valeurs normales 77 à 1433 en mg/l  $SO_4^{2-}$ ). Donc pour pouvoir affirmer la présence de cette famille au sien de cette cavité, une recherche spécifique de cette famille s'impose.

### Genre *Desulfosarcina*

#### Coloration par sonde fluorescente



#### *Desulfosarcina*.

C) Photo des tiges colorées par une sonde ANME1-862 étiquetée avec de la fluorescéine. Les bactéries sont colorées en vert.

*Desulfosarcina* spp est tachée de la sonde DSS\_658 étiquetée avec Cy-3 (en rouge).

D) Un grand agrégat bactérien coloré avec la sonde « ANME-1/sulfate-reducing » du *Desulfosarcina*, montrant une association entre les bactéries dans le groupe. Barre d'échelle de 10 m.

#### Phylogénétique

À ce jour aucune analyse génomique complète a été réalisée sur l'ADN du *Desulfosarcina*.

#### Structure cellulaire et métabolisme

Les réducteurs des sulfates ont un large éventail de morphologie cellulaire, y compris de tiges, des formes vibrios, des formes ovales ou sphériques et même des cellules en forme de déchirure et d'oignon. Ce sont pour la plupart des bactéries mésophiles, mais quelques espèces sont thermophiles ; certaines sont mobiles et d'autres non.

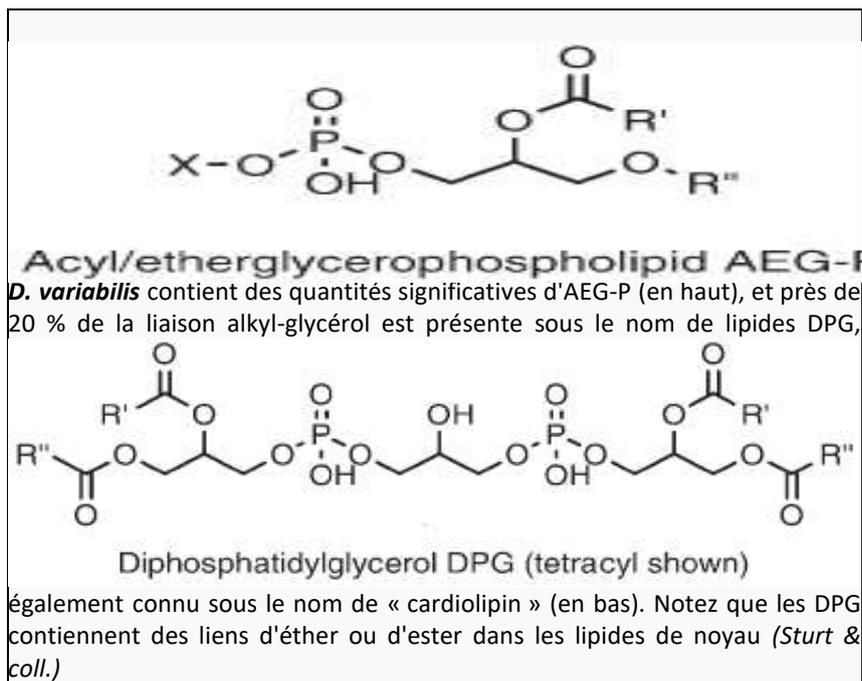
L'espèce *Desulfosarcina variabilis* est mésophile et contient des lipides bactériens de base (voir les images ci-dessous). Ce sont des phospholipides dont<sup>376</sup> :

La phospho-éthanolamine pour 48 %

Le phospho-glycérol pour 33 %

Cette espèce contient uniquement des chaînes latérales d'éther n-hexadecyl.

Ces structures lipidiques sont proches des lipides observés dans les *Archaea*<sup>377</sup>.



## Environnement

Les *Desulfosarcina* : bien que la réduction de sulfate soit vraisemblablement un processus anaérobie, les bactéries sulfate-réductions (SRB) sont également importantes dans les environnements aérobies si elles peuvent proliférer dans les zones anaérobies. Par exemple, dans les sédiments marins et dans les systèmes aérobies de traitement des eaux usées, la réduction du sulfate représente jusqu'à 50 % de la minéralisation de la matière organique. En outre, la réduction du sulfate stimule fortement la corrosion microbienne des métaux.



Les *Desulfosarcina* ayant été identifiés par le PIMO (*Plum Island Microbial Observation*) dans la côte du Massachusetts. Cet organisme identifie les procaryotes dans les sédiments des marais salés et dans le plancton et en détermine leur rôle dans le contrôle des principaux processus écosystémiques. Parmi les souches identifiées le *Desulfosarcina variabilis* et le *Desulfobacterium anilini* se sont avérés persistants dans les sédiments<sup>378</sup>.

### 24.1.3 Ordre *Myxococcales*

Nom donné par Beelbe en 1941.

Cet ordre *Myxococcales* a une seule famille : Famille *Cystobacterineae*

#### 24.1.3.1 Famille *Cystobacterineae*

Ordre *Myxococcales* ; Famille *Cystobacterineae* ; Genre *Myxococcus*

#### Morphologie

Ces myxospores sont contenus dans des cystes avec une paroi bien définie

Les cellules végétatives sont effilées. Il y a production de myxospores sphériques ou ovales sans sporange bien défini.

#### Genres connus dans cette famille :

- *Myxococcus*
- *Angiococcus*

- *Cystobacter*

#### 24.1.3.1.1 Genre *Myxococcus* (Gouffre de Sambuy)

Nom donné par Beebe 1941.

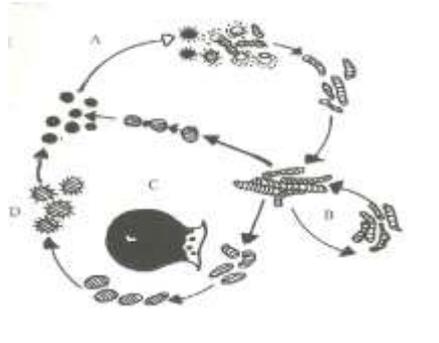
##### Différentes espèces *Myxococcus*

<i>M. coralloides</i>	<i>M. stipitatus</i>
<i>M. flavescens</i>	<i>M. virescens</i>
<i>M. fulvus</i>	<i>M. xanthus</i> .
<i>M. macrosporus</i>	

### Morphologie

	<p style="text-align: center;"><b>Genre <i>Myxococcus</i></b></p> <p><b>Morphologie :</b> en forme de bâtonnets ou de des «cocci» (télomorphes), leur mobilité se fait par sans flagelle mais par glissement sur un substrat solide de mucus ; elles réalisent une fructification, aérobie, mobiles par glissement avec libération de substances muqueuses ; ils possèdent des myxospores, Gram (-). Ces bactéries réalisent un cycle de développement avec des fructifications et présence de myxospores ou microcytes.</p>
---	--

### Pléomorphisme du *Myxococcus*

	<p style="text-align: center;"><b>Myxococcus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• - Germination</li> <li>• - Croissance</li> <li>• - Fructifications</li> <li>• - Microcystes</li> </ul> <p>Les cellules végétatives sont effilées. Production de myxospores sphériques ou ovales sans sporange bien défini (<i>Myxococcus</i> <i>Angiococcus</i>)</p>
---	--

### Caractéristiques métaboliques

Ordre *Myxococcales* se sont des bactéries aérobies, avec catalase + ; Elles sont bactériolytiques ; soit cellulolytiques ; leur paroi est composée de muco-peptides ; Elles sont soit bactériolytiques, soit cellulolytiques ; ce groupe est hétérogène. La paroi des *Myxobacteria* est composée de muco-peptide en amas, reliés entre eux par du matériel non muco-peptidique. Le lipo-polyoside contient du 3-O-méthyl-D-xylose étant inconnu chez les autres bactéries ; Les pigments sont des esters de caroténoïdes-glycosides d'acides gras. Elles hydrolysent les protéines, les acides nucléiques, les esters d'acide gras et de nombreux polysaccharides (cellulose pour les *polyangiaceae*) ; Les formes de résistance sont situées dans des structures plus volumineuses dénommées fructifications. Celle-ci sont soit des groupements de forme de résistance englobées dans une masse visqueuse, soit des structures plus complexes où les formes de résistance sont incluses dans des kystes pouvant être portées par des tiges simples ou ramifiées. Les fructifications sont en général fortement colorées et souvent assez volumineuses pour être vues à l'œil nu.

### Phylogénétique

L'analyse de l'ADN-ADN donne en C+G = 67 à 71 % (très élevé).

## Culture

Les colonies sont jaunes verdâtres, rouges ou violettes. Les cellules se recourent en colonies, souvent dénommées « essaims » ou « pseudoplasmodes », étant aplaties, minces, envahissant rapidement la surface du substrat par mouvements actifs des cellules localisées à leur périphérie.

### Analyse différentielle des Cocci

Caractères	<i>Deinobacter</i>	<i>Deinococcus</i>	<i>Marinococcus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Planococcus</i>	<i>Salinicoccus</i>
Arrangement des cellules	Bâtonnets en paire	Paires tétrades	Paires tétrades	Amas tétrades	Paires tétrades	Paires, tétrades, grappes
Mobilité	-	-	+	-	+	-
Halophiles obligatoires exigeant 7,5 % de NaCl	-	-	+	-	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Acidité à partir des glucides	-	-	-	+	-	-
Acide téichoïques	+	-	+	-	-	-
G+C %	69	62-70	44-47	64-75	39-52	51

Les pigments sont des esters de caroténoïdes-glucosides-acide gras.

## Historique

Les *Myxococcales* ont été découvertes en 1941 par Charles William Beebe. Cette bactérie se distingue par son aptitude à se regrouper en « essaim », c'est-à-dire qu'elle ne va plus fonctionner individuellement, mais possède un « esprit » de groupe comme les fourmis ou les abeilles. Cette bactérie a de nombreuses applications pour l'Homme.

## Environnement

Elle vit préférentiellement sur la surface de la terre dans des milieux inhabités avec un pH compris entre 5 et 8. Cependant elle peut survivre à des pH extrêmes grâce à sa forme sporulée. Cette bactérie préfère les surfaces riches en matière organique, car c'est sa substance nutritive, mais on peut la retrouver dans des milieux avec peu ou pas de matière organique comme le sable ou sur des surfaces rocheuses. Elle peut également se retrouver dans des milieux liquides comme l'eau douce.

## Biotechnologie

Cette bactérie peut produire différentes substances. Vivant au détriment d'autres microorganismes, elle sécrète dans le milieu extérieur des enzymes hydrolytiques pour dégrader les autres organismes présents. C'est d'ailleurs par cette production d'enzymes hydrolytiques que certains médicaments sont créés. En effet ces enzymes hydrolytiques permettent de dégrader les levures, moisissures ou entérobactéries ; ces enzymes peuvent donc être utilisés comme antibiotiques. La bactérie va donc se nourrir d'autres micro-organismes en les dégradant. Par cette dégradation *Myxococcus* va pouvoir récupérer les nutriments disponibles.

### Espèce retenue *Myxococcus xanthus*

#### **Particularité du *Myxococcus xanthus***

Il a un cycle de vie complexe notamment régulé par l'interaction entre cellules. En effet dans la sphère bactériologique, certaines bactéries ont développé la capacité d'interagir entre elles. On appelle ces interactions la multicellularité. On peut définir la multicellularité, comme la condition

d'un organisme pour lequel, les activités des différentes cellules le composant sont coordonnées et en contacts suffisamment proches pour interagir.

### **Culture**

**Milieu**, pour le *Myxococcus xanthus* :

**Acides aminés** :

- Asparagine, proline, histidine 2 mM ;
- Glycine, lysine, sérine, valine, alanine, 1 mM ;
- Leucine, isoleucine, arginine, méthionine, tryptophane, phénylalanine, 0.5 mM ;

**Minéraux** : MgSO<sub>4</sub> 1 mM ; tampon phosphate pH 7.6, 2mM ; agar 5g /l.

### **Particularité dans la formation de bio-concrétions**

Récemment il a été mis en évidence que les bactéries peuvent être à l'origine de minéralisations carbonatées. Elles ont été proposées comme méthode pour empêcher la décomposition du carbonate des pierres ornementales. Cependant cette méthode possède deux défauts majeurs étant une trop faible protection en profondeur (seulement quelques micromètres) et une obstruction des pores de la pierre. Nous pouvons penser que les spéléothèmes observés dans certaines cavités sont plus ou moins orientés par ce monde microbien.

### **Pathogénicité**

À ce jour pas de pathologie particulière signalée.

Dans les investigations faites dans la grotte de Sulzbrunn, la présence de l'embranchement des *Epsilonproteobacteria* a été signalé, mais sans donner l'importance de cette flore. Le genre signalé dans cette cavité est *Sulfurimonas*.

### Taxonomie

Cet embranchement contient les ordres suivants :

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Nautiliales</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>Nautiliaceae</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u><i>Caminibacter</i></u></li> <li>▪ <u><i>Lebetimonas</i></u></li> <li>▪ <u><i>Nautilia</i></u></li> <li>▪ <u><i>Nitratifactor</i></u></li> <li>▪ <u><i>Nitratiruptor</i></u></li> <li>▪ <u><i>Thioreductor</i></u></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Campylobacterales</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>Hydrogenimonadaceae</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u><i>Hydrogenimonas</i></u></li> </ul> </li> <li>○ <u>Campylobacteraceae</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u><i>Candidatus Thioturbo</i></u><sup>1</sup></li> <li>▪ <u><i>Arcobacter</i></u></li> <li>▪ <u><i>Campylobacter</i></u></li> <li>▪ <u><i>Sulfurospirillum</i></u></li> </ul> </li> <li>○ <u>Helicobacteraceae</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u><i>Helicobacter</i></u></li> <li>▪ <u><i>Sulfuricurvum</i></u></li> <li>▪ <u><i>Sulfurimonas</i></u></li> <li>▪ <u><i>Sulfurovum</i></u></li> <li>▪ <u><i>Thiovulum</i></u></li> <li>▪ <u><i>Wolinella</i></u></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
--	---

### Généralités

Les *Epsilonproteobacteria* ont été d'abord décrits dans les années quatre-vingt-dix comme la cinquième sous-classe des *Proteobacteria* (Tenover et coll., 1992) et par la suite reçu le statut de classe au sein de ce phylum (Garry et al., 2005).

Le groupe est largement connu pour ses genres pathogènes *Campylobacter*, *Helicobacter* et dans une moindre mesure *Arcobacter*. Cependant, d'autres membres, de cette classe bactérienne, sont connus pour jouer un rôle écologique important dans un ensemble de divers environnements dans lesquels elles s'épanouissent comme mésophiles ou modérée thermophiles (Nakagawa et Takaki, 2009).

Les *Epsilonproteobacteria* sont chimio-lithotrophes, leur présence est importante dans la flore microbienne primaire des cheminées hydrothermales en haute-mer, où ils sont souvent la lignée bactérienne dominante dans les panaches d'excrétion et de dépôts (Huber et al., 2010, Flores et al., 2011) et autour des tapis microbiens (Moussard et al., 2006 ; Opartkiewicz et al., 2009 ; Rassa et al., 2009). Les *Epsilonproteobacteria* sont présents jusqu'à 85 % sur les cheminées d'aérations, (observation de biomasse microbienne faite par Nakagawa et al., 2006). La capacité métabolique de réaliser l'oxydation du soufre par les *Epsilonproteobacteria* est couplée à la réduction des N-oxydes tout en fixant le carbone comme le montre l'inversion du Cycle de Krebs (Hügler et al., 2005 ; Campbell et coll., 2009), cela leur permet d'être les premiers colonisateurs des écosystèmes microbiens (Alain et al., 2004 ; Campbell et al., 2006 ; Gulmann et al., 2015).

Les parents non pathogènes, les *Campylobacter* comme les *Sulfurospirillum* et les *Thiovulum* sont souvent détectés dans les sédiments riches en sulfures, tandis que d'autres montrent une affinité pour les environnements riches en hydrocarbures (Huber et al., 2012)<sup>379</sup>. -

L'association dans cette catégorie de *Campylobacter*, d'*Helicobacter* et de certaines espèces d'*Arcobacter* sont connues comme des agents pathogènes opportunistes des vertébrés tandis que les membres des *Caminibacter*, *Nautilia* et *Sulfurospirillum* ont été signalés en liaison avec la faune des événements hydrothermaux en eau profonde.

Des données récentes de méta-transcriptomique<sup>vvv</sup> ont mis en évidence le rôle de *Sulfurimonas* comme les bactéries d'oxydation de soufre axées sur l'hydrogénase et la dénitrification sur les branchies d'un escargot de mer dans les grandes profondeurs (Sanders and al., 2013).

On a observé maintes fois la présence d'*Epsilonproteobacteria* dans des habitats hydrothermaux et des suintements froids<sup>www</sup>. Exemples d'isolats: *Sulfurimonas autotrophica*, *Sulfurimonas paralvinellae*, *Sulfurovum lithotrophicum* et *Nautilia profundicola*. Un membre de la classe *Epsilonproteobacteria* se présente comme un endosymbiote dans les branchies de l'escargot de mer en eau profonde (genre *Alviniconcha*)<sup>380,381,382</sup>.

Les *Epsilonproteobacteria* vivent en symbiose dans le tube digestif des vertébrés. Ils sont spiroïdes, comme *Wolinella spp*, *Helicobacter spp* et *Campylobacter*. Ils vivent en symbiose chez les bovins (*Wolinella spp*) ou sont pathogènes chez l'Homme (*Helicobacter*, *Campylobacter spp* dans le duodénum).

Les *Epsilonproteobacteria* trouvés dans les recherches océanographiques et hydrothermales sont typiquement chimio-lithotrophes (oxydant le soufre). Quant aux *Epsilonproteobacteria* autotrophes, ils fixent le dioxyde de carbone dans la biomasse par voie d'inversion du Cycle de Krebs.

Leur faible tolérance à l'oxygène est compatible avec leur comportement micro-aérophile ou anaérobie. Cela explique leurs évolutions dans le milieu océanique du Mésoprotérozoïque<sup>xxx</sup>, puisque ce milieu est considéré comme avoir été fortement sulfuré avec un faible niveau d'oxygène disponible (étant donné qu'il est produit par une photosynthèse cyanobactérienne encore très faible).

Une partie des *Epsilonproteobacteria* ont une morphologie spiroïde<sup>208</sup>.

### ***Epsilonproteobacteria*** (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la grotte de Sulzbrunn la répartition microbienne des *Epsilonproteobacteria* par catégorie de prélèvement n'a pas été recensée.

---

<sup>vvv</sup> **Transcriptome** : l'ensemble des ARN issus de la transcription du génome. L'analyse transcriptomique peut caractériser le transcriptome d'un tissu particulier, d'un type cellulaire, ou comparer les transcriptomes entre différentes conditions expérimentales.

La caractérisation et la quantification du transcriptome dans un tissu donné et dans des conditions données permettent d'identifier les gènes actifs, de déterminer les mécanismes de régulation d'expression des gènes et de définir les réseaux d'expression des gènes (Réseaux de co-expression de gènes). Les techniques couramment utilisées pour mesurer simultanément la concentration d'un grand nombre de types différents d'ARN messagers incluent les puces à ADN, et, plus récemment, le séquençage d'ARN à haut débit dit ARN-Seq.

<sup>www</sup> **Suintement froid** : les expressions suintement froid ou « émission de fluide froid » désignent, par opposition à l'émission de *fluide chaud* des sources hydrothermales, des lieux sous-marins d'émanation permanente de sulfure d'hydrogène, de méthane et d'autres hydrocarbures, à basse température (< 40 °C). Ces suintements se produisent au niveau du plancher océanique, ou parfois sur les flancs d'un mont sous-marin. Ils sont parfois associés à une accumulation locale (petit-lac) d'eau très saline et très dense (saumure).

Les suintements froids est aussi le nom donné aux systèmes biologiques et à l'écosystème qui se constituent autour de la sortie de ce *fluide froid*. Ces écosystèmes sont une sorte d'équivalent froid des fumeurs noirs qui se forment également à grande profondeur mais sur des sources hydrothermales très chaudes.

Les suintements froids sont à la fois un habitat et un écosystème de « milieu extrême ». Mieux les comprendre pourrait faire avancer les connaissances sur l'origine de la vie ou sur la possibilité de vie sur d'autres planètes. On y trouve des espèces qui résistent, au moins dans une certaine mesure, à la toxicité du pétrole et d'autres hydrocarbures, et qui montrent même une aptitude remarquable à le dégrader pour s'en nourrir. L'abondance de la biomasse microbienne et de la méio-faune associée autour des suintements riches en hydrocarbures soutient l'hypothèse d'un fort enrichissement du réseau trophique benthique par les microbes et la méio-faune. Ces espèces et ces systèmes intéressent fortement les spécialistes de la dépollution des sols.

<sup>xxx</sup> **Mésoprotérozoïque** : deuxième ère du Protérozoïque. Elle s'étend de -1 600 à -1 000 Ma

## 25.1.1 Ordre *Campylobacterales*

Nom donné par Sebald et Veron, 1963.

### Morphologie

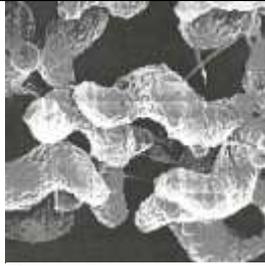


Photo microscope électronique du genre *Campylobacter*

On a isolé de nombreuses espèces d'*Epsilonproteobacteria* dans les sources hydrothermales et les cheminées volcaniques marines.

Nous nous intéresserons particulièrement aux *Helicobacter* étant particulièrement résistants dans les sols. Les *Helicobacter* sont résistants aux milieux acides, grâce à une uréase puissante et donc résistent aux conditions karstiques.

## Classification de l'ordre *Campylobacterales*

### Familles :

- *Hydrogenimonadaceae*
- *Campylobacteraceae*
- *Helicobacteraceae*
- *Phyllobacteriaceae*

### Genres de cet ordre :

- *Hydrogenimonadaceae*
- Genres : *Nautilia* (Miroshnichenko and al., 2002). Ce sous-ordre joue un rôle important dans la nitrification, les modifications du sol, les symbioses végétales. Il a une importance environnementale.
- Genre *Nitratiruptor* (Nakagawa and al)
- Genre *Hydrogeninimonas* (Takai and al., 2004)<sup>383,384</sup>.
- Genre *Sulfuricurvum* (Kodama and Watanabe)
  - Espèce *Sulfurovum lithotropicum*
- Genre *Thiovulum* (Hinze 1913)
- ***Sulfurimonas autotrophica* et *S. paralvinella***

Les familles ci-dessous peuvent donner des symbioses ou des parasitismes animaux, étant à l'origine de pathologies végétales, humaines et animales.

### 25.1.1.1 Famille *Helicobacteraceae* (Grotte de Sulzbrunn)

Nom donné par Marshall et al, 1985 & Goodwin et al, 1989.

#### 25.1.1.1.1 Genre *Sulfurimonas* (Grotte de Sulzbrunn)

Dans la cavité de Sulzbrunn ce germe est présent dans la source minérale et à tous les endroits où il y a présence de soufre.

- Genres de la famille *Helicobacteraceae*.
  - *Wolinella* (symbiose animale; par Tanner and al., 1981)
  - *Helicobacter* (agent pathogène du duodénum humain ; symbiose chez les oiseaux ; par Goodwin and al., 1989)
  - ***Sulfurimonas***

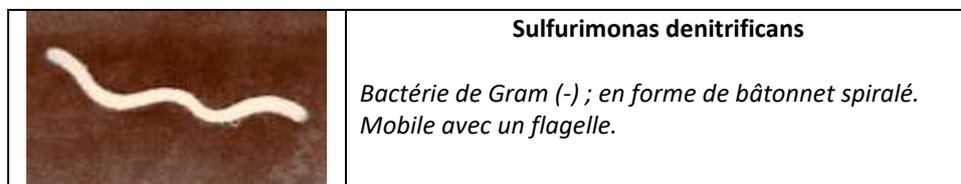
### Embranchement *Epsilonproteobacteria* ; Ordre *Campylobacterales* ;

**Famille *Helicobacteraceae* ; Genre *Sulfurimonas*** (Inagaki et al., 2003) => Anciennement classé dans les *Thiomicrospira*

## Espèces du genre *Sulfurimonas*

<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	<i>Sulfurimonas parvalvinellae</i>
<i>Sulfurimonas autotrophica</i>	<i>Sulfurimonas pelophila</i> : autotrophe (+) ; dénitrifiant (-)
<i>Sulfurimonas gotlandica</i>	<i>Sulfurimonas crunogena</i> : autotrophe (+) ; dénitrifiant (-)

## Morphologie



### Morphologies spécifiques des quatre espèces dans le genre *Sulfurimonas*

Espèces	Tailles	Morphologies	Mouvements
<i>S. autotrophica</i>	L 1,5 à 2,5 x l. 0,5 à 1 µm	Tige	1 seul flagelle polaire
<i>S. denitrificans</i>	Longueur variable avec largeur ~0.3µm	Courte tige ou spirilles-aimés	Variable
<i>S. gotlandica</i>	L 0.66 ± 0.083 x 62.1 ± 0.54 µm	Barre courbé ou spirilles-aimés	Un seul flagelle polaire ou deux flagelles aux pôles opposés
<i>S. parvalvinellae</i>	L 1.50-2.50 x l. 0,6 – 0,8 µm	Tige	Déplacement de flagelle 1,5 à 2,5 µm de longueur et 0,6 – 0,8 µm de large

## Métabolisme

Généralement, les bactéries *Sulfurimonas* possèdent de nombreuses voies pour leur métabolisme. Des espèces du genre *Sulfurimonas*, vivent dans un large éventail d'environnements. Les processus chimio-autotrophes jouent un rôle essentiel, dans leur adaptation au milieu. Le succès de *Sulfurimonas spp* est crédité par sa capacité de son activité lithotrophe, avec un métabolisme flexible lui permettant de résister à l'évolution par le fait qu'il est donneur/accepteur d'électrons, comme les bactéries lithotrophes utilisant le soufre inorganique, les *Sulfurimonas* métabolisent le carbone inorganique, en présence d'oxygène, permettant à cette bactérie de s'adapter à l'environnement en utilisant les quatre types de matières premières énergétiques dans son métabolisme, étant le soufre, l'hydrogène, l'azote et le carbone.

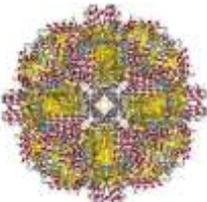
## Caractéristiques métaboliques

*Sulfurimonas denitrificans* est une bactérie neutrophile, mésophile et aérobie, c'est une chimio-litho-autotrophe dénitrifiant ; elle tire son énergie de l'oxydation des composés de soufre, lorsque la dénitrification est survenue (l'oxydation du soufre par de l'oxygène résultant de la dénitrification). Les donneurs d'électrons incluent l'utilisation du soufre et de ses formes réduites H<sub>2</sub>S, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, S<sup>0</sup> (soufre inorganique). Tandis que O<sub>2</sub> et NO<sub>3</sub><sup>-</sup> peut servir comme accepteurs d'électrons (Kelly et Bois, 2001). En couplant l'oxydation et la réduction de composés inorganiques pour sa production de biomasse, ses activités microbiennes produisent un cycle géochimique entre des substrats d'oxydoréduction pour les cycles du carbone, l'azote et du soufre.

Bien que les mécanismes de l'oxydation du soufre du *Sulfurimonas denitrificans* (dans les *Thiobacteria*) aient été bien étudiés, il reste beaucoup de zone encore mystérieuse dans le métabolisme de cette bactérie. Seule la dernière étape de l'oxydation du sulfite en sulfate est connue. Elle fait intervenir une APS-réductase, une ADP -sulfurylase et régénère une mole d'ATP pour deux moles de sulfite oxydé en sulfate (voir page «281 », Étape de l'oxydation de divers composés soufrés pour les *Thiobacilli*).

### Autres caractéristiques dans les autres espèces du genre

L'enzyme soufre oxygénase-réductase (EBP) catalyse le soufre, pour la création de sulfite, de thiosulfate et de sulfure. Le gène DORS gène codant sulfur oxygénase/réductase est présent dans *S. gotlandica* et *S. autotrophica*, mais absent dans *S. denitrificans*. Il a été émis l'hypothèse que le gène DORS de *S. denitrificans* a été perdu à cause de l'habitat faible en sulfure dans la mer de Waldden (Pays-Bas).

<b>Gène DORS</b>	
 <p>Sulfure oxygénase réductase homo23mer, <i>Acidianus ambivalens</i></p> <p>Sun CW, Chen ZW, He ZG, Zhou PJ, Liu SJ (2003). "Purification and properties of the sulfur oxygenase/reductase from the acidothermophilic archaeon, <i>Acidianus</i> strain S5". <i>Extremophiles</i>.</p>	<p><b>Composition du génome :</b> IntEnz, BRENDA, ExPAS, KEGG, MetaCyc, PRIAM, PDB structure.</p> <p>L'enzyme sulfuro-oxygénase/réductase est une enzyme catalysant la réaction chimique</p> $4S^0 + 5H_2O + O_2$ <p style="text-align: center;">{Sulfure oxygénase/réductase}</p> $2SH_2 + 2H_2SO_3 + 2H^+$ <p style="text-align: center;"><small>(sulfure + acide sulfidrique + hydrogène)</small></p> <p>Les trois substrats de cette enzyme, sont soufre, H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub>, alors que ses trois produits résultant de l'action enzymatique sont sulfure d'hydrogène, bisulfite et H<sup>+</sup>.</p> <p>Cette enzyme appartient à la famille des oxydoréductases, spécifiquement ceux utilisant les donateurs uniques avec O<sub>2</sub> comme oxydant et incorporation de deux atomes d'oxygène dans le substrat (oxygénases). L'oxygène incorporé n'a pas besoin d'être dérivé de l'O<sub>2</sub>.</p>

Le *Sulfurimonas paralvinellae* dans la réaction d'oxydation du soufre est capable d'utiliser une enzyme l'oxygénase/réductase, produisant deux molécules d'hydrogène, celle-ci pouvant être réutilisé pour le métabolisme. Cette réaction se produisant seulement en deuxième stade en eau profonde comme dans les fonds marins.

Le *Sulfurimonas paralvinellae* est également capable d'utiliser l'extrait de levure comme une source de soufre, dans ce cas, il est pris en priorité par la bactérie pour sa croissance, même si le soufre minéral se trouve en excès. Cela s'explique peut-être par la plus petite quantité d'hydrogène moléculaire pour soutenir la croissance dans une cellule bactérienne par rapport au soufre réduit.

#### Liste des donneurs d'électrons pour les espèces *Sulfurimonas* (= oui)

	<i>Sulfurimonas autotrophica</i>	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	<i>Sulfurimonas gotlandica</i>	<i>Sulfurimonas paralvinellae</i>
<b>Sulfures</b>				X
<b>Soufre</b>				
<b>Thiosulfates</b>				
<b>Sulfites</b>	X	X		X
<b>Hydrogène</b>	X			

À l'exception de *S. paralvinellae*, toutes les espèces de *Sulfurimonas* peuvent utiliser le sulfure comme donneur d'électrons, par oxydation de sulfures en sulfate<sup>385,386</sup>. La voie sulfure servant de source d'énergie utilise la quinone réductase (SQR) codant les gènes impliqués dans la voie responsable de la catalyse d'oxydation des sulfures. La quinone réductase comprend six types de protéines.

### Classification SQR dans les espèces du genre *Sulfurimonas*

La plupart des isolats d'*Epsilonproteobacteria* ont leurs protéines composant l'enzyme SQR (Soufre Quinone Réductase), elles sont classées comme Type II, IV et VI, mais il n'y a jamais de Type I dans *Epsilonproteobacteria*.

Dans le cas des *Sulfurimonas*, elles ont parfois plusieurs types dans la même bactérie comme les types III et V. *Sulfurimonas* étant le seul genre connu d'*Epsilonproteobacteria* disposant des types III et V, des protéines SQR.

Le Type III se trouve uniquement dans *S. denitrificans* et *S. gotlandica*.

Selon une étude sur expression hétérologue SQR, il a été remarqué que dans *S. denitrificans*, il y a trois SQR homologues fonctionnelles : types II, III et IV.

La protéine SQR du type IV est hautement conservée et se trouve chez les quatre espèces de *Sulfurimonas* et elle est donc considérée comme la plus importante protéine SQR pour la survie des cellules du genre *Sulfurimonas*.

Une autre étude a également révélé que la protéine SQR de Type VI n'était pas présente chez *S. denitrificans*, mais qu'elle se trouvait dans les trois autres espèces. Les chercheurs ont constaté que la protéine SQR de Type VI fonctionnait dans des environnements à forte teneur en sulfure et ils ont émis l'hypothèse que *S. denitrificans* ne requiert pas cette protéine SQR de type VI parce que les membres de l'espèce auraient une faible probabilité de d'utiliser les sulfures.

En revanche, *S. autotrophe* est la seule des quatre espèces contenant les protéines SQR de Type V et à être associée à des organismes vivants dans les mines acides (ex : mine de gypse)<sup>387</sup>.

Les fonctions des protéines SQR restent inconnues. Cependant, en général, la protéine SQR est cruciale pour l'oxydation des sulfures, pour l'assimilation, la génération d'énergie et la tolérance pondérée aux métaux.

Par conséquent, les membres du genre *Sulfurimonas* sont d'importants contributeurs au cycle global de soufre comme tous les membres de l'espèce oxydant le soufre en sulfate.

### Métabolisme de l'hydrogène

Toutes les espèces de *Sulfurimonas* peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie pour croître. Mais *S. autotrophica* est la seule des *Sulfurimonas spp* faisant exception à cette règle. En revanche, l'hydrogène est utilisé comme donneur d'électrons, tantôt par des bactéries appartenant aux espèces *S. denitrificans*, *S. gotlandica* et *S. parvalvinellae*, utilisation se substituant à l'utilisation du soufre.

L'utilisation par le genre *Sulfurimonas* du métabolisme de l'hydrogène, stimule les bactéries en utilisant [Ni, Fe] -hydrogénase, donnant la réaction :



L'enzyme [Ni, Fe] -hydrogénase est classée en différents groupes étant notés (groupes I à IV) et se trouvent chez les quatre espèces les plus connues de *Sulfurimonas*<sup>388</sup>.

Comme l'espèce *S. autotrophica* contient une déshydrogénase, une étude a conclu qu'elle peut être capable de consommer de l'hydrogène dans certaines conditions environnementales spécifiques.

Il a été montré que *S. denitrificans* pousse plus efficacement dans une atmosphère d'hydrogène qu'en présence de thiosulfate<sup>389</sup>.

Les trois espèces de *Sulfurimonas* étant aptes à l'utilisation de l'hydrogène peuvent exprimer leurs hydrogénases et peuvent se développer en présence d'hydrogène.

Les conditions de vie marine pour ces bactéries (c'est-à-dire l'eau de mer, les sédiments ou les cheminées hydrothermales) auront un impact sur le niveau d'oxygène dans l'environnement et donc une adaptation au métabolisme étant plus performant.

### Métabolisme de l'azote

Le métabolisme de l'azote se produit chez tous les membres appartenant à des espèces *Sulfurimonas* à l'exception du *Sulfurimonas autotrophica*. Il a été démontré, que *Sulfurimonas autotrophica* ne peut pas croître avec une concentration de nitrate de sodium de 5 mM dans des conditions de laboratoire. La dénitrification par *Sulfurimonas spp* a un rôle crucial dans le cycle de l'azote. Le *S. denitrificans* accepte un taux de nitrate de 20 mM avec un temps de culture de trois jours sur un milieu contenant (thiosulfate et hydrogène) et à six jours sur le milieu (thiosulfate et aucun hydrogène).

Les taux de nitrates tolérés dans les deux autres espèces, *S. gotlandica* et *S. parvalvinellae*, sont tout à fait différents :

- *S. gotlandica* utilise seulement 1 mMole de nitrate en 9 jours de culture (avec le thiosulfate).
- *S. parvalvinellae* utilise 10 mMoles de nitrate en 4 jours de culture (avec de l'hydrogène et du soufre).
- En outre, chez *S. gotlandica* et *S. denitrificans* on peut utiliser du nitrite au lieu du nitrate comme accepteur d'électron.

**Liste des accepteurs d'électrons pour les espèces *Sulfurimonas***

	<i>Sulfurimonas autotrophica</i>	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	<i>Sulfurimonas gotlandica</i>	<i>Sulfurimonas parvalvinellae</i>
<b>Nitrate</b>	X			
<b>Nitrite</b>	X			X
<b>Oxygène</b>				

Pour catalyser la réaction du métabolisme de l'azote, toutes les espèces de *Sulfurimonas* ont une sous-unité de l'enzyme catalytique périplasmique nitrate réductase appelée (Nap) (NapA).

Les genres d'*Epsilonproteobacteria*, ayant une forte affinité pour les nitrates, peuvent acquérir une adaptation de leurs membranes cytoplasmiques à des concentrations environnementales faibles en nitrate en haute mer.

Les isolats des espèces *S. gotlandica* et *S. denitrificans* sont bien adaptés aux fluctuations de l'oxygène et aux concentrations de sulfure d'hydrogène de l'environnement car ils peuvent utiliser les deux formes nitrites, nitrates ou l'oxygène comme accepteurs d'électrons. Ils ont une bonne capacité à modifier leur utilisation comme accepteur d'électrons, en fonction de la niche écologique et de la zone anoxique ; dans les profondeurs marines, cette adaptation sera définie par la colonne d'eau.

### Actualités récentes

L'espèce *Sulfurimonas hongkongensis* a été découverte récemment à Hong Kong<sup>43</sup>, dans les sédiments côtiers du chenal d'approche de Kai Tak.

Elle produit de l'énergie dans des conditions anoxiques. Son donneur d'électrons est le thiosulfate, étant transformé en sulfure d'hydrogène, et son accepteur d'électrons est le nitrate.

Sa morphologie est en forme de tige et elle pousse à 15-35 °C (optimum à 30 °C), pH 6,5 à 8,5 (optimum à 7 à 7,5) et g 10-60 L<sup>-1</sup> NaCl (optimum à 30 g L<sup>-1</sup>). Son génome est constitué

La teneur de l'ADN-ADN donne un C+G de 34,9 moles %.

Avec :

- 2 290 gènes codant des protéines.
- 42 gènes d'ARN (3 ARNr).

**Principaux acides gras cellulaires en pourcentage de la matière grasse**

C14 : 0 (4,8 %), C16 : 0 (32,8 %), 2-OH C16 : 0 (9,5 %), C16 : 1 (14,6 %),	C18 : 0 (16,9 %) C18 : 1 (19,2 %).
---	---------------------------------------

La composition de ces acides gras est semblable à ceux trouvés dans les isolats de *Sulfurimonas parvalvinellae* et *Sulfurimonas autotrophica*, mais il y a un unique acide gras, représenté par 2-OH C16 : 0 définissant le *Sulfurimonas hongkongensis* comme une espèce différente d'autres membres du genre des *Sulfurimonas*.

## Culture

Espèces	Dépendance	Limites de croissances	Conditions optimales	Doubler le temps sous conditions optimale
<i>S. autotrophica</i>	Mésophiles	T = 10-40 °C ; pH : 5-9	T = : 23 à 26 °C pH = 6,5	14
<i>S. denitrificans</i>	Mésophiles	T = 10 à 30 °C ; pH : 7	T = 22 °C pH = 7	12
<i>S. gotlandica</i>	Psychrotolérant	T = : 4 à 20 °C pH : 6.7 – 8,0	T = 15 °C	13
<i>S. paralvinellae</i>	Mésophiles	T = 4 à 35 °C pH : 5.4-8.6	T = 30 °C pH = 6,1	13- 16

## Analyse phylogénétique

Les espèces constituant le genre *Sulfurimonas* se distinguent par leurs différences physiologiques et génotypiques. Plusieurs isolats ont été partiellement ou complètement séquencés. Par exemple, le génome d'une souche de *S. autotrophica* a environ 2 153 198 paires de bases.

Ce genre bactérien habite dans les eaux sulfurées, les zones pélagiques étant des milieux redox et les cheminées volcaniques en eau profonde, où les composés soufrés sont abondants. Les espèces du genre *Sulfurimonas* utilisent une variété de protéines catalysant des composés spécifiques trouvés dans ces zones. Ils possèdent des points communs (phénotype commun) et des différences dans leur génome ADN<sup>390</sup>.

Les similitudes dans les séquences du gène 16 s ARN entre *Sulfurimonas gotlandica*, *Sulfurimonas paralvinellae*, *Sulfurimonas autotrophica* et *Sulfurimonas denitrificans* sont supérieures à 90 %<sup>391</sup>. *S. gotlandica* partage une similitude de 93,7 à 94,2 % avec les autres espèces. De même, *S. paralvinellae* et *S. autotrophica* (souche OK10) ont dans leurs séquences de gène ARNr 16 s, 96,3 % des similarités de séquence *S. denitrificans* et *S. autotrophica* (OK10) ont une similarité de séquence 93,5 %.

Les valeurs de ADN-ADN des bases nucléiques G + C contenues dans le génome de l'espèce *S. gotlandica* est de 33,6 % de mol. Alors que la teneur de l'ADN-ADN en (A + T) est de 66,4 de mol %. Pour le *S. paralvinellae* la teneur de l'ADN-ADN en G + C est de 37,6 mol % et une valeur en (A+ T) de 63,4 mol %.

Les analyses phylogénétiques ont montré que *Sulfurimonas* présente une capacité de dispersion limitée, car sa spéciation est affectée plus par la situation géographique, que par la composition hydrothermale<sup>392</sup>. En outre, les courants de l'océan profond peuvent affecter la spéciation.

Le tableau suivant résume les renseignements fournis ci-dessus :

**Contenu en ADN et ARNr 16s, similitude des gènes entre les membres du genre *Sulfurimonas***

Espèces	ADN de G + C % mol.	L'ADN A + T % mol.	ARNr 16s similitude des gènes en (%)
<i>S. autotrophica</i>	N/A	N/A	96,3 % de similarité avec <i>S. paralvinellae</i> . 93,7-94,2 % de similarité avec <i>S. gotlandica</i> . 93,5 % de similarité avec <i>S. denitrificans</i> .
<i>S. denitrificans</i>	N/A	N/A	93,5 % de similarité avec <i>S. autotrophica</i> (OK10). 93,7-94,2 % de similarité avec <i>S. gotlandica</i> .
<i>S. gotlandica</i>	33,6 % de mol	66,4 % de mol	93,7-94,2 % de similarité avec toutes les espèces. 96,3 % de similarité avec <i>S. autotrophica</i> (OK10).
<i>S. paralvinellae</i>	37,6 % de mol	63,4 % de mol	93,7-94,2 % de similarité avec <i>S. gotlandica</i> .

Le génome de *Sulfurimonas denitrificans* DSM1251 a été séquencé. Ce génome possède de nombreuses fonctionnalités, y compris une plus grande taille (2,2 Mb), suggérant une plus grande polyvalence métabolique ou réactivité à l'environnement que pour la plupart des autres d'*Epsilonproteobacteria* séquencées.

Une chaîne de transport d'électrons ramifiés est apparente, avec des gènes codants des complexes pour l'oxydation, de l'hydrogène, des composés de soufre réduit et pour les formates et la réduction des nitrates et de l'oxygène.

Les gènes sont présents pour un complexe, autotrophe-réductrice et pour le Cycle de Krebs. Plusieurs gènes ont été isolés du *Sulfurimonas denitrificans* pouvant favoriser la croissance dans l'habitat de sédiments spatialement et temporellement hétérogènes.

Ces gènes (10 au total) jouent un rôle dans l'opposition aux variations du développement et ils sont présents dans les factons génétiques codant les protéines de transports.

Parmi ceux-ci, plusieurs sont prévues pour coder les protéines de transport du flux de métaux lourds. Un arsenal complexe des gènes de codage des protéines sensoriels et réglementaires est en place, comme les gènes nécessaires pour prévenir et combattre le stress oxydatif (Sievert SM et al., 2008).

### Niche écologique

**Historique :** *Sulfurimonas denitrificans* fait référence à sa capacité à réduire les nitrates en di-azote gazeux atmosphérique (N<sub>2</sub>). En 2006, *Sulfurimonas denitrificans* était la dernière espèce à être placée dans le genre *Sulfurimonas*, car en 2000 il a été classé à tort dans le genre *S. capable*.

L'étude du *Sulfurimonas gotlandica* a été principalement réalisée sur des échantillons prélevés dans la mer Baltique. Cette étude a été faite à l'aide de la microscopie électronique à transmission et microscopie de fluorescence avec coloration à l'acide phosphotungstique et DAPI-tache comme des formes de visualisations.

*Sulfurimonas parvalinellae* a été trouvée en symbiose avec des invertébrés marins dans un nid de vers polychètes de la famille *Alvinellidae* en haute mer.

Des membres du genre *S. parvalinellae* ont été trouvés sur un monticule de sulfure sur une source hydrothermale profonde dans la fosse Mid-d'Okinawa. Ces membres du genre *Sulfurimonas* se sont trouvés dans un environnement différent comprenant des zones de mers profondes, des sédiments marins et des habitats terrestres. Leur capacité à survivre dans des conditions extrêmes est attribuée à plusieurs enzymes. *Sulfurimonas denitrificans* a été identifié dans les zones hydrothermales, des gisements de pétrole et pourrait jouer un rôle dans l'environnement pour le cycle du soufre.

L'oxydation du soufre par les *Epsilonproteobacteria* est commune dans une variété d'environnements sulfido-géniques. Ces bactéries autotrophes et les bactéries mixotrophes oxydantes du soufre ont contribué substantiellement au cycle mondial de l'oxydation du soufre.

Les pollutions industrielles par les dérivés soufrés (comme H<sub>2</sub>S), après émission pouvant être transformées par les bactéries en SO<sub>2</sub>. Puis par une activité chimio synthétique transformées en SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> entrant dans l'acidification des mers et des pluies acides.

## Symbioses des *Sulfurimonas*

<p>Prostomatea</p> 	<p><b>Sulfurimonas sous-groupe GD17</b> <i>Domine les chimiotrophes de la mer Baltique</i></p> <p><i>On a constaté que cette bactérie avait une croissance lente avec un temps de dédoublement de 1 à 1,5 jours, étant très long.</i></p> <p><i>Les Sulfurimonas sont consommés par des vers d'invertébrés, et deviennent des hôtes du tube digestif (forme son microbiote) afin d'améliorer leur digestibilité. Cette symbiose a pour effet de permettre aux invertébrés d'améliorer leurs zones de pâturage par une consommation relativement importante.</i></p> <p><i>Il y a cinq brouteurs actifs ciliés consommant cette bactérie : Oligo hyménophores (Alveolata), Prostomatea, étant des protozoaires, Ciliophora flagellés et MAST-4, Chrysophyta, Cercozoa étant de ce fait des prédateurs du Sulfurimonas. Dans l'écosystème on a aussi, les crabes Lithodid, se nourrissant des nappes bactériennes thiotropiques (biofilm), nappes se composant de différents types de bactéries dont le Sulfurimonas.</i></p> <p><i>Il a été constaté qu'en l'absence d'autres prédateurs possibles, ce genre de Sulfurimonas se développe, augmente la productivité et la diversité bactérienne. Cela signifie que sans facteurs prédictifs, ces bactéries peuvent se différencier et croître de façon exponentielle.</i></p>
<p>Lithodid crabes</p> 	

### Bactéries sulfureuses symbiotiques d'invertébrés marins

Ces sont des bactéries sulfureuses oxydantes pouvant vivre dans des milieux à très faible concentration en oxygène. On les a trouvés dans les sources thermales océaniques à des profondeurs d'environ de 2 000 m de fond en symbiose avec des invertébrés marins genre *Riftia* (ni bouche, ni tube digestif), *Calyptogena* (mollusques bivalves), l'un et l'autre possèdent en revanche un tissu spongieux développé dans toute la cavité du corps, fait essentiellement de bactéries chimio-autotrophes utilisant l'énergie libre de l'oxydation du H<sub>2</sub>S. Il a été remarqué que certains annélides et mollusques vivants dans des sédiments superficiels à faible concentration en oxygène possèdent des bactéries sulfo-oxydantes dans leurs tubes digestifs (microbiote).

### Environnement

Par leur consommation du soufre réduit et l'oxydation de l'azote, les membres des *Sulfurimonas* affectent directement l'équilibre biologique et géochimique des éléments dans des environnements où ils sont numériquement abondants. Par exemple, *Sulfurimonas gotlandica* peut expliquer jusqu'à 25 % de la population microbienne dans la mer Baltique dans les cellules de poissons.

### Biotechnologie

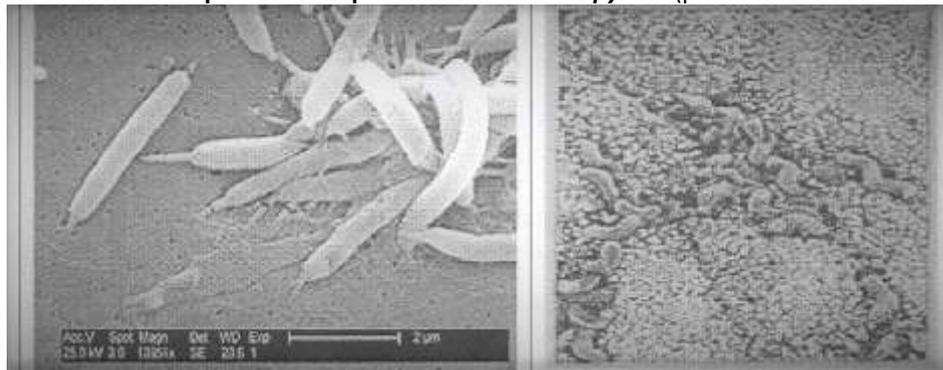
Les *Sulfurimonas* sont des germes ayant un intérêt pour la biotechnologie. Ils sont des dénitrifiants et ils transforment les sulfures en sulfates, ainsi mieux tolérés par l'organisme. Les sulfures des sources profondes sont souvent une raison de la non-potabilité de l'eau (odeur nauséabonde). La transformation des sulfures en sulfates peut résoudre le problème des odeurs des eaux thermales ou eaux profondes.

### 25.1.1.1.2 Genre *Helicobacter*

#### Caractéristiques morphologiques différentielles

Caractères	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Aquaspirillum</i>	<i>Hélicobacter</i>	<i>Halovibrio</i>
Cultivable en laboratoire	-	+	+	+	+
Flagelles polaires	Monotriche	Monotriche Ou amphotriche	Touffes bipolaires	Multiple à 1 ou 2 pôles	Monotriche
Flagelle engagé	+	-	-	+	
Flagelles latéraux	-	-	±	+	-
Pathogène pour l'homme et animaux	-	±	-	-	
Inhibé par NaCl à 3.5%	±	±	±	+	
Exige de l'eau de mer	±	-	-	-	+
Nitrogénase	-	-	+	-	-
Aérobie	+	-	+	-	+
Microaérophile	-	+	-	+	-
Croissance anaérobie avec H <sub>2</sub> ou formiate et fumarates	-	±	-	-	-
Habitat					
Eau douce	±	-	-	-	-
Eau de mer	±	-	-	-	-
Sol	±	-	+	±	+
Racines	-	-	+	-	-
animaux	-	+	-	±	-

Photos de microscopie électronique d'un *Helicobacter pylori* (photo Goodwin et al 1988)



#### Caractéristiques

L'*Helicobacter*, c'est une bactérie mobile par ciliature polaire. Son métabolisme est aérobie et son système respiratoire est micro-aérophile, ce sont des bactéries chimio-organotrophe, avec l'oxydase positive et la catalase positive.

### Espèces du genre *Helicobacter* :

<ul style="list-style-type: none"><li>○ <i>Helicobacter acinonychis</i></li><li>○ <i>Helicobacter aurati</i></li><li>○ <i>Helicobacter bilis</i></li><li>○ <i>Helicobacter bizzozeronii</i></li><li>○ <i>Helicobacter canadensis</i></li><li>○ <i>Helicobacter canis</i></li><li>○ <i>Helicobacter cholecystus</i></li><li>○ <i>Helicobacter cinaedi</i></li><li>○ <i>Helicobacter felis</i></li><li>○ <i>Helicobacter fennelliae</i></li><li>○ <i>Helicobacter ganmani</i></li><li>○ <i>Helicobacter gastritis</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ <i>Helicobacter heilmannii</i></li><li>○ <i>Helicobacter hepaticus</i></li><li>○ <i>Helicobacter mesocricetorum</i></li><li>○ <i>Helicobacter muridarum</i></li><li>○ <i>Helicobacter mustelae</i></li><li>○ <i>Helicobacter pametensis</i></li><li>○ <i>Helicobacter pullorum</i></li><li>○ <i>Helicobacter pylori</i></li><li>○ <i>Helicobacter rodentium</i></li><li>○ <i>Helicobacter salomonis</i></li><li>○ <i>Helicobacter trogontum</i></li><li>○ <i>Helicobacter typhlonius</i></li></ul>
---	--

### Caractéristiques biologiques

L'*Helicobacter* sont isolés de la muqueuse gastrique humaine sont associés aux gastrites. Ils résistent aux pH acides, grâce à une uréase puissante. Ils pourraient constituer un cofacteur dans la pathogenèse de l'adénocarcinome.

#### 29.1.1.2 Famille *Campylobacteraceae*

Nom donné par Sebald & Véron 1963.

#### Genres de la famille des *Campylobacteraceae* :

- *Campylobacter*
- *Sulfurospirillum*
- *Thiovulum*

#### 25.1.1.2.1 Genre *Campylobacter*

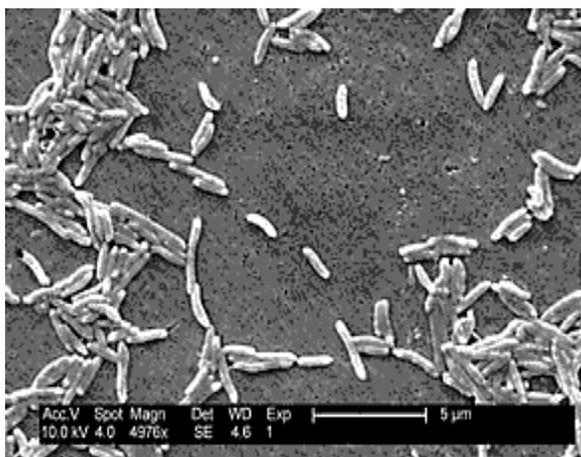
Nom donné par Sebald & Véron 1963.

#### Ordre *Campylobacterales* ; Famille *Campylobacteraceae* ; genre *Campylobacter*

#### Espèces du genre de Genre *Campylobacter*

<ul style="list-style-type: none"><li>• <u><i>C. jejuni</i></u></li><li>• <u><i>C. fetus</i></u></li><li>• <u><i>C. coli</i></u></li><li>• <u><i>C. sputorum</i></u></li><li>• <u><i>C. mucosalis</i></u></li><li>• <u><i>C. concisus</i></u></li><li>• <u><i>C. nitrofigilis</i></u></li><li>• <u><i>C. lari</i></u></li><li>• <u><i>C. pyloridis</i></u></li><li>• <u><i>C. hyointestinalis</i></u></li><li>• <u><i>C. helveticus</i></u></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <u><i>C. upsaliensis</i></u></li><li>• <u><i>C. cryaerophila</i></u></li><li>• <u><i>C. curvus</i></u></li><li>• <u><i>C. gracilis</i></u></li><li>• <u><i>C. hominis</i></u></li><li>• <u><i>C. insulaenigrae</i></u></li><li>• <u><i>C. lanienae</i></u></li><li>• <u><i>C. laridis</i></u></li><li>• <u><i>C. rectus</i></u></li><li>• <u><i>C. showae</i></u></li></ul>
---	---

## Morphologie



(Fig.7 :  
Image [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Campylobacter\\_fetus\\_01.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Campylobacter_fetus_01.jpg))

## Campylobacter

**Morphologie :** bactérie très fine de 1,2 à 2 µm de long et 0,2 µm de largeur, légèrement spiralée ou incurvée, ou avec un aspect en (S) dans les cultures jeunes; en spirilles ou en sphère après plusieurs jours de culture.

Gram(-), bacille à coloration de Gram difficile. Micro-aérophile, elle est sporulée (présence d'une capsule) et possède un ou deux flagelles polaires; mobilité très rapide.

**Caractéristiques biochimiques :** métabolisme hydrocarboné généralement réduit; absence d'activité protéolytique; H<sub>2</sub>S (+); indole (+).

**Pour l'observation microscopique :** il est conseillé d'utiliser le colorant de Vago ou de faire une observation sur fond noir<sup>393</sup>.

## Caractères antigéniques

Des antigènes O, H et K entraînent l'apparition d'agglutinines dans les sérums des sujets atteints de vibriose; mais les différences antigéniques individuelles sont considérables suivant les souches.

## Pouvoir pathogène expérimental

*C. fetus* provoque l'avortement des souris et des cobayes en gestation en 48 h. Il n'est pas pathogène pour les animaux mâles.

## Identification de *Campylobacter fetus*

Sa petite taille, sa morphologie, sa mobilité ainsi que les caractères de ses cultures assez difficiles orientent le diagnostic. La différenciation avec *Campylobacter sputorum bubulus* est résolue par la recherche des caractères énoncés plus haut, ainsi que par l'étude du pouvoir pathogène sur cobayes gestantes.

## Observations générales :

Bacilles très mobiles incurvés.

Gram (-)

Culture délicate

Oxydase positive

Catalase positive

Inactifs sur les glucides

## Caractéristiques biochimiques différentielles

Espèces	Catalase	Reduction des Nitrites	H <sub>2</sub> S Réaction sur band.	(Na Cl) 3,5 %	Culture à (25°C)
<i>C. fetus var fetus</i>	+	-	-	-	+
<i>C. fetus var intestinalis</i>	+	-	+	-	+
<i>C. fetus var jejuni</i>	+	-	+	-	-
<i>C. sputorum var sputorum</i>	-	+	+	-	+
<i>C. sputorum var bubulus</i>	-	+	+	+	d

## Culture

**Culture et milieu :** se cultive sur milieux sélectifs, O, D, BBL, avec supplément de Butzler, avec test de CAMP ou *Campylobacter* agar, isolement milieu de Preston (rifampicine 5mg ; triméthoprime (mg ; actidione<sup>yyyy</sup> 50mg) ; température de 37 à 42 °C en conditions micro-aérophiles pendant 44 à 48 h jusqu'à 5 jours ; inhibé par Na Cl 3,5 % (croissance en anaérobiose), atmosphère (5 % O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>; 85 % N<sub>2</sub>).

Particularité du ***Campylobacter fetus*** il se multiplie sur une gélose au sang, sérum coagulé-ascite ou sérum incubés en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. On obtient de petites colonies transparentes et visqueuses.

Il se multiplie aussi sur une bouillon ordinaire gélosé à 1 ‰ ou en bouillon thio-glycolate de sodium.

Ce ***Campylobacter fetus*** n'a pas de pouvoir sur les glucides, pas de pouvoir hémolytique, ni de pouvoir protéolytique.

**Milieu de culture commercialisés :** agar sélectif, O,D,BBL ; antibiotiques suppléments, O,D ; supplément de Butzler, B ; supplément Skirrow, B ; Blaser *Campylobacter* agar, D ; *Campylobacter* agar Skirrow's, D ; *Campylobacter* sélective médium Karmali's, O ; Fermentation de base for *Campylobacter*, D ; Triméthylamine N-oxid médium, O ;

Milieu d'enrichissement de Preston : bouillon nutritif n°2, Oxoid, supplément sélectif de Preston, Oxoid (polymyxine 2500 U, rifampicine 5 mg, triméthoprime 5 mg, actidione 50 mg), sang lysé de cheval Oxoid 5 %.

**Milieu d'isolement :** milieu Preston comparable à celui utilisé pour l'enrichissement plus 1.2% d'agar.

### Milieu pour les *Campylobacter jejuni*, *C. coli* et *C. lari*

Utiliser un milieu sélectif de Preston ou Skirrow

Incubation : la plupart des milieux d'enrichissement sont incubés à 42°C pendant 24 à 48 h sous atmosphère micro-aérophile.

### Les souches témoin utilisées sont les suivantes :

- NCTC 11 322 *C. jejuni*
- NCTC 10 418 *E. coli*

**Test :** inoculer avec un écouvillon de prélèvement la surface du milieu. Incuber 4 h à 37°C, puis à 42°C pendant 44 à 68h dans une atmosphère contenant du CO<sub>2</sub> 5 à 15 % et de O<sub>2</sub> 5 à 10%. *C. jejuni* et *C. lari* donnent des colonies plates, brillantes, diffuses. Les colonies bien espacées ressemblent à des gouttes de liquides.

### Test hippurate :

- **Réactif : la Ninhydrine :** 3.5 % dans de l'acétone-butanol (1/1).
- **Solution hippurate :** 5 % dans de l'eau, stocker à 20° C

La culture se fait sur gélose au sang pansant 18-24 h à 37°C en micro-aérophile.

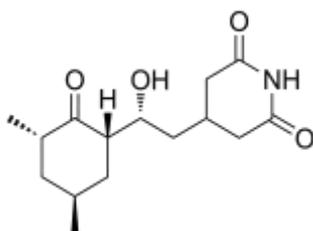
Mettre en suppression quelques colonies dans 2 ml d'eau distillée.

Mélanger, ajouter 0.5 ml de la solution d'hippurate.

Incuber au bain marie à 37°C pendant 2 h, ajouter 1 ml de solution de Ninhydrine mn et laisser 2 h à 20°C ou 10 mn à 37°C. Une réaction positive est indiquée par une coloration pourpre (formation de glycine).

---

<sup>yyyy</sup> **Actidione**, ou cycloheximide, inhibe les *Aspergillus*, les levures du genre *Cryptococcus*, certaines levures du genre *Candida*. Les dermatophytes et la plupart des levures du genre *Candida* sont sélectionnés. Lecture : après un à plusieurs jours à 37°C ou à 30°C en aérobiose : examen macroscopique des colonies.



cycloheximide

## Quelques bouillons sélectifs pour les *Campylobacter*

Stades	Bouillon de Preston	Bouillon Park et Sander
Base	Extrait de viande 10g	Tryptone 10g
	Peptone 10g	Peptone pepsique de viande 10g
	Chlorure de sodium 5g	Glucose 1g
	Agar-agar 1g	Extrait de levure 2g
	Eau distillée 1000 ml	Citrate de sodium 1g
		Chlorure de sodium 5g
		Bisulfite de sodium 0.1g
		Pyruvate de sodium 0.25g
		Eau distillée 1000mg
Supplément	Sang de cheval lysé 50ml	Sang de cheval lysé 50ml
Agent Sélectif	Polymyxine 5000 UI	<b>Solution A</b>
	Rifampicine 0.01g	Vancomycine 0.01g
	Triméthoprime 0.01g	Triméthoprime 0.01g
	Cycloheximide 0.1g	<b>Solution B</b>
		Céfopérazone 0.032g
		Cycloheximide 0.01g

Milieu gélosé du commerce pour les *Campylobacter* :

Milieu de Skirrow ; milieu de Butzler modifié ; Milieu de Preston ; Karmali CSM ; Milieu Bouton

**Phylogénétique** : Les *Campylobacter* ont une ADN-ADN avec un C + G de 30 à 34 mol %

### Habitat

Bactéries très mobiles, présentes dans l'intestin de nombreux animaux — notamment oiseaux d'élevage<sup>394</sup>.

### Mode de vie

Certaines de ces bactéries vivent près des sources hydrothermales, mais la plupart ont un mode de vie parasitique ou symbiotique. Ces dernières vivent dans les voies digestives ou génitales des mammifères. Bon nombre d'entre elles sont pathogènes.

- ***Campylobacter pyloridis*** anciennement appelé ***Helicobacter pylori***<sup>395</sup>

***C. pyloridis*** est une bactérie dont la structure externe est hélicoïdale (d'où son nom *Helicobacter*), munie de flagelle, et infectant la muqueuse gastrique. 80 % des ulcères gastroduodénaux sont causés par des infections de ***C. pyloridis***, même si, chez beaucoup d'humains infectés, la maladie reste asymptomatique.

- ***Campylobacter jejuni* et *coli***

***C. jejuni*** et ***C. coli*** sont la première cause de pathologie entérique d'origine bactérienne dans les pays industrialisés. Une infection, à ***C. jejuni*** et ***C. coli***, peut engendrer, dans de rares cas, des neuropathies auto-immunes sévères (syndromes de Guillain Barré et de Miller-Fischer). Les symptômes caractéristiques de l'infection comprennent une diarrhée aqueuse (les selles pouvant contenir des globules rouges ou des globules blancs), une entérocolite inflammatoire, des douleurs abdominales, de la fièvre, des nausées et des vomissements. Ces symptômes disparaissent généralement après une semaine. Un des principaux vecteurs de la pathologie est le réservoir intestinal des oiseaux et des volailles<sup>311, 310</sup>.

### Statistiques sur les *Campylobacter* chez l'homme

Campylobacters chez l'homme par type de prélèvement				
Espèce	Selles	Sang	Autre	Total (%)
<i>C. jejuni</i>	3 071	156	44	3 271 (68)
<i>C. coli</i>	808	46	19	873 (18,2)
<i>C. fetus</i>	89	289	72	450 (9,4)
<i>C. upsaliensis</i>	33	4	3	40 (< 1)
<i>C. lari</i>	20	7	3	30 (< 1)
<i>C. sputorum</i>	3	3	2	8 (< 0,1)
<i>C. hyointestinalis</i>	4			4 (< 0,1)
<i>A. cryaerophila</i>	1			1 (< 0,1)
<i>H. cinaedi</i>	2	3	1	6 (< 0,1)
<i>Campylobacter</i> sp.	78	26	13	115 (2,4)
<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylii</i>	5		2	7 (< 0,1)
<i>Helicobacter pylori</i>			2	2 (< 0,1)
<b>Total</b>	<b>4 114</b>	<b>534</b>	<b>161</b>	<b>4 807</b>
%	85,6	11,2	3,2	

### Pathologie

**Incubation :** les symptômes de cette maladie apparaissent habituellement deux à cinq jours après l'infection, mais la durée de la période d'incubation peut aller d'un à dix jours.

**Symptômes cliniques :** les plus courants dans les infections à *Campylobacter* sont la diarrhée (accompagnée souvent de sang dans les selles), les douleurs abdominales, la fièvre, les céphalées, les nausées et/ou les vomissements. Ces symptômes durent habituellement entre trois et six jours.

- Les décès par campylobactériose sont rares et ne concernent habituellement que les très jeunes enfants et les personnes âgées ou encore les individus souffrant déjà d'une autre maladie grave comme le sida.
- Des complications telles que bactériémie (présence de bactéries dans le sang), hépatite ou pancréatite (infections du foie et du pancréas respectivement) et fausse-couche ont été rapportées avec divers degrés de fréquence.
- On peut également observer des complications post-infections : arthrite réactive (inflammation douloureuse de l'articulation, pouvant durer plusieurs mois) et troubles neurologiques comme le syndrome de Guillain-Barré, une forme de paralysie offrant des similitudes avec la poliomyélite et pouvant entraîner des dysfonctionnements respiratoires et neurologiques sévères, voire le décès dans un faible nombre de cas.

**Sources et transmission :** les espèces du genre *Campylobacter* se retrouvent chez la plupart des animaux à sang chaud. Elles sont présentes chez les animaux destinés à l'alimentation humaine tels que volailles, bovins, porcs, ovins, autruches et crustacés, et chez les animaux de compagnie tels que chiens et chats. C'est une zoonose particulière sur la volaille.

On pense généralement que la principale voie de transmission est alimentaire et passe par la consommation de viandes et de produits dérivés de la viande insuffisamment cuits ou encore de lait cru ou contaminé. L'eau ou la glace contaminée sont aussi sources d'infection. Une certaine proportion des cas résulte du contact avec une eau contaminée dans le cadre d'activités récréatives.

### Physiopathologie

*C. jejuni* est une bactérie invasive mais dont le mécanisme de pathogénicité n'est pas encore connu au niveau moléculaire. Il n'a pas été possible d'individualiser des souches plus pathogènes. Cette bactérie fabrique également une toxine distendant le cytosquelette. La propension de *C. fetus* à donner des infections systémiques a été mise sur le compte de sa résistance à la phagocytose du fait de la présence d'une capsule. Le mimétisme moléculaire entre le lipopolysaccharide de certains sérogroupes de *C. jejuni* et les terminaisons de la myéline est à l'origine du syndrome de Guillain-Barré

### Traitement

Un traitement antimicrobien (érythromycine, tétracycline, quinolones) est recommandé dans les cas invasifs (lorsque la bactérie envahit les cellules de la muqueuse intestinale et endommage les tissus)

ou pour éliminer les porteurs sains (individus hébergeant *Campylobacter* dans leur organisme et continuent de l'excréter tout en restant asymptomatiques).

### Possibilité de contamination en *Campylobacter* dans le karst

Le vecteur des *Campylobacter* est surtout animal, ce sont des bactéries commensales du tube digestif de nombreux oiseaux. C'est dans ce cadre, que la contamination bactérienne peut être transmise lors d'explorations spéléologiques dans les entrées de cavités servant d'abri à ces volatiles.

#### 25.1.1.3 Famille *Phyllobacteriaceae* (Grottes de Sulzbrunn et gouffre de la Sambuy)

Nom donné par : Mergaert & Swings, 2006.

#### Ordre *Campylobacterales* ; Famille *Campylobacteraceae* ;

#### Ancien ordre *Rhizobiales* ; Famille *Phyllobacteriaceae* ; Genre *Candidatus*

Bactéries attaquant les plantes de la famille des *Solanaceae* provoquant la maladie « chips zébrée » sur les tomates les carottes. Elle est transmise par les insectes.

Cette famille comprend 4 haplotypes ayant été décrits. Dans le gouffre de la Sambuy cette famille a été décrite par l'espèce *Candidatus Magnetobacterium bavaricum*

#### Genres de la famille *Phyllobacteriaceae*

<i>Aliiohoefflea</i>	<i>Hoefflea</i>	<i>Pseudahrensia</i>
<i>Aminobacter</i>	<i>Lentillitoribacter</i>	<i>Pseudaminobacter</i>
<i>Aquamicrobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Pseudohoefflea</i>
<i>Chelativorans</i>	<i>Nitratireductor</i>	<i>Roseitalea</i>
<i>Corticobacterium</i>	<i>Oricola</i>	<i>Thalassocella</i>
( <i>Defluviobacter</i> )	<i>Paramesorhizobium</i>	<i>Thalassocola</i>
	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Tianweitania</i>

#### 25.1.1.3.1 Genre *Candidatus Magnetobacterium* (Gouffre de la Sambuy)

#### Espèce *Candidatus Magnetobacterium*

<i>Candidatus Magnetobacterium bavaricum</i>	
	<p><b>Morphologie</b> : c'est l'une des plus grosses bactéries magnétostatiques connues, avec une forme en bâtonnet de 8 à 10 µm de long pour un diamètre de 1,5 à 2 µm. Elle est cependant très différente des autres bactéries magnétostatiques, partageant moins de 80 % de similitudes avec elles. Elle contient des globules de soufre et pourrait utiliser du sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S pour produire son énergie métabolique par réaction d'oxydoréduction avec le fer. Au niveau du cytoplasme le fer ferreux est oxydé en fer ferrique dans la membrane d'un organisme appelé magnétosome. Dans cette membrane le fer ferrique moins soluble précipite et donne de nanocristaux de magnétite (Fe<sup>+3</sup>/Fe<sup>+2</sup>), dont l'orientation sera soit Sud, soit Nord, du côté polaire de la bactérie mono-flagellée. Le champ magnétique est modifié en permanence en fonction de la température et le déplacement de nanoparticules de magnétite ou de greigite<sup>zzzz</sup>. Mais l'orientation est toujours dans le sens polaire de la bactérie.</p>

À ce jour, toutes les bactéries magnétostatiques contiennent un précipité, la magnétite ou greigite. Ces cristaux ou parfois des chaînes de cristaux, peuvent conserver l'enregistrement magnétique géologique, comme c'est le cas des magnéto-fossiles dont les plus anciennes proviennent du lit de craie du Crétacé au Sud de l'Angleterre. Gunflint Chert rapporte que les magnéto-fossiles seraient vieux de 1,9 milliards d'années<sup>396,397</sup>. Cette propriété bactérienne a fait rêver beaucoup de chercheurs ayant imaginé utiliser ces propriétés pour cibler et orienter des éléments thérapeutiques dans l'organisme vivant<sup>398</sup>.

<sup>zzzz</sup> **Greigite** : minéral de formule (Fe<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>)<sub>2</sub>S<sub>4</sub>. Ce minéral est l'équivalent soufré de la magnétite Fe(II)Fe(III)<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Ses propriétés magnétiques sont utilisées par certaines bactéries magnéto-tactiques, qui synthétisent des nano-cristaux de greigite afin de s'orienter par le champ magnétique terrestre.

Dans cette catégorie des Magnétobactérium ou bactéries présentant une magnétotaxie on trouve :  
Classe des **Nitrospirae** ; Ordre **Nitrospirales** ; Famille des **Nitrospiraceae** ;  
Genre **Candidatus Magnetobacterium** et Espèce **Candidatus Magnetobacterium bavaricum** nommé  
par : Amann, Ludwig, Schleifer, van Gemerden et Petersen en 1993

#### **Environnement :**

Le **Candidatus Magnetobacterium bavaricum** se trouvent dans les sédiments d'eau douce. La description originale a été faite sur des relèvements dans des sédiments côtiers d'un lac d'eau douce dans le sud de l'Allemagne (lac de Chiemsee).

Des types similaires de bactéries ont également été observés dans des sédiments d'autres de lacs d'eau douce de l'Allemagne du sud et au Brésil.

Les prélèvements dans les différentes couches verticales de sédiments du lac de Chiemsee indiquent que les **Candidatus Magnetobacterium** est un organisme à gradient typique, particulièrement adapté aux zones de faibles niveaux d'oxygénation, où ils atteignent le plus haut niveau d'abondance (observation de Petersen et al, 1993).

Une fraction mineure, de ces bactéries, a également été trouvée dans la zone plus riche en oxygène, tandis que, des concentrations élevées d'oxygène ne peuvent pas être tolérées par ces bactéries sur de longues périodes.

Cette observation de localisation de ces bactéries en Allemagne du sud, nous montre que l'existence du **Candidatus Magnetobacterium** ou d'autres magnéto-bactéries, ont une forte probabilité d'être présente dans la cavité de Sulzbrunn.

L'étude allemande rapportée par l'*ISME Journal* précise que l'analyse du carbone C<sup>13</sup> du méthane de la grotte de Sulzbrunn provient de la source d'eau minérale.

Bien que le règne des *Archaea* ne soit pas analysé, la présence de méthane provenant l'eau de la source nous laisse supposer que cette présence a pour origine la méthanogenèse de la microflore souterraine des *Archaea*.

Afin de mieux comprendre les mécanismes microbiens de ce règne, une information sur les genres et la méthanogenèse des *Archaea* est nécessaire.

Nous allons nous orienter vers des *Archaea* du type méthanogène, c'est-à-dire de l'embranchement *Euryarchaeota* pouvant être cultivés et analysés, afin d'avoir le plus d'informations sur cette grande famille. En nous orientant vers les formes possibles des *Archaea* étant susceptibles de produire le méthane trouvé dans cette cavité.

## 26.1 Règne des *Archaea*

Nous ne pouvons pas parler du monde microbien karstique, sans évoquer ces précurseurs de la vie microbienne, ayant survécu jusqu'à aujourd'hui. Ces organismes microbiens ont dû résister à tous les bouleversements géologiques et aux pires conditions climatiques pour parvenir jusqu'à nous. Par quels mécanismes ont-elles pu s'adapter et survivre ?

Leurs biotopes cavernicoles leur ont permis de survivre à l'abri des changements de l'épi-karst s'étant succédé depuis quelques millions voire milliards d'années. En cela réside l'intérêt de l'étude de cette flore microbienne.

Les bactéries ont pu surmonter tous ces bouleversements malgré la simplicité de leur organisation. C'est là un mystère que seules la biochimie et la génétique nous permettent de comprendre. Qu'elles aient pu ainsi se reproduire, évoluer, dans un milieu aussi inhospitalier que l'endo-karst, dans un espace aussi restreint, sans pour cela disparaître.

La recherche en biotechnologie devient de plus en plus en attente d'une flore peu courante pouvant lui apporter de nouvelles enzymes ou bioproduits pharmaceutiques. Il est donc important pour eux de connaître la flore adaptée à des milieux très spécifiques comme le karst. De nombreuses découvertes scientifiques ont été inspirées par la nature. C'est là tout l'intérêt que nous apporte l'étude approfondie des *Archaea*, afin de faire évoluer la recherche pharmaceutique.

### 26.1.1 Généralités sur les *Archaea*

D'apparence souvent semblable à ces dernières, les *Archaea* ont longtemps été considérées comme des bactéries extrémophiles particulières, jusqu'à ce que les recherches phylogénétiques sur les procaryotes, débutées en 1965, aboutissent à leur différenciation, avec les travaux de Carl Woese et George E. Fox. Cette vision s'est depuis largement imposée aux microbiologistes, mais demeure contestée par certains scientifiques, tel Thomas Cavalier-Smith, pour lui les *Archaea* ne sont qu'un embranchement (*phylum*) des *Unibacteria* dans le règne des bactéries.

Du point de vue de leur génétique, leur biochimie et leur biologie moléculaire, les *Archaea* sont des organismes aussi différents des bactéries que des eucaryotes. Les enzymes réalisant la réplication de l'ADN, la transcription de l'ADN en ARN ainsi que la traduction de l'ARN messager en protéines chez les *Archaea* sont apparentées à celles des eucaryotes et non à celles des bactéries, de même que la présence d'histones dans le matériel génétique des *Archaea* rapproche ces dernières des eucaryotes et les distingue des bactéries<sup>399</sup>.

En revanche, les gènes des *Archaea* ne possèdent pas d'introns et leur ARN messager ne subit pas de modification post-transcriptionnelle<sup>400</sup>, étant le cas également chez les bactéries mais pas chez les eucaryotes. Par ailleurs, certaines archées possèdent des voies métaboliques n'existant ni chez les bactéries, ni chez les eucaryotes comme la méthanogenèse chez les archées méthanogènes, tandis que les archées dans leur ensemble sont dépourvues d'acide gras synthétase, contrairement à la fois

aux bactéries et aux eucaryotes. Elles font un usage très limité des acides gras et leur membrane plasmique est constituée essentiellement d'éther-lipides, à la différence des bactéries et des eucaryotes. Un trait, propre aux archées est la présence chez certaines d'entre elles d'une paroi cellulaire constituée de pseudo-peptidoglycane ou pseudo-muréine.

Ces caractères de différenciation entre les *Eubacteria* et les *Archaea* incitent à étudier et à explorer le potentiel enzymatique et biochimique de ces *Archaea*.

**Caractéristiques différentielles des *Eubactéries* et des *Archaea***

Actions	Caractéristiques	Eubactérie	Archaea
Métabolisme	Anaérobies stricts avec production de méthane	-	+
	Anaérobies avec production de H <sub>2</sub> S à partir des sulfates Thermophiles et extrêmes (92 °C)	-	
	Coenzymes spécifiques (méthanobactéries)	-	+
Parois	Acide muramique	+	-
Sensibilité aux antibiotiques	Pénicilline	+	-
Lipides de constitution	Phytanols	-	+
	Liaison ester	+	-
Synthèse des lipides par la voie	• mévalonate	-	+
	• malonate	+	-
Biologie moléculaire	Ribothymine présente dans ARNt	+	-
	Pseudo-uridine ou 1-méthylpseudouridine dans ARN	-	+
	Acide aminé initiant la chaîne polypeptidique : • Méthionine • N-formylméthionine	- +	+
	Paire de base AU termine le bras amino-acyle de ARNt initiateur	-	+
	Synthèse des protéines inhibées par : • anisomycine • kanamycine • chloramphénicol	- + +	+
	Gènes ARNt contenant des nitrons	-	+
	ADN dépendantes de l'ARN polymérase Multi composants	-	+
	ADN polymérase inhibées par l'aphidicoline ou le butyphényl d GTP et rafamycine, steptolydigne	+	-

Dans ce tableau, nous pouvons remarquer que les *Archaea* sont résistants aux antibiotiques normalement utilisés pour la flore bactérienne.

### 26.1.2 Historique sur la classification des *Archaea*

On a cru pendant longtemps que seuls les lacs salés, les sources hydrothermales océaniques, ou encore les sources chaudes volcaniques étaient le biotope idéal pour les *Archaea*, depuis ils ont été observés dans toute une variété de biotopes n'étant pas nécessairement extrêmes, tels que le sol, l'eau de mer, les marécages, la flore intestinale...

Les *Archaea* seraient particulièrement nombreuses dans les océans ; celles faisant partie du plancton constitueraient l'un des groupes d'organismes les plus abondants sur terre. Les *Archaea* interviennent par ailleurs de façon non négligeable dans le cycle du carbone et le cycle de l'azote ; ils sont souvent en symbiose ou commensales avec les plantes, les animaux et les Hommes.

Nous pouvons citer les *Archaea* méthanogènes de l'intestin animal et humain, participant aussi à la digestion des substances non-dégradables par le système enzymatique de l'hôte.

Les *Archaea* ont d'abord été classées comme un groupe paraphylétique des procaryotes en 1977 par Carl Woese et George E. Fox dans les arbres phylogénétiques basés sur les séquences de l'ARNr 16S des gènes<sup>401</sup>. Mais il s'est avéré depuis que les structures de ces bactéries sont proches des *Eucaryotes*, sans toutefois qu'elles puissent appartenir à ce règne<sup>402</sup>.

### Classification dans le règne des *Archaea*

Elle est divisée en cinq phylums :

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Crenarchaeota</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Classe : <i>Thermoprotei</i></li> </ul> </li> <li>• <i>Euryarchaeota</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Classe <i>Archaeoblobi</i></li> <li>• Classe <i>Halobacteria</i></li> <li>• Classe <i>Methanococci</i></li> <li>• Classe <i>Methanomicrobia</i></li> <li>• Classe <i>Methanopyri</i></li> <li>• Classe <i>Nanohaloarchaea</i></li> <li>• Classe <i>Thermoplasmata</i></li> <li>• Classe <i>Thermococci</i></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Korarchaeota</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Genre <i>Candida</i> <i>Korarchaeum</i></li> </ul> </li> <li>• <i>Nanoarchaeota</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Genre <i>Nanoarchaeum</i></li> </ul> </li> <li>• <i>Thaumarchaeota</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ordre <i>Cenarchaeales</i></li> <li>• Ordre <i>Nitrosopumilales</i></li> <li>• Ordre <i>Nitrososphaerales</i></li> </ul> </li> </ul>
--	---

### 26.1.3 Taxonomie des autres *Archaea* méthanogènes

Les Archée-bactéries par leur caractère proche des eucaryotes ont été reclassées dans les *Archaea*<sup>403</sup>.

Classification des *Archaea* méthanogènes

Ordres	Familles	Genres
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacter</i> <i>Methanosphaera</i>
	<i>Methanothermaceae</i>	<i>Methanothermus</i>
<i>Methanococcales</i>	<i>Methanoceccaceae</i>	<i>Methanococcus</i>
<i>Methanomicrobiales</i> ( <i>Euryarchaeota</i> )	<i>Methanocorpusculaceae</i> <i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanocorpusculum</i> <i>Methanofollis</i> <i>Methanoculleus</i> <i>Methanogenium</i> <i>Methanolacinia</i> <i>Methnomicrobium</i> <i>Methanoplanus</i>
	<i>Methanoregulaceae</i>	<i>Methanoregula</i> <i>Methanothrix</i> <i>Methanosaeta</i> <i>Methanolinea</i> <i>Methanosphaerula</i>
	<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>
<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i> <i>Halomethanococcus</i> <i>Methanococcoides</i> <i>Methanolobium</i> <i>Methanolophilus</i> <i>Methanolobus</i>
	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>
<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyraceae</i>	<i>Methanopyrus</i>

## Familles et espèces des *Archaea* méthanogènes

<p><u>F : Methanobacteriaceae</u>  <i>Methanobacterium bryantii</i><sup>75</sup>  <i>Methanobacterium formicum</i>  <i>Methanobacterium thermoaggregans</i>  <i>Methanobacterium thermoalcaliphilum</i>  <i>Methanobacterium wolfei</i>  <i>Methanobrevibacter arborphilicus</i>  <i>Methanobrevibacter gottschalkii</i>  <i>Methanobrevibacter ruminantium</i>  <i>Methanobrevibacter smithii</i></p> <p><u>F: Methanothermaceae</u>  <i>Methanothermus fervidus</i>  <i>Methanothermus sociabilis</i></p> <p><u>F: Methanococcaceae</u>  <i>Methanococcus jannaschii</i>  <i>Methanococcus maripaludis</i>  <i>Methanococcus vannielii</i>  <i>Methanococcus termoautotrophicum</i>  <i>Methanococcoides burtonii</i>  <i>Methanococcus aelicus</i>  <i>Methanococcus deltae</i></p>	<p><u>F. : Methanosarcinaceae</u>  <i>Methanosarcina acetivorans</i>  <i>Methanosarcina thermophila</i>  <i>Methanosarcina barkeri</i></p> <p><u>F : Methanosaetaceae</u>  <i>Methanosaeta concilii</i>  <i>Methanosaeta thermophila</i>  <i>Methanosaeta acetivorans</i>  <i>Methanosaeta harundinacea</i>  <i>Methanotherix thermophila</i></p> <p><u>F: Methanocorpusculaceae</u>  <i>Methanocorpusculum labreanum</i></p> <p><u>F: Methanopyraceae</u>  <i>Methanopyrus kandleri</i></p>	<p><u>F : Methanoregula</u>  <i>Methanoregula boonei</i>  <i>Methanoregula formicica</i></p> <p><u>F : Methanomicrobiaceae</u>  <i>Methanoculleus bourgensis</i>  <i>Methanoculleus marisnigri</i>  <i>Methanogenium cariaci</i>  <i>Methanogenium figidum</i>  <i>Methanogenium organophlum</i>  <i>Methanogenium wolfer</i>  <i>Methanogenium thermophilicum</i>  <i>Methanogenium frittonii</i>  <i>Methanomicrobium mobile</i>  <i>Methanofollis liminatans</i>  <i>Methanofollis athanolicus</i>  <i>Methanofollis formosanus</i>  <i>Methanofollis tationis</i>  <i>Methanofollis ethanolicus</i>  <i>Methanofollis aquaemaris</i></p>
--	--	--

### 26.1.3.1 Famille *Methanobacteriaceae*

#### Morphologie et caractéristiques

Les *Methanobacteriaceae* sont Gram (+), immobiles, bactéries en bâtonnets plus ou moins long, utilisant le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) et l'hydrogène (H<sub>2</sub>) et quelques fois les formiates et le méthanol. Leurs ADN-ADN ont une valeur en G +C de 23 à 61 moles %.

### 26.1.3.2 Famille *Methanothermaceae*

#### Morphologie et caractéristiques

Les *Methanothermaceae* sont Gram (+), immobiles, en forme de bâtonnets, thermophiles <70 °C, utilisant CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>. Leurs ADN-ADN ont une valeur en G+C de 33 à 34 moles %.

### 26.1.3.2 Famille *Methanococcaceae*

#### Morphologie et caractéristiques

Les *Methanococcaceae* sont Gram (-), mobiles ou immobiles, utilisant H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> et les formiates. Leurs ADN ont une valeur de G+G = 29 à 34 moles %.

### 26.1.3.3 Famille *Methanomicrobiaceae*

#### Morphologie et caractéristiques

Les *Methanomicrobiaceae* sont mobiles ou immobiles, forment des coccoïdes irrégulières ou bâtonnets, spirales ou aplatis, Ils utilisent H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, fréquemment les formiates, parfois le méthanol. Leurs ADN-ADN ont une valeur en G+C de 39 à 61 moles %.

### 26.1.3.4 Famille *Methanocorpusculaceae*

#### Morphologie et caractéristiques

Les *Methanocorpusculaceae* sont Gram (-), petits coccoïdes irréguliers, ils sont mobiles ou non, utilisant H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>; des formates et quelques fois le méthanol. Leurs ADN-ADN ont une valeur en G+C de 48 à 52 moles %.

### 26.1.3.5 Famille *Methanosarcinaceae*

#### Morphologie et caractéristiques

Les *Methanosarcinaceae* sont Gram ( $\pm$ ), ils sont immobiles, forment des paquets cubiques, ils sont coccoïdes irréguliers ou filaments engainés, utilisant les acétates et les composés méthylés ; jamais les formiates, quelquefois  $H_2 + CO_2$ . Leurs ADN-ADN ont une valeur en G+C de 36 à 52 moles %.

### 26.1.3.6 Famille *Methanosaetaceae*

#### Morphologie et caractéristiques

Les *Methanosaetaceae* sont une espèce acétotrophes (produisant du méthane à partir des acétates).

### 26.1.3.7 Méthanogènes thermophiles

Température de résistance et développement :

- *Methanococcus jannaschii* ( $t^\circ = 85^\circ C$ )
- *Methanothermus fervidus* ( $t^\circ = 83^\circ C$ )
- *Methanothermus sociabilis* ( $t^\circ = -97$  à  $+ 65^\circ C$ )
- *Methanococcus thermoautotrophicum* ( $t^\circ = - 70^\circ C$  à  $65^\circ C$ )
- *Methanobacterium thermoaggregans* ( $t^\circ = 65^\circ C$ )
- *Methanobacterium thermoalcaliphilum* ( $t^\circ = 60^\circ C$ )
- *Methanobacterium wolfei* ( $t^\circ = -65$  à  $+ 55^\circ C$ )
- *Methanogenium thermophilicum* ( $t^\circ = 55^\circ C$ )
- *Methanogenium frittonii* ( $t^\circ = 57^\circ C$ )
- *Methanosarcina thermophila* ( $t^\circ = 50^\circ C$ )

## 27.1 Phylum *Methanomicrobia*

### 27.1.1 Ordre *Methanomicrobiales*

#### 27.1.1.1 Famille *Methanomicrobiaceae*

Les conditions anoxiques, de méthanogénèse, de vie en d'eau profonde, de résistance à des températures d'environ 30 à 50 °C, de résistance aux d'infiltrations sédimentaires, étant les caractéristiques des eaux thermales et étant celles de la source récoltée dans la grotte de Sulzbrunn, nous orientent vers des espèces d'*Archaea* répondant à ces critères bio-topiques.

#### Morphologie

La famille des *Methanomicrobiaceae* sont en bâtonnets, en spirales ou aplats ou cocci irréguliers, mobiles ou immobiles. Ils utilisent le CO<sub>2</sub> avec l'hydrogène (H<sub>2</sub>), fréquemment le formate, parfois le méthanol.

Leur ADN – ADN a une valeur de C+G en moles % de 39 à 61 %.

##### 27.1.1.1.1 Genre *Methanolacinia*

#### Morphologie

Les *Methanolacinia* sont de Gram (-), ils ont une morphologie irrégulière en forme de bâtonnet de 0,6 µm de diamètre et de 1,5 à 2,5 µm de long, sans formation d'endospores. Ils sont immobiles et ont un seul flagelle.

L'enveloppe cellulaire des *Methanolacinia* se compose d'une membrane cytoplasmique et d'une couche en forme de S hexagonale arrangée avec une constante de réseau des sous-unités géométriques de 15,3 nm, tandis que les structures périodiques sur l'enveloppe cellulaire de *Methanomicrobium mobile* n'ont pas été caractérisées.

#### Caractéristiques

Les *Methanolacinia* sont anaérobies, méthanogènes, ils fixent le CO<sub>2</sub> avec l'aide de l'hydrogène (H<sub>2</sub>) comme donneur d'électron (e<sup>-</sup>) ; ils ne catabolisent pas les formiates, les acétates, ou les composant méthylés, comme la méthylamine, méthanol en présence d'hydrogène.

Ils contiennent de l'enzyme M et le coenzyme F 420.

Les *Methanolacinia* trouvent l'azote dans l'oxydation de l'ammoniac et le soufre en réduisant les sulfures en soufre.

Les cellules contiennent de l'acide muramique. Les lipides sont des hydrocarbures isoprenoïdes ester liés au glycérol.

La couche S du *Methanolacinia paynteri* contient une sous-unité de glycoprotéine avec un poids moléculaire apparent de 155 000. Les polyamines sont comparables à ceux des espèces de *Methanogenium*, mais diffèrent considérablement de ceux du *Methanomicrobium mobile*.

Les analyses comparatives lipidiques de *Methanomicrobium mobile*, *Methanogenium cariaci*, *Methanospirillum hungatei* et *Methanolacinia paynteri* révèlent des différences marquées.

#### Phylogénétique

L'affiliation phylogénétique propose de classer le *Methanomicrobium paynteri* (Rivard et al., 1983, 23 ; validé en 1984 [Rivard et al., 1984, 25]) au sein d'un nouveau genre *Methanolacinia* comme *Methanolacinia paynteri* peigne nov.

Ainsi sur de faible valeur SAB de 0,51, dont *Methanolacinia paynteri* partage avec *Methanomicrobium mobile*, ces éléments corroborent la reclassification proposée.

#### Culture

En outre, *Methanolacinia paynteri* pousse non seulement sur le H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> comme il est indiqué, mais également sur 2-propanol/CO<sub>2</sub>, 2-butanol/CO<sub>2</sub> et cyclo-pentanol/CO<sub>2</sub>. Il est sensible à la lyse par les détergents.

**Incubation** : il se développe à 40 °C ; pH du milieu de 6,6 à 7,2.

**Milieu** : milieu de base, mélange de  $K_2HPO_4$  5g,  $Mg SO_4 7H_2O$  0,1 g,  $(NH_4)_2SO_4$  0,3 g,  $FeSO_4 7H_2O$  0,02 g, autolysat de levure 5ml,  $CaCO_3$  100g,  $Na_2CO_3$  0,5 g, faire une stérilisation à 121 °C pendant 15 mn. Puis séparément du  $Na_2S$  et éthanol sont ajoutés au milieu de base après stérilisation.

**Habitat**

Milieus et sédiments marins.

**28.1 Classe *Methanococcus*****28.1.1 Ordre *Methanococcales*****28.1.1.1 Famille *Methanococcaceae*****28.1.1.1.1 Genre *Methanococcus***

 <p><b><i>Methanocaldococcus jannaschii</i></b> Photos de B. Boonyaratankornkit et D. S. Clark, génie chimique, G. Vrdoljak, Electron Microscope Lab, University of California Berkeley</p>	<p style="text-align: center;"><b>Genre <i>Methanococcus</i></b></p> <p><i>Ils sont mésophiles, sauf les genres thermophiles comme le <b>M. thermolithotrophicus</b> et l'hyperthermophile <b>M. jannaschii</b>. Ce dernier a été découvert à la base d'une cheminée de fumées blanches à 21° latitude nord sur l'East Pacific Rise. <i>Methanococcus</i> a été le premier génome Archaea ayant été complètement séquencé. Ce génome a révélé de nombreux éléments semblables aux eucaryotes.</i></p>
--	---

**Phylogénétique**

Aucune différence n'a été notée dans la somme G+C de l'ADN-ADN des gènes des thermophiles comparativement aux mésophiles de *Methanococcus*.

Cependant, il y a une différence au niveau des protéines. Les protéines thermophiles ont plus de radicaux hydrophobiques sur ses protéines, moins d'acides aminés et moins les résidus polaires comparativement aux protéines des *Methanococcus* mésophiles.

**Pathogénicité**

À ce jour il n'y a pas d'information sur le sujet.

**Méthanogénèse**

Dans la grotte de Sulzbrunn la méthanogénèse est l'un des facteurs importants dans l'équilibre gazeux de l'atmosphère de la cavité. Notre étude montre qu'il y a un équilibre entre la flore méthanogène et la flore méthanotrophe.

La méthanogénèse permet de tenir la grotte dans une atmosphère composée de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, et d'air. C'est cette constante dans le mélange gazeux, nous faisant dire que la population des *Archaea* a sûrement une importance plus grande que nous le laissons penser l'étude remarquable de Clement Karwautz "*Microbial mégalcities fueled by methane oxidation in mineral spring cave*".

Il est important de bien comprendre les différents mécanismes, que nous offre la flore microbienne pour produire le méthane. La connaissance des facteurs influençant la production gazeuse de la cavité nous permettra de tenir l'équilibre dans la flore microbienne.

Les organismes méthanogènes sont dans la plupart des cas des anaérobies stricts. Certaines espèces peuvent néanmoins survivre quelque temps en présence d'oxygène, de même que dans des milieux difficiles (sols arides, acides, toxiques...). Il existe aussi au moins une exception connue à l'anaérobiose, *Methanosarcina barkeri*, produisant une enzyme (superoxyde dismutase ou SOD) lui permettant de survivre longtemps en présence de dioxygène (O<sub>2</sub>).

**Importance de la méthanogénèse**

Les germes méthanogènes sont des chimio-autotrophes. Ils jouent un rôle important dans le cycle du carbone, dans le rétrocontrôle du climat. Il a été estimé qu'un tiers du méthane rejeté dans l'atmosphère pourrait avoir pour origine ces microorganismes.

Les méthanogènes jouent un rôle écologique majeur dans des environnements anaérobies où elles suppriment les excès d'hydrogène et des produits issus de fermentation par d'autres formes de respiration anaérobie. Ils prospèrent habituellement dans les environnements dans lesquels tous les

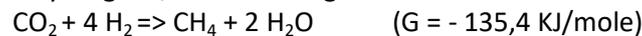
autres accepteurs d'électrons (comme l'oxygène, les nitrates, les sulfates et le fer trivalent ont été épuisés [anoxie]).

Il existe aussi des symbioses avec des bactéries anaérobies strictes fournissant en continu l'hydrogène et le gaz carbonique indispensables à la méthanogenèse hydrogénotrophe. On dit qu'il se forme un consortium écologique.

Étroitement lié à la bio-méthanogenèse, ils existent des organismes méthanotrophes, capables d'oxyder le méthane, *via* une réduction par des sulfates et nitrates. C'est pour cela que nous pouvons penser que dans la grotte de Sulzbrunn, il y ait une symbiose entre les *Archaea* méthanogènes et les bactéries méthanotrophes que nous avons précédemment étudiées.

## Méthanogenèse

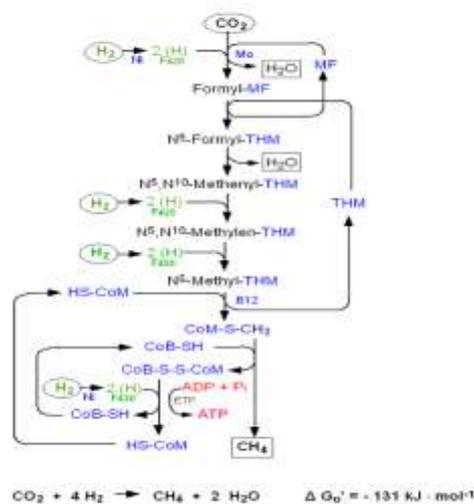
Les bactéries méthanogènes sont strictement anaérobies. Des traces d'oxygène suffisent à les tuer, en partie par l'auto-oxydation de certains cofacteurs nécessaires à leur métabolisme. Il y a plusieurs façons de produire du méthane dans la nature. Les matériaux les plus courants sont le mélange de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) et d'hydrogène, comme un agent réducteur.



La réaction étant fortement exergonique, les bactéries l'utilisent donc pour leur production d'énergie. L'hydrogène est un substrat.

Tous ces *Archaea* se développent et produisent du méthane uniquement avec du CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>, ils sont autotrophes stricts.

### Cycle de la méthanogenèse à partir du CO<sub>2</sub>



L'enzyme principale de la méthanogenèse est le Coenzyme F<sub>420</sub>

L'hydrogène engendré par des fermentations dans les biotopes où vivent les méthanogènes. D'autres réactions conduisent également au méthane à partir de l'acide acétique, du méthanol.

***Methanococcus thermolithotrophicus*** est un autotrophe facultatif, il peut utiliser les formiates :

- $4 \text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{HCOOH} + 3 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$

Quatre autres espèces sont capables de se développer sur des acétates et le méthanol comme seules sources de carbone et d'énergie pour la production de méthane :

- ***Methanotherix soehngeni***
- ***Methanosarcina acetivorans***
- ***Methanosarcina mazei***
- ***Methanosarcina barkeri***

Pour l'utilisation des acétates on a :

- $\text{CH}_3 \text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2 \quad (G = - 32,5 \text{ KJ /mole})$

Pour l'utilisation du méthanol on a :

- $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$  (G = - 112,5 KJ/mole)

Les formates peuvent être aussi utilisés comme source d'électrons par la plupart des méthanogènes hydrogénotrophes.

- $\text{HCOOH} + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$

Dans ce type de méthanogénèse on connaît trois espèces sachant utiliser le monoxyde de carbone (CO) pour générer du méthane :

- ***Methanobacterium termotrophicum***
- ***Methanobacterium formicum***
- ***Methanotherix sohngeni***

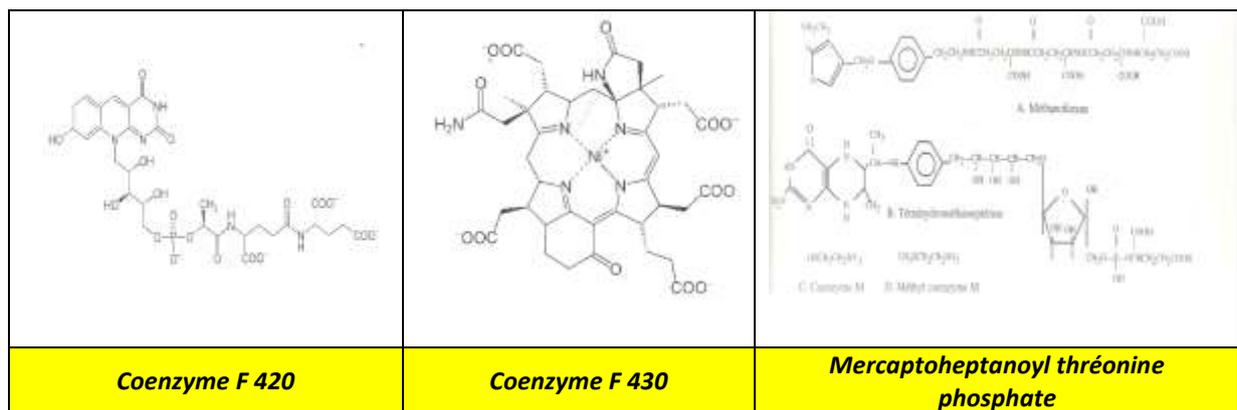
Dans certains cas, l'éthanolamine peut être impliquée :

- $\text{CH}_3\text{NH}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{NH}_3$

Sept coenzymes sont impliquées dans ces méthanogénèses :

- Méthanolfurane
- Tétrahydréméthanoptérine
- Coenzyme M  $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
- Méthyl coenzyme M  $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
- Mercaptoheptanoylthréonine-phosphate
- Coenzyme F<sub>430</sub>
- Coenzyme F<sub>420</sub>

#### Structures des coenzymes entrant dans la méthanogénèse



#### Composés inorganiques dans la production microbiologique de méthane

Les bactéries méthanogènes sont des bactéries autotrophes. Elles utilisent des composés carbonés inorganiques ou organiques simples comme source d'énergie. Leur croissance se fait par l'assimilation du carbone inorganique tel que le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) étant l'apport de carbone pour leur constitution. Elles possèdent des intermédiaires communs, ainsi que de nombreuses coenzymes ayant des fonctions anaboliques et cataboliques.

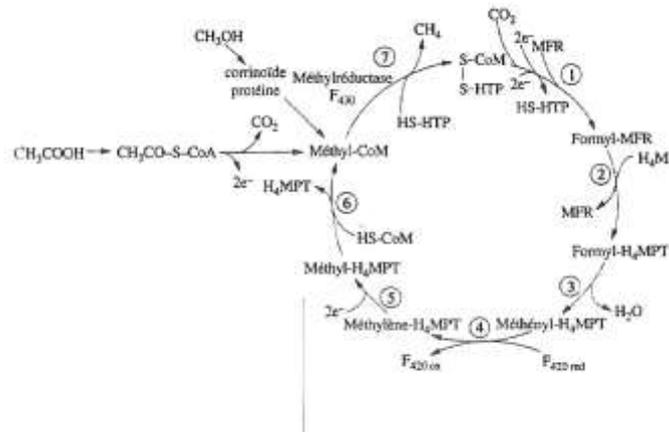
Les méthanogènes utilisent le cycle anabolique tricarboxylique pour synthétiser les molécules carbonées cellulaires par l'intermédiaire de l'Acétyl coenzyme A. L'acétylcoenzyme A et le transporteur de carbone, étant lié à la tétra-hydro-méthanoptérine et possédant des intermédiaires comme de nombreuses enzymes, ayant des fonctions anaboliques et cataboliques. Les méthanogènes hétérotrophes exigent de l'acétate exogène pour leur croissance. Ils ont besoin de flore hétérotrophe fermentaire pour convertir une large gamme de composés organiques en substrat de méthanisation. La matière organique est fermentée en acides organiques et en hydrogène (H<sub>2</sub>) et en gaz carbonique (CO<sub>2</sub>).

Cette méthanogénèse est une forme de respiration où le CO<sub>2</sub>, les groupements méthyle des composés en C1 où le méthyl de l'acétate est l'accepteur d'électrons. Ils sont abondants dans les habitats où les accepteurs d'électrons (O<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Fe<sup>3+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) sont limitants ; digesteurs anaérobies,

sédiments anoxiques, sols inondés, appareil gastro-intestinal. Dans les milieux anoxiques, le  $\text{NO}_3^-$ , le  $\text{Fe}^{3+}$ , et le  $\text{SO}_4^{2-}$  inhibent la méthanogénèse.

Les méthanogènes peuvent directement cataboliser le  $\text{H}_2$ , le  $\text{CO}_2$ , les formiates et les acétates, mais les chaînes plus longues les propionates, les butyrates doivent être métabolisés par les bactéries non méthanogéniques, dite en syntrophies (syno : synusie), engendrant les substrats méthanogéniques.

### Synthèse du méthane à partir des acétates, du méthanol et du $\text{CO}_2$



Le méthyl-Coenzyme M est l'intermédiaire clef pour la réaction du  $\text{CO}_2$  de l'acétate et du méthanol en méthane

### Les acétotrophes incluent :

- *Methanotherx sohngeni*
- *Methanosarcina acetivorans*

### Ainsi que plusieurs espèces tels :

- *Methanobacterium thermoautotrophicum*
- *Methanobacterium formicum*
- *Methanobacterium arbophilus*

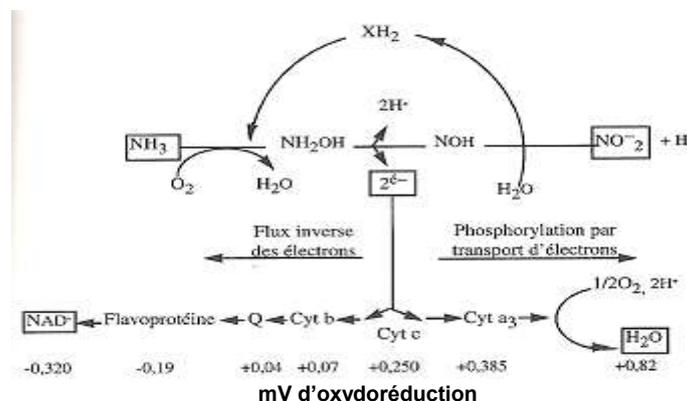
Ces espèces se développent uniquement sur le mélange d'hydrogène et de gaz carbonique et sont donc autotrophes.

### Les autres méthanogènes autotrophes facultatifs :

- *Methanosarcina sehngeni*
- *Methanosarcina mazei*

Utilisation de l'ion ammonium comme donneur d'électron, cas de l'utilisation de l'éthanolamine

### Mécanisme de donneur d'hydrogène à partir de l'ion ammonium



Oxydation de l'ion ammonium en hydroxylamine puis en  $\text{NO}_2^-$   
L'oxydation du  $\text{NH}_3$  en  $\text{NH}_2\text{OH}$  impliquant le cytochrome cytoplasmique.

### Présence dans le karst

La grotte de Sulzbrunn nous montre qu'il existe dans cette grotte un équilibre entre la flore microbienne produisant le méthane comme c'est le cas des *Archaea* et la flore transformant ce

méthane en acétate ou en CO<sub>2</sub>. Cet équilibre nous montre qu'il faut préserver l'ambiance atmosphérique du milieu naturel pour éviter de faire basculer l'équilibre dans le sens d'une production exclusive de méthane.

### **Biotechnologie**

La production **d'Archaea** reste un problème biotechnologique. Il est toujours très difficile de vouloir cultiver des germes autotrophes et en plus anaérobies. Car nous ne connaissons que peu de chose sur le métabolisme de ce système microbien étant en plus très sensible à la présence d'oxygène. Mais nous pouvons constater que la culture industrielle d'*Archaea* serait une bonne chose au niveau médical.

**L**a grotte de Sulzbrunn a été visitée à des époques bien déterminées afin de ne pas perturber la flore microbienne ambiante. Ces visites se font au printemps, période où les échanges d'air entre endo-karst et épi-karst sont les plus faibles. Cette grotte est décrite comme un habitat unique pour la croissance du biofilm microbien.

Bien que la grotte soit située à quelques mètres sous la surface, des communautés microbiennes largement indépendantes des apports de carbone et d'énergie de surface ont été découvertes. Contrairement à nos attentes initiales, le microbiote du biofilm était étonnamment diversifié, avec une foule de populations apparentées à des méthanotrophes, des méthylotrophes bien connus et également des bactéries potentiellement méthylant l'iode.

Ces résultats fournissent des preuves pertinentes supplémentaires de l'intervention du microbisme des puits de méthane souterrains (McDonouah et al., 2016, Lennon et al., 2017).

## 29.1 Conclusion de la publication

La production massive observée de substances extracellulaires polymériques, peut servir de puits d'électrons pour les méthylotrophes limités en nutriments et donc limités en croissance.

Bien que ces premiers aperçus d'un système de biofilm souterrain apparemment unique soient très intrigants, de nombreuses questions de recherche restent ouvertes. L'application de substrats de méthane et de méthylotrophes marqués au  $^{13}\text{C}$  en combinaison avec des sondes d'isotopes stables à base d'acide nucléique est actuellement en cours et aidera à mieux comprendre les schémas complexes de partage de carbone et d'énergie à prévoir dans les biofilms. Les recherches futures devraient également porter sur l'organisation spatiale et le répertoire métagénomique du microbiote du biofilm, ainsi que sur le rôle possible des archées, des protozoaires, des phages et de la faune dans le réseau trophique de cet écosystème apparemment dominé par les procaryotes.

## ABSTRACT

This study by *Bavarian institutes*, detailing the exceptional formations of extensive, massive and recently discovered biofilms in a semi-artificial cave located in southern pre-alpine Germany, fed by a source Sulzbrunn (Schott, 1858). Subaerial and submerged microbial biofilms ("subaerial" - non-submerged; "submersed" - submerged), completely cover the walls and ceiling of this semi-natural cave, giving rise to vast mucous structures hanging up to 15 cm in length, also known as snottites (Hose and Pisgrowicz, 1999). The natural formation of this Cave of Sulzbrunn dates back 15 million years when Bavaria was covered by the sea (the sea in Bavaria appeared 30 million years ago). Alpine molasses covered the Bavarian coast resulting in anaerobic microbial isolation.

In 2014 water analyses found in this borehole show high iodine loads of 23 mg/l with high salinity in mineral spring water, being an indicator of the formation of an "upwelling" (coastal part receiving the surf).

Organic sediment deposits dating back to the Londen, in contact with this water, explain oil and gas production (Lu et al., 2015). In 2015 the Bavarian institutes decided to carry out further investigations to understand the evolution of this artificial cavity.

On September 22, 2017, *ISME Journal* publishes the results of the analyses of the Sulzbrunn cave. A synthesis was able to establish that the geomorphology of the formation of this cavity with marine origins dates from 15 million years ago.

Despite the number of years that have passed, marine microbiology is still active. This characteristic can be used to investigate the causes of such a long microbiological longevity.

By parallelizing the microbiological analyses of soils, freshwater and seawater, in biofilms, snottites, waters present in the cave, a differentiation between snottites and subaerial biofilms is revealed.

Compared to cave water and "submersed" biofilms.

This difference relates to the fact that the aerial parts of the structures (snottites and biofilms) are equipped with bacteria of the type *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, the *NC10 class*, as well as *Alphaproteobacteria*, unlike other structures, such as water, are devoid of them.

Submersed biofilms have very little. The absence of these bacteria in the waters of the cave, allows us to assume that this contamination was present at the formation of this cavity, thus defining the evolution of the ecosystem.

This observation shows that snottites had to be formed before biofilms, a hypothesis reinforced by the presence of freshwater flora in snottites. *Arenibacter* and *Porphyrobacter*, benthic marine bacteria, are absent in mixing water and spring water, but present in subaerial snottites and biofilm, they are evidence of the formation of these structures at the origin of the cavity. Methylophils and methanotrophs must have appeared long after the formation of snottites and "submersed" biofilms, as this activity comes from methanogenesis associated with the catabolism of organic matter.

***"The anoxic environment that has persisted for many years must have played a selective role in the general flora of the cavity. This selection had to be fed by the deep source, thus bringing anaerobic bacteria, Archaea, having produced methane and hydrocarbons currently being in the water and atmosphere of this cave."***

However, being more difficult to understand, it is how such microbial flora, living in endosymbiosis (like *Rickettsiaceae*), can live without the presence of a fauna adapted to its biotope. Moreover, how could they get into this cavity having remained closed for many years. This parasitism is only present in the aerial part.

The significant presence of *Pseudomonas* and *Legionella* in snottites and subaerial biofilms suggests aerial contamination because of their existence in these structures and their absence in water and submerged biofilm.

These bacteria can be carried by water droplets ("brumisation", fog). "Snottites" and biofilms play a role in microbial protection and conservation, to defend against the risks of biotope change (such as

climate change, change in brightness, change in oxygenation...) and aggressions External. It is therefore not the activity neither methanotrophic nor methylotrophic, having been the only factor favoring the formation of biofilms and snottites, but the fact of adaptation to a new biotope, protected by isolation in a new ecosystem. Such structures require a balanced ecosystem.

At the outset the colonies will regroup and develop, then make a fixation in a specific location (like a colony in a Petri box). In the biofilms and snottites examined we can see that there is a set of bacteria forming a biocoenosis, so that this bacterial flora can live from a common complementarity "synusie" allowing the sustainability of the whole.

- **Biocenosis Analysis**

Bacterial diversity in biofilm appears to be a factor in biofilm's sustainability.

This diversity is not identical from one structure to another, meaning that there is no taxonomic order, but it depends on all the physical-chemical and biochemical characteristics of "biocoenosis" bacteria. It is therefore not the definition of the species being a factor of choice, but the function of each of the bacteria they must perform in the ecosystem.

Given the bacterial diversity observed, it cannot be said that biofilms and "snottites" were made by a bacterial strain, but that a bacterial set has established one or more structures that allow longevity and resistance over the years.

- **Energy balance**

The results provide a relatively good energy balance for submersed biofilms. On the other hand, "snottites" and "subaerial" biofilms appear to be less equipped at this level. So there is a greater use of atmospheric methane, carbon dioxide, atmospheric nitrogen, for these two structures. Phosphorus deficiencies in "biofilms" and "subaerial" "snottites", observed in the Bavarian study, do not also appear to warrant justification. The calculation made taking into account the mass of the membrane of these structures in the C and N intake, this deficiency seems minimized.

Turnover (mortality and birth of bacteria) and microbial catabolisms (destruction of dead bacteria to feed living bacteria) play a large role in preserving the energy balance of the ecosystem. The *Saprospiraceae* family found in subaerial biofilms and "snottites" must play a large role in providing food and energy to the bacteria in these structures. The same is true for *Bdellovibrio* endo-bacteriophage bacteria with the ability to parasitize and kill other bacteria (present in 1.4 to 2.2% in snottites and biofilms).

## **Bacterial transfer between mixing water and snottites and biofilms**

Exchange mechanism between mixing water and "submersed" biofilms

The study of possible transfers between "submersed" biofilms and mixing water on the basis that there is two possibilities:

- **An active transfer**, or there is a sorting or selection of bacteria entering submersed biofilms.
- **A passive transfer**, or only the laws of physical diffusion in a membrane are taken into account (type: communicating vases). The analysis in this study is a static analysis because none of the dynamic data were within our reach.
- **Mobility in passive transfer**  
It was shown that mobile bacteria were more suitable for passive transfer between mixing water and "submersed" biofilm (this relationship is relatively small, about 5 % estimated on the coefficient of correlation).
- **Aerobiosis in passive transfer**  
Aerobiosis may be a limiting factor in the fact that the "submersed" biofilm is semi-aerobiosis. In this study we did not find a link between the penetration of bacteria between water and biofilm.
- **Marine bacteria in passive transfer**  
Only bacteria capable of living in soils and waters differ from other bacteria. These are aquatic bacteria, being best tolerated in the transfer between mixing water and submersed biofilm. There is a very small difference between telluric and purely marine bacteria in this transfer.

## Estimate of mixing water bacteria that may have had a passive passage.

- **In the case of a passive passage**

This form of penetration into the "submersed" biofilm is estimated at around 42% of the flora of the mixing water. The hull shape of the bacteria seems to be one of the criteria for passive passage.

- **In the active passage**

This type of transfer can be estimated by the complementary value of the passive passage (however there will be a source of error due to the internal development of bacteria in the biofilm).

- By deduction, it can therefore be estimated that approximately 58 % of the flora of the mixing water has undergone an active passage. In these 58 % we have:
- Bacteria remaining in the biofilm "submersed" without coming out – 38 %
- Bacteria present in mixing water and absent in the biofilm "submersed", they represent 6 %.
- Bacteria from the *Methylophilaceae* family represent 3 % of the mixing water.
- That's a total of about 47 % active passage from mixing water to submersed biofilm.
- Of the 58 %, 11 % would remain: either a development of flora in the "submersed" biofilm, making the difference.
- That is, mortality in mixing water can also be a bias. The lack of dynamic analysis of the flora of "submersed" biofilms does not allow us to safely assert the values analyzed, but they are still a basis for estimation.
- Bacteria Size by Penetration Rate

***“The study of theoretical values of bacterial lengths and widths shows that the passive diffusion of mixing water bacteria in the ‘submersed’ biofilm appears to be more influenced by the form bacterial than by the dimensions of it.”***

The hull shape (Cocci) is easier for a passive passage. The length of bacteria appears to be a smaller factor (if the bacterium is spiral-shaped or has “peritrich” flagella or very long polar flagella). As bacterial dimensions are theoretical values of the literature, these observations must be confirmed by measurements in electron microscopy.

## Bacterial speciation

For 15 million years when the cave was isolated from the outside world, in the “épigé” the evolution of living beings was making its way, some of the fauna and flora are transformed and the hominids evolved towards... *Homo sapiens*. The bacteria in the Sulzbrunn cave seem to have stopped their evolution. All possible forms of microbial evolution, which cave bacteria, could use to transform and adapt to a new terrestrial environment, were analyzed and showed, that there was no reason to have inhibition or a shutdown speciation.

## Following previous observations,

It is difficult to accept that after 15 million years of life in an unfavourable environment, there has been no evolution and a new speciation to adapt to the environment. Based on an anomaly every 210 days, being the most favorable cases, this gives after 15 million years of bacterial isolation, a value of possible genetic transcription errors of more than 26 million per lineage of bacteria, for example: in the case of cave mixing water with bacterial flora  $1.6 \cdot 10^6$  germ/l, this gives in 15 million years a possible number of transcription errors of  $4.16 \cdot 10^{13}$  germ/l, or 7 600 germs with errors (of mutations) per day per ml.

## The hypotheses could be:

Either a slow life in this cavity, but over 15 million years this would not have had an influence on the inhibition of speciation. That is, a taxonomic analysis that is insufficiently advanced to determine the weak changes that may have occurred. Or the radiation set against the earth and which can cause mutations, has spared the cavity. Either there has been a parallel evolution between the karst and

the “épigé”, covering all evolutionary forms and thus erasing the evolutionary differential between these two ecosystems. This is why the search for possible evolution in this cavity is of major interest in the knowledge of evolution and speciation through the ages.

### **Epidemiology related to the bacteria of the flora of Sulzbrunn**

Analysis of the geolocation of the current epidemiology of bacteria present in the cave. The global distribution of certain bacteria identified in this cavity, suggests, that in its initial formation there was: Either a relatively large planetary homogeneity of marine and terrestrial flora in the period of formation of this Cavity. Either there is an evolutionary parallelism, having produced an identical evolution in the cave and in the “épigé”. The isolation of marine and terrestrial flora during recovery (e.g. the presence of the genus *Arenibacter* being an isolated bacterium from marine sediment samples in the cave, was also collected in China and India) that this bacterium would have been present on the whole of our planet or that its origins have evolved uniformly on earth.

### **Use of the analysis of this cavity in the service of the environment**

After the discovery of the diversity of the Cave of Sulzbrunn, such an important study, the question may arise: what is the point of such an achievement? The study of ecosystems is never an unnecessary task, it allows to analyze the natural mechanisms put in place to regain the ecological balance protecting the sustainability of our planet. That is what we are seeing in this study. It is indeed sustainability, the important point of the 15 million years, allowing this cavity to continue to live in a completely transformed universe from maritime life to terrestrial life.

Why not use the know-how-bacteria to break the deadlock, in which our society has fallen, by pollution, by the use of fuel producing greenhouse gases, by the population increase... Knowledge of microbial life, bacterial culture and enrichment practices, i.e. biotechnology, will enable us to solve many of the problems that the evolution of our society has created. Biotechnology research must focus on environmental protection: the aim is to produce native or genetically modified strains to meet the needs of organisms and industrialists, in order to eliminate pollutants from our planet.

#### ***“Areas that can be covered by biotechnology:***

- ***The production of bacteria to be able of consuming methane, as part of biologically processing the natural production of this greenhouse gas.***
- ***The production of autotrophic bacteria to be able of consuming carbon dioxide for energy purposes would also be a measure of reducing pollution.***
- ***The production of anoxic biomass (artificial biocenosis) that can transform anthropogenic and industrial waste into the landfill process without rendering soils anoxic.***
- ***The transformation of waste by methanization for district heating and treatment of methanization residues by bacteria capable of using hydrocarbons.***
- ***The production of hydrogen by microbial means: hydrogen can replace fossil fuels; its production by biological means would be possible. The***
- ***Have oxygen produced by bacteria like *Methylomirabilis* for orbital flights and interstellar travel.***
- ***.....”***

Cave of Sulzbrunn is a museum, it tells us about the past life of our planet. If bacteria have created life, they can help us sustain it for many years to come.

***“Biotechnology can be an important key in ecology for controlling global warming. Bacteria corrected the climate 3 billion years ago. 1.5 billion years ago, they allowed us to live in an aerobic environment that suits us with oxygen, they made our planet livable. They can therefore rectify our current climate, being far from the pollution of these geological periods”***

## 30 BIBLIOGRAPHIE DE LA PUBLICATION : “MICROBIAL MEGACITIES FUELED BY METHANE OXIDATION IN A MINERAL SPRING CAVE”

(ISME Journal)

### Licence of ISME Journal

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercialShareAlike 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

© The Author(s) 2018

Supplementary Information accompanies this paper on the ISME Journal website <http://www.nature.com/ismej>

### **En français :**

Ce travail a été réalisé sous une licence creative “Commons Attribution-NonCommercialShareAlike 4.0 International License”. Les images ou autres documents de cet article sont inclus dans la licence Creative Commons, sauf indication contraire dans la ligne de crédit ; si le matériel n'est pas inclus dans la licence Creative Commons, les utilisateurs devront obtenir la permission du titulaire de la licence pour reproduire le matériel. Pour visualiser une copie de cette licence, consultez le site <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

© Les auteurs 2018

Des informations complémentaires accompagnent ce document sur le site du ISME Journal (<http://www.nature.com/ismej>)

- **AELION CM, HÖHENER P, HUNKELER D, and ARAVENA R**, “Environmental Isotopes in Biodegradation and Bioremediation”, *CRC Press*, Boca Raton, FL, USA, 2009
- **AMACHI S, MURAMATSU Y, AKIYAMA Y, MIYAZAKI K, YOSHIKI S, HANADA S, and al.**, “Isolation of iodideoxidizing bacteria from iodide-rich natural gas brines and seawaters”, *Microbial. Ecol.*, 49: 547–557, 2005
- **AMACHI S, KAWAGUCHI N, MURAMATSU Y, TSUCHIYA S, WATANABE Y, SHINOYAMA H, and al.**, “Dissimilatory Iodate reduction by marine *Pseudomonas* sp. strain SCT”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 5725–5730, 2007
- **ARAKAWA Y, AKIYAMA Y, FURUKAWA H, SUDA W, and AMACHI S**, “Growth stimulation of iodide-oxidizing  $\alpha$ -Proteobacteria in iodide-rich environments”, *Microbial. Ecol.*, 63: 522–531, 2012
- **BARTON HA, GIARRIZZO JG, SUAREZ P, ROBERTSON CE, BROERING MJ, BANKS ED, and al.**, “Microbial diversity in a Venezuelan orthoquartzite cave is dominated by the *Chloroflexi* (Class *Ktedonobacterales*) and *Thaumarchaeota* Group I.1c”, *Front. Microbiol.*, 5: 615, 2014
- **BATTIN TJ, BESEMER K, BENGTSSON MM, ROMANI AM, and PACKMANN AI**, “The ecology and biogeochemistry of stream biofilms”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 14: 251–263, 2016
- **BAYER A, DREXEL R, WEBER N, and GRIEBLER C**, “Quantification of aquatic sediment prokaryotes—a multiple-steps optimization testing sands from pristine and contaminated aquifers”, *Limnologica* 56:6 –13, 2016
- **BECK DA, KALYUZHAYAYA MG, MALFATTI S, TRINGE SG, GLAVINA DEL RIO T, IVANOVA N and al.**, “A metagenomic insight into freshwater methaneutilizing communities and evidence for cooperation between the *Methylococcaceae* and the *Methylophilaceae*”, *Peer J.*, 1: e23, 2013
- **BERGMANN FD, ABU LABAN NMFH, MEYER AH, ELSNER M, and MECKENSTOCK RU**, “Dual (C, H) isotope fractionation in anaerobic low molecular weight (poly)aromatic hydrocarbon (PAH) degradation: potential for field studies and mechanistic implications”, *Environ. Sci. Technol.*, 45: 6947–6953, 2011
- **BERNSTEIN A, ADAR E, RONEN Z, LOWAG H, STICHLER W, and MECKENSTOCK RU**, “Quantifying RDX biodegradation in groundwater using  $[\delta]^{15}\text{N}$  isotope analysis”, *J. Contam. Hydrol.*, 111: 25–35, 2010
- **BOLTZ JP, SMETS BF, RITTMANN BE, VAN LOOSDRECHT MCM, MORGENROTH E, and DAIGGER GT**, “From biofilm ecology to reactors: a focused review”, *Water Sci. Technol.*, 75: 1753–1760, 2017
- **BOND PL, SMRIGA SP, and BANFIELD JF**, “Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3842–3849, 2000

- **BORNEMANN M, BUSSMANN I, TICHY L, DEUTZMANN J, SCHINK B, and PESTER M**, “Methane release from sediment seeps to the atmosphere is counteracted by highly active *Methylococcaceae* in the water column of deep oligotrophic Lake Constance. FEMS”, *Microbiol. Ecol.*, 92: fiw123–fiw123, 2016
- **CHEN Y, WU L, BODEN R, HILLEBRAND A, KUMARESAN D, MOUSSARD H, and al.**, “Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur-and ammoniumbased chemolithotrophy in Movile Cave”, *ISME J.*, 3: 1093–1104, 2009
- **CUMMINGS DE, CACCAVO JR F, SPRING S, and ROSENZWEIG RF**, “*Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments”, *Arch. Microbiol.*, 171: 183–188, 1999
- **CURY JA, and KOO H**, “Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms”, *Anal. Biochem.*, 365: 208–214, 2007
- **EMERSON D, FIELD E, CHERTKOV O, DAVENPORT K, GOODWIN L, MUNK C, and al.**, “Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: implications for physiology, ecology, and systematics”, *Front. Microbiol.*, 4: 254, 2013
- **ENGEL AS, MEISINGER DB, PORTER ML, PAYN RA, SCHMID M, STERN LA and al.**, “Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA)”, *ISME J.*, 4: 98–110, 2010
- **ETIOPE G.**, “Natural emissions of methane from geological seepage in Europe”, *Atmos. Environ.*, 43: 1430–1443, 2009
- **ETTIG KF, BUTLER MK, LE PASLIER D, PELLETIER E, MANGENOT S, KUYPERS MMM and al.**, “Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria”, *Nature*, 464: 543–548. 19, 2010
- **FERNANDEZ-CORTES A, CUEZVA S, ALVAREZ-GALLEGO M, GARCIA-ANTON E, PLA C, BENAVENTE D and al.**, “Subterranean atmospheres may act as daily methane sinks”, *Nat. Commun.*, 6: 7003, 2015
- **FLEMMING H-C, WINGENDER J, SZEWZYK U, STEINBERG P, RICE SA, and KJELLEBERG S**, “Biofilms: an emergent form of bacterial life”, *Nat. Rev. Micro.*, 14: 563–575, 2016
- **FUJIMORI T, YONEYAMA Y, TANIAI G, KURIHARA M, TAMEGAI H, and HASHIMOTO S**, “Methyl halide production by cultures of marine proteobacteria *Erythrobacter* and *Pseudomonas* and isolated bacteria from brackish water”, *Limnol. Oceanogr.*, 57: 154–162, 2012
- **GAGLIANO AL, TAGLIAVIA M, D’ALESSANDRO W, FRANZETTI A, PARELLO F, and QUATRINI P**, “So close, so different: geothermal flux shapes divergent soil microbial communities at neighbouring sites”, *Geobiol.*, 14: 150–162, 2016
- **GOTTARDI W**, “Iodine and disinfection: theoretical study on mode of action, efficiency, stability, and analytical aspects in the aqueous system”, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 332: 151–157, 1999
- **GOZLAN RS, and MARGALITH P**, “Iodide oxidation by *Pseudomonas iodooxidans*”, *J. Appl. Bacteriol.*, 37: 493–499, 1974
- **GRIEBLER C, and LUEDERS T**, “Microbial biodiversity in groundwater ecosystems”, *Freshw. Biol.*, 54: 649–677, 2009
- **HESSE R, und SCHMIDT-THOME P**, „Neue JodwasserVorkommen im Bereich der bayerischen Alpenrandstrukturen bei Bad Tölz (aufgrund von Tiefbohrungen 1957-1967)“, 1975
- **HILTMANN W, KUCKELKORN K, und WEHNER H**, „Das Inkohlungsprofil der Bohrung Grambach 1 - erster Hinweis auf eine ‘Ölküche’ im Molassebecken“, *Geol. Jahrb.*, C11: 31–66. Erdöl Erdgas Kohle 115: 294–297, 1999
- **HOLMES AJ, TUJULA NA, HOLLEY M, CONTOS A, JAMES JM, ROGERS P, and al.**, “Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia *Environ. Microbiol.* 3: 256–264, 2001
- **HOSE LD, and PISAROWICZ JA**, Cueva de Villa Luz, Tabasco, “Mexico: reconnaissance study of an active sulfur spring cave and ecosystem”, *J. Cave Karst Stud.*, 61: 13–21, 1999
- **HOU X, AMAIS RS, JONES BT, and DONATI GL**, “Inductively coupled plasma optical emission spectrometry”, In: Meyers RA (ed), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, NJ, USA, 2006
- **HUTCHENS E, RADAJEWSKI S, DUMONT MG, McDONALD IR, and MURRELL JC**, “Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing”, *Environ. Microbiol.*, 6: 111–120, 2004
- **ITO K, NAKAJIMA N, YAMAMURA S, TOMITA M, SUZUKI H, and AMACHI S**, “Draft genome sequence of *Arenibacter* sp. strain C-21, an iodine-accumulating bacterium isolated from surface marine sediment”, *Genome Announc.*, 4: e01155–e01116, 2016
- **JONES DS, TOBLER DJ, SCHAPERDOTH I, MAINIERO M, and MACALADY JL**, “Community structure of subsurface biofilms in the thermal sulfidic caves of Acquasanta Terme, Italy”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 5902–5910, 2010
- **KALYUZHAYAYA MG, BECK DAC, VOROBEV A, SMALLEY N, KUNKEL DD, LIDSTROM ME, and al.**, “Novel methylotrophic isolates from lake sediment, description of *Methylotenera versatilis* sp. nov. and emended description of the genus *Methylotenera*”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62: 106–111, 2012

- **KALYUZHAYAYA MG, YANG S, ROZOVA ON, SMALLEY NE, CLUBB J, LAMB A, and al.**, “Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium”, *Nat. Commun.*, 4: 2785, 2013
- **KAMPBELL DH, and VANDEGRIFT SA**, “Analysis of dissolved methane, ethane, and ethylene in ground water by a standard gas chromatographic technique”, *J. Chromatogr. Sci.*, 36: 253–256, 1998
- **KARWAUTZ C, and LUEDERS T**, “Impact of hydraulic well restoration on native bacterial communities in drinking water wells”, *Microbes Environ.*, 29: 363–369, 2014
- **KNIEF C**, “Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker”, *Front. Microbiol.*, 6: 1346, 2015
- **KÜPPER FC, FEITERS MC, OLOFSSON B, KAIHO T, YANAGIDA S, ZIMMERMANN MB, and al.**, “Commemorating two centuries of iodine research: an interdisciplinary overview of current research”, *Angew. Chem. Int.*, Ed 50: 11598–11620, 2011
- **LENNON JT, NGUYEN-THUY D, PHAM TM, DROBNIK A, TA. PH, PHAM ND, and al.**, “Microbial contributions to subterranean methane sinks”, *Geobiol.*, 15: 254–258, 2017
- **LINTON J, WATTS P, AUSTIN R, HAUGH D, and NIEKUS H**, “The energetics and kinetics of extracellular polysaccharide production from methanol by micro-organisms possessing different pathways of C1 assimilation”, *Microbiology*, 132: 779–788, 1986
- **LU Z, HUMMEL ST, LAUTZ LK, HOKE GD, ZHOU X, LEONE J, and al.**, “Iodine as a sensitive tracer for detecting influence of organic-rich shale in shallow groundwater”, *Appl. Geochem.*, 60: 29–36, 2015
- **MATHIS JT, HANSELL DA, KADKO D, BATES NR, and COOPER LW**, “Determining net dissolved organic carbon production in the hydrographically complex western Arctic Ocean”, *Limnol. Oceanogr.*, 52: 1789–1799, 2007
- **MCDONALD IR, WARNER KL, MCANULLA C, WOODALL CA, OREMLAND RS, and MURRELL JC**, “A review of bacterial methyl halide degradation: biochemistry, genetics and molecular ecology”, *Environ. Microbiol.*, 4: 193–203, 2002
- **MCDONOUGH LK, IVERACH CP, BECKMANN S, MANEFIELD M, RAU GC, BAKER A and al.**, “Spatial variability of cave-air carbon dioxide and methane concentrations and isotopic compositions in a semi-arid karst environment”, *Environ. Earth Sci.*, 75: 700, 2016
- **MCMURDIE PJ, and HOLMES S**, “Phyloseq: an package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data”, *PLoS One*, 8: e61217, 2013
- **MICHALKE B, and WITTE H**, “Characterization of a rapid and reliable method for iodide biomonitoring in serum and urine based on ion chromatography–ICP-mass spectrometry”, *J Trace Elem. Med. Biol.*, 29: 63 – 68, 2015
- **NEWBY DT, REED DW, PETZKE LM, IGOE AL, DELWICHE ME, ROBERTO FF and al.**, “Diversity of methanotroph communities in a basalt aquifer”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48: 333–344, 2004
- **NORTHUP DE, BARNES SM, YU LE, SPILDE MN, SCHELBLE RT, DANO KE, and al.**, “Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves”, *Environ. Microbiol.*, 5: 1071–1086, 2003
- **O’HARA SCM, DANDO PR, SCHUSTER U, BENNIS A, BOYLE JD, CHUI FTW and al.**, “Gas seep induced interstitial water circulation: observations and environmental implications”, *Cont. Shelf Res.*, 15: 931–948, 1995
- **OKABE S, SATOH H, and WATANABE Y**, “In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes”, *Appl Environ Microbiol.*, 65: 3182–3191, 1999
- **ONDOV BD, BERGMAN NH, and PHILLIPPY AM**, “Interactive metagenomic visualization in a Web browser”, *BMC Bioinformatics*, 12: 385, 2011
- **ORTIZ M, LEGATZKI A, NEILSON JW, FRYSLIE B, NELSON WM, WING RA et al.**, “Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave”, *ISME J.*, 8: 478–491, 2014
- **OSHKINI Y, BECK DAC, LAMB AE, TCHESNOKOVA V, BENUSKA G, MCTAGGART TL, and al.**, “Methane-fed microbial microcosms show differential community dynamics and pinpoint taxa involved in communal response”, *ISME J.*, 9: 1119–1129, 2015
- **PAUL BG, DING H, BAGBY SC, KELLERMANN MY, REDMOND MC, ANDERSEN GL, and al.**, “Methane-oxidizing bacteria shunt carbon to microbial mats at a marine hydrocarbon seep”, *Front Microbiol.*, 8: 186, 2017
- **PILLONI G, VON NETZER F, ENGEL, and M, LUEDERS T**, “Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 78: 165–175, 2011
- **PILLONI G, GRANITSIOTIS MS, ENGEL M, and LUEDERS T**, “Testing the limits of 454 pyrotag sequencing: reproducibility, quantitative assessment and comparison to T-RFLP fingerprinting of aquifer microbes”, *PLoS One*, 7: e40467, 2012

- **PREUSS I, KNOBLAUCH C, GEBERT J, PFEIFFER EM**, “Improved quantification of microbial CH<sub>4</sub> oxidation efficiency in arctic wetland soils using carbon isotope fractionation”, *Biogeosci.*, 10: 2539–2552, 2013
- **PRUESSE E, PEPLIES J, and GLÖCKNER FO**, “SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes”. *Bioinformatics* 28: 1823–1829, 2012
- **QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, GERKEN J, SCHWEER T, YARZA P, and al.**, “The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and webbased tools”, *Nucleic Acids Res.*, 41: D590–D596, 2013
- “R Development CoreTeam, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria”, [http:// www.R-project.org](http://www.R-project.org), 2013
- **RIQUELME C, RIGAL F, HATHAWAY J J M, NORTHUP D E, SPILDE MN, BORGES PAV, and al.**, “Cave microbial community composition in oceanic islands: disentangling the effect of different colored mats in diversity patterns of Azorean lava caves”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 91: fiv141, 2015.
- **RUFF SE, BIDDLE JF, TESKE AP, KNITTEL K, BOETIUS A, and RAMETTE A**, “Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome”, *PNAS* 112: 4015–4020, 2015
- **RUSZNYAK A, ADOB DM, NIETZSCHE S, EUSTERHUES K, TOTSCHKE KU, NEU TR and al.**, “Calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic Herrenberg Cave”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 1157–1167, 2012
- **SARBU SM, KANE TC, and KINKLE BK**, “A chemoautotrophically based cave ecosystem”, *Science*, 272, 1996
- **SCHOTT AC**, „Wildbad Sulzbrunn bei Kempten in Bayern nebst der neuesten vom Freiherrn Dr Von Liebig vollzogenen authentischen Analyse seiner Jodquellen, sowie der dadurch auf organischem Wege erzeugten Jodmilch und Jodmolke“, Vömel: Frankfurt, Germany, 1858
- **STOECKER K., BENDINGER B., SCHÖNING B., NIELSEN P.H., NIELSEN J.L., BARANYI C. and al.**, “Cohn's *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase”, *PNAS*, 103: 2363–2367, 2006
- **STOEWER MM, KNÖLLER K, and STUMPP C**, “Tracing freshwater nitrate sources in pre-alpine groundwater catchments using environmental tracers”. *J. Hydrol.* 524: 753–767, 2015
- **STRONG P J, XIE S, and CLARKE WP**, “Methane as a resource: can the methanotrophs add value?”, *Environ. Sci. Technol.*, 49: 4001–4018, 2015
- **VREDE K, HELDAL M, NORLAND S, and BRATBAK G**, “Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton”, *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2965–2971, 2002
- **WATANABE T, KOJIMA H, and FUKUI M**, “Complete genomes of freshwater sulfur oxidizers *Sulfuricella denitrificans* skB26 and *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H: genetic insights into the sulfur oxidation pathway of *Betaproteobacteria*”, *Syst. Appl. Microbiol.*, 37: 387–395, 2014
- **WEISSBRODT D, NEU T, KUHLICKE U, RAPPAZ Y, and HOLLIGER C**, “Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms”, *Front. Microbiol.* 4: 175, 2013
- **WHITEHEAD D**, “The distribution and transformations of iodine in the environment”, *Environ. Int.*, 10: 321–339, 1984
- **WHITTENBURY R, PHILLIPS K, and WILKINSON J**, “Enrichment, isolation and some properties of methaneutilizing bacteria”, *Microbiology* 61: 205–218, 1970
- **ZHANG R, NEU TR, ZHANG Y, BELLENBERG S, KUHLICKE U, LI Q, and al.**, “Visualization and analysis of EPS glycoconjugates of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99: 7343–7356, 2015
- **ZIEGLER S, DOLCH K, GEIGER K, KRAUSE S, ASSKAMP M, EUSTERHUES K, and al.**, “Oxygen-dependent niche formation of a pyrite-dependent acidophilic consortium built by archaea and bacteria”, *ISME J* 7: 1725–1737, 2013

## 31 BIBLIOGRAPHIE (FFS)

- <sup>1</sup> Séquence complète du génome de la souche de type *Spirosoma linguale* (1T) //Standardisingenomics.biomedcentral.com/articles/9.4056/sigs.741334#CR22
- <sup>2</sup> IRIS Ming-Jing Xu and al., “Transketolase counteracts oxidative stress to drive cancer development”, *PNAS*, mis en ligne avant impression le 25 janvier 2016
- <sup>3</sup>
- <sup>4</sup> Haut de la page numéro de *GEO* : 780A018, Aire naturelle : Front Bregenzer Wald, Géologie : Couches de Weissach (F-USM, O Oligocène)
- <sup>5</sup> SAUER K. « Vaincre les biofilms »,
- <sup>6</sup> LUEDERS T., de : Institute of Groundwater Ecology, Helmholtz Zentrum Münche-German Research Centre for Environmental Health, Ingolstädter, Neuherberg 85764.
- <sup>7</sup> FRONTIER S., PICHOD-VIALE D., LEPRETRE A., DAVOULT D. et LUCZAK Ch., « Ecosystèmes » ; éd. Dunod, p. 149, 2008
- <sup>8</sup> Extrait de la publication web : KALVUZHNAVA MG, BOWERMAN S, LARA JC, LISDSTROM ME, CHISTOSERDOVAL L. Source : Full Text Sources ingenta pic : Other Literature Sources : COS Schelar Universe Molecular Biology Database SILVASS Database SILVA.
- <sup>9</sup> STRONG P.J., XIE S. and CLARKE W.P., “Methane as a Resource: Can the Methanotrophs Add Value?”, Centre for Solid Waste Bioprocessing, School of Civil Engineering, School of Chemical Engineering”, *The University of Queensland*, St. Lucia, Brisbane, Queensland 4072, Australia
- <sup>10</sup> SAIYED Z.M., TELANG S.D., and RAMCHAND C.N., “Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedecine”, *Biomag. Res. Tech. Biomed. Centrtechnic*.
- <sup>11</sup> BILLING S.A., and RICHTER D.D., “Soil Biologi and Biochemistry Impact Factor”, 3,93 ; september 2000
- <sup>12</sup> DARTNELL L.R., HUNTER, S.J., LOVELL K.V., COASTES A., and al., “Low-Temperature Ionizing Radiation Resistance of *Deinococcus radiodurans* and Antarctic Dry Valley Bacteria”, *Astrobiology*, 10 (7): 717-32, 2010
- <sup>13</sup> FRONTIER S., *op. cit.* (7), p.183
- <sup>14</sup> SMADJA C., « Des espèces apparaissent même sans isolement géographique », éd. *La Recherche* n° 480, p. 38. octobre 2013
- <sup>15</sup> *Op. cit.* (1)
- <sup>16</sup> TADDEI F., MATRIC I., and RADMAN M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, éd. USA, 92, 11736, 1995
- <sup>17</sup> TADDEI F., MATRIC I., and RADMAN M., « Du nouveau sur l’origine des espèces » ; éd. *La Recherche* n° 291, octobre 1996
- <sup>18</sup> DOUZERY E. et GALTIER N., « À chaque espèce son rythme d’évolution » ; éd. *La Recherche*, n° 21, mars – avril 2017, p. 22
- <sup>19</sup> *Ibid*°
- <sup>20</sup> International Human Genome Sequencing Consortium, “Initial sequencing and analysis of the human genome”, *Nature*, vol. 409, pp. 820-921, 2001
- <sup>21</sup> DUPONT D<sup>f</sup> J.-M., « Empreinte parentale », consulté le 19 avril 2011
- <sup>22</sup> WEBER M., « Profils de méthylation de l’ADN dans les cellules normales et cancéreuses », dans *Médecine/Sciences*, n<sup>os</sup> 8-9, vol. 24, août-septembre 2008 ; consulté le 21 avril 2011
- <sup>23</sup> “DNA methylation in bacteria”, *News-medical.net*, consulté le 18 mai 2011
- <sup>24</sup> GINET R. et DECOU V., « Initiation à la biologie et à l’écologie souterraines », éd. Jean Pierre Delarge, 1977
- <sup>25</sup> FRONTIER S., *op. cit.* (7), p. 373-376
- <sup>26</sup> SCHAUER M., and HAHN M. W., “Diversity and phylogenetic affiliations of morphologically conspicuous large filamentous bacteria occurring in the pelagic zones of a broad spectrum of freshwater habitats”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:1931-1940, 2005
- <sup>27</sup> DUNFIELD P.F., KHELENINA V.N., SUZINA N.E., TROTSSENKO Y.A., and DEDYSH S.N., “*Methylocella silvestris* sp. nov. a novel methanotrophic bacterium isolated from an acidic forest cambisol”; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53:1231-1239, 2003
- <sup>28</sup> DEDYSH S.N., PANIKOV N.S., and TIEDJE J.M., “Acidophilic methanotrophic communities from Sphagnum peat bogs”; ed. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:922-929, 1998

- 
- <sup>29</sup> SKRYABIN G.K., Institute of Biochemistry and Physiology of Methilomicrobiums, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142292, Russia.
- <sup>30</sup> MAUREL M.-Chr., « Comment la vie est apparue sur terre ? », *La Recherche* n°27, octobre-novembre 2018, p. 65
- <sup>31</sup> ZETTLER E. and al., *Env. Sci. & Tech.*, 47, 7137, 2013 (publié dans *La Recherche* n°479, septembre 2013)
- <sup>32</sup> JOUZEL J., NOUAILLAS O., *Quel climat pour demain*, éd. Dunod, p. 22, 2015
- <sup>33</sup> O. SEEHAUSEN and al., *Nature*, 455, 620, 2008
- <sup>34</sup> MINET P., « Un seul lac pour des centaines d'espèce » ; *La Recherche* n° 480, p. 44, 2013
- <sup>35</sup> KLINGLER C., « Des espèces apparaissent même sans isolement géographique », *La Recherche* n°480, p. 39-41, octobre 2013
- <sup>36</sup> MINET P., *op. cit.* (34)
- <sup>37</sup> BLANCHET É. « Conception d'un procédé d'électrosynthèse microbienne », Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, p. 77, 1<sup>er</sup> avril 2016
- <sup>38</sup> FUSE H., OHTA M., TAKIMURA O., MRAKAMI K., INOUE H., YAMAOKA Y., OCLARIT J.M., and al., "Oxidation of trichloréthylène ans dimethyl sulfide by a marine *Methylomicrobium* strain cantaining soluble méthane monooxygenase", *Biosci Biotechnol Biochem*, 62, 1935-1931, 1999
- <sup>39</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>40</sup> "Hydrogen from algae – fuel of future?" version du 4 mai 2008 sur l'internet archive.
- <sup>41</sup> SANTI C., BOGUSZ D., and FRANCHE C., "Biological nitrogen fixation in non-legume plants", *Ann Bot*, 111: 743–767, 2013
- <sup>42</sup> SESSITSCH A., HARDOIM P., DORING J., WEILHARTER A., KRAUSE A., WOYKE T., and al., "Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis", *Mol Plant Microbe Interact*, 25 : 28–36, 2012
- <sup>43</sup> AMES E.K., OLIVARES F.L., "Infection and colonization of sugarcane and other graminacious plants by endophytic diazotrophs", *Crit Rev Plant Sci*, 17 : 77–119, 1998
- <sup>44</sup> *International Journal of Microbiology*, UMS imprimé en Grande-Bretagne 1651, 2011
- <sup>45</sup> CAO FENG N., and BROMAN E., "Microbial coinuty and metabolic activity in Thiocyanate", publication september 2018
- <sup>46</sup> *Op. cit.* (1)
- <sup>47</sup> *Op. cit.* (1)
- <sup>48</sup> *Op. cit.* (1)
- <sup>49</sup> IVANOVA E.P., NEDASHKOVSKAYA O.I., CHUN J., LYSENKO A.M., FROLOVA G.M., SVETASHEV V.I., VYSOTSKII M.V., MIKHAILOV V.V., HUQ A., and COLWELL R., *International journal of Systematic and Evolution Microbiologie*, 2001
- <sup>50</sup> *Ibid.*
- <sup>51</sup> Center of Marine Biotechnology, university of Maryland Biotechnology Institute ; Baltimore 21202, USA.
- <sup>52</sup> NEDASHKOVSKAYA O.I., KIM S.B., LYSENKO A.M., and al., "Pacific institute of Biogoganic Chemistry of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences", Pr 100 Let Vladivostok 159. 690022 Vladivostok Russia
- <sup>53</sup> IVANOVA E.P., *op. cit.* (49)
- <sup>54</sup> GREEN DH, JP BOWMAN, SMITH EA, T GUTIERREZ, and BOLCH CJS, "*Marinobacter algicola* sp nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellates", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56; march 2006.
- <sup>55</sup> NEDASHKOVSKAYA O.I., *op. cit.* (52)
- <sup>56</sup> IVANOVA E.P., *op. cit.* (49)
- <sup>57</sup> *Op. cit.* (44)
- <sup>58</sup> *Op. cit.* (51)
- <sup>59</sup> NEDASHKOVSKAYA O.I., *op. cit.* (52)
- <sup>60</sup> Seoul National University School of Biological Sciences, Seoul 151742, Korea
- <sup>61</sup> NEDASHKOVSKAYA O.I., *op. cit.* (52)

- 
- <sup>62</sup> HOLMES B., and MCMEEKIN TA, “Genus *Flavobacterium*”, *Manuel of Systematic Bacteriology*, ed. by NR. Krieg and J.G. Hot Baltimore Williams and Wilking ; pp. 353-361,1984
- <sup>63</sup> HOLMES B., “Recent developments in *Flavobacterium*, Taxonomy in advances”, in *The Taxonomy and Significance of Flavobacterium Cytophaga and Related Bacteria*, Ed. by P. J. Jooste Bloenfontein South Africa, university of the Oganse Free State Press ; pp. 6-15
- <sup>64</sup> NEDASHKOVSKAYA O.I., *op. cit.* (52)
- <sup>65</sup> IVANOVA E.P., *op. cit.* (49)
- <sup>66</sup> SANG Hyeon Jeong, HYUN Mi Jin, JEONG Myeong Kim, and CHE Ok Jeon, *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 679-684, 2013
- <sup>67</sup> *School of Biological Sciences, Chung - Ang University, Seoul, 156-756, Republic of South Korea.*
- <sup>68</sup> JEONG SH, JIN HM, KIM JM, and JEON CO, “*Arenibacter hampyeongensis* sp. nov., a marine bacterium isolated from a tidal flat”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, n°63, I 2013 Feb;63(Pt 2):679-84. doi: 10.1099/ij.s.0.040683-0. Epub 2012 Apr 27.
- <sup>69</sup> BENEDETTI P., RASSU M., PAVAN G., SEFTON A., and PELLIZZER G., “Septic shock, pneumonia, and soft tissue infection due to *Myroides odoratimimus*: report of a case and review of *Myroides* infections”, *Infection*, 39 (2), pp. 161–165, 2011
- <sup>70</sup> HSUEH P.R., Wu J.J., HSIUE T.R., and al., “Bacteremic necrotizing fasciitis due to *Flavobacterium odoratum*”, *Clin. Infect. Dis.*, 21: pp. 1337-1338, 1995
- <sup>71</sup> YAGCI A., CERIKCIOGLU N., KAUFMANN M.E., and al., “Molecular typing of *Myroides odoratimimus* (*flavobacterium odoratum*) urinary tract infections in a Turkish hospital. ”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.*, 19: pp. 731-732, 2000
- <sup>72</sup> *Op. cit.* (51)
- <sup>73</sup> FRENEY J., HANSEN W., PLOTON C., MEUGNIER H., MADIER S., BORNTAIN N., and FLEURETTE J. “Septicemia caused by *Sphingobacterium multivorum*”, Laboratoire de Biologie - Virologie de la faculté de Médecine Alexis Carrel, 69008 Lyon
- <sup>74</sup> NEDASHKOVSKAYA O.I., *op. cit.*
- <sup>75</sup> FRENEY J., *ibid*<sup>o</sup>
- <sup>76</sup> SAIMAN L., CHEN Y., TABIBI S., SAN GABRIEL P., ZHOU J., LIU Z., and LAI L., “Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis”, *J. Clin. Microbiol.*, 39. DOI 10.1128/JCM.39.11. pp. 3942-3945, 2001
- <sup>77</sup> ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, and LIPMAN DJ., “Gapped Blast and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res*; 25:3389-3402, 1997
- <sup>78</sup> XIA Y., KONG H. et NIELSEN P.H., « *In situ* détection de micro-organismes hydrolyse de protéines dans les boues activées », *FEMS Microbiol. Ecol.*, 60:156-165, 2007
- <sup>79</sup> KONG Y., XIA Y., NIELSEN J.L. and NIELSEN P.H., “Structure and function of the microbial community in a full-scale enhanced biological phosphorus removal plant”, *Microbiology*, 153, 12, 4061-4073, 2007
- <sup>80</sup> XIA Y., KONG Y., ROLIGHED T., NIELSEN P.H., “Identification and ecophysiological characterization of epiphytic protéin-hydrolyzing Saprospiraceae (*Candidatus Epiflobacter* spp) in actived sludge”, *Appl. Environ. Microbiol.*, Am Soc Microbiol, 2008
- <sup>81</sup> GHERNA R, WOESE CR. “A partial phylogenetic analysis of the *Flavobacter-bacteroides* phylum: basis for taxonomic restructuring”, *Syst Appl Microbiol*, 1992.
- <sup>82</sup> LEWIN R.A., “Growth and nutrition of *Saprospira grandis* Gross (*Flexibacteriales*)”, *Can J. Microbiol*, 1972
- <sup>83</sup> LEWIN RA., “*Saprospira grandis*: A flexibacterium that can catch bacterial prey by *Ixotrophy*”, *Microb ecol*, 1997
- <sup>84</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>85</sup> GROSS J., „Über freilebende Spironemaceen“. *Mitt. Zool. Stat. Neapel*, 191
- <sup>86</sup> CHANG Shih-Bin Robin and KIRSCHVINK Joseph Lynn, “Magnetofossils, the magnetization of sediments, and the evolution of magnetite biomineralization”, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 17: pp. 169-195, 1989
- <sup>87</sup> FURUSAWA G, YOSHIKAWA T, YASUDA A, SAKATA T., “Algicidal activity and gliding motility of *Saprospira* sp. SS98-5”, *Can J Microbiol*; 49:92-100 10.1139/w03-017, 2003

- <sup>88</sup> ASHTON PJ, ROBERTS RD, “Apparent predation of *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin by a *Saprospira*-like bacterium in a hypertrophic lake (Hartbeespoort Dam, South Africa)”, *J. Limnol. Soc. South Afr.*; 13:44-47, 1987
- <sup>89</sup> BURKE C, THOMAS T, LEWIS M, STEINBERG P, and KJELLEBERG S., “Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*”, *ISME J*; 5:590-600, 2011
- <sup>90</sup> SHI M, ZOU L, LIU X, GAO Y, ZHANG Z, WU W, WEN D, CHEN Z, and AN C. “A novel bacterium *Saprospira* sp. strain PdY3 forms bundles and lyses cyanobacteria”, *Front Biosci*, 2006
- <sup>91</sup> CORRELL DL., “*Rhaphidosomes: 2'-O-methylated ribonucleoproteins*”, *Science*, 1968
- <sup>92</sup> DELK AS and DEKKER CA, “Characterization of rhaphidosomes of *Saprospira grandis*”, *J Mol Biol*; 64:287-295, 1972
- <sup>93</sup> STRONG P. J., XIE S., and CLARKE W. P., “Methane as a Resource: Can the Methanotrophs Add Value?”, Centre for Solid Waste Bioprocessing, School of Civil Engineering, School of Chemical Engineering, The university of Queensland, St. Lucia, Brisbane, Queensland 4072, Australia.
- <sup>94</sup> IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team--Phytoplasma Taxonomy Group, “*Candidatus Phytoplasma*, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54, n° 4, pp. 1243–1255, 2004
- <sup>95</sup> (in) MURRAY R.G.E. and SCHLEIFER K.H., “Taxonomic Notes: A Proposal for Recording the Properties of Putative Taxa of Prokaryotes”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 44, n° 1, p. 174–6, 1994
- <sup>96</sup> *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001
- <sup>97</sup> EUZÉBY J.P., TINDALL B.J. and International Committee on Systematics of Prokaryotes, “Status of strains that contravene Rules 27(3) and 30 of the Bacteriological Code. Request for an opinion”, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 54, n° 1, p. 293–301, 2004
- <sup>98</sup> LARPENT Jean Paul, « Cycle de Calvin-Benson des bactéries phototrophes et chimiolithotrophes » ; *Mémento technique de biochimie*, ed. TEC\_DOC New York ; p. 748, 1997
- <sup>99</sup> IRIS Ming-Jing Xu, *op.cit.*
- <sup>100</sup> LÜDTKE Stefan, NEUMANN Piotr, ERIXON Karl M., LEEPER Finian, KLUGER Ronald, FICNER Ralf and TITTMANN Kai, “Sub-ångström-resolution crystallography reveals physical distortions that enhance reactivity of a covalent enzymatic intermediate”, *Nature Chemistry*, vol. 5, n° 9, septembre 2013,
- <sup>101</sup> LUESKEN FA, WU ML, OP DEN CAMP HJ, KELTJENS JT., STUNNENBERG H, FRANCOIS KJ, STROUS M, JETTEN MS, “Effect of oxygen on the anaerobic methanotroph ‘*Candidatus Methylopirabilis oxyfera*’: kinetic and transcriptional analysis”, *Environmental Microbiology*, january 2012
- <sup>102</sup> KILLGORE J., SMIDT C., DUICH L., ROMERO-CHAPMAN N., TINKER D., REISER K., MELKO M., HYDE D., and RUCKER R. B., “Nutritional importance of pyrroloquinoline quinone”, *Science*, vol. 245, n° 4920, p. 8501, 989
- <sup>103</sup> Masse molaire calculée d’après “*Atomic weigghts of the éléments 2007*”, sur [www.chem.qmul.ac.uk](http://www.chem.qmul.ac.uk).
- <sup>104</sup> WU ML., VAN ALEN TA., VAN DONSELAAR EG, and al., “Co-localization of particulate methane monooxygenase and cd1 nitrite reductase in the denitrifying methanotroph ‘*Candidatus Methylopirabilis oxyfera*’”, *FEMS Microbiology Letters*, vol 334, issue 1, p. 49, september 2012
- <sup>105</sup> Université Radboud, Nijmegen, dpt de microbiologie, dpt de biologie moléculaire et dpt d’informatique biomoléculaire, Pays-Bas.
- <sup>106</sup> WU M.L., *op. cit. (104)*
- <sup>107</sup> CEA/CNRS - Géoscope d’Evry, université d’Evry Val d’Essonne, France
- <sup>108</sup> Institut Max Planck, centre de biotechnologies pour la microbiologie marine, université de Bielefeld, Bremen, Allemagne
- <sup>109</sup> BATES Scott T., EILERS Kathryn G., LAUBER Christian L., BERGMANN, Gaddy T., CAPORASO James G., WALTERS William A., KNIGHT Rob, and FIERER Noah, *The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities*; éd. Soil Bio Biochem PMC 18, Jan. 2012
- <sup>110</sup> AMEYAMA M., MATSUSHITA K., SHINAGAWA E., HAYASHI M., and ADACHI O., “Pyrroloquinoline quinone: excretion by methylotrophs and growth stimulation for microorganisms”, *Biofactors*, vol. 1, n° 1, p. 51-53, 1988
- <sup>111</sup> RUCKER R., STORMS D., SHEETS A., TCHAPARIAN E., and FASCETTI A., “Biochemistry : is pyrroloquinoline quinone a vitamin?”, *Nature*, vol. 433, n° 7025, E10-E11 ; discussion E11-12, 2005
- <sup>112</sup> BUCKLEY D.H. and SCHMIDT T.H., “Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35 : 105-112, 2001
- <sup>113</sup> BATES Scott T., *op. cit. (109)*

- 
- <sup>114</sup> NYREN P., PETERSSON B. and UHLEN M., “Solid Phase DNA Minisequencing by an Enzymatic Luminometric Inorganic Pyrophosphate Detection Assay”, *Analytical Biochemistry*, 208 (1), 171-175, 1993
- <sup>115</sup> UHLEN M., “Magnetic separation of DNA”, *Nature*, 340: 733-4, 1989
- <sup>116</sup> NYREN P. and LUNDIN A., “Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis”, *Anal. Biochem.*, DOI:10.1016/0003-2697(85)90211-8, 1985
- <sup>117</sup> RONAGHI M., UHLÉN M. and NYREN P., “A sequencing method based on real-time pyrophosphate”, *Science*, 281 (5375): 363, 1998
- <sup>118</sup> MARGUILES M. and al., “Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors”, *Nature*, 437, 376-380, 2005
- <sup>119</sup> *Pyrosequencing Technology and Platform Overview*, Retrieved 4 August 2017 and Hollmer, Mark (October 17, 2013), <https://www.qiagen.com/at/service-and-support/learning-hub/technologies-and-research-topics/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/>
- <sup>120</sup> NOGALES, B., MOORE E.R.B., LLOBET-BROSSA E., ROSSELLO-MORA R., AMANN R., and TIMMIS K.N., “Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:1874-1884, 2001
- <sup>121</sup> BATES Scott T., *op. cit.* (109)
- <sup>122</sup> BUCKLEY D.H., *op. cit.* (112)
- <sup>123</sup> MACRAE A., RIMMER D.L., and O’DONNELL A.G., “Novel bacterial diversity recovered from the rhizosphere of oilseed rape (*Brassica napus*) determined by the analysis of the 16S ribosomal DNA”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 78 : 13-21. 2000
- <sup>124</sup> LILES M.R., MANSKE B.F., BINTRIM S.B., HANDELSMAN J., and GOODMAN R.M., “A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 : 2684-2691, 2003
- <sup>125</sup> KUSKE C.R., BARNS S.M., and BUSCH J.D., “Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 : 3614-3621, 1997
- <sup>126</sup> HOLMES A.J., BOWYER J., HOLEY M.P., O’DONOGHUE M., MONTGOMERY M., and GILLINGS M.R., “Diverse, yet-to-be-cultured members of the Rubrobacter subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 33:111-120, 2000
- <sup>127</sup> FURLONG M.A., SINGLETON D.R., COLEMAN D.C., and WHITMAN W.B., “Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:1265-1279, 2002
- <sup>128</sup> FELSKA A. and AKKERMANS A.D.L., “Prominent occurrence of ribosomes from an uncultured bacterium of the Verrucomicrobiales cluster in grassland soils”, *Lett. Appl. Microbiol.*, 26 : 219-223, 1998
- <sup>129</sup> DUNBAR J., BARNS S.M., TICKNOR L.O., and KUSKE C.R., “Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 : 3035-3045, 2002
- <sup>130</sup> CHOW M.L., RADOMSKI C.C., MCDERMOTT J.M., DAVIES J., and AXELROOD P.E., “Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 42 : 347-357, 2002
- <sup>131</sup> BORNEMAN J. and E. W. TRIPLETT., “Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia : evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 : 2647-2653, 1997
- <sup>132</sup> AXELROOD P.E., CHOW M.L., RADOMSKI C.C., MCDERMOTT J.M., and DAVIES J., “Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance”, *Can. J. Microbiol.*, 48 : 655-674, 2002
- <sup>133</sup> FELSKA A., *op. cit.* (128)
- <sup>134</sup> JANSSEN P.H., YATES P.S., GRINTON B.E., TAYLOR P.M., and SAIT M., “Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:2391-2396, 2002
- <sup>135</sup> HOLMES A.J., *op. cit.* (126)
- <sup>136</sup> ELLIS R.J., MORGAN P., WEIGHTMAN A.J., and FRY J.C., “Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 : 3223-3230, 2003

- <sup>137</sup> OCHSENREITER T., SELEZI D., QUAISER A., BONCH-OSMOLOVSKAYA L., and SCHLEPER C., “Diversity and abundance of *Crenarchaeota* in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real-time PCR”, *Environ. Microbiol.*, 5 : 787-797, 2003
- <sup>138</sup> FELSKA A., WOLTERINK A., VAN LIS R., DE VOS W.M., and AKKERMANS A.D.L., “Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:4581-4587, 1998
- <sup>139</sup> BUCKLEY D.H. and SCHMIDT T.H., “Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems”, *Environ. Microbiol.*, 5:441-452, 2003
- <sup>140</sup> BUCKLEY D.H., *op cit.* (112)
- <sup>141</sup> NOGALES, B., *op. cit.* (120)
- <sup>142</sup> HEDLUND B.P., GOSINK J.J., and STALEY J.T., “*Verrucomicrobia* div. nov., a new division of the Bacteria containing three new species of *Prostheco bacter*”, *Antonie Leeuwenhoek*, 72 : 29-38, 1997
- <sup>143</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>144</sup> JANSSEN P.H., SCHUHMAN A., MÖRSCHER E., and RAINEY F.A., “Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the *Verrucomicrobiales* lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:1382-1388, 1997
- <sup>145</sup> CHIN K.-J., LIESACK W., and JANSSEN P.H., “Description of *Opitutus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate new strains of the division *Verrucomicrobia* isolated from rice paddy soil”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51 : 1965-1968, 2001
- <sup>146</sup> CHIN K.-J., HAHN D., HENGSTMANN U., LIESACK W., and JANSSEN P.H., “Characterization and identification of numerically abundant culturable bacteria from the anoxic bulk soil of rice paddy microcosms”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 : 5042-5049, 1999
- <sup>147</sup> JANSSEN P.H., *op. cit.* (144)
- <sup>148</sup> JOSEPH S.J., HUGENHOLTZ P., SANGWAN P., OSBORNE C.A., and JANSSEN P.H., “Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:7210-7215, 2003
- <sup>149</sup> CHIN K.-J., *op. cit.* (146)
- <sup>150</sup> JOSEPH S.J., *op. cit.* (148)
- <sup>151</sup> WARD-RAINEY N., RAINEY F.A., SCHLESNER H., and STACKEBRANDT E., “Assignment of hitherto unidentified 16S rDNA species to a main line of descent within the domain Bacteria”, *Microbiology*, 141 : 3247-3250, 1995
- <sup>152</sup> VANDEKERCKHOVE Tom T.M., NAVARRO Jason B., COOMANS August, and HEDLUND Briam P., “*Candidatus Xiphinematobacter*”; éd. Wiley online library, 2015
- <sup>153</sup> QIU Y.L., KUANG X.Z., SHI X.S., YUOM X.Z., and GUO R.B., “*Terrimicrobium sacchariphylum* ger nov, sp. nov. *Spartobacterium* in the phylum *Verrucomicrobia* isolated from a rice paddy field”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014
- <sup>154</sup> CHIN K.-J., *op. cit.* (145)
- <sup>155</sup> WINOGRADSKY S.N., Institute of Microbiology, Russian Academy of Science, Prospect 60-let Oklyabray 7/2, 117811, Moscow, Russia
- Institute for Biological Resources and Functions National Institute of Advanced Industrial Science and technology Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305 - 8566, Japan.
  - Departement of Chemical Engineering, University of Washington, Box 331750, Seattle, WA 98195 - 1750 USA
  - Pushchino State University, Pushchino, Moscow région, 142290
- <sup>156</sup> JANSSEN P.H., *op. cit.* (144)
- <sup>157</sup> JANSSEN P.H., *op. cit.* (134)
- <sup>158</sup> HOTAMISIGIL G.S., DELMAS E., and al., *Science* 259, 87,1993
- <sup>159</sup> HOTAMISIGIL G.S., DELMAS E., et coll, « Une protéine responsable des pathologies de l’obésité », *La Recherche*, p 73 – 76, mars 2017
- <sup>160</sup> LINDSTRÖM Eva S., KAMST-VAN AGTERVELD Miranda P., and ZWART Gabriel, “Distribution of typical Freshwater Bactériel groups Is associated with pH, température, and Lake water retention time” *Microbial Ecology*, 0.1128/AEM.71.12.8201-8206, 2005
- <sup>161</sup> HOTAMISIGIL G.S., *op.cit.* (158)

- 
- <sup>162</sup> DORE Joël et CLEMENT Karine, « Notre état de santé dépend d'une symbiose avec notre microbiote » ; *La Recherche*, février 2018, p 42
- <sup>163</sup> FELSKA A., *op.cit.* (128)
- <sup>164</sup> BATES Scott T., *op. cit.* (109)
- <sup>165</sup> ZWART G., CRUMP B.C., KAMST-VAN AGTERVELD M.P., HAGEN F. et HAN S.-K., "Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers", *Aquat. Microb. Ecol.*, vol.28, pp. 141-155, 2002
- <sup>166</sup> ZWART G., VAN HANNEN E.J., KAMST-VAN AGTERVELD M.P., VAN DER GUCHT K., LINDSTRÖM E.S., VAN WICHELEN J., LAURIDSEN T., CRUMP B.C., S.-K. HAN, and S.A.J. DECLERCK, "Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization", *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 10: 5875-5883, 2003
- <sup>167</sup> HUGENHOLTZ P., GOEBEL B.M., and N.R. PACE, "Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity", *J. Bacteriol.*, 180 : 4765-4774, 1998
- <sup>168</sup> LEE S.-Y., BOLLINGER J., BEZDICEK D., and OGRAM A., "Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 : 3787-3793. 1996
- <sup>169</sup> WARD-RAINEY N., *op. cit.* (151)
- <sup>170</sup> HEDLUND B.P., *op. cit.* (142)
- <sup>171</sup> GRAY N.D. and HEAD I.M., "Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria", *Environ. Microbiol.*, 3:481-492, 2001
- <sup>172</sup> MCCAIG A.E., GLOVER L.A., and PROSSER J.I., "Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures", *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 : 1721-1730, 1999
- <sup>173</sup> JANSSEN P.H., *op. cit.* (134)
- <sup>174</sup> HEDLUND B.P., *op. cit.* (142)
- <sup>175</sup> GARRITY G.M., BELL J.A., and LILBURN T.G., "Taxonomic outline of the procaryotes", release 4.0. Springer, New York, 2003
- <sup>176</sup> SCHLESNER H., "*Verrucomicrobium spinosum* gen. nov., sp. nov. : a fimbriated prosthecate bacterium", *Syst. Appl. Microbiol.*, 10:54-56, 1987
- <sup>177</sup> KHADEM AF and al., "Autotrophic methanotrophy in *Verrucomicrobia: Methylacidiphilum fumariolicum* SolV uses the Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation", *J. Bacteriol.*, 193 : 4438-4446, 2011
- <sup>178</sup> MCCAIG A.E., *op. cit.* (172)
- <sup>179</sup> FELSKA A., WOLTERINK A., VAN LIS R., DE VOS W.M., and AKKERMANS A.D.L., "Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes", *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 : 3998-4003, 2000
- <sup>180</sup> AXELROOD P.E., *op. cit.* (132)
- <sup>181</sup> CHOW M.L., *op. cit.* (130)
- <sup>182</sup> MACRAE A., *op. cit.* (123)
- <sup>183</sup> LILES M.R., *op. cit.* (124)
- <sup>184</sup> KUSKE C.R., *op. cit.* (125)
- <sup>185</sup> HOLMES A.J., *op. cit.* (126)
- <sup>186</sup> FURLONG M.A., *op. cit.* (127)
- <sup>187</sup> FELSKA A., *op. cit.* (128)
- <sup>188</sup> DUNBAR J., *op. cit.* (129)
- <sup>189</sup> CHOW M.L., *op. cit.* (130)
- <sup>190</sup> HUGENHOLTZ P., *op. cit.* (167)
- <sup>191</sup> OCHSENREITER T., *op. cit.* (137)
- <sup>192</sup> BUCKLEY D.H., *op. cit.* (112)
- <sup>193</sup> QIU Y.L., *op. cit.* (153)
- <sup>194</sup> WARD-RAINEY N., *op. cit.* (151)
- <sup>195</sup> QIU Y.L., *op. cit.* (153)
- <sup>196</sup> VANDEKERCKHOVE Tom T.M., *op. cit.* (152)
- <sup>197</sup> VANDEKERCKHOVE Tom T.M., *op. cit.* (152)

- <sup>198</sup> LEE KB, LIU CT, ANZAI Y, KIM H, AONO T, and OYAIU H, "The hierarchical system of the *Alphaproteobacteria*: description of *Hyphomonadaceae* fam. nov., *Xanthobacteraceae* fam. nov. and *Erythrobacteraceae* fam. nov", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55 (Pt 5): 1907-1919, 2005
- <sup>199</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>200</sup> SEGERS R., "Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland méthane fluxes", *Biogeochemistry*, 41 : 23-51, 1998
- <sup>201</sup> GILLIGAN P.H. and LUM G, VANDAMME and al, "*Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, *Pandoraea* and *Acidovorax*", in: MURRAY, BARON, JORGENSEN, et al., dir., *Manual of Clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> éd. Washington, DC: ASM Press; 2003:pp. 729-744, 2003
- <sup>202</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>203</sup> LEWIS R. Dartnell, HUNTER Stephanie J., Keith V. Lowell, Coates Andrew J., and WARD John M., "Low-Temperature Ionizing Radiation Resistance of *Deinococcus radiodurans* and Antarctic Dry Valley Bacteria". *Astrobiology*, 10 (7): 717-32, 2010
- <sup>204</sup> CHO J.C. and GIOVANNONI S. J., "*Fulvimarina pelagi* gen. nov. sp. nov., a marine bacterium that forms a deep evolutionary lineage of descent in the order *Rhizobiales*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1853-1859, 2003
- <sup>205</sup> DUNFIELD P.F., *op. cit.* (27)
- <sup>206</sup> DEDYSH S.N., DERAKSHANI M., and LIESACK W., "Detection and enumeration of methanotrophs in acidic Sphagnum peat by 16S rRNA fluorescence in situ hybridization, including the use of newly developed oligonucleotide probes for *Methylocella palustris*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:4850-4857, 2001
- <sup>207</sup> DEDYSH S.N., LIESACK W., KHMELLENINA V.N., SUZINA N. E., TROTSSENKO Y.A., SEMRAU J.D., ABING A.M., PANIKOV N.S., and TIEDJE J.M., "*Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50:955-969, 2000
- <sup>208</sup> DEDYSH S.N., BERESTOVSKAYA Y.Y., VASYLIEVA L.V., BELOVA S.E., KHMELLENINA V.N., SUZINA N.E., TROTSSENKO Y.A., LIESACK W., and ZAVARZIN G.A., "*Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic peatlands of tundra", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54:151-156, 2004
- <sup>209</sup> DUNFIELD P.F., *op. cit.* (27)
- <sup>210</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)
- <sup>211</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (207)
- <sup>212</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (206)
- <sup>213</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (207)
- <sup>214</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (207)
- <sup>215</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (206)
- <sup>216</sup> WEISBURG W.G., BARNS S.M., PELLETIER D.A., and LANE D.J., "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *J. Bacteriol.*, 2:697-903, 1991
- <sup>217</sup> *Op. cit.* (119)
- <sup>218</sup> *Op. cit.* (119)
- <sup>219</sup> SAIYED Z.M., TELANG S.D., and RAMCHAND C.N., "Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine", *Biomag. Res. Tech.*, 1(1):2, october 2003
- <sup>220</sup> WEISBURG W.G., *op. cit.* (216)
- <sup>221</sup> CHAIN P., LAMERDIN J., LARIMER F., REGALA W., LAO V., and al.. "Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*", *J. Bacteriol.*, 185:2759-2773. 2003
- <sup>222</sup> DEDYSH S. N., N.S. PANIKOV, W. LIESACK, R. GROSSKOPF, J. ZHOU, and J.M. TIEDJE, "Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands"; *Science*, 282:281-284, 1998
- <sup>223</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (207)
- <sup>224</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)
- <sup>225</sup> DEDYSH S.N., KHMELLENINA V.N., SUZINA N.E., TROTSSENKO Y.A., SEMRAU J.D., LIESACK W., and J.M. TIEDJE, "*Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52:251-261, 2002
- <sup>226</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)

- 
- <sup>227</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)
- <sup>228</sup> CONRAD R., “Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO)”, *Microbiol. Rev.*, 60 : 609-640, 1996
- <sup>229</sup> SEGERS R., *op. cit.* (200)
- <sup>230</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)
- <sup>231</sup> DUNFIELD P.F., *op. cit.* (27)
- <sup>232</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)
- <sup>233</sup> DUNFIELD P.F., *op. cit.* (27)
- <sup>234</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)
- <sup>235</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)
- <sup>236</sup> DUNFIELD P.F., *op. cit.* (27)
- <sup>237</sup> MUSTAKHIMOV I., KALYZHNAY M.G., LIDSTROM M.E., and CHISTOSERDOVA L., “Insights into denitrification in *Methylothermobacter mobilis* from denitrification pathway and methanol metabolism mutants”, *J. Bacteriol.*, 195(10):2207-11, May 2013
- <sup>238</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (207)
- <sup>239</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (28)
- <sup>240</sup> SAIYED Z.M., *op. cit.* (219)
- <sup>241</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)
- <sup>242</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (222)
- <sup>243</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (28)
- <sup>244</sup> DUNFIELD P.F., *op. cit.* (27)
- <sup>245</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)
- <sup>246</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (207)
- <sup>247</sup> BERRESTOWKAYA J.J., KOTSYRBENKO O.R., TOUROVA T., and VASILYEVA L.V., *Russian Academy of Sciences*, May 2011
- <sup>248</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (225)
- <sup>249</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (208)
- <sup>250</sup> STRONG P.J., XIE S., and CLARKE W.P., “Methane as a Resource: Can the Methanotrophs Add Value?”, *Environ Sci Technol.*, 49(7):4001-18, Apr 7 2015
- <sup>251</sup> CHO J.C., *op. cit.* (204)
- <sup>252</sup> BRYANT D.A., COSTAS A.M.G., MARESCA J.A., CHEW A.G.M., KLATT C.G., BATESON M.M., TALLON L.J., HOSTETLER J., NELSON W.C., HEIDELBERG J.F., and WARD D.M., “Candidatus *Chloracidobacterium thermophilum*: An Aerobic Phototrophic Acidobacterium”, *Science*, vol. 317, n° 5837, pp. 523–526, 2007
- <sup>253</sup> PARK J.Y. and YOO Y., “Biological nitrate removal in industrial wastewater treatment: which electron donor we can choose”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82:415–429, 2009
- <sup>254</sup> BAMFORTH C.W. and QUAYLE J.R., “Aerobic and anaerobic growth of *Paracoccus denitrificans* on methanol”. *Arch. Microbiol.*, 119:91–97, 1978
- <sup>255</sup> LARPENT J.-P. « Cycle de Calvin-Benson des bactéries phototrophes et chimiolithotrophes », *Mémento technique de biochimie*, ed. TEC-DOC, New-York, p. 748, 1987
- <sup>256</sup> SKERMAN V.B.D., MCGOWAN V. et SNEATH P.H.A., “Approved Lists of Bacterial Names”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 30, n° 1, pp. 225-420, Jan. 1980
- <sup>257</sup> DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P., and coll., “Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*; unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51 (Pt 6): 2145–65, 2001
- <sup>258</sup> FIKRIG E., “New test developed for serodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis”, *J. Clin. Microbiol.*, 37 : pp. 3540-3544, Reuters Health, 1999
- <sup>259</sup> DUMLER J.S., *op. cit.* (257)
- <sup>260</sup> LARPENT J.-P. et LARPENT-GOURGAUD M., *Mémento technique de microbiologie*, éd. Lavoisier Tec. Doc., 3<sup>e</sup> édition, p. 405, 2000

- 
- <sup>261</sup> *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition, Release 2.0, Springer-Verlag, New York, 284 pages, 2002
- <sup>262</sup> BILLINGS A.N., TELTOW G.J., WEAVER S.C., and WALKER D.H., "Molecular characterization of a novel *Rickettsia* species from *Ixodes scapularis* in Texas", *Emerging Infectious Diseases*, 4(2): pp. 305-309, 1998
- <sup>263</sup> DUMLER J.S., *op. cit.* (257)
- <sup>264</sup> *Op. cit.* (261)
- <sup>265</sup> ANDERSON B.E., DAWSON J.E., JONES D.C., and WILSON K.H., "*Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis", *J. Clin. Microbiol.*, 29: pp. 2838-2842, 1991
- <sup>266</sup> DUMLER J.S. and BAKKEN J.S., "Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections", *Clin. Infect. Dis.*, 20: pp.1102-1110, 1995
- <sup>267</sup> MAEDA K., MARKOWITZ N., HAWLEY R.C., RISTIC M., COX D., and MCDADE J.E., "Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia", *N. Engl. J. Med.*, 316: pp. 853-856, 1987
- <sup>268</sup> DUMLER J.S., *op. cit.* (257)
- <sup>269</sup> BREITSCHWERDT Edward B., HEGARTY Barbara C., and HANCOCK Susan I., "Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* and *Bartonella vinsonii*", *J. Clin. Microbiol.*, 36(9): pp. 2645-2651, 1998
- <sup>270</sup> MONSON T.P., DUMLER J.S., MORRIS C.C., WESTBROOK A.B., DUNCAN J.L., DAWSON J.E., and al., "Identification of *Ehrlichia chaffeensis* morulae in cerebrospinal fluid mononuclear cells", *J. Clin. Microbiol.*, 30(8):2207-10, aug. 1992
- <sup>271</sup> ANDERSON B.E., *op. cit.* (265)
- <sup>272</sup> MAEDA K., *op. cit.* (267)
- <sup>273</sup> *Op. cit.* (261)
- <sup>274</sup> BAKKEN J.S., "Human ehrlichioses: newly recognized infections transmitted by ticks", *Annu. Rev. Med.*, 49: pp. 201-213, 1998
- <sup>275</sup> BROUQUI P. and RAOULT D., "Human ehrlichiosis", *N. Engl. J. Med.*, 330:1760-1, 1994
- <sup>276</sup> REMY V., HANSMANN Y, DE MARTINO S, CHRISTMANN D, and BROUQUI P., "Human Anaplasmosis Presenting as Atypical Pneumonitis in France", *Clin. Infect. Dis.*, 37 : pp. 846-848, 2003
- <sup>277</sup> ANDERSON B.E., *op. cit.* (265)
- <sup>278</sup> BILLINGS A.N., *op. cit.* (262)
- <sup>279</sup> BREITSCHWERDT E.B., *op. cit.* (269)
- <sup>280</sup> GOODMAN Jesse L., NELSON Curtis, VITALE Blaise, MADIGAN John E., DUMLER J. Stephen, KURTTI Timothy J., and al., "Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis", *N. Engl. J. Med.*, 334:209-215, Jan. 25, 1996
- <sup>281</sup> *Op. cit.* (261)
- <sup>282</sup> REMY V., *op. cit.* (276)
- <sup>283</sup> LEBECH A.M., HANSEN K., PANCHOLI P., SLOAN L.M., MAGERA J.M., and PERSING D.H., "Immunoserologic evidence of Human Granulocytic Ehrlichiosis in Danish patients with Lyme neuroborreliosis", *Scand. J. Infect. Dis.*, 30 (2): 173-6, 1998
- <sup>284</sup> BROUQUI P., *op. cit.* (275)
- <sup>285</sup> LEBECH A.M., *op. cit.* (283)
- <sup>286</sup> P.H. GILLIGAN, *op. cit.* (201)
- <sup>287</sup> GARRITY George, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, 2005
- <sup>288</sup> BILLINGS A.N., *op. cit.* (262)
- <sup>289</sup> BRENNER Don J.; KRIEG Noel R., and STALEY James T., "*The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*", 2005, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, New-York, Springer, 2005
- <sup>290</sup> BOONE D.R. and CASTENHOLZ R.W., "The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria", *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> ed., vol.1, Springer-Verlag, New-York, pp. 465-466, 2001
- <sup>291</sup> YOON Jung-Hoon, LEE Mi-Hwa, and TAE Kwang Oh., Correspondance jhyoon@kribb.re.kr Yoon Jung-Hoon. Korea Research Institute of Bioscience et biotechnologie (IKRBB), PO Box 115, Yusong, Taejon, Corée, Publié en ligne avant impression le 17 septembre 2004

- <sup>292</sup> LEE K.-B., LIU C.-T., ANZAI Y., H. KIM, AONO T., and OYAIU H., “The hierarchical system of the ‘*Alphaproteo-bacteria*’: description of *Hyphomonadaceae* fam. nov., *Xanthobacteraceae* fam. nov. and *Erythrobacteraceae* fam. nov.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 55 (5): 1907-1919, 2005
- <sup>293</sup> CHAIN P., LAMERDIN J., LARIMER F., REGALA W., LAO V., and al.. “Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*”; *J. Bacteriol.*, 185:2759-2773, 2003
- <sup>294</sup> GARRITY, BELL, and LILBURN, Reference: *Burkholderiales*, 2006
- <sup>295</sup> WEYANT R.S., MOSS C.W., WEAVER R.E., and al., “Identification of unusual pathogenic gram-negative aerobic and anaerobic optional Bacteria.”, 2<sup>nd</sup> ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1996
- <sup>296</sup> ATKINSON B.E., D.L. SMITH, and W.R. LOCKWOOD, “*Pseudomonas testosteroni* sepsis”, *Ann Intern Med.*, 83:pp. 369-370, 1975
- <sup>297</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>298</sup> WEYANT R.S., *op. cit.* (295)
- <sup>299</sup> MCLLOY Simon Jon, TAKANORI, A. NIERYCHLO Marta and al., “Ecophysiology of novel core phylotypes in activated sludge wastewater treatment plants with nutrient removal”, Poster presented at 15th International Symposium on Microbial Ecology, Seoul, Republic of Korea
- <sup>300</sup> KOJIMA Hisaya and FUKUI Manabu, “*Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 1651–1655, 2011
- <sup>301</sup> MCLLOY Simon Jon, *op. cit.* (299)
- <sup>302</sup> KOJIMA Hisaya, *op. cit.* (300)
- <sup>303</sup> KOJIMA Hisaya, *op. cit.* (300)
- <sup>304</sup> NI Gaofeng, CANIZALES Sebastian, BROMAN Elias, and al., “Microbial Community and Metabolic Activity in Thiocyanate Degrading Low Temperature Microbial Fuel Cells”, *Front. Microbiol.*, Sept. 2018
- <sup>305</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>306</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>307</sup> BODEN R., HUTT L.P., and RAE A.W., “Reclassification of *Thiobacillus aquaesulis* (Wood & Kelly, 1995) as *Annwoodia aquaesulis* gen. nov., comb. nov., transfer of *Thiobacillus* (Beijerinck, 1904) from the *Hydrogenophilales* to the *Nitrosomonadales*, proposal of *Hydrogenophilalia* class. nov. within the ‘Proteobacteria’, and four new families within the orders *Nitrosomonadales* and *Rhodocyclales*”, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 67(5):1191-1205, May 2017
- <sup>308</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>309</sup> „Über die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlen’sure als Kohlenstoffquelle ern’hren k’nnen”, *Centralbl Bakteriol Parasitenkd Infektions Hyg. Abt II*, 11: pp. 592-599
- <sup>310</sup> BAKER S.C., FERGUSON S.J., LUDWIG B., PAGE M.D., RICHTER O.M., and VAN SPANNING R.J., “Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:1046–1078, 1998
- <sup>311</sup> *Guide de surveillance biologique basée sur les macro-invertébrés benthiques d’eau douce du Québec- cours d’eau peu profonds à substrat grossier*,  
[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwiC9JDu1YfnAhVORBoKHwCQDxkQFjAAegQIChAB&url=http%3A%2F%2Fwww.environnement.gouv.qc.ca%2Feau%2Feco\\_aqua%2Fmacroinvertebre%2Fsurveillance%2Fbenthiques.pdf&usq=AOvVaw1CLLY6ZI4DQFMOaPc-2jn0](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwiC9JDu1YfnAhVORBoKHwCQDxkQFjAAegQIChAB&url=http%3A%2F%2Fwww.environnement.gouv.qc.ca%2Feau%2Feco_aqua%2Fmacroinvertebre%2Fsurveillance%2Fbenthiques.pdf&usq=AOvVaw1CLLY6ZI4DQFMOaPc-2jn0), 2013
- <sup>312</sup> HALLBECK L. and PEDERSEN K., “Autotrophic and mixotrophic growth of *Gallionella ferruginea*”, *Journal of General Microbiology*, 137, 2657-2661, 1991
- <sup>313</sup> ANDERSON C.R. and PEDERSEN K., “*In situ* growth of *Gallionella* biofilms and partitioning of lanthanides and actinides between biological material and ferric oxyhydroxides”, *Geobiology.* Volume1, Issue2October 2003Pages 169-178
- <sup>314</sup> HALBACH M., KOSCHINKY A. et HABACH P., « Rapport sur la découverte de *Gallionella ferruginea* à partir d’un champ hydrothermal actif en haute-mer », *InterrIDGE News*, vol.10, n°1, 2001
- <sup>315</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>316</sup> HALLBECK L., *op. cit.* (312)
- <sup>317</sup> SUBHRAVETI Pallavi, ONG Quang, KESELER Ingrid, KOTHARI Anamika, CASPI Ron, and KARP Peter D., *SRI international*

- 
- <sup>318</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>319</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>320</sup> LIU Y., WANG Z., and al, “A trans-outer membrane porin-cytochrome protein complex for extracellular electron transfer by *Geobacter sulfurreducens* PCA” ; *Environmental Microbiology Reports*, 6(6): 776-785, Dec 2014
- <sup>321</sup> KOJIMA Hisaya, *op. cit.* (300)
- <sup>322</sup> BAYTSHTOK V., LU H., PARK H., KIM S.Y.R., and CHANDRAN K.I., “Impact of varying electron donors on the molecular microbial ecology and biokinetics of methylotrophic denitrifying bacteria”, *Biotechnol. Bioeng.*, 102:1527–1536, 2009
- <sup>323</sup> MUSTAKHIMOV I., *op. cit.* (237)
- <sup>324</sup> Extrait de la publication web de : KALVUZHNAVA MG ; BOWERMAN S, LARA JC ; LISDSTROM ME ; CHISTOSERDOVAL L. Source : Full Text Sources ingenta pic : Other Literature Sources : COS Schelar Universe Molecular Biology Database SILVA
- <sup>325</sup> MUSTAKHIMOV I., *op. cit.* (237)
- <sup>326</sup> PARK J.Y., *op. cit.* (253)
- <sup>327</sup> NEEF A., ZAGLAUER A., MEIER H., AMANN R., LEMMER H., and SCHEIFER K.H., “Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and *in situ* identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:4329–4339, 1996
- <sup>328</sup> BAYTSHTOK V., *op. cit.* (322)
- <sup>329</sup> BAKER S.C., *op. cit.* (310)
- <sup>330</sup> BAMFORTH C.W., *op. cit.* (254)
- <sup>331</sup> BARYSHNIKOVA M., GRISHCHENKOV V.G., ARINBASAROV M.U., SHKIDCHENKO A.N. and BORONIN L.M., “Biodegradation of Oil Products by Individual Degrading Strains and Their Associations in Liquid Media”, *Applied Biochemistry and Microbiology*, Volume 37, Number 5, 463-468
- <sup>332</sup> CORNELIS P (éditeur), 1<sup>re</sup> éd. Caister Academic Press, 2008
- <sup>333</sup> LARPENT J.-P. et LARPENT-GOURGAUD M., « Changement dans l’azote non protéique pendant la croissance », *Mémento technique de microbiologie*, éd. Lavoisier Tec. Doc., 3<sup>e</sup> édition, p. 664, 1990
- <sup>334</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>335</sup> DELORT Anne-Marie, « Des nuages pleins de vie », *La Recherche*, N°476, p. 66, juin 2013
- <sup>336</sup> EUZÉBY J.P., *op. cit.* (97)
- <sup>337</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (207)
- <sup>338</sup> GREEN David H., BOWMAN John P., SMILTH Elizabeth A., GUTIERREZ Tony and BOLCH Christopher J. S., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 523-527, 2006  
Participation :
- Scottish Association for Marine science, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban
  - Australian Food Safety Centre, University of Tasmania, Hobart, Australia.
  - Fisheries Research Services Marine Laboratory, Aberdeen AB11 9DB, UK.
  - Shool of Aquaculture, University of Tasmania, Launceston, Australia.
- <sup>339</sup> KOLB, S., C. KNIEF, S. STUBNER, and CONRAD R., “Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays”; *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:2423-2429, 2003
- <sup>340</sup> BOWMAN J.P., SLY L.I. and coll., “Revised taxonomy of the *methanotrophs* description of *Methylobacter* gen. nov. Emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I méthylotrophs”, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43; 735-753, 1993
- <sup>341</sup> HANSON R.S. and HANSON T.E., “Methanotrophic bacteria”, *Microbiol Rev.*, 60(2):439-71, Jun 1996
- <sup>342</sup> KALYUZHNAVA M.G., KHEMELENINA V.N., and al., “A new moderately halophilic methanotrophe of the genus *Methylobacter*”, *Microbiology*, 67, 438-444, 1996
- <sup>343</sup> KALYUZHNAVA M.G., and al., “Classification of halo(alkali)philic and halo(alkali)tolerant metanotrophs provisionally assigned to the genera *Methylomicrobium* and *Methylobacter* and emended description of the genus *Methylomicrobium*”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 591–596, 2008
- <sup>344</sup> DUNFIELD P.F., *op. cit.* (27)
- <sup>345</sup> FUSE H., *op. cit.* (38)
- <sup>346</sup> KALYUZHNAVA M.G., *op. cit.* (343)

- <sup>347</sup> KHMELNINA V.N., KALYUZHNAVAYA M.G., STAROSTINA N.G., SUZINA N.E., and TROTSSENKO Y.A., “Isolation and characterization of halotolerant alkaliphilic methanotrophic bacteria from Tuva soda lakes”, *Curr. Microbiol.*, 35: 257–261, 1997
- <sup>348</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>349</sup> KHADEM A.F. and al., “Autotrophic methanotrophy in *Verrucomicrobia: Methylococcus* SolV uses the Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation”, *J. Bacteriol.*, 193: 4438–4446, 2011
- <sup>350</sup> CAMPBELL M.A. and al., “Model of the molecular basis for hydroxylamine oxidation and nitrous oxide production in methanotrophic bacteria”, *FEMS Microbiol. Lett.* 322: 82–89, 2011
- <sup>351</sup> KALYUZHNAVAYA M.G., *op. cit.* (346)
- <sup>352</sup> RESHETNIKOV A.S., KHMELNINA V.N., and TROSENKO Y.A., “Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotrophs, *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z”, *Achiv. Microbiol.*, 184 (5):286-97, Jan. 2006
- <sup>353</sup> FUSE H., *op. cit.* (345)
- <sup>354</sup> RESHETNIKOV A.S., *op. cit.* (352)
- <sup>355</sup> KALYUZHNAVAYA M.G., *op. cit.* (342)
- <sup>356</sup> DEDYSH S.N., *op. cit.* (206)
- <sup>357</sup> BOWMAN J.P., *op. cit.* (340)
- <sup>358</sup> SIEBURTH J., JOHNSON P. and al., “The first methane-oxidizing bacterium from the upper mixed layer of the deep ocean *Methylomonas pelagica* sp.”; *Curr. Microbiol.*, 14, 285-293, 1987
- <sup>359</sup> BOWMAN J.P., SLY L.I., COX J.M., and HAYWARD A.C., “*Methylomonas fodinarum* sp. nov. and *Methylomonas aurantiaca* sp. nov.: two closely related type I obligate methanotrophs”, *Syst. Appl. Microbiol.*, 13: 278–286, 1990
- <sup>360</sup> SIEBURTH J., *op. cit.* (358)
- <sup>361</sup> KLOTZ M.G. and al., “Evolution of an octaheme cytochrome c protein family that is key to aerobic and anaerobic ammonia oxidation by bacteria”, *Environ. Microbiol.*, 10 : 3150–3163, 2008
- <sup>362</sup> HOHENLOSER W., LINGENS F., and PRÄVE P., “Characterization of a new methylotrophic strain, *Methylomonas clara*” *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6: 167–179, 1978
- <sup>363</sup> IVANOVA Elena P., FLAVIER Sébastien and CHRISTEN Richard, “Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov.”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54, Issue 5, 2004
- <sup>364</sup> YOON Jung-Hoon, *op. cit.* (291)
- <sup>365</sup> YOON Jung-Hoon, *op. cit.* (291)
- <sup>366</sup> P.H. GILLIGAN, LUM G, VANDAMME, and al, “*Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, *Pandoraea* and *Acidovorax*” in : MURRAY, BARON, JORGENSEN, et al., dir. *Manual of Clinical Microbiology.*, 8th éd. Washington, DC: pp. 729-744, 2003
- <sup>367</sup> MARKELOVA N.Y., “Predacious bacteria, *Bdellovibrio* with potential for biocontrol”, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(6):428-31, Nov 2010
- <sup>368</sup> SAIMAN L., CHEN Y., TABIBI S., SAN GABRIEL P., ZHOU J., LIU Z., LAI L., and WHITTER S., “Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis”, *J. Clin. Microbiol.*, 39(11): pp.3942-45, Nov. 2001
- <sup>369</sup> LAMBERT C, HOBLEY L., CHANG C., FENTON A., CAPENESS M., and SOCKETT L., “A predatory patchwork: Membrane and surface structures of *Bdellovibrio bacteriovorus*”, *Advances in Microbial Physiology*, 54:313-61, 2009
- <sup>370</sup> LAMBERT C., CHANG C., CAPENESS M., and SOCKETT E., “The first Bite — Profiling the predatosome in the bacterial pathogen *Bdellovibrio*,” *PLoS One*, Jan. 2010
- <sup>371</sup> SOCKETT E. and LAMBERT C., “*Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance?”, *Nature Reviews Microbiology*, 2, pp. 669-675, 2004
- <sup>372</sup> RENDULIC S., GOESMANN A., MEYER F., SOCKETT E., SCHUSTER S., JAGTAP P., ROSINUS A., EPPINGER M., BAAR C., LANZ C., KELLER H., LAMBERT C., and EVANS K., “A predator unmasked: Life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective”, *Science*, 303(5658), 689-92, 2004
- <sup>373</sup> ANDERSON B.E., *op. cit.* (265)

- 
- <sup>374</sup> LIU Y., *op. cit.* (320)
- <sup>375</sup> LARPENT J.-P., *op. cit.* (260)
- <sup>376</sup> RUTTERS H., SASS H., CYPIONKA H., and RULLKOTTER J., “Monoalkylether phospholipids in the sulfate-reducing bacteria *Desulfosarcina variabilis* and *Desulforhabdus amnigenus*”, *Arch Microbiol.*, 176(6) : 435-42 Dec. 2001
- <sup>377</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>378</sup> SANTEGOEDS, CECILIA M ; TIMOTHY G. FERDELMAN, GERARD MUYZER, DIRK DE BEER « Dynamique structurelle et fonctionnelle des populations de sulfate-réduction dans les biofilms bactériens », *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, octobre 1998
- <sup>379</sup> BARYSHNIKOVA M., *op. cit.* (331)
- <sup>380</sup> SUZUKI Yohey, SASAKI Takenori, SUZUKI Masae, NOGI Yuichi, MIWA Tetsuya, TAKAI Ken, NEALSON Kenneth H., and HORIKOSHI Koki, “Novel Chemoautotrophic Endosymbiosis between a Member of the *Epsilonproteobacteria* and the Hydrothermal-Vent Gastropod *Alviniconcha* aff. *hessleri* (*Gastropoda: Provannidae*) from the Indian Ocean”, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9): 5440–5450 2005
- <sup>381</sup> SMITH Julie L., CAMPBELL Barbara J., HANSON Thomas E., ZHANG Chuanlun L., and CARY S. Craig “*Nautilia profundicola* sp. nov., a thermophilic, sulfur-reducing epsilonproteobacterium from deep-sea hydrothermal vents”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (7): 1598–1602 2008
- <sup>382</sup> TAKAI K., “*Sulfurimonas paralvinella* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen-and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the *Epsilonproteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56 (8): 1725–1733, Jan. 2006
- <sup>383</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>384</sup> *Ibid*<sup>o</sup>
- <sup>385</sup> HAN Yuchen and PERNER Mirjam, “The globally widespread genus *Sulfurimonas*: versatile energy metabolisms and adaptations to redox clines”, *Front Microbiol.*, 6: 989, Sept. 2015
- <sup>386</sup> HAN Yuchen and PERNER Mirjam, “The Role of hydrogen for *Sulfurimonas denitrificans* Metabolism”, *PLoS ONE*, Aug. 2014
- <sup>387</sup> SIKORSKI Johannes, MUNK Christine, [...], and KLENK Hans-Peter, “Complete genome sequence of *Sulfurimonas autotrophica* type strain (OK10<sup>T</sup>)”, *Standards in Genomic Sciences*, 3(2): pp. 194–202, Oct 2010
- <sup>388</sup> [https://en.wikipedia.org/wiki/Sulfurimonas#cite\\_note-4-13](https://en.wikipedia.org/wiki/Sulfurimonas#cite_note-4-13)
- <sup>389</sup> CONRAD R., “Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO)”, *Microbiol. Rev.*, 60 : 609-640, 1996
- <sup>390</sup> CARDMAN Zena, “Active prokaryotic communities along a thermally and geochemically variable transect in Guaymas Basin hydrothermal sediment”, Chapel Hill, NC: University of North Carolina at Chapel Hill Graduate School, 2014. <https://doi.org/10.17615/vc6m-2v56>
- <sup>391</sup> LABRENZ Matthias, GROTE Jana, [...], and JÜRGENS Klaus, “*Sulfurimonas gotlandica* sp nov., a chemoautotrophic and psychrotolerant epsilonbacterium isolated from a pelagic redoxcline, end an emended description of the genus *Sulfurimonas*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63 (11): 4141–4148, Jan. 2013
- <sup>392</sup> MINO S., NAKAGAWA S., MAKITA H., TOKI T., MIYAZAKI J., SIEVERT S. M, POLZ M. F, INAGAKI F., and GODFROY A., “Endemicity of the cosmopolitan mesophilic chemolithotroph *Sulfurimonas* at deep-sea hydrothermal vents”, *The ISME Journal*, 11: 909–919, April 2017
- <sup>393</sup> MADIGAN M.T. et MARTINO J., *Biologie des micro-organismes*, ed. Person, p. 136, 2000
- <sup>394</sup> JONSSON M.E., CHRIÉL M., NORSTRÖM M., and HOFSHAGEN M., “Effect of climate and farm environment on *Campylobacter* spp. colonization in Norwegian broiler flocks”, *Preventive Veterinary Medicine*, 1;107(1-2):95-104, Nov. 2012
- <sup>395</sup> ZHANG Chuan, YANADA Nobutaka, WU Yun-Lin, WEN Min, MATSUHISA Takeshi, and MATSUKURA Norio, “*Helicobacter pylori* infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer”, *World journal of gastroenterology*, vol. 11, n° 6, pp. 791-796, 2005

---

<sup>396</sup> CHANG Shih-Bin Robin and KIRSCHVINK Joseph Lynn, “Magnetofossils, the magnetization of sediments, and the evolution of magnetite biomineralization”, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 17: pp. 169-195, 1989

<sup>397</sup> *Ibid*°

<sup>398</sup> SAIYED Z.M., *op. cit.* (10)

<sup>399</sup> IGUCHI Hiroyuki, YURIMOTO Hiroyua, and SAKAI Yasuyoshi, *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, June 2016

<sup>400</sup> [https://fr.wikipedia.org/wiki/Modification\\_post-transcriptionnelle#cite\\_note-1](https://fr.wikipedia.org/wiki/Modification_post-transcriptionnelle#cite_note-1)

<sup>401</sup> WOESE Carl R. and FOX George E., “Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (11) 5088-5090, Nov. 1977

<sup>402</sup> ETTO Rafael, *Comunidades Procarioticas turfeiras Dos Campos de Altitude Paranaenses*, Thesis for PhD, Sept. 2011

<sup>403</sup> SIEGENTHALER Andy, ARTZ A., FRANCEZ André-Jean, BUTTLER Alexandre, SAMARITANI Emanuela, GILBERT Daniel, YLI-PETAYS Mika, BORTOLUZZI Estelle, TONOLLA Mauro, MITCHELL Edward A.D., “Contrasted Relationships Between Type I and Type II methanotrophs, the condition found in typical regeneration stages across European peatlands and the elapsed time since adandonment of the peat cutting”, *Peatnet International Congress 'Carbon in Peatlands'*, Praha, Czech Republic, Sep 2009