

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MICROORGANISMES MARINS ANAÉROBIES STRICTS

IV. — Les bactéries sulfato-réductrices du fond de la Mer noire au niveau de la côte dobrogéenne

par Mircea ZARMA

La principale caractéristique de la Mer noire est constituée par l'existence de deux zones : la première oxygénée, allant jusqu'à la profondeur approximative de 200 m et l'autre avec de l'hydrogène sulfuré, située au-dessous de 200 m.

Nous sommes, aujourd'hui, en mesure d'affirmer avec certitude que l'hydrogène sulfuré est engendré dans les mers par des microorganismes. Malgré l'importance présentée par ceux-ci, les données sur la morpho-physiologie et la taxonomie des microorganismes de la Mer noire qui produisent l'hydrogène sulfuré par réduction des sulfates en anaérobiose sont presque inexistantes.

Par conséquent, nous nous sommes proposé d'effectuer des recherches concernant ce problème, dont les résultats font l'objet de la présente communication.

Historique.

BEIJERINCK (1895) décrivait le *Spirillum desulfuricans* (3), isolé de l'eau douce et émettait l'hypothèse que l'hydrogène sulfuré de la Mer noire est probablement produit par une bactérie ressemblante. MIGULA (cité par SÉNEZ [31]) lui donne le nom de *Microspira desulfuricans*. VAN DELDEN (1904) (11), décrivait la *Microspira aestuari* isolée de la mer. Dans une communication (20) de 1924 et dans une autre suivante (18) ISSATCHENKO a identifié les bactéries sulfato-réductrices de la Mer noire, qu'il attribuait, avec réserve, à l'espèce *Microspira aestuari*, sans les étudier en détail dans des cultures pures. BERTEL (1935) (4) a signalé dans la Méditerranée des bactéries sulfato-réductrices. BOUTKEVITCH (1938) (7) dans la Mer d'Azov et KOPP (1948) (21) dans la Mer noire ont mis en évidence des sulfato-réducteurs sans en mentionner toutefois les espèces. Quelques travaux soviétiques plus récents (24-28) se sont occupés seulement du processus de la réduction des sulfates dans la Mer noire, sans étudier la morpho-physiologie et la taxonomie des bactéries respectives, à l'exception des travaux de STOURM (36-37) qui décrit une nouvelle bactérie sulfato-réductrice, facultative anaérobie.

Nous citons encore quelques données sur la taxonomie générale des réducteurs de sulfates intéressant nos recherches.

ELION (1924) (13) décrivait le *Vibrio thermodesulfuricans*. Suivant l'opinion de GAHL et ANDERSON (1928) (14), les trois sulfato-réducteurs représentent des variétés de la même espèce, ce que démontrera expérimentalement BAARS (1931) (cité par SÉNEZ [32]). BAARS avait considéré comme étant d'importance taxonomique les donneurs d'hydrogène et avait décrit le *Vibrio rubentschiki*, qui utilise les acides butyriques, propioniques et acétiques et sa variété *anomalus*, n'utilisant pas l'acide acétique. KLUYVER et VAN NIEL (1936) (cités par SÉNEZ [32]) ont donné aux sulfato-réducteurs le nom générique de *Desulfovibrio*. ZOBELL (1943) (cité par SÉNEZ [32]) décrivait la forme dulcicole *Sporovibrio hydrocarbonoclasticus* et la forme marine

Sporovibrio halohydrocarbonoclasticus ayant la capacité de scinder les hydrocarbures à longues chaînes; CAMPBELL et FRANCK (1957) (9) ont démontré que la dénomination générique de *Sporovibrio* des sulfato-réducteurs, proposée par STARKEY (1938) (35) doit être abandonnée, et contrairement aux données de GAHL et ANDERSON (14), de BAARS (cité par SÉNEZ [32] et de STARKEY (35), *Sporovibrio thermodesulfuricans* n'est pas une variété thermophile de l'espèce *Desulfovibrio desulfuricans*, mais identique à *Clostridium nigrificans* WERKMAN et WEAVER (1927). Il est le seul sulfato-réducteur sporulé. ADAMS et POSTGATE (1959 [1]) décrivent le *Desulfovibrio orientis*. D'autres sulfato-réducteurs dont les caractères diffèrent de la forme commune ont été isolés, sans recevoir de noms, par STEPHENSON et STICKLAND (cités par STARKEY [35]), par BUNKER (cité par BUTLIN [8]) et par HAMADA MINORU (cité par PRÉVOT [29]).

La taxonomie du genre *Desulfovibrio* est riche en confusions et en contradictions, comme le remarque BUTLIN (8). Nous constatons, avec PRÉVOT (29), que le vibron isolé en 1924 par ISSATCHENKO de la Mer noire est insuffisamment décrit pour pouvoir être comparé et identifié à l'une des espèces connues actuellement.

Méthode.

Afin d'obtenir des cultures d'enrichissement, on a employé le milieu de Taouson (cité par KRISS et ROUKINA [23]), qui s'est montré supérieur au milieu de Van Delden et de Starkey. Ce milieu possède la composition suivante, modifiée par nous :

Eau des conduites	1000 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g
MgSO ₄	1 g
NaCl	10 g
Lactate de calcium	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Sel de Mohr	quelques cristaux
pH = 7,8.	

Le milieu présente un précipité qui ne suscite pas de grandes difficultés à l'observation et aux repiquages des colonies isolées. La stérilisation préalable des sels de fer, selon BUTLIN (8), ainsi que les autres méthodes mentionnées dans la littérature pour obtenir des milieux clairs, se sont avérées sans valeur.

Le noircissement des sédiments et l'odeur d'hydrogène sulfuré nous ont indiqué le développement des réducteurs des sulfates dans le milieu liquide, cependant que l'apparition des colonies en forme de petits points noirs les indiquaient dans le milieu gélosé 5 %₀ réparti dans les tubes de Weinberg.

Nous n'avons pas obtenu, jusqu'à présent, par le procédé des tubes de Weinberg, les sulfato-réducteurs thermophiles en cultures pures.

Ce milieu liquide a été employé dans nos expériences préliminaires en variant les différents ingrédients, dans le but d'établir les premiers échelons des recherches que nous effectuerons ultérieurement sur les sulfato-réducteurs de la Mer noire.

Pour l'identification des sulfato-réducteurs, nous avons eu recours aux données bibliographiques citées dans notre historique et aux déterminateurs existants (5, 22, 30).

Expériences et résultats.

Les expériences que nous avons effectuées et le résultat sont représentés par les tableaux 1 et 2.

Conclusions.

1^o) Quelle que soit la provenance des échantillons, les bactéries du genre *Desulfovibrio* sont présentes sur le fond de la plateforme continentale de la Mer noire.

2^o) Grâce à leur développement dans des conditions optimum, à la concentration de NaCl de 0 - 10 ‰⁽¹⁾, nous considérons que les sulfato-réducteurs de la Mer noire sont représentés par *Desulfovibrio desulfuricans* (BEIJERINCK, 1895), (KLUYVER et VAN NIEL, 1936), contrairement à ISSATCHENKO (20) qui pensait les identifier à *Desulfovibrio aestuari* (VAN DELDEN, 1904; ZOBELL, 1948). Mais il ne s'agit pas d'un *Desulfovibrio desulfuricans* typique, parce que nos bactéries ont engendré des cultures dépassant la concentration de NaCl 25 ‰, considérée comme maximale pour *Desulfovibrio desulfuricans* (14), et la même concentration de 60 ‰, considérée maximale pour *Desulfovibrio aestuari* (19). Il y a peu de probabilité pour que les deux bactéries, ayant des exigences différentes pour la salinité, puissent cohabiter dans les conditions habituelles de la salinité de la Mer noire. L'absence des cultures lorsque le chlorure de sodium manque dans quelques cas (tabl. 1, échantillon n^o 4) ne s'est plus produite à des répétitions (tabl. 2). Il reste à démontrer, par une série de souches isolées en cultures pures, si le *Desulfovibrio aestuari* est réellement absent dans la Mer noire.

3^o) La possibilité d'utiliser l'acétate, le butyrate et le propionate comme donateurs d'hydrogène dans la plupart des tubes, indique la présence du *Desulfovibrio rubentschiki* (BAARS, 1938; ZOBELL, 1948) dans la Mer noire. Nous signalons donc pour la première fois la présence de cette espèce dans les mers, respectivement dans la Mer noire, en confirmant les suppositions de SÉNEZ (31). Nos résultats ont été confirmés par des expériences effectuées sur les trois donateurs d'hydrogène mentionnés avec une souche pure, isolée à partir de l'échantillon n^o 9.

La réduction du sulfate par un des échantillons seulement aux dépens du lactate, prouve que *Desulfovibrio rubentschiki* n'est pas le seul sulfato-réducteur dans la Mer noire, confirmant nos conclusions mentionnées ci-dessus au 2^o).

4^o) La réduction des sulfates obtenue à 56°C, nous a permis de conclure que le *Clostridium nigrificans* WERKMAN et WEAVER est présent sur le fond de la Mer noire. Nous signalons donc, aussi pour la première fois, la présence de cette bactérie dans les mers, respectivement dans la Mer noire. En même temps, elle représente la première bactérie thermophile mise en évidence dans la Mer noire. C'est pour la quatrième fois que des thermophiles sont signalées dans les mers [EGOROVA, 1938 (12), BARTHOLOMEW et RITTENBERG, 1949 (2), MC. BEE et coll., 1956 (25-26)].

5^o) Les bactéries sulfato-réductrices manifestent une longévité qui dépasse 2 ans 1/2 dans des échantillons de vase marine, desséchés. PRÉVOT (29) et STARKEY (35) se sont aussi prononcés en faveur de la longévité des sulfato-réducteurs.

Importance. Nous constatons que les études des bactéries qui réduisent les sulfates dans la Mer noire, doivent être continuées, vu l'importance des problèmes qu'elles soulèvent. Elles sont responsables, dans une grande mesure, de la production de l'hydrogène sulfuré dans cette mer. Les données de la littérature attribuent aux sulfato-réducteurs des propriétés physiologiques polyvalentes, ayant une grande importance pratique : la possibilité d'engendrer les dépôts de sulfure de fer (17) et de pétrole (16, 29), au cours des périodes géologiques de la terre, la propriété de produire la corrosion du fer immergé dans l'eau (6, 27), de solubiliser les combinaisons du fer et du manganèse en abaissant le pH (39) (p. 59) et de rendre possible, de cette manière, le développement des ferobactéries, la possibilité de se nourrir aussi autotrophiquement⁽²⁾ récemment démontrée (8, 10, 33, 34) et la capacité de fixer l'azote moléculaire (15), que nous avons déjà mentionnée (38).

(1) Selon GAHL et ANDERSON (14), *Desulfovibrio desulfuricans* nécessite NaCl 0-15 ‰ et tolère des concentrations de 0-25 ‰, tandis que la concentration de NaCl de 5 ‰ représente la limite inférieure nécessaire à *Desulfovibrio aestuari* (VAN DELDEN (1904), ZOBELL (1948)). L'optimum pour cette bactérie est la concentration de 10-30 ‰ NaCl. Selon ISSATCHENKO (19), la première bactérie donne cultures à une concentration de NaCl de 0-20 ‰, la seconde à 15-60 ‰.

(2) BUTLIN (K.R.), ADAMS (M.F.). — Autotrophic growth of sulfatereducing bacteria. — Nature, 160, 154, London, 194.

SISLER (F.D.), ZOBELL (C.E.), 1951. — Hydrogen utilisation by some marine sulfatereducing bacteria. — J. Bact., 62, 117, Baltimore.

N° de l'échantillon					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Station d'origine					Sulina		Agigea		Est de Mangalia					Est de Constantza		
					Latitude : 43° 49'		Longitude					44°30'				
					Baie nord	Baie sud	100 m de la côte	près de la côte	30°28'	30°18'5"	29°51'	29°24'	29°11'	30°46'		
Profondeur d'eau (en m)					1	0,2	15	0,5	220	110	74	64	55	90		
Nature de l'échantillon					sable vaseux	vase sablo-neuse	vase	sable	vase					concr. fero - mangan.		
Date de récolte					6.VI.1959		13.VIII.1958		30.IX.1956					29.IX 1958		
Date de l'ensemencement					11.VI.1959											
Température d'incubation (en degrés Celsius)	30°	Donateur d'hydrogène	Lactate de calcium	La concentration de NaCl par mille	0	Nombre des jours jusqu'à l'apparition du H ₂ S	3	2	5		9	4	3	4	7	4
							3	2	7	3	2	9		5	3	
							3	2	7	4				11	4	
							3	2	11	4					4	
							3	3	7	7					4	
	56°	Donateur d'hydrogène	Acétate de sodium	La concentration de NaCl par mille	0	Nombre des jours jusqu'à l'apparition du H ₂ S	4	3	7	11	7	11			7	7
							4	3	9	11	11	11			12	12
							7		7	11	7	7			11	11
							2	2	7						9	
56°	Donateur d'hydrogène	Lactate de calcium	La concentration de NaCl par mille	0	Nombre des jours jusqu'à l'apparition du H ₂ S											

TABLEAU I. — Comportement des bactéries sulfato-réductrices selon la température, la concentration en chlorure de sodium dans le milieu de culture et selon la période de la récolte des échantillons du fond de la Mer noire. (Les échantillons proviennent de différents lieux; nous avonsensemencé 1 cc d'une dilution 1/10 dans le milieu de culture réparti dans des tubes à hémolyse, remplis aux 3/4).

N° de l'échantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11					
Station d'origine	Sulina		Agigea		Est de Mangalia					Est de Constantza						
	Baie nord	Baie sud	à 100 m de la côte	près de la côte	Latitude : 43°49'					44°30'	44°10'					
					Longitude											
					30°28'	30°18'5"	29°51'	29°24'	29°11'	30°46'	28°47'					
Profondeur d'eau (en m)	1	0,2	15	0,5	220	110	74	64	55	90	28					
Nature de l'échantillon	sable vaseux	vase sablonneuse	vase	sable	vase					concr. fero-mang.	vase					
Date de récolte	6.VI.1959		13.VIII.1959		30.IX.1956					29.IX.1958	VI.1959					
Date de l'ensemencement	30.VI.1959															
Température d'incubation (en degrés C)	30°	Donateur d'hydrogène : lactate de calcium	La concentration de NaCl par mille	Nombre des jours jusqu'à l'apparition du H ₂ S	4	3	4	3	3	7	7	7	3	4		
					4	2	4	4	4	5	7	7	5		3	
56°					4	2	10	3	5	7		7	9	5	3	
					5	3	10	3	5						3	
						3	7	10	5	10						3
						4	7	11	5							4
					10	9	4	4	7							5
						12	4	10	7							5
					2	2	2		2		5					2
					3	2	2		2							2
3	3			3							2					
3											2					

TABLEAU 2. — Comportement des bactéries sulfato-réductrices selon la température, la concentration en chlorure de sodium dans le milieu de culture et selon la période de la récolte des échantillons du fond de la Mer noire. (Les échantillons proviennent de différents lieux, nous avonsensemencé directement de la vase conservée par dessiccation en quantités approximativement égales.)

BIBLIOGRAPHIE

- 1) ADAMS (M.F.), POSTGATE (J.R.), 1959. — *J. gen. Microb.*, **20**, p. 252.
- 2) BARTHOLOMEW (J.W.) et RITTENBERG (S.C.), 1949. — *J. Bact.*, **57**, p. 658.
- 3) BEIJERINCK (M.W.), 1895. — *Ctbltt.f.Bakt.*, **1** (2), p. 1.
- 4) BERTEL (R.), 1935. — *Bull. Inst. océanogr. Monaco*, n° 672, p. 1.
- 5) BREED (R.S.), MURRAY (E.G.D.) et SMITH (N.R.), 1952. — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7-th. ed., Baltimore, 912 p.
- 6) BRISOU (J.), 1955. — *La Microbiologie du Milieu marin*, Paris, 276 p.
- 7) BOUTKEVITCH (V.S.), 1938. — *Mikrobiologhiia*, **7**, p. 1005.
- 8) BUTLIN (K.R.), ADAMS (M.E.) et THOMAS (M.), 1949. — *J. gen. Microb.* **3**, p. 46.
- 9) CAMPBELL (L.L.) et FRANK (H.A.), 1957. — *J. Bact.*, **73**, p. 516.
- 10) CZURDA (V.), 1940. — *Arch. f. Mikrobiol.*, **11**, p. 187.
- 11) DELDEN (A. van), 1904. — *Ctbltt. f. Bakt.*, **11** (2), p. 94.
- 12) EGOROVA (A.A.), 1938. — *C. R. Acad. Sci. U. R. S. S.*, **19**, p. 649.
- 13) ELION (L.), 1924. — *Ctbltt.f.Bakt.*, **63** (2), p. 58.
- 14) GAHL (R.) et ANDERSON (B.), 1928. — *Ctbltt.f.Bakt.*, **73** (2), p. 331.
- 15) LE GALL (J.), SÉNEZ (J.C.) et PICHINOTY (F.), 1959. — *A. Inst. Past.*, **96**, p. 223.
- 16) GHINSBOURG-KERAGHITCHEVA (T.L.), 1958. — *Priroda*, **3**, p. 26.
- 17) ISSATCHENKO (B.L.), 1950. — *Priroda*, **8**, p. 34.
- 18) — 1951. — *Issatch. Izbr. Trudî*, **1**, p. 306.
- 19) — 1951. — *Issatch. Izbr. Tr.*, **2**, p. 126.
- 20) — 1924. — *C. R. Acad. Sci.*, **178**, p. 2204.
- 21) KOPP (F.I.), 1948. — *Tr. Sevast. Biol. St.*, **6**, p. 298.
- 22) KRASILNIKOV (N.A.), 1949. — *Opredeliteli bakterii i aktinomitzetov*, 830 p. Moskva-Leningrad.
- 23) KRISS (A.E.), ROUKINA (E.A.), 1952. — *Izv. A.N. S. S. S. R.*, Ser. biol., **6**, p. 67.
- 24) — 1949. — *Mikrobiologhiia*, **18**, p. 332.
- 25) MCBEE (R.H.), GAUGLER (L.P.), 1956. — *J. Bact.*, **71**, p. 186.
- 26) MCBEE (R.H.), MCBEE (V.H.), 1956. — *J. Bact.*, **71**, p. 182.
- 27) NIKITINA (N.S.) et OULIANOVSKI (I.B.), 1954. — *D.A.N. S.S.S.R.*, **98**, p. 841.
- 28) OSNITZKAIA (L.K.), 1949. — *Mikrobiologhiia*, **18**, p. 525.
- 29) PRÉVOT (A.R.), 1949. — *A. Inst. Past.*, **77**, p. 400.
- 30) — 1957. — *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*, Paris, p. 362.
- 31) SÉNEZ (J.), 1949. — *A. Inst. Past.*, **77**, p. 512.
- 32) — 1951. — *Vie et Milieu*, **2**, p. 5.
- 33) SOROKIN (I.I.), 1953. — *D.A.N. S.S.S.R.*, **90**, p. 897.
- 34) — 1954. — *Tr.In.ta. Mikrob.*, **3**, p. 21.
- 35) STARKEY (R.L.), 1938. — *Arch.f.Mikrobiol.*, **9**, p. 268.
- 36) STOURM (L.D.), 1948. — *Mikrobiologhiia*, **17**, p. 334.
- 37) — 1948. — *Mikrobiologhiia*, **17**, p. 415.
- 38) ZARMA (M.). — *Contribuții la studiul microorganismelor marine obligator anaerobe. III. Bacterii fixatoare de azot molecular anaerobe, izolate de pe fundul platformei continentale a Marii Negre (sous presse).*
- 39) — 1959. — *Microbiologie marina. Cercetari sovietice în perioada 1946-1957*, București, p. 176.