

Génétique

Réf :
108 031

Français – p 1

Version : 7103

**Kit cyanobactéries pour formation
stromatolites**

TP précipitation biochimique du carbonate de calcium par les cyanobactéries-
Formation des stromatolithes

1. Introduction

1.1 Contexte géologique

La terre s'est formée, il y a 4,6 milliards d'années par agglomération de poussières, blocs et planétésimaux. Cette Terre primitive a, par la suite subit de nombreuses transformations qui ont permis l'émergence de conditions favorables à la vie. Si l'origine de la Terre peut être datée, il est plus difficile de connaître avec certitude la période où la vie est réellement apparue sur Terre. Les plus anciennes traces sédimentaires sont probablement les gneiss d'Isua au Groenland datée à 3,82 milliards d'années (l'origine organique reste cependant contestée). Les témoignages sédimentaires sont plus abondants à partir de 3,5 milliards d'années, de nombreux fossiles présents dans les roches semblent attester de l'apparition de l'activité biologique dans les océans pendant cette période. Ainsi, les plus anciens fossiles découverts sont des microstructures retrouvées dans la formation de Pilbara¹ (ouest de l'Australie), elles seraient la trace d'une activité bactérienne, il y a 3,49 milliards d'années.

On a découvert que cette période a vu le développement d'un écosystème très diversifié de microorganismes. Les stromatolithes sont la conséquence encore visible de leur croissance et de leur agglomération.

Les stromatolithes fossiles sont formés de couches concentriques successives alternant des couches de calcaire et des couches de cyanobactéries fossilisées. En comparant ces fossiles et des processus microbiens actuels de formation de biofilms dans des environnements, l'hypothèse la plus courante pour expliquer la formation des stromatolithes est l'action des cyanobactéries qui permettraient la précipitation du carbonate de calcium pour former ces couches de calcaires.

Les stromatolithes font parties des formations sédimentaires dominantes dans les eaux peu profondes. Elles sont considérées comme l'une des plus anciennes traces de vie. Pourtant l'origine biologique de ces structures a souvent été remise en cause. En effet, aucun microfossile n'a été retrouvé directement dans ces stromatolithes².

1.2 Introduction sur les cyanobactéries

Le groupe des cyanobactéries comptent quelques 2000 espèces réparties en 150 genres, elles appartiennent au règne des bactéries. Les cyanobactéries sont des procaryotes photosynthétiques.

En raison de la présence d'un système photosynthétique et de leur capacité de producteur primaire de biomasse, les cyanobactéries ont été pendant longtemps classées parmi les algues.

Par habitude, on les dénomme encore sous les termes Cyanophyceae ou d'algues bleues d'où de nombreuses confusions sur leur classement.

L'information génétique est portée par un chromosome ADN circulaire et des plasmides, ce sont donc bien des bactéries qui possèdent la particularité de disposer de matériel photosynthétique. Pour capter cette lumière elles utilisent différents pigments : des phycocyanines (de couleur bleu-vert) ou la chlorophylle.

Le groupe c'est fortement diversifié au cours de 2,5 milliards d'années d'évolution. Ainsi, on les retrouve dans tous les milieux aquatiques, sous formes sphériques, bâtonnets, unicellulaires ou filamenteuses, certaines se reproduisent par division binaire ou par germination ou encore par cellules différencierées...

1.3 Cyanobactéries et évolution des conditions de vie terrestre

Photoautotrophe, les cyanobactéries consomment, lors de la photosynthèse, du dioxyde de carbone et produisent un sous-produit : l'oxygène. Présentes dans tous les océans depuis plus de 2 milliards d'années, ce dégagement important d'oxygène a eu un rôle majeur dans l'évolution de la composition atmosphérique de la Terre en dissociant le CO₂ et en créant une atmosphère aérobie.

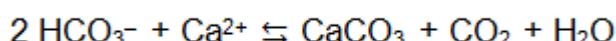
Deux hypothèses pour leur formation :

1. Le piégeage mécanique des minéraux par encroûtage des dépôts successifs dans le biofilm
2. La précipitation biochimique du calcium liée à l'activité photosynthétique.

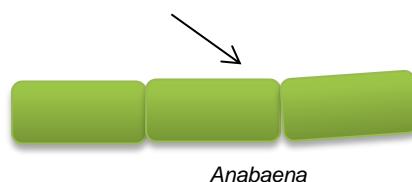
Ici nous allons éprouver expérimentalement la deuxième hypothèse, la précipitation du CaCO₃ par les cyanobactéries. Et ainsi montrer l'importance des microorganismes dans les transformations de la biosphère et leur possible implication dans la formation sédimentaires de type stromatolithes.

- *Relation entre la précipitation de carbonate de calcium et l'activité photosynthétique des cyanobactéries.*

Le CO₂ est naturellement soluble dans l'eau, une partie forme des ions hydrogénocarbonates HCO₃⁻. Les ions Ca²⁺, très abondants dans l'eau de mer, se combinent avec HCO₃⁻ pour former du carbonate de calcium insoluble qui précipite pour former un dépôt solide calcaire (CaCO₃) selon l'équilibre :



Lors de la photosynthèse, la consommation de CO₂ entraîne un déplacement de l'équilibre vers la droite et donc la précipitation de calcaire.



2. Déroulement de l'expérimentation

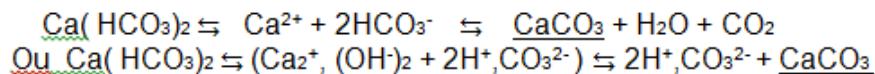
2.1 Objectif

Mise en évidence de la précipitation de carbonate de calcium par Anabaena PCC6309, en présence d'hydrogénocarbonate de calcium [HCO₃⁻, Ca²⁺]

La souche utilisée est Anabaena PCC6309, une cyanobactérie filamentueuse, cultivée dans un milieu BG11 classique. Parmi les cyanobactéries, la vitesse de croissance des souches Anabaena est relativement élevée (nécessite un repiquage toutes les 4 à 6 semaines). Anabaena est, avec Nostoc, l'une des formes les plus fréquentes rencontrée dans les sols humides ou submergés par les eaux. Elle se présente en amas regroupés formant des nuages d'un vert intense. On la rencontre dans les rizières où elle est l'un des acteurs de la fertilité du sol en fixant l'azote.

Principe de l'expérience :

L'hydrogénocarbonate de calcium est très soluble dans l'eau si le CO₂ est consommé par l'activité photosynthétique de la cyanobactérie alors l'équilibre se déplace vers la droite et on précipite le carbonate de calcium.



2.2 Matériel

Composition du kit pour 15 binômes :

- 60 ml Anabaena PCC6309
- 60 ml hydrogénocarbonate de calcium
- 1,2 ml de milieu BG11 50x
- 1 pipette stérile 10 ml
- 30 boîtes de Pétri 55 mm
- 10 pipettes 1 ml stérile

Conservation

Ce kit se conserve à température ambiante +12°C à +25°C.

A réception du flacon de Cyanobactéries *Anabaena* :

- 1- Dévisser légèrement le bouchon pour permettre les échanges gazeux, mais sans enlever le bouchon.
- 2- Stocker à la lumière (éviter la lumière directe du soleil), conservation 3- 5 jours dans ces conditions, en zone calme pour éviter les contaminations.

Pour une conservation plus longue :

- Transvaser dans un flacon stérile d'un volume supérieur à 60 ml, par ex. 125 ml afin d'obtenir une surface d'échange avec l'air suffisante
- Boucher à l'aide de cordon cardé stérile.
- Pour une conservation de 2 à 3 semaines, rajouter dans votre flacon environ 30 ml du milieu BG11 1x. Pour cela prélever 600 µl dans le microtube BG 11 50x+ 30 ml d'eau stérile ou plus simplement de l'eau de source (faiblement minérale) en bouteille non entamée.

Milieux

Préparation du BG 11 1x

Reprendre le contenu du microtube (BG11 50x) dans 60 ml d'eau stérile. (Dans 30ml, si vous avez déjà utilisé du BG11 pour une plus longue conservation)

Préparer 60 ml d'eau stérile à l'aide d'un autoclave (ou d'un autocuiseur), si cela n'est pas possible 2 méthode de substitution :

- Porter à ébullition l'eau pendant 15-20 minutes cela n'élimine pas le risque de contamination par des spores.
- Utiliser de l'eau en bouteille non entamée faiblement minérale (pauvre en Ca²⁺ et Mg²⁺) exemple Volvic.

Solution hydrogénocarbonate de calcium Ca(HCO₃)₂

Un voile blanc peut éventuellement apparaître sur le fond du flacon, il s'agit d'un léger dépôt de carbonate de calcium. L'apparition de ce dépôt est due à une modification de la solubilité de l'hydrogénocarbonate de calcium conséquence probable de variations de température ou à des échanges avec l'air (dissolution de CO₂) si le flacon est entamé.

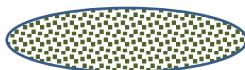
- Mise en présence des cyanobactéries

Conseil : Effectuer ces manipulations de préférence en conditions stériles, si vous souhaitez conserver plusieurs jours (voire semaines) vos cultures.

Cyanobactéries : avant de procéder au prélèvement, agiter le flacon prudemment afin de créer un tourbillon afin de désagréger les amas et remettre en suspension en fines particules.

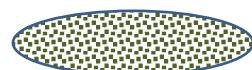
Test de précipitation

3,5 ml hydrogénocarbonate de calcium*
2 ml de cyanobactéries



Témoin

3,5 ml milieu croissance BG11
2 ml de cyanobactéries



*Variante : on peut modifier la quantité d'hydrogénocarbonate de calcium 1, 2 ou 3ml afin de montrer l'influence de la concentration en $[HCO_3]$ et $[Ca^{2+}]$ sur la vitesse d'apparition des cristaux.

Plusieurs témoins possibles :

- Témoin 1 : 2,5ml de BG11 + 1,5 ml de cyanobactéries.
- Témoin 2 : 2,5 ml de solution carbonatée + 1,5 ml de BG11.

b) Mettre à la lumière et à température de la pièce de travail

c) Observation des cristaux

Les résultats sont observables dès le lendemain au microscope, mais on peut également prolonger le temps de culture jusqu'à une semaine d'où l'importance de bien manipuler dans des conditions le plus aseptique possible.

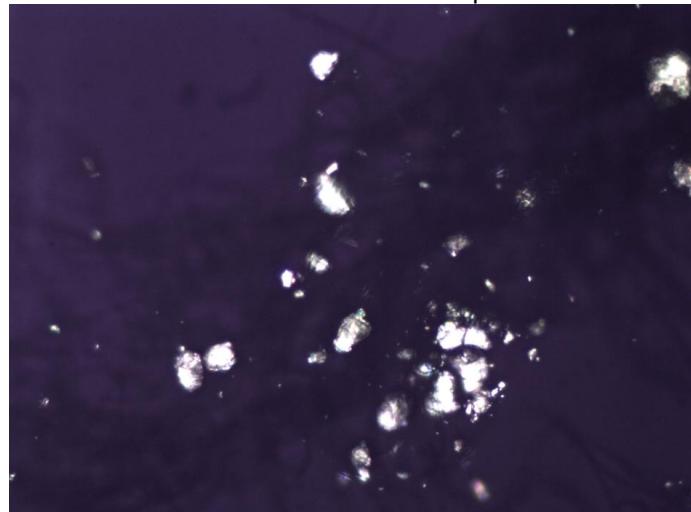
On peut observer les cristaux directement à la loupe binoculaire si l'on dispose d'une bonne optique ou microscope.

Montage par transfert direct entre lame et lamelle, bien homogénéisé (ou sur des lames à concavités).

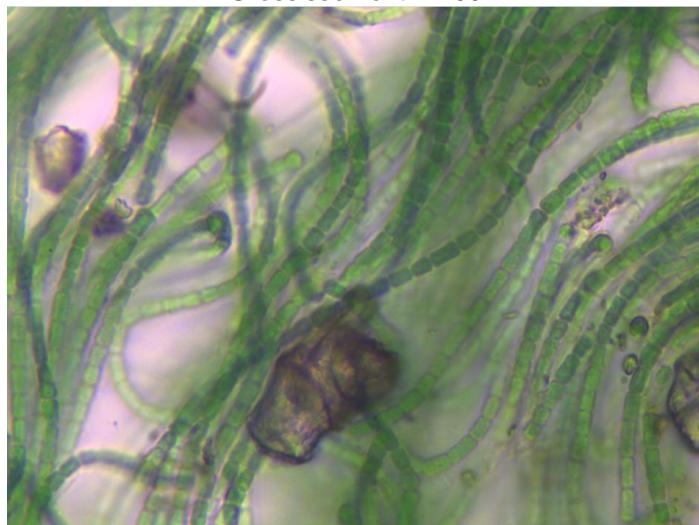
Grossissement X100



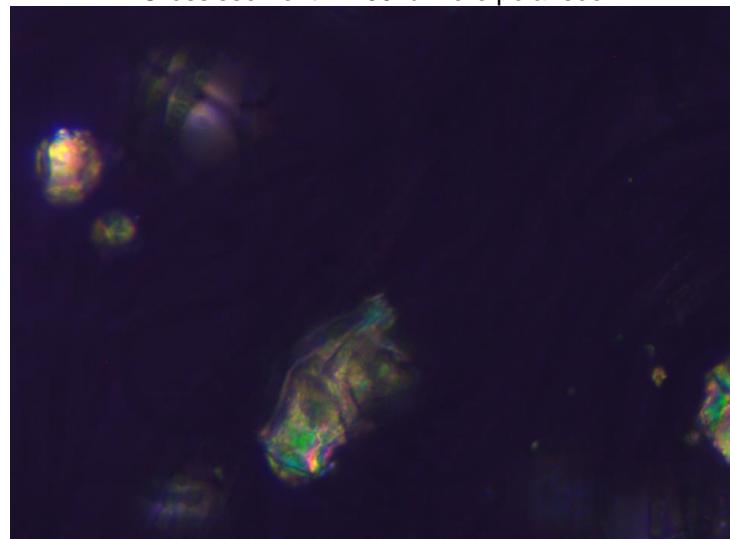
Grossissement X100 lumière polarisée



Grossissement X400



Grossissement X400 lumière polarisée



3. Pour aller plus loin

De nouveaux faits scientifiques sur le mécanisme de biominéralisation en faveur de l'hypothèse de la formation des stromatolithes par précipitation du calcaire.

Problématique : On a retrouvé dans des roches archéennes des microfossiles datés à 3,4 milliards d'années(5), cependant dans les stromatolithes aucun microfossile n'a été retrouvé ou identifié directement.

Par quel processus la formation de ces structures ne provoque pas le piégeage de microorganismes ?

Doc 1- La précipitation de calcite est favorisée par les polymères (protéoglycane) de surface des cyanobactéries, les EPS («extrapolymeric substances») (3).

Si les processus de la photosynthèse entraînent la précipitation du CaCO₃, celle-ci est accélérée par la présence des EPS qui jouent le rôle de noyaux de cristallisation, catalysant la réaction de précipitation. Cette approche valide toujours l'apparition de dioxygène, mais cette hypothèse offre une nouvelle ouverture : les cyanobactéries joueraient alors un rôle majeur dans les processus d'autoépuration des eaux. Ainsi, les cyanobactéries ne joueraient pas uniquement un rôle important dans le cycle du calcium des écosystèmes aquatiques. Leur grande surface de contact augmentée par les cristaux, favorise la précipitation d'autres métaux, notamment les métaux lourds toxiques, à la surface des cristaux de calcite.

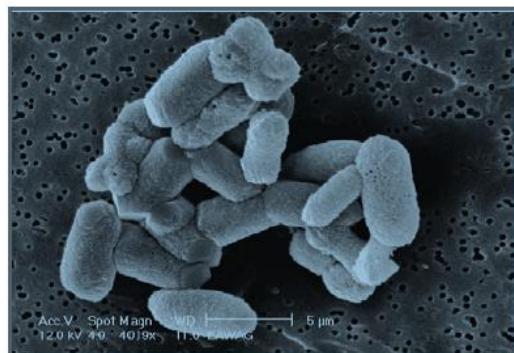


Fig. 1: Particules en forme de bâtonnets entièrement recouvertes de calcite issues du lac des Quatre-Cantons. Il s'agit très probablement de cyanobactéries.

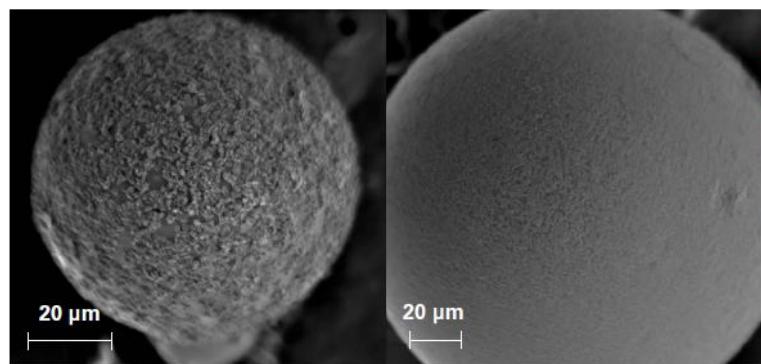


Fig. 2: Des cristaux de calcite se forment à la surface de billes d'agarose recouvertes d'EPS (photo de gauche) mais restent absents des billes d'agarose nues (photo de droite).

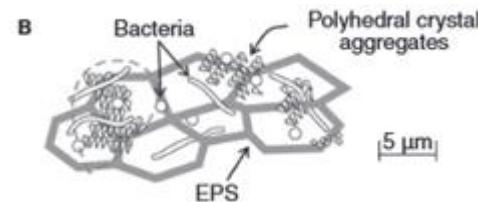
Photo : Maria Ditttrich, Eawag

doc 2- Modèle de formation des Stromatolithes : exemple les étapes de la formation d'une microstructure pelloïdale dans les stromatolithes de Lagoa Vermelha d'après Spadafora et col (4)*

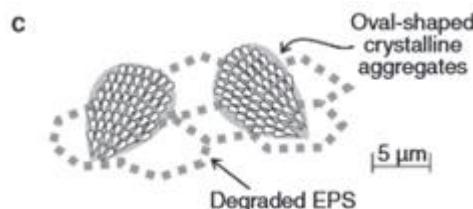
De la calcification du biofilm microbien initial jusqu'à la formation du corps de stromatolite.



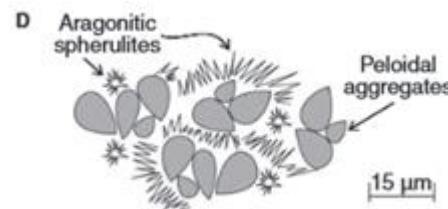
(A) Dans le biofilm microbien, les processus de dégradation des EPS conduisent à la précipitation des carbonate de calcium et carbonate de magnésium formant ainsi une mince couche de carbonate.



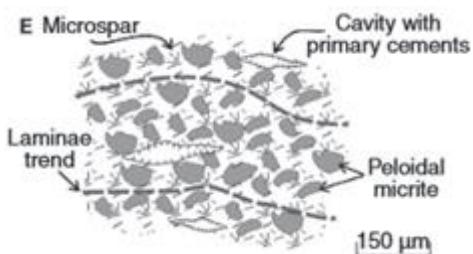
(B) la précipitation du carbonate débute avec la formation de cristaux polyédriques (probablement après coalescence de nanoglobules) cela entraîne la minéralisation de la matière organique (y compris le remplacement des corps bactériens).



(C) Le processus de minéralisation avançant, les cristaux polyédriques forment des agrégats de cristaux ovales.



(D) Le regroupement des structures ovoïdes forment des agrégats microstructure pelloïdes, ensuite la précipitation de l'aragonite entraîne la formation un ciment microcristallin (microsparite) qui s'insère dans les pores entre les agrégats.



(E) La microstructure pelloïdes (micrite et microsparite) constitue la texture principale dans toutes les strates de stromatolites de *Lagoa Vermelha*.



(F) Ultérieurement pour terminer le processus de lithification de la structure de stromatolites, des ciments marins peuvent éventuellement remplir les cavités restantes.

*Pelloïdes : petits grains composés de matière organique d'origine bactérienne cristallisée (micrite), la structure interne bactérienne n'est plus identifiable.

**Micrite : boues carbonatées finement cristallisées

Un mécanisme biochimique qui soulève encore des interrogations

Cette modélisation de biominéralisation, basée sur les propriétés de surface des cyanobactéries permet d'expliquer l'absence de trace du vivant identifiable dans les structures des stromatolithes. Un second modèle stipule que la précipitation du carbonate de calcium serait liée à une modification du pH de l'environnement primitif, provoqué par l'activité photosynthétique des microorganismes.

Bien que les mécanismes de calcification par les cyanobactéries restent mal compris, ce processus, quel que soit le modèle, est invariablement considéré comme extracellulaire.

On considère qu'il est le résultat d'un processus indirect, non contrôlé lié à l'activité photosynthétique comme dans notre expérience. Or en 2014, plusieurs espèces possédant une capacité de biométhanisation intracellulaire ont été étudiées(6). L'équipe de chercheurs a observé l'existence de plusieurs phénotypes de cyanobactéries possédant cette caractéristique. De plus, deux types d'inclusion de carbonate de calcium ont été décrits, ce qui suggère l'existence d'au moins deux mécanismes distincts de biométhanisation : une avec des inclusions CaCO₃ dispersés dans le cytoplasme de la cellule comme dans *Ca. G. lithophora*, et une autre observée dans les souches appartenant à la *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 lignée, dans laquelle les inclusions de carbonate de calcium se situent au niveau des pôles cellulaires, montrant une connexion complexe et originale entre la division cellulaire et la biométhanisation. Ces conclusions ouvrent de nouvelles perspectives sur l'évolution de la calcification des cyanobactéries et par conséquence des champs d'investigation nouveaux sur leur implication dans les modifications des paléo-environnements.

4. Bibliographie

- 1-Noffke N., Christian D., Wacey D., and Hazen R. (2013)
A microbial ecosystem in an ancient sabkha of the 3.49 ga pilbara, western australia, and comparison with mesoarchean, neoproterozoic and phanerozoic examples-
Astrobiology. December 2013, 13(12): 1103-1124. doi:10.1089/ast.2013.1030.
- 2- Grotzinger et Knoll, (1999)
Stromatolithes in precambrian carbonates: Evolutionary Mileposts or Environmental Dipsticks?
Annual Review of Earth and Planetary Sciences
Vol. 27: 313-358 (Volume publication date May 1999)DOI: 10.1146/annurev.earth.27.1.313
- 3- Dittrich M., Sibler S. (2005): Cell surface groups of two picocyanobacteria strains studied by zeta potential investigations, potentiometric titration, and infrared spectoroscopy.
Journal of Colloid and Interface Science 286, 487– 495.
- 4- Spadafora A, Perri E. and al. (2010)
Microbial biomineralization processes forming modern Ca:Mg carbonate stromatolites
Journal compilation© 2009 International Association of Sedimentologists,
Sedimentology, 57 / 27–40
- 5 - David Wacey, Matt R. Kilburn, Martin Saunders, John Cliff & Martin D. Brasier (2011)
Microfossils of sulphur-metabolizing cells in 3.4-billion-year-old rocks of Western Australia
Nature Geoscience 4, 698–702 doi:10.1038/ngeo1238
- 6- Karim Benzerara, Feriel Skouri-Paneta, Jinhua Lia, Céline Férarda, Muriel Guggerb, Thierry Laurent, Estelle Couradeaua, Marie Ragona,c, Julie Cosmidisa, Nicolas Menguya, Isabel Margaret-Olivera, Rosaluz Taverad, Purificación López-Garcíac, and David Moreirac (2014)
Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteriaPNAS | July 29, 2014 | vol. 111 | no. 30 | 10933–10938

5. Service après-vente

Pour toute question, veuillez contacter :

JEULIN - SUPPORT TECHNIQUE
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France
0 825 563 563*
* 0,15 € TTC/min. à partir un téléphone fixe

Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge
immédiatement votre appel
pour vous apporter une réponse
adaptée à votre domaine
d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre,
Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

* Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour la France
métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EEE,
composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne
FAQ.jeulin.fr

Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request
immediately to provide you
with the right answers regarding
your activity field : Biology, Physics,
Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

* Call cost not included.

** Only for call from foreign countries.



468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France

Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr

International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr

SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux