

1.4. DISTRIBUTION DES POPULATIONS BACTÉRIENNES HÉTÉROTROPHES DANS LES SÉDIMENTS ET DANS LES EAUX PROCHES DU FOND EN MER DE NORVÈGE

A. BIANCHI

Station Marine d'Endoume, Marseille.

V. JACQ

Centre ORSTOM, Dakar.

M. BENSOUSSAN

Université de Provence, Marseille.

Au cours de la mission ORGON I du *N/O Jean-Charcot* en mer de Norvège, nous avons étudié la distribution des populations bactériennes hétérotrophes de 88 échantillons répartis sur 11 stations de prélèvement.

Pour caractériser les microflores de ces divers échantillons, nous avons procédé à la numération des divers types physiologiques bactériens, ainsi qu'à l'isolement de plus de 2 000 souches bactériennes, dans le but de décrire ultérieurement la structure des populations microbiennes de ces sédiments.

1.4.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.4.1.1. Le prélèvement des échantillons.

La localisation des stations de prélèvement ainsi que les différentes opérations effectuées à bord ont été décrites dans la partie I.I. « Généralités »⁽¹⁾ (PELET et coll.); nous ne précisons ici que les opérations concernant le traitement des échantillons destinés à l'étude bactériologique.

Les échantillons de sédiment superficiel ont été prélevés par microcarottage secondaire (\varnothing 5 cm) dans les carottes effectuées avec un Reineck court de grande section (40 cm \times 20 cm). Cet engin permet le prélèvement de sédiments superficiels peu perturbés. Nous avons analysé les cinq premiers millimètres, le niveau 3-5 cm et le niveau 8 à 10 cm.

Les échantillons de sédiment profond ont été récoltés dans les carottes prélevées au moyen d'un carottier Reineck long (section 15 cm \times 15 cm). Sur ce matériel nous avons effectué des prélèvements tous les 100 cm.

Tous les prélèvements de bactériologie ont été réalisés en priorité immédiatement après la remontée à bord des engins. Dans tous les cas, la couche de sédiment en contact avec les parois du carot-

⁽¹⁾ Voir *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, 1975, XXX-1, p. 17.



tier était éliminée, sur une épaisseur de 30 mm, de manière à permettre le prélèvement de l'échantillon au centre de la carotte, dans la zone la moins susceptible d'être contaminée.

1.4.1.2. Les cultures.

Les cultures ont été effectuées à bord, immédiatement après le prélèvement. Pour chaque échantillon, nous avons réalisé une suspension au 1/5 en eau de mer stérile et maintenue en agitation pendant 20 mn. A partir de cette suspension, nous avons effectué des dilutions au 1/100, au 1/1 000 et dans certains cas au 1/10 000.

Les cultures ont été effectuées en duplicata, par étalement de 0,2 ml de ces suspensions sur plaque de gélose nutritive.

A. Microflore hétérotrophe aérobie.

Nous avons utilisé deux milieux de culture destinés à dénombrer la microflore hétérotrophe aérobie, souvent appelée, à tort, microflore totale (BIANCHI (A.) et BIANCHI (M.), 1972).

L'un de ces milieux contient une concentration pléthorique de peptone. C'est le milieu 2216 E d'OPPENHEIMER et ZOBELL (1952) qui est un des plus universellement utilisés en microbiologie du milieu marin. La concentration en substrat énergétique est beaucoup moins importante dans le second milieu et la peptone est exclue de sa composition :

Glutamate : 0,05 g ;
 Succinate : 0,05 g ;
 Pyruvate : 0,05 g ;
 Extraits de levures : 0,01 g ;
 FePO₄ : 0,01 g ;
 SO₄(NH₄)₂ : 1 g ;
 Agar : 15 g ;
 Eau de mer vieillie : 750 ml ;
 Eau distillée : 250 ml.

Nous avons recherché les germes mésophiles par incubation à 18-20° C, et les germes psychrophiles par incubation à 4° C pendant trois mois. Certains germes psychrophiles stricts sont extrêmement sensibles aux chocs thermiques (JANNASCH et col., 1971). Pour éviter tout échauffement de l'échantillon, les opérations concernant ces germes étaient effectuées en priorité absolue et terminées en moins de 15 mn après la remontée à bord. Le matériel utilisé, verrerie et milieux de culture, était préalablement réfrigéré, pour éviter tout choc thermique lors des mises en suspension successives et de l'ensemencement.

B. Microflore hétérotrophe anaérobie.

Les germes fermentants sont recherchés sur les milieux de culture suivants :

Extraits de levures : 1 g ;
 Pyruvate de sodium : 5 g ;
 SO₄(NH₄)₂ : 0,5 g ;
 Rouge de phénol : 1 ml d'une solution à 0,1 % ;
 Eau de mer vieillie : 750 ml ;
 Eau distillée : 250 ml.

Le pH est ajusté à la valeur 7,5 et le milieu réparti en tubes de \varnothing 10 mm.

Les cultures ont été effectuées en tubes scellés sous argon. Après une période d'incubation de un mois à 18° C les numérations sont réalisées selon la méthode de MC CRADY (1918).

Les germes sulfatoréducteurs ont été mis en évidence sur le milieu de POSTGATE (1966) modifié par JACQ. Ce milieu a la composition suivante :

K₂HPO₄ : 0,5 g ;
 NH₄Cl : 1,0 g ;
 Na₂SO₄ : 1,0 g ;
 CaCl₂·6H₂O : 1,0 g ;
 MgCl₂·6H₂O : 2,0 g ;
 Lactate de Na : 3,5 g ;
 Extraits de levures : 1,0 g ;
 Gélose : 15,0 g ;
 Eau de mer vieillie : 600 ml ;
 Eau distillée : 400 ml.

Après dissolution, cette fraction est répartie en tubes 300 × 8 mm, à raison de 4 ml/tube, et stérilisée à 115° C pendant 30 mn. Au moment de l'emploi on incorpore à chaque tube 0,5 ml de la solution :

Chlorhydrate de cystéine : 0,400 g ;
 Sel de Mohr : 0,125 g ;
 H₂O : 50 ml.

Le chlorhydrate de cystéine, dissous dans 40 ml d'eau distillée, est neutralisé par NaOH avant adjonction du sel de Mohr dissous dans 10 ml d'eau. Une couleur violette franche doit apparaître à l'agitation. Cette solution est stérilisée par filtration et répartie dans les tubes de milieu gélosé dans les 10 mn suivant sa préparation.

L'ensemencement, par 0,5 ml de suspension, doit être immédiat. Après solidification de la gélose par immersion dans un bain de glace, 1 ml de paraffine liquéfiée est versée dans chaque tube. En quelques secondes il se forme un bouchon imperméable à l'air. Les colonies sulfatoréductrices forment des souches noires dans le milieu de culture.

1.4.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1.4.2.1. Microflore hétérotrophe aérobie.

Comme dans la plupart des échantillons d'eau, prélevés au voisinage du fond (ZOBELL, 1946 ; KRISS, 1963), les populations bactériennes (de 50 à 5 000 germes/ml) sont nettement supérieures à la valeur moyenne des concentrations bactériennes en milieu océanique, qui est de l'ordre de 1 germe/ml.

La distribution de ces populations aux différentes stations n'est pas homogène. L'amplitude des variations est de l'ordre de une puissance de 10. Cette distribution ne paraît en relation ni avec la profondeur, ni avec la température de l'eau; pas plus qu'avec les teneurs en phosphate et ammoniac (DAUMAS et col., 1975).

Dans les niveaux sédimentaires superficiels les concentrations bactériennes sont comprises entre 100 et 950 000 germes par millilitre de sédiment (tabl. I). Des effectifs de l'ordre de 10⁴ à 10⁶ germes par millilitre sont très fréquemment rencontrés dans la pellicule sédimentaire superficielle prélevée à de telles profondeurs (ZOBELL, 1942 ; RITTENBERG, 1940 ; BIANCHI, 1971). Parmi ces valeurs, les plus importantes sont supérieures à celles de certains sédiments littoraux (BIANCHI, 1973).

TABLEAU I.

CONCENTRATIONS EN BACTÉRIES HÉTÉROTROPHES AÉROBIES CULTIVANT
SUR MILIEU PEPTONÉ AUX DIFFÉRENTS NIVEAUX DES STATIONS ÉTUDIÉES.
(Incubation à 20° C, et () incubation à 4° C. Nombre de colonies par millilitre.)

STATION N°	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
EAU	1 750 (750)	2 000	1 200	700 (300)	875 (1 000)	2 850 (1 000)	550 (500)	5 000 (4 000)	1 400 (1 100)	650	650
Sédiment (cm)											
0	17 500 (450 000)	19 000	400 000	65 000 (25 000)		950 000 (500 000)	220 000 (60 000)	6 500 (6 000)	100 (2 000)	300	550
5	17 500	19 000	600 000	8 000		10 000 (1 000)	22 500 (10 000)	5 000 (1 000)	75 (0)		0
10	12 000 (20 000)	9 500	20 000	3 500 (4 000)		17 500	4 500 (1 000)	350 (1 300)	125 (10)	125	0
50			8 000	5 000	1 200 (400)	1 000	400	100	0	0	300
100	750	23 000	5 500	250 (0)	1 500	100	200	0	250	25	150
200	100	5 000	0	1 500 (0)		50 000	425 (0)	125	700	12 500	
300	0	0		0 (0)		50 000					
400			400	0 (0)				250		0	150
500				0 (0)	10 000			50			
600											50
700											0
Ogive		0				(5 000)		0	550 (500)	550	2 400

Par contre, les concentrations bactériennes de l'ordre de 10^2 germes/ml de sédiment sont plus exceptionnelles dans cette pellicule superficielle. Cela est d'autant plus remarquable que le modèle de carottier utilisé est parmi ceux qui perturbent le moins possible cette couche de surface lors du prélèvement.

Aux stations n^{os} 11, 12 et 14 la microflore est plus abondante dans l'eau que dans les sédiments !

Cette distribution est observée dans les zones les plus froides, où la température de l'eau du fond n'excède pas $-0,7^{\circ}$ C. Les germes psychrophiles, et surtout psychrotolérants, sont plus abondants que les mésophiles (tabl. I), cependant la population « totale » demeure exceptionnellement réduite ($2\ 000$ germes/ml de sédiment).

Dans les niveaux sédimentaires sous-jacents, les populations aérobies sont moins abondantes. La pauvreté des horizons superficiels des stations 11, 12 et 14 est confirmée. Seul le niveau 5 cm de la station n^o 5 présente une population importante. La concentration en oxygène dissous est la plus faible ($0,4$ ppm), ainsi que le Eh ($+285$ mV), alors que la teneur en $N-NH_3$ est l'une des plus élevée pour ces niveaux de subsurface (DAUMAS et col., 1975).

A ces niveaux, ainsi que dans les sédiments plus anciens, les germes sont soit mésophiles, soit psychrophiles facultatifs. Les bactéries psychrophiles strictes ne représentent qu'une fraction infime de ces populations.

A partir de 50 cm de profondeur, les effectifs de l'ordre de 10^4 germes/ml sont exceptionnels. C'est cependant le cas des niveaux 200 et 300 cm de la station 8. Les populations microbiennes sont de l'ordre de $5 \cdot 10^4$ alors que dans les niveaux immédiatement sus-jacents la microflore n'excède pas 10^2 germes/ml.

1.4.2.2. Microflore anaérobie.

A. Germes fermentants.

La grande sensibilité de certains germes anaérobies à l'oxygène atmosphérique (HUNGATE, 1966) nous a conduits à ne rechercher ces germes que dans un nombre limité d'échantillons. Ainsi les résultats obtenus (tabl. II) correspondent à des milieux de cultureensemencés à bord, moins de 15 mn après l'ouverture des engins de prélèvement.

Dans l'eau interstitielle de tous les échantillons étudiés, le potentiel d'oxydoréduction est positif et l'oxygène dissous présent (DAUMAS et col., 1975). La microflore fermentante peu développée est toujours quantitativement moins importante que la population aérobie. Seule, la microflore prélevée à 5 cm de profondeur à la station 2 constitue une exception. A ce niveau, les valeurs du Eh et de la concentration en oxygène dissous ne présentent rien de remarquable.

Il n'y a pas d'augmentation du nombre de germes fermentants dans les niveaux sédimentaires plus anciens. L'augmentation du rapport anaérobies/aérobies, de la surface de sédiment ($1/200$), vers la profondeur ($1/2$), proche de celle décrite par ZOBELL et ANDERSON (1936) est due essentiellement à la diminution plus rapide des germes aérobies. A partir de 2 m de profondeur, les échantillons ne donnant aucune culture fermentante sur le milieu utilisé sont plus fréquents que les échantillons ne donnant pas de culture aérobie. Toutefois, il convient de rappeler que la microflore fermentative ne représente qu'un des modes de vie microbienne en anaérobiose.

B. Les germes sulfatoréducteurs.

Les germes sulfatoréducteurs présentent une des autres possibilités de vie en anaérobiose. On peut observer sur le tableau II que les distributions de la microflore fermentante et des sulfatoréducteurs ne sont pas liées.

TABLEAU II.

CONCENTRATIONS EN BACTÉRIES HÉTÉROTROPHES ANAÉROBIES AUX DIFFÉRENTS NIVEAUX DES STATIONS ÉTUDIÉES.
(Bactéries sulfatoréductrices, et () bactéries fermentantes exprimées en germe/ml. + : moins de 10 germes/l.)

STATION N°	2	4	5	6	7	8	9	10	11	14
EAU	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0
							(25)		(250)	
Sédiment (cm)										
0	1 740 (450)	500		1 200		100	160 (4 500)	320	20 (75)	430
5	260 (25 000)	280	70	1 480		70	125 (4 500)	480 (25)	6 (0)	
10	3 800 (7 500)	340		70		680	40 (2 500)	210	20 (75)	
50			540 (2 500)	680	10	30	150	400 (75)	220	430
100		70	370 (250)	660	300	2 680	180 (45)	35 (0)	75	200
200			2 200 (0)			500	120 (250)	20 (0)	50	25
300		320 (0)	(0)	30		10	15 (0)	70	130	
400			60					50 (10)		110
500		10		70				20 (0)		
700										130
Ogive					10	80	15	10		

Les germes sulfatoréducteurs ne sont qu'exceptionnellement présents dans les eaux du fond et toujours en proportion infime. Par contre, ces germes sont toujours présents dans les échantillons de sédiment où ils ont été recherchés. Leur concentrations de l'ordre de 10^2 germes/ml sont les plus fréquentes, mais on peut observer quelques populations de 1 000 à 3 000 germes/ml. La présence de ces microflores plus importantes n'est pas liée à des niveaux plus réducteurs ou à des teneurs en oxygène dissous moins importantes.

Un cas intéressant est celui du niveau 100 cm de la station 8, où la population aérobie est très réduite (100 germes/ml) alors que la population sulfatoréductrice est parmi les plus importantes (2 800 germes/ml).

Dans plusieurs échantillons profonds, les germes aérobies sont absents tandis que les sulfatoréducteurs sont représentés par quelques dizaines d'individus par millilitre.

1.4.3. RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Dans cette partie de la mer de Norvège, on observe une distribution hétérogène des populations bactériennes des eaux proches du fond et des sédiments. Dans la zone la plus méridionale les concentrations observées sont du même ordre de grandeur que les valeurs antérieurement décrites dans diverses aires océaniques.

Par contre, dans la région la plus septentrionale, qui est également la plus profonde et la plus froide, les populations bactériennes hétérotrophes aérobies sont restreintes. Les germes psychrophiles et psychrotolérants y sont relativement plus abondants que dans les zones moins froides, mais les populations bactériennes globales demeurent très réduites; toutefois, les populations barophiles obligatoires échappent à nos investigations effectuées à la pression atmosphérique normale. Mais c'est également dans ces zones les plus froides que les concentrations en ATP sont les plus basses (DAUMAS et col., 1975).

Ces observations confirment les expérimentations de JANNASCH et WIRSEN (1973) sur les effets combinés des basses températures et des pressions hydrostatiques croissantes, sur la limitation des processus biologiques en mer profonde.

Les germes sulfatoréducteurs ne sont qu'exceptionnellement représentés dans les eaux proches du fond, mais, par contre, ils sont présents à tous les niveaux sédimentaires étudiés. Toutefois, dans l'épaisseur du sédiment, y compris dans les niveaux les plus profonds, les populations microbiennes dominantes sont toujours aérobies. Les dosages d'oxygène dissous dans l'eau interstitielle ont montré la persistance d'oxygène à tous ces niveaux permettant la survie de ces germes.

La structure des populations bactériennes isolées de ces différents échantillons est en cours d'étude sur une collection de 2 000 souches qui seront décrites par 216 caractères morphologiques, physiologiques et nutritionnels. Cette analyse, réalisée selon le principe adansonien de classification, permettra de comparer la composition taxonomique, la physiologie et les potentialités cataboliques des populations bactériennes des différents niveaux sédimentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- BIANCHI (A.). — 1971. Distribution de certaines bactéries hétérotrophes aérobies dans les sédiments profonds de Méditerranée orientale. *Mar. Biol.*, 11 (2), 106-117.
- BIANCHI (A.). — 1973. Variations de la concentration bactérienne dans les eaux et les sédiments littoraux. *Mar. Biol.*, 22, 23-29.
- BIANCHI (A.) et BIANCHI (M.). — 1971. La numération des populations bactériennes du milieu marin. *Tethys*, 3, 697-704.
- DAUMAS (R.), LABORDE (P.) et ROMANO (J.-C.). — 1975. Étude de l'eau de mer sus-jacente et de l'eau interstitielle contenue dans les sédiments de la mer de Norvège. Campagne ORGON I. *Rev. Inst. Franç. du Pétrole*, XXX-2, 1975, p. 199-203.
- HUNGATE (R. E.). — 1966. The rumen and its microbes, *New York Academic Press*.
- JANNASCH (H. W.), EIMHJELLEN (K.), WIRSEN (C. O.) and FARMANFARMAIAN (A.). — 1971. Microbial degradation of organic matter in the deep sea. *Science*, 171 (3972), 672-675.
- JANNASCH (H. W.) and WIRSEN (C. O.). — 1973. Deep-sea microorganisms: in situ response to nutrient enrichment. *Science*, 180, 641-643.
- KRISS (A. E.). — 1963. *Marine Microbiology (Deep Sea)* translated by J. M. SHEWAN and Z. KABATA, London, *Oliver and Boyd*, 536 p.
- Mc CRADY (M. H.). — 1918. Tables for rapid interpretation of fermentative tube results. *Canad. J. publ. Health*, 9, 201.
- OPPENHEIMER (C. H.) and ZOBELL (C. E.). — 1952. The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. mar. Res.*, 11, 10-18.
- PELET (R.), CAUWET (G.), COMBAZ (A.). — 1975. La géochimie organique des sédiments marins profonds. Mission ORGON I (mer de Norvège). I.1. Généralités. *Rev. Inst. Franç. du Pétrole*, XXX-1, 1975, p. 18-29.
- POSTGATE (J. R.). — 1966. Media for sulphur bacteria. *Lab. Pract.*, 15 (11), 1239-1244.
- RITTENBERG (S. C.). — 1940. Bacteriological analysis of some long cores of marine sediments. *J. mar. Res.*, 3, 191-201.
- ZOBELL (C. E.). — 1942. Changes produced by microorganisms in sediments after deposition. *J. sed. Petr.*, 12 (3), 127-136.
- ZOBELL (C. E.). — 1946. *Marine microbiology*, — *Waltham Chronica Botanica Press*, 240 p.
- ZOBELL (C. E.) and ANDERSON (D. Q.). — 1936. Vertical distribution of bacteria in marine sediments. *Bull. amer. Assoc. petrol. Geol.*, 20 (3), 258-269.

Manuscrit reçu en janvier 1975.

LA GÉOCHIMIE ORGANIQUE DES SÉDIMENTS MARINS PROFONDS MISSION ORGON 1, 1974 (MER DE NORVÈGE)

On présente quelques généralités sur la constitution et les buts du groupe ORGON, groupe d'étude de la géochimie organique des sédiments marins profonds qui comprend, outre l'IFP, les compagnies CFP, Elf-RE et SNPA et un certain nombre de laboratoires universitaires et du CNRS (Paris VI, Bordeaux, Strasbourg, Nancy, Perpignan, Aix-Marseille).

Un premier compte rendu de la mission ORGON 1974 en mer de Norvège insiste sur les quatre premières mondiales réalisées à son occasion :

- utilisation du carottier par gravité Reineck long (12 m) par mer profonde (jusqu'à 2 000 m) ;
- dosage du carbone organique à bord par appareil automatique LECO ;
- lyophilisation à bord de grandes quantités de sédiments ;
- cultures et numération bactériennes à bord sur prélèvements le long d'une carotte longue (jusqu'à 13,5 m).

Some general information is given on the formation and aims of the ORGON Group, a group for studying the organic geochemistry of deep marine sediments and, in addition to IFP, including CFP, Elf-RE and SNPA as well as various university and CNRS laboratories (Paris VI, Bordeaux, Strasbourg, Nancy, Perpignan and Aix-Marseille).

An initial report on the 1974 ORGON Mission in the Norwegian Sea emphasizes the four world firsts it achieved :

- using a Reineck gravity core drill 12 m long under deep water (up to 2,000 m) ;
- shipboard organic carbon titration with a LECO automatic apparatus ;
- shipboard freeze drying of large amounts of sediments ;
- shipboard bacterial culture and counting in samples taken from a long core sample (up to 13.5).

Se presentan algunas generalidades sobre la constitución y los objetivos del grupo ORGON, grupo de estudio de la geoquímica orgánica de los sedimentos marinos profundos que comprende, además del IFP, las compañías, CFP, ELF-RE y SNPA y un cierto número de laboratorios universitarios y del CNRS (Paris VI, Bordeaux, Strasbourg, Nancy, Perpignan, Aix-Marseille).

Un primer informe de la misión ORGON 1974 en el mar de Noruega insiste sobre las cuatro « premières » mundiales realizadas por la misión :

- utilización de extractor de testigos por gravedad Reineck, largo (12 m), en mar profunda (hasta 2 000 m) ;
- determinación de carbono orgánico a bordo, por aparato automático LECO ;
- liofilización a bordo, de grandes cantidades de sedimentos ;
- cultura y numeración bacterianas a bordo, sobre muestreos a lo largo de un testigo largo (de hasta 13,5 m de largo).