POPULATIONS BACTÉRIENNES PRÉSENTES DANS LA GROTTE «PEŞTERA DE LA MOVILE», DOBROGEA MÉRIDIONALE, ROUMANIE

RUXANDRA CHIURTU* et LUCIA DUMITRU**

Les auteurs présentent les résultats de l'étude de la communauté bactérienne de la grotte «Peştera de la Movile». On a analysé le nombre total des bactéries, puis on a mis en évidence la participation des bactéries dans les cycles de l'azote, du soufre et du fer.

1. LE CADRE GÉOGRAPHIQUE ET GÉOLOGIQUE

La grotte «Peştera de la Movile» est située à environ 3 km est de la mer Noire et à 1 km nord-est de la ville Mangalia.

La cavité est développée dans des calcaires oolitiques et lumachelliques d'âge sarmatien, profondément modélés par la circulation des eaux souterraines sulfureuses-mésothermales, avec caractère ascensionnel (Constantinescu, 1989; Lascu 1989).

On a mis en évidence deux niveaux de disposition des galeries de la grotte.

– le niveau fossile (supérieur), qui présente un haut degré de sécheressse

– le niveau actif (inférieur), à 4–5 m au-dessous de celui fossile, presque totalement inondé; les exceptions sont les quatre cloches d'air, très riches en faune. Les cloches d'air, situées au long des passages submergés de la grotte, contiennent des vrais «voiles» microbiens, qui flottent à la surface de l'eau, ou couvrent partiellement les parois. Ce fait présente intérêt au point de vue microbiologique, par une très riche microflore bactérienne, adaptée aux conditions spéciales de la grotte.

2. DONNÉES PHYSICO-CHIMIQUES

Pour l'analyse proposée, une importance spéciale est présentée par les données physico-chimiques, les paramètres qui confèrent à l'eau sourterraine de la grotte des caractéristiques distinctives face aux autres hydrostructures karstiques du pays: le faciès hydrochimique, la minéralisation totale, la température, la présence de l'hydrogène sulfuré. Illustré par des exemples, dans le Tableau 1 (d'après Marin, 1995):

L'apport de la substance organique d'origine photosynthétique dans la grotte a été établi, par des investigations de surface de la région, à une valeur peu importante. Les arguments sont, le prémier, l'absence d'une entrée naturelle dans la grotte «Peştera de la Movile», et le second, l'absence, dans la région des sources d'eau ou des lacs pour donner de la matière organique à l'aquifère karstique (Sârbu et Popa, 1992).

Trav. Inst. Spéol. «Émile Racovitza», t. XXXIV, p. 89–97, Bucarest, 1995

Tableau 1

Caractéristique phisyco-chimiques de l'eau souterraine de la grotte «Peştera de la Movile».

Paramètres	L'eau du lac	L'eau cloche 2
L'âge géologique	Sarmatien	Sarmatien
Température (degrés C)	20,7	21,8
Densité (g/cm³)	1,008	1,008
pH	7,4	7,46
Hydrogène sulfuré (mg/l)	32,5	29,3
Métaux majeurs (mg/l)		
Natrium	182,7	186,8
Kalium	13,6	14,3
Magnésium	32,8	31,5
Calcium	45,1	46,6
Ferum (total)	0,035	0,485
Non-métaux (anionique) (mg/l)		
Borates $(B)^-$	1,23	1,25
Alcalinité totale $(HCO_3)^-$	399,7	379,9
Silicium soluble (Si)	14,9	15,0
Azote ammoniacal $(NH_4)^+$	1,9	1,9
Nitrites $(NO_2)^-$	0,01	0,0005
Nitrates $(NO_3)^-$	0,2	4,3
Phosphore soluble (P)	0,033	0,026
Sulfates $(SO_4)^{-2}$	4,5	6,2
Chlorures $(Cl)^-$	237,6	251,7
Minéralisation totale (mg/l)	934	940

3. L'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE L'ÉCOSYSTÈME

Dans la période octobre 1993–mai 1994, on a récolté des épreuves d'eau et de sol, pour réaliser une étude microbiologique. Dans l'ensemble des conditions géographiques, géologiques et physico-chimiques, les analyses éfectuées ont montré le niveau de chargement microbien pour les échantillons considérés.

Le premier objectif a été l'évaluation globale, quantitative des microorganismes hétérotrophes totaux, puis l'isolation des colonies sur des milieux de culture généraux, avec la sous-culture sur des milieux de culture inclinés, pour les caractériser microscopiquement.

Le deuxième objectif était d'analyser les groupes physiologiques qui participent aux cycles de l'azote, du soufre et du fer, rapportés aux conditions spécifiques de la grotte «Peştera de la Movile».

3.1. L'ÉVALUATION NUMÉRIQUE DES BACTÉRIES HÉTÉROTROPHES AÉROBES

Le Tableau 2 présente le chargement microbien différent pour les échantillons d'eau et de sol.

Tableau 2

Le nombre total de bactéries de la grotte «Peştera de la Movile».

Echantillons d'eau	Germes par millilitre	Echantillons de sol	Germes par gramme sol (poids sec)
P_1	1×10^6	P_2	$7{,}5 \times 10^2$
1	2×10^4	5	$1{,}6 \times 10^4$
2	$2{,}5 \times 10^5$	6	$2{,}8 \times 10^3$
3	$2{,}4 \times 10^5$	7	7×10^3
4	5×10^3	9	5×10^3
8	2×10^4		

Pour les échantillons d'eau, le nombre total de bactéries est de l'ordre de 5 à 250 mille de germes par millilitre. Pour les échantillons de sol, les valeurs sont entre 7 et 700 milles de germes rapportés à 1 gramme de sol, poids sec. Le plus grand nombre est d'un million de germes par millilitre, pour les échantillons d'eau du lac souterrain, avec le «voile» microbien à la surface. La plus basse valeur: 5 milles germes/ 1ml, pour l'eau du lac – surface.

3.2. CARACTÈRES DE CULTURE, MORPHOLOGIQUES ET AFFINITÉS TEINTORIALES

Même pour les échantillons d'eau et de sol, les colonies présentes sont, en général, sphériques, et de type S (smooth).

Après la coloration Gram, les germes Gram-positifs (G+) et sporulés, dans les échantillons d'eau sont plus abondants que dans le sol, où il y a une préponderance de germes Gram-négatifs.

Morphologie:

Les formes bacillaires, isolées ou comme streptobacilles, sont prédominantes. Très intéressante est leur disposition «en palissade», trouvée dans les deux types d'échantillons.

Pour le échantillons d'eau trois souches bactériennes isolées sont coccoïdes, comme streptococci ou groupées en tétrades, ou *Sarcina*.

Les formes cocco-bacillaires sont les mêmes pour l'eau et le sol.

Un cas particulier est représenté par le «voile» microbien:

– les colonies sphériques, type S (smooth) sont jaunes, roses, oranges;

– il y a une prepondérance des formes coccoïdes G(+), disposées comme streptococci, tétrades ou *Sarcina*

Dans l'échantillon 9, on trouve des colonies sphériques, rouges, S, morphologie cocco-bacillaire, G(–), appartenant au genre *Serratia*.

L'examen microscopique a signalé le genre *Corynebacterium*, par des bactéries G(+), bacillaires, avec une extrémité comme une massue; il y a, aussi, le genre *Bacillus*.

4. BACTÉRIES PARTICIPANT AU CYCLE DU SOUFRE

Le cadre physico-chimique, par la présence de l'H_2S (hydrogène sulphuré) dans l'atmosphère de la grotte, justifie les expérimentations pour les bactéries impliquées dans diverses réactions qui forment le cycle du soufre.

La conversion du soufre, comme nutrient important:

– le sulfate, SO_4 (forme oxidée) → soufre S^{2-} (forme réduite) avec la forme intermédiaire du soufre élémentaire, S, est réalisée par les bactéries.

Selon leur participation au métabolisme du soufre, les bactéries sont:

a. sulf-oxydantes (ex. *Beggiatoa, Thiobacillus thiooxydans, Thiobacillus thioparus, Thiobacillus denitrificans*);

b. sulfate-réductrices (éx. *Desulfovibrio*).

a. LES BACTÉRIES SULF-OXYDANTES BACILLAIRES

Principe:

– le millieu électif est exclusivement minéral. Le soufre élémentaire (S), comme fleur de soufre ou thiosulfate de natrium, est oxydé par les bactéries sulf-oxydantes, qui obtiennent, de cette manière, des substances réductrices, de l'énergie.

Milieux:

– milieux sélectifs, avec de différentes valeurs de pH (Postgate, 1966)
Ensemencement:
– avec les dilutions 10^{-1} à 10^{-6}, 1 ml par tube et 3 tubes par dilution.

Résultats:

Les bactéries sulf-oxydantes sont plus abondantes dans les échantillons d'eau ($1,1 \times 10^5$ germes par 1 ml) que dans le sol et le sédiment ($2,2 \times 10^3$ germes par 1 gramme). La valeur maximale est pour le «voile» microbie ($1,1 \times 10^5$ germes/ml).

On a identifié les espèces *Thiobacillus thiooxydans, Th. thioparus* et *Th. denitrificans*, presque également représentées dans les deux types d'échantillons (Tableau 3):

Tableau 3

La répartition des espèces de genre *Thiobacillus* trouvées dans les échantillons d'eau et de sol dans la grotte «Peştera de la Movile».

Echantillon	*Th. thiooxydans*	*Th. thioparus*	*Th. denitificans*
P_1 – a	+	–	–
1 – a	–	+	–
2 – a	–	+	–
3 – a	+	+	+
4 – a	–	+	–
8 – a	+	+	+
P_2 – s	–	+	–
5 – s	+	+	+
6 – s	+	–	+
7 – s	+	+	+
9 – s	–	–	+

Les observations microscopiques en contraste de phase, sur le «voile» microbien ont montré la présence du genre *Beggiatoa*, bacteries sulf-oxydantes filamenteuses, avec un mouvement caractéristique (gliding-bacteria), avec des granulations de soufre incluses dans chaque filament.

b. LES BACTÉRIES RESPONSABLES DE LA SULFATO-RÉDUCTION

Principe: Le sulfate (SO_4^{2-}) est pris par les bactéries sulfato-réductrices, en anaérobiose, comme des accepteurs finaux d'éléctrones, avec la réduction au hydrogène sulfuré.

Milieux: milieu pour la sulfato-réduction, d'après Postgate, 1966.

Ensemencement: avec les dilutions 10^{-1} à 10^{-8}, 2 ml par tube (anaérobiose), 3 tubes par dilution.

Résultats

La présence des bactéries sulfato-réductrices en grand nombre, complétée avec celle des bactéries sulf-oxydantes, dans l'ensemble physico-chimique, justifie l'existence d'un cycle du soufre dans l'écosystème de la grotte.

Le groupe des germes, dans le sol, ont une valeur maximale de 240 000 germes/g. face à 110 000 germes/ml, pour l'eau (Tableau 4).

Tableau 4

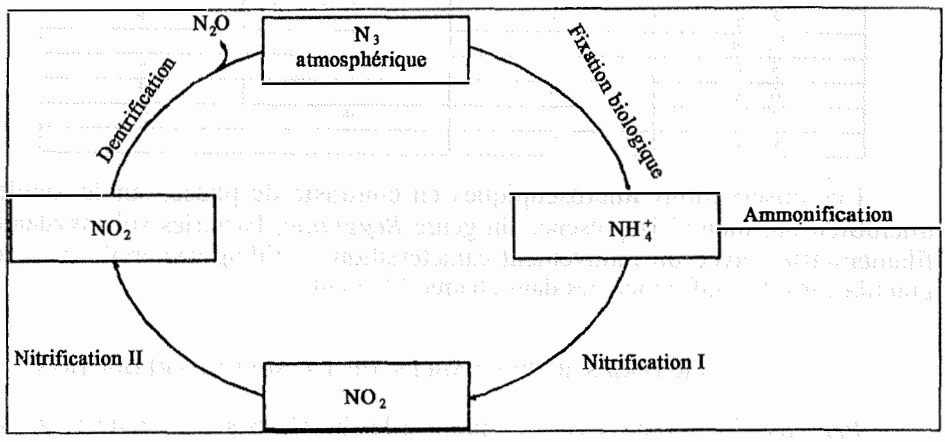
La répartition des bactéries responsables de la sulfato-réduction dans la grotte «Peştera de la Movile».

Echantillon eau	Germes/ml	Echantillon sol	Germes/g
P_1	$1{,}1 \times 10^5$	P_2	$2{,}8 \times 10^4$
1	1×10^2	5	$1{,}4 \times 10^4$
2	$1{,}7 \times 10^4$	6	$2{,}3 \times 10^4$
3	$1{,}7 \times 10^3$	7	2×10^5
4	$1{,}4 \times 10^3$	9	$2{,}4 \times 10^5$
8	$1{,}4 \times 10^4$		

5. BACTÉRIES PARTICIPANT AU CYCLE D'AZOTE

La présence d'azote oxydé, comme NO_3^- et NO_2^- ou réduit (NH_4^+), (exemple dans le Tableau 1), dans la grotte, ont déterminé quelques expériments pour chercher les bactéries qui participent au cycle de l'azote.

On a évalué les germes qui oxydent les combinaisons de l'azote (la nitrification), qui les réduisent (la dénitrification) et aussi les germes ammonifiants. On peut répresenter ces étapes:



Le cycle d'azote dans la nature (d'après G. Zarnea, 1984).

Prélèvement: les échantillons ont été prélevés de quelque points d'intérêt majeur.

Principe:

– pour la nitrification I et II, l'ammonium est oxydé au nitrite, puis au nitrate.
– pour la dénitrification, le nitrate est réduit à l'azote.

Milieux: – des milieux minéraux sélectifs, pour la nitrification, dénitrification et ammonification, selon Pochon (1962).

Ensemencement: avec les dilutions 10^{-1} à 10^{-6}, 1 ml par tube et 3 ml par dilution.

Résultats:

Tous les quatre processus (nitrification I et II, dénitrification et ammonification) sont très bien mis en évidence sur les milleux de culture utilisés. On peut dire que dans la grotte «Peştera de la Movile», il existe une forte participation des bactéries dans le cycle de l'azote.

Les valeurs numériques les plus grandes ont été trouvées dans l'eau du lac souterrain (ex. $2{,}4 \times 10^8$ germes par 1ml, pour l'ammonification); le plus pauvre est l'échantillon de sédiment pariétal de la gallerie d'accès ($1{,}1 \times 10^4$ germes par gramme de sol, pour la dénitrification). Pour des détails, voir Tableau 5:

Tableau 5

L'activité bacterienne dans le cycle biogéochimique de l'azote, dans la grotte «Peştera de la Movile».

Ech antillon	Nitrifiants I	Nitrifiants II	Dénitrifiants	Ammonifiants
IV – a	$1,4 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	2×10^8	$2,4 \times 10^8$
II – s	$2,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$
I – s	$1,4 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$
III – s	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^7$

6. LES BACTÉRIES IMPLIQUÉES DANS LE CYCLE DU FER

Le caractére exclusif minéral de l'écosystème de la grotte «Peştera de la Movile», la présence du fer total dans l'eau du lac souterrain, ont déterminé des investigations sur les Ferrobactéries.

On a évalué la présence des Ferrobactéries réductrices ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$), non-spécialisées:

Principe: la réduction du Fe^{3+} à Fe^{2+}, qui forme un précipité.

Milieux: le milieu Winogradski pour les Ferrobactéries.

Ensemencement: avec les dilutions 10^{-1} à 10^{-6}, anaérobiose, 2 ml par tube, 3 tubes par dilution.

Résultats: le Tableau 6:

Tableau 6

La présence des Ferrobactéries dans la grotte «Peştera de la Movile».

Echantillon eau	Ferrobactéries germes/1 ml	Echantillon sol	Ferrobactéries germes/1 g
P_1	$1,1 \times 10^6$	P_2	4×10^7
1	$1,7 \times 10^3$	5	$2,7 \times 10^4$
2	2×10^3	6	$3,1 \times 10^4$
3	$1,4 \times 10^4$	7	$2,4 \times 10^4$
4	$1,7 \times 10^2$	9	$2,4 \times 10^5$
8	$1,7 \times 10^3$		

Le plus grand nombre est de 40 millions Ferrobactéries par gramme de sol. L'eau du lac, surface, a l'activité la plus basse.

Les valeurs sont approximatives, car les bactéries du cycle du soufre interviennent indirectement dans le cycle du fer (Gounot, 1967). On peut avoir, aussi, quelques influences par la réduction chimique spontanée du fer, dans le milieu aérobe et alcaline de la grotte, finalisée avec un depôt rouilleux.

7. CONCLUSIONS

Des investigations sur les échantillons d'eau et de sol, provenant de la grotte «Peştera de la Movile», mettent en évidence les observations suivantes:

1) Les échantillons d'eau et de sol sont contaminées avec des bactéries chimioautotrophes et hétérotrophes

2) En général, l'eau du lac contient plus de germes hétérotrophes que les échantillons de sol

3) Les résultats, ne contenant pas toutes les étapes, montrent clairement les réactions qui forment les cycles de l'azote, du soufre et du fer, réalisées par les bactéries chimioautotrophes.

Pour le cycle de l'azote, la nitrification (avec les étapes I et II), la dénitrification et l'ammonification, sont bien représentées sur les milieux de culture utilisées. La plupart de la faune de la grotte est concentrée dans la Salle du Lac, apportant de la sorte des tissus animaux morts, qui sont ensuite minéralisés par les micro-organismes. L'une des réactions de la minéralisation est celle de l'ammonification, suivie par la nitrification.

Le cycle du soufre est très bien documenté, par la présence des germes impliqués dans les réactions de sulf-oxydation et de réduction. La conversion du soufre, comme nutrient d'une vrai importance dans la nature, est réalisée par les bactéries, en majorité. Pour le lac souterrain, l'oxydation de l'hydrogène sulfuré et des sulfures, au sulfate, est importante pour régénérer le pouvoir oxydant; le sulfate est important pour la minéralisation aérobe.

L'étude présentée, par les observations faites, est seulement une première étape dans l'identification des populations microbiennes de cette grotte.

Pour l'identification des bactéries hétérotrophes on a besoin de tests physiologiques et biochimiques, qu'on fera dans les expérimentations ultérieures.

Assemblant toutes les données obtenues, on aura, finalement, une image complète sur les groupes de microorganismes et leur fonction dans l'écosystème souterrain de la grotte «Peştera de la Movile».

BIBLIOGRAPHIE

1989 CONTANTINESCU T., *Considérations sur la zone karstique de «la Movile»*, Misc. Spéol. Rom., Bucureşti, 1, 7–12.

1970 GOUNOT A.M., *Microflore des limons souterrains*, Ann. de Spéol., Moulis-Ariège, XXII, 1, p. 1–116.

1989 LASCU C., *Paleogeographical and hydrogeological hypothesis regarding the origin of a peculiar cave fauna*, Misc. Spéol. Rom., Bucureşti, 1, 13–18.

1995 MARIN C., *Analize fizico-chimice în peştera de la Movile*, manuscrit.

1962 POCHON J., *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*, Ann. Inst. Pasteur, 98, p. 457–446.

1966 POSTGATE J. R., *Media for sulphur bacteria*, Lab. Practice vol. 15, p. 1240–1245, Univ. Press, Cambridge.

1990 SARBU S., *The unusual fauna of a cave with thermomineral waters containing H_2S, from southern Dobrogea, Romania*, Mém. Biospéol., XVII, 191–195.
1992 SÂRBU S., POPA R., *A unique chemoautotrophically based cave ecosystem*, Nat. Hist. of Biospéol., Camacho, Madrid, 640–666.
1984 ZARNEA G., *Tratat de microbiologie generală*, II, Edit. Acad., Bucureşti.
1992 ZARNEA G., MIHĂESCU G., VELEHORSCHI V., *Principii şi tehnici de microbiologie generală*, I, Bucureşti.

*Institut de Spéologie «Emile Racovitza», Bucarest
**Institut de Biologie, Bucarest

Reçu le 15 septembre 1995