

## Kit formation des stromatolithes

Réf. STRO

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Avant toute manipulation**, étudier les conseils de **sécurité**

### **COMPOSITION** (pour 15 binômes)

- Un flacon de cyanobactéries *Synechocystis* (50ml)
- Milieu contrôle (400ml)
- Milieu carboné (400ml)
- Boîtes de pétri stériles 55 (2x15)
- Lamelles stériles 18x18mm (100)
- Lames (non stériles) (50)
- Poires stériles (60)
- Une notice technique et pédagogique
- Un flacon d'Alizarine rouge 2% (10ml)

### **MATERIEL NECESSAIRE**

- Pince fine stérile
- Microscope (objectifs x5 à x10)

#### **Pour la coloration à l'Alizarine rouge :**

- Eau
- Poires (non stériles)

### **OBJECTIFS COGNITIFS**

Mettre en évidence le principe de formation des stromatolithes (précipités carbonés) à partir d'une culture de cyanobactéries en conditions carbonées.

### **RAPPELS**

Un stromatolithe ou stromatolite est une roche calcaire ou une structure marine biogénique (c'est-à-dire bio-construits par des communautés bactériennes où dominent actuellement les cyanobactéries) et organique laminée double-couche.

Le stromatolithe en tant que structure n'est pas vivant, seules les bactéries qui le construisent le sont.

Tous les stromatolithes se forment en eaux peu profondes. Leur structure inhabituelle crée un écotone et habitat très particulier qui, selon les cas, peut être quasi-plein ou laisser une quantité significative de vide dans lesquels d'autres bactéries ou organismes peuvent trouver abri.



Les premiers stromatolithes, fossilisés, datent de plus de 3 milliards d'années. Ils sont la trace des premières formes de vie en colonies fixées et ont sans doute contribué à créer notre atmosphère riche en dioxygène et la couche d'ozone qui ont permis le développement d'une vie terrestre et océanique plus complexe. Ces communautés microbiennes sont ainsi, dans le passé, à l'origine d'une première importante séquestration du carbone et du calcium.



Les stromatolithes morts sont considérés comme des roches fossiles. Les stromatolithes anciens sont parmi les plus anciennes roches fossiles d'origine biologique connues (plus anciennes connues : 3,465 milliard d'années). Elles sont les plus fréquentes dans les sédiments d'âge précambrien. Ces communautés ont dominé la vie marine entre 3 500 et 500 Ma. L'apparition de formes de vie plus complexes tels que les mollusques, les crustacés et les vertébrés vers la fin du Précambrien et le début du Cambrien annoncent leur déclin.

Traces de stromatolithes sur roche sédimentaire

Il existe plusieurs hypothèses concernant le rôle de l'évolution dans l'apparition des stromatolithes.

Une première hypothèse est que le mucilage et la structure multicouche des stromatolithes produits par les cyanobactéries pourraient tous deux avoir comme origine la sélection naturelle : lorsque ces organismes sont apparus et ont commencé à coloniser les terres à cette époque émergées, l'absence d'oxygène dans l'atmosphère, puis sa rareté, n'ont longtemps pas permis l'existence d'une couche d'ozone telle que celle qui nous protège aujourd'hui des radiations solaires et en particulier des UV, mortels pour les bactéries. Cette structure aurait donc pu jouer un rôle d'écran solaire anti-radiations UV.

De nos jours, on peut encore observer de type d'organismes (ex nostoc ou algues supportant d'être exposées plusieurs heures au plein soleil à marée basse grâce à un mucus ou une substance mucilagineuse).

Ce mucilage pourrait aussi avoir un rôle de protection contre l'oxygène ; déchet du métabolisme des bactéries photosynthétiques toxique pour celles-ci, et contre l'acide carbonique et le bicarbonate issus du CO<sub>2</sub> dissous dans l'océan primitif (les stromatolithes ont contribué à désacidifier l'océan primitif et à permettre une vie plus complexe). De son côté, le feuillet externe de calcaire biogénique (formé par les colonies de cellules à partir d'un biofilm "externe" et de la substance mucilagineuse qui facilite la précipitation du calcium en calcaire) semble jouer plusieurs rôles complémentaires. Il doublerait la protection offerte par les mucilages contre les UV, la chaleur et la déshydratation (notamment à marée basse quand les stromatolithes étaient exposés au soleil et au vent), serait un support d'ancrage favorable à ce type de colonies bactériennes dans leur zone d'optimum écologique, et apporterait une protection physique contre les vagues et l'érosion par les particules sableuses dures en suspension.

Une dernière hypothèse conférerait un rôle aux stromatolithes dans la physiologie biogéoplanétaire et de la biosphère, grâce à l'absorption et l'inertage du CO<sub>2</sub>, conjointement au calcium. Alors que la température du soleil et les radiations infrarouges émanant du soleil et reçues par la terre augmentaient, menaçant la vie naissante, ce gigantesque puits de carbone constitué par les stromatolithes aurait permis que la température de la terre reste relativement stable ; permettant ainsi l'apparition d'autres formes de vie plus complexe.

## **MANIPULATION ET RESULTATS ATTENDUS**

**Mise en culture : à réaliser en conditions stériles**

**Chaque binôme réalisera 2 boîtes de culture : l'une avec le milieu de culture contrôle (conditions de culture normales – noté MCN), l'autre avec le milieu de culture carboné (noté MCSTRO).**

**On notera « MCN » la boîte de culture contrôle, et « MCS » la boîte de culture en conditions carbonées.**

- Transférer 1.5 à 2ml de culture mère de Synnechocystis dans chaque boîte de pétri à l'aide d'une poire stérile
- A l'aide d'une 2ème poire stérile, ajouter 7ml de milieu contrôle (MCN) dans la boîte « MCN »
- A l'aide d'une 3ème poire stérile, ajouter 7ml de milieu carboné (MCSTRO) dans la boîte « MCS »
- A l'aide d'une pince fine flambée (pour la rendre stérile), disposer 3 lamelles stériles au fond de chaque boîte.

**On veillera à flamber la pince entre les 2 boîtes pour éviter la contamination de milieu.**

- Mettre en culture à température ambiante, à la lumière pendant une semaine. **Un biofilm de cyanobactéries se forme.**

Pour des résultats encore plus flagrant, on pourra pousser la culture jusqu'à 1 mois en veillant à rajouter du milieu stérilement en cas d'évaporation (rajouter le milieu correspondant aux conditions de culture indiquées sur la boîte).

**Observation des stromatolithes :** (sans conditions stériles)

- Noter une 1<sup>ère</sup> lame « MCN » et une 2<sup>ème</sup> lame « MCS »
- A l'aide d'une pince fine, prélever dans la boîte « MCN » une lamelle et la transférer **face du dessus contre le verre** sur la lame « MCN ». Ainsi, la culture de cyanobactéries se trouve piégée entre lame et lamelle. **Ne pas égoutter la lamelle avant de la déposer afin que le liquide serve aussi de milieu de montage.**
- Procéder de même avec la boîte « MCS » ; monter une lamelle sur la lame « MCS »
- Il est possible de monter 1 à 3 lamelles de la même condition de culture sur chaque lame afin de comparer les résultats obtenus sur chaque lamelle.
- Observer au microscope, objectif 5x puis 10x (l'objectif 40x n'est pas nécessaire pour observer la formation de cristaux) : on constate la présence de nombreux cristaux (cubes transparents) à la surface du biofilm sur les lames MCS, correspondant aux cultures en milieu carbonés. Ces cristaux sont absents du biofilm de la lame MCN, correspondant aux cultures en conditions normales.

NB : il est possible parfois d'observer des dépôts dans les lames MCN, cependant ces dépôts ne forment généralement pas de cristaux caractéristiques (cubes) et sont en quantité très faible. Ils correspondent à des débris et/ou des cyanobactéries mortes qui s'amassent et non à des précipités de type stromatolitiques.

**Coloration des précipités à l'Alizarine rouge :** (sans conditions stériles)

On pourra observer directement 1 lamelle et colorer les 2 autres.

- Préparer 2 récipients de colorant notés « MCN » et « MCS » et 6 récipients d'eau pour les rinçages (3 notés « MCN » et 3 notés « MCS »). On pourra utiliser des boîtes de pétri ou tout autre récipient bas afin de manipuler aisément les lamelles.
- La solution d'Alizarine rouge peut être utilisée pour réaliser plusieurs colorations successives (une dizaine soit l'équivalent d'une classe entière).
- A l'aide d'une pince fine, prélever une lamelle et la transférer directement dans l'Alizarine rouge. **Ne pas rincer ni égoutter afin de ne pas lessiver le biofilm formé par les cyanobactéries.**
- Laisser colorer 5 à 10 minutes (température ambiante, sans agitation).
- Récupérer la lamelle délicatement avec la pince fine et la transférer dans le premier bain de rinçage. Ne pas égoutter ni agiter.
- Laisser agir quelques secondes.
- Procéder de même pour le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> bain de rinçage.
- On note déjà la présence d'un épais biofilm rouge dans les boîtes MCS. Les boîtes MCN présentes des biofilm moins colorés et très ajourés qui s'estompent au cours des lavages.
- Noter une 1<sup>ère</sup> lame « MCN » et une 2<sup>ème</sup> lame « MCS »
- Après le 3<sup>ème</sup> rinçage, prélever dans la boîte « MCN » une lamelle et la transférer **face du dessus contre le verre** sur la lame « MCN ». Ainsi, la culture de cyanobactéries se trouve piégée entre lame et lamelle. **Ne pas égoutter la lamelle avant de la déposer afin que le liquide serve aussi de milieu de montage.**
- Procéder de même avec la boîte « MCS » ; monter une lamelle sur la lame « MCS »
- Il est possible de monter 1 à 3 lamelles de la même condition de culture sur chaque lame afin de comparer les résultats obtenus sur chaque lamelle.
- Observer au microscope, objectif 5x puis 10x (l'objectif 40x n'est pas nécessaire pour observer la formation de cristaux) : on constate la présence de nombreux cristaux (cubes rouges) à la surface du biofilm sur les lames MCS, correspondant aux cultures en milieu carbonés. Ces cristaux sont absents du biofilm de la lame MCN, correspondant aux cultures en conditions normales.

NB : il est possible parfois d'observer des dépôts colorés en rouge dans les lames MCN, cependant ces dépôts ne forment généralement pas de cristaux caractéristiques (cubes) et sont en quantité très faible. Ils correspondent à des débris et/ou des cyanobactéries mortes qui s'amassent et non à des précipités de type stromatolitiques.

### FICHE DE SECURITE

L'ensemble des milieux, souches, boîtes et lames peuvent être jetés à l'évier et/ou à la poubelle ménagère.

L'Alizarine rouge peut être conservée pour les colorations suivantes (à température ambiante, à l'abri de la lumière). Elle peut ensuite être jetée à l'évier.

Les souches peuvent être repiquées en conditions stériles (voir fiche « conseil de repiquage pour les cyanobactéries »).