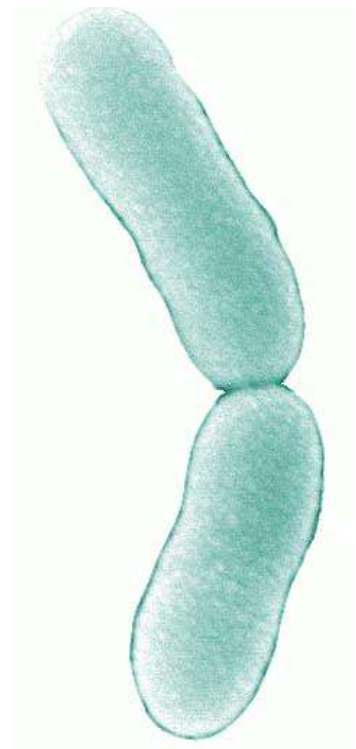


Olivier BRAISSANT

Carbonatogénèse bactérienne liée au cycle
biogéochimique oxalate-carbonate

*Bacterial carbonatogenesis related to the oxalate-
carbonate biogeochemical cycle*





Institut de Géologie
et d'Hydrogéologie



Carbonatogénèse bactérienne liée au cycle biogéochimique oxalate-carbonate

Thèse

Présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel

Pour l'obtention du grade de Docteur ès Science

par

Olivier Braissant

Soumise au jury de thèse suivant :

Prof. Eric Verrecchia, Université de Neuchâtel (directeur de thèse)

Prof. Michel Aragno, Université de Neuchâtel

Prof. Judith A. McKenzie, Ecole polytechnique fédérale de Zurich

Prof. Pieter Visscher, Université du Connecticut (USA)

Dr. Frédéric Marin, Université de Bourgogne (France)

Dr. Christophe Dupraz, Université de Neuchâtel

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Carbonatogénèse bactérienne liée au
cycle biogéochimique oxalate-carbonate

Olivier BRAISSANT

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury

Mme J. Mckenzie (ETH Zürich),
MM. E. Verrecchia (directeur de thèse),
M. Aragno, C. Dupraz
F. Marin (Dijon F)
et P. Visscher (Groton, Connecticut USA)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 12 décembre 2005

Le doyen :


J.-P. Derendinger

Table des matières

Résumé - Abstract	v
Avant-propos	vii
Contenu de cette thèse	vii
Remerciements	vii
Chapitre 1: Introduction	1
L'acide oxalique et l'oxalate de calcium	1
Propriétés physiques	1
Propriétés chimiques	2
Propriétés minéralogiques	2
L'oxalate dans la biosphère	3
Oxalates abiotiques	3
Oxalates associés aux systèmes biologiques	5
Les producteurs d'oxalate	5
Les dégradeurs d'oxalate	9
Le cycle oxalate-carbonnate	14
Introduction au cycle oxalate-carbonnate	14
Importance du cycle oxalate-carbonnate	15
le carbonate de calcium	17
Propriétés physiques	17
Propriétés chimiques	17
Minéralogie	18
Le carbonate de calcium dans la biosphère	18
Le carbonate de calcium d'origine abiotique	20
Le carbonate de calcium d'origine biotique	21
Le carbonate de calcium comme biominéral chez les micro-organismes	22
Processus métabolique menant à la carbonatogénèse	22
Influence du facteur biologique sur la précipitation du carbonate de calcium	23
Résumé - Summary	24
Chapitre 2: Méthodes	25
Microbiologie classique	25
Description des souches	25
Composition des milieux de cultures	28
Microbiologie moléculaire	28
Extraction d'ADN	28
PCR gradient	29
PCR	29
Electrophorèse	29
Séquençage	29
BLAST	29
Expérience de (bio)minéralisation abiotique	31

Chimie et pédologie	31
Mesure du pH H ₂ O	31
Dosage des carbonates	31
Dosage des oxalates	31
Analyse des anions et cations	32
Diffraction des rayons X	32
Microscopie	32
Microscopie optique	32
Microscopie électronique	33
Préparation des échantillons	34
Artéfacts	34
Masque flou	34
Débruitage des images	36
Résumé - Summary	36
Chapitre 3: Carbonatogénèse bactérienne à partir d'oxalate	39
Introduction	39
Méthodes	40
Résultats	41
Evolution du pH en fonction de la croissance bactérienne et de la consommation d'oxalate	41
Carbonates de calcium et autres minéraux produits lors de cultures bactériennes sur oxalate de calcium	43
Carbonates de calcium produits sur milieu B4	49
Discussion	53
Liens entre la consommation d'oxalate et l'augmentation du pH dans les cultures bactériennes	53
Cristaux produits lors de cultures bactériennes sur oxalate de calcium	59
Conclusion	61
Résumé - Summary	62
Chapitre 4: Etude du cycle oxalate-carbonate en milieu naturel	65
Introduction	65
Méthodes	68
Description des sites	68
Méthode d'échantillonnage	68
Analyses microbiologiques	70
Analyses chimiques	71
Observations des échantillons de plantes	71
Expérience de biominéralisation	71
Résultats	71
Observations autour des irokos	71
Observations autour des opuntiae	74
Observations autour dans une vigne	80
Expérience de biominéralisation	82
Discussion	82
Réservoirs / "Pools" d'oxalate dans les sols	82
Dégradations bactériennes des oxalates	82
Augmentation du pH et précipitation de carbonate de calcium	83
Evolution vers un système carbonaté	86
Conclusion	88
Résumé - Summary	88

Chapitre 5: Influence des structures bactériennes sur le carbonate de calcium produit	89
Introduction	89
Méthodes	89
Résultats	91
Inventaire morphologique des cristaux produits par des bactéries oxalotrophes isolées	91
Rôles des exopolysaccharides	100
Affinité du xanthane pour les différents cationns	101
Discussion	104
Cristaux de l'inventaire morphologique	104
Rôle des exopolysaccharides et comparaison entre culture et expérience abiotique . .	104
Affinité des cations pour le xanthane	107
Conclusion	107
Résumé - Summmary	109
Chapitre 6: Discussion générale	111
L'acide oxalique; un acide organique parmi les autres	111
La guile oxalotrophe	112
Contribution de la guilde oxalotrophe à la production de carbonate	112
Conséquences de l'activité oxalotrophe liée aucycle oxalate-carbonate	114
Stockage du carbone	114
Modification des sols - mobilité des métaux	114
Perspectives et éventuelles applications	115
Biologie moléculaire	115
Microcosmes	115
Les biofilms	115
Identification des carbonates	116
Utilisation des carbonates	116
Une vision plus large du cycle oxalate-carbonate	117
Chapitre 7: Conclusions	119
Bibliographie	121

Résumé - Abstract

Résumé

L'influence des micro-organismes sur la précipitation et la dissolution des minéraux est connue depuis longtemps. Dans ce contexte, le cas particulier de l'oxalate de calcium est particulièrement intéressant car l'oxalate est présent dans de nombreux systèmes biologiques tels que chez les plantes et chez les champignons. L'oxalate joue aussi un rôle important dans certains cycles biogéochimiques ainsi que dans certaines pathologies humaines telles que les calculs rénaux. Malgré la faible solubilité des complexes métaux-oxalates et le degré d'oxydation élevé de l'anion oxalate, un nombre limité de bactéries sont capables d'utiliser l'acide oxalique et l'oxalate de calcium comme sources de carbone et d'énergie. La dégradation de l'oxalate par des bactéries aérobies mène à une augmentation du pH qui permet la précipitation de minéraux carbonatés. L'étude de ce processus dans les sols autour de l'iroko (*Milicia excelsa*), de cactus, et de plants de vigne montre que les pools d'oxalates sont très variables et que leur dégradation dans le sol et la rhizosphère est assurée principalement par les streptomycètes et les protéobactéries, respectivement. Dans tous les cas, on observe une alcalinisation des sols et une précipitation de carbonate de calcium. De plus les carbonates observés dans les différents sols peuvent être reproduits en laboratoire en utilisant les bactéries oxalotrophes isolées. L'étude de la morphologie et de la minéralogie des carbonates produits en laboratoire montre que les exopolysaccharides et les polymères pariétaux ont une grande influence sur la nature des carbonates produits. De même la cristallisation abiotique de différents polymorphes du carbonate de calcium dans un EPS commercial souligne l'importance de celui-ci dans la formation de phases métastables et des morphologies particulières du carbonate de calcium. Considérant ces éléments, cette étude propose le modèle suivant pour résumer le fonctionnement du cycle oxalate-carbonate dans les sols. Les plantes produisent un premier réservoir d'oxalate. Lors de la dégradation des tissus ligneux et de la litière, les champignons saprophytes produisent un second pool d'oxalate. De plus ils favorisent la libération des cristaux d'oxalate de calcium enchâssés dans les tissus végétaux. Ces deux pools d'oxalate sont ensuite consommés par les bactéries oxalotrophes. Il en résulte une augmentation du pH et une précipitation concomitante de carbonate de calcium.

Abstract

The influence of microbes on the precipitation and dissolution of minerals has been known for a long time. In this context the case of calcium oxalate is particularly interesting because calcium oxalate is present in many biological systems such as plant and fungi. Oxalate also plays an important role in biogeochemical cycles and human diseases such as kidney stones. Despite the poor solubility of metal oxalate complexes and the high oxidation state of oxalate, a limited number of bacteria are able to use oxalate and calcium oxalate as carbon and energy sources. Bacterial aerobic degradation of oxalates leads to a pH increase that allows the precipitation of carbonate minerals.

The investigation of such processes in soils around an African tree (iroko, *Milicia excelsa*), cacti, and grape plants shows that oxalate pools are highly variable. In the soil and the rhizosphere, oxalic acid and oxalate crystals are mainly degraded by streptomycetes and proteobacteria respectively. In each case, an alcalinization of soil solution is observed and precipitation of calcium carbonate can occur. Moreover, calcium carbonate crystals observed in soils can be reproduced in the laboratory

using isolated oxalotrophic bacteria. The study of the different morphologies and mineralogies produced by oxalotrophic bacteria in the laboratory shows that exopolysaccharides (EPS) and parietal polymers have a great influence on the nature of calcium carbonate crystals produced. In addition, abiotic crystallization of different polymorphs of calcium carbonate in an industrial EPS emphasizes EPS role in the formation of metastable phases and specific morphologies of calcium carbonate.

Considering these points, this study proposes the following model for the oxalate-carbonate cycle in soils. Plants produce an initial pool of oxalate. During wood and litter decay, saprophytic fungi produces a second pool of oxalate, increasing the release of oxalate crystals encased in plant tissues. These two pools of oxalates are consumed by oxalotrophic bacteria resulting in a pH increase and a concomitant calcium carbonate precipitation.

Avant-propos

Contenu de cette thèse

Cette thèse a commencé il y a quatre ans et quelques mois. Le sujet proposé était l'étude du cycle oxalate-carbonate autour des irokos. Il s'agissait d'un sujet interdisciplinaire nécessitant la collaboration d'un géologue et d'un microbiologiste. Après quatre années, trois campagnes de terrains en Afrique et une en Espagne, cette thèse présente le cycle oxalate-carbonate du point de vue du microbiologiste. Elle ne donne en ça qu'une image partielle de ce cycle. Ce travail est donc indissociable l'approche géologique du cycle oxalate-carbonate faite par Guillaume Cailleau avec qui j'ai eu la chance de collaborer tout au long de ce travail.

Cette thèse s'organise en sept chapitres. Les deux premiers chapitres donnent les bases théoriques et méthodologiques nécessaires à la lecture de ce travail. Les trois chapitres suivants exposent et discutent les résultats obtenus au long de ces quatre dernières années. Ces trois chapitres correspondent de manière grossière aux articles publiés dans différentes revues scientifiques. Finalement les deux derniers chapitres présentent une discussion globale des résultats exposés auparavant et essaient de donner une vision plus large du cycle oxalate-carbonate.

Un nombre volontairement limité d'annexes figurent à la fin de ce manuscrit. Parmi celles-ci, les articles scientifiques publiés durant cette thèse traitant des aspects microbiologiques et géologiques du cycle oxalate-carbonate. Pour des raisons administratives (cession de droits d'auteurs), certains de ces articles ne sont pas complets. Néanmoins les personnes intéressées sont encouragées à prendre contact avec l'un ou l'autre des auteurs pour se les procurer.

Remerciements

Ce travail doit beaucoup aux personnes qui m'ont entouré pendant ces quatre années de thèse. Je remercie en particulier à Guillaume Cailleau avec qui j'ai partagé ce sujet de thèse, ainsi que de nombreux moments de discussion ou de franches rigolades que se soit sur le terrain, au laboratoire, ou dans le bureau. J'aimerais aussi montrer ma gratitude au professeur Eric Verrecchia et au professeur Michel Aragno qui m'ont confié ce sujet de thèse. Eric a suivi le déroulement de cette thèse avec bienveillance pendant quatre années, et j'ai beaucoup appris de lui. Michel Aragno a consacré beaucoup de temps à ce manuscrit et qui m'a permis de rendre un manuscrit final est bien meilleur que la version originale. Ces deux directeurs m'ont accueilli au sein de leurs équipes de recherche respectives, l'institut de géologie (IGUN) et le laboratoire de microbiologie (LAMUN). Je tiens ici à remercier tous les membres de ces deux unités de recherche qui m'ont accueilli chaleureusement, et m'ont toujours soutenu.

De même ce travail doit aussi énormément à toutes les personnes qui ont contribué à ma formation. Le docteur Massoud Dadras, Mireille Leboeuf, Michèle Vlimand et le Professeur Diehl m'ont tous énormément appris à propos de la microscopie électronique. Philipp Steinmann m'a permis de compléter mes connaissances en chromatographie. Vanessa Di Marzo m'a permis de me réapprendre les techniques de biologie moléculaire qui ont beaucoup évolué depuis mon diplôme. Le docteur Thierry Adatte a pris le temps de me montrer les bases en ce qui concerne la diffraction des rayons X et qui a passer un grand nombre d'échantillons pour moi. Finalement je dois aussi beaucoup à Christophe Dupraz qui m'a fait découvrir un grand nombre de systèmes géologiques où les bactéries

sont impliquées ; Christophe m'a aussi beaucoup appris sur les carbonates, la sédimentologie et les microbialites.

Je tiens à adresser un merci tout particulier au docteur Neree Onguene Awana qui m'a permis de découvrir les multiples visages de l'Afrique et qui m'a accueilli au sein de son laboratoire à Yaoundé. L'aide de Jean-Marie Gargouille et de la SEFN a aussi été d'une grande importance dans les missions effectuées au nord Cameroun. Je remercie aussi Léonard Kaboré et Eslain Bomisso pour leur aide en Côte d'Ivoire, ainsi que le Centre Suisse de Recherche Scientifique (CSRS-Abidjan) qui a mis ses infrastructures à notre disposition.

A tous les autres, Cyril Dommergues, Laurent Chalumeau, Michèle Lettingue, Claire Rambeau, Nicole Jeanneret, Sonia Tarnawski, Nadia Khammar et Jérôme Hamelin pour les discussions scientifiques (ou pas...), pour leur aide sur le terrain et pour tous les autres bons moments passé à Neuchâtel.

Merci aussi à ID software, EPIC, Activision, Digital Extreme, Gray Matter, BioWare et au programmeur de l'année 2004 (aka grOOn) pour des logiciels utiles et agréables... Qui ne plantent pas eux.

Ce travail a été soutenu financièrement par le Fond National Suisse de la Recherche (FNS), par les fonds Wuthrich et Matthey-Dupraz ainsi que par l'Association Suisse des Sciences Naturelles (ASSN).

Chapitre 1: introduction

Ce chapitre a pour but de fournir les bases nécessaires à la lecture de cette thèse, de présenter la problématique étudiée dans celle-ci, et finalement d'expliquer en quoi cette problématique est importante pour notre environnement. Parmi ces bases figurent un rappel des propriétés principales des oxalates et des carbonates qui seront les deux principales molécules abordées dans cette thèse, et une rapide description des organismes qui sont capables d'interagir avec ces deux molécules.

L'acide oxalique et l'oxalate de calcium

Les différentes formes de l'acide oxalique et des oxalates de calcium (Figure 1) ont des propriétés physiques, chimiques et minéralogiques très différentes (Table 1, 2 et 3). La connaissance des propriétés physiques et chimiques de l'acide oxalique permet d'appréhender le comportement et les réactions de cette molécule dans son environnement ainsi qu'en laboratoire. C'est sur la base des propriétés chimiques et physiques de l'acide oxalique que celui-ci est purifié ou quantifié par exemple. Les propriétés minéralogiques des oxalates de métaux permettent, quant à elles, d'identifier ceux-ci, ainsi que de les séparer en vue d'analyses ultérieures.

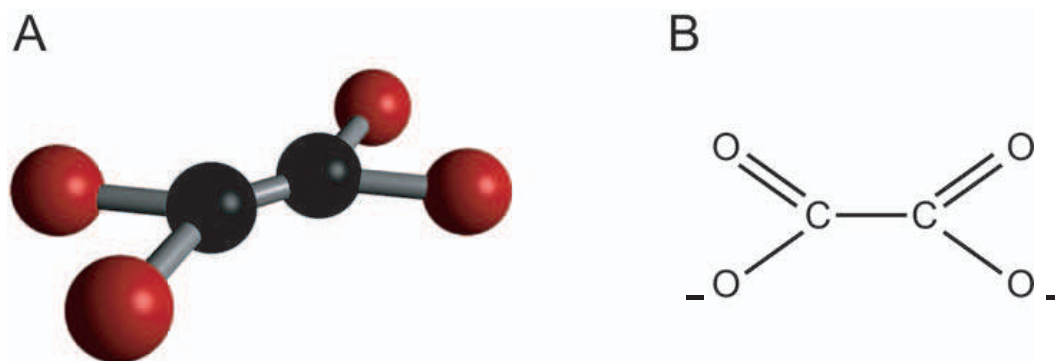


Figure 1: A: Modèle de l'anion oxalate. B: Représentation schématique de l'anion oxalate. A: *Oxalate anion model.* B: *Schematic representation of the oxalate anion.*

Propriétés physiques

L'acide oxalique ou éthanedioïque (selon la nomenclature IUPAC) est le plus simple des diacides organiques avec pour formule chimique $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ou $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pour sa forme dihydratée. Sous forme anhydre, l'acide oxalique se présente sous forme de cristaux octaédriques allongés ou pyramidaux ; la maille de ses cristaux étant orthorhombique. Sous cette forme, il a une densité de 1.9 ($d^{17^\circ} = 1.9$). L'acide oxalique dihydrate se présente lui sous forme de granules, de cristaux prismatiques ou de cristaux en tablettes monocliniques (O'Neil et al. 2001). La forme dihydrate a une densité de 1.653 ($d^{18.5^\circ} = 1.653$). Les deux formes de l'acide oxalique se subliment entre 102°C et 157°C suivant les conditions de pression et de température.

Table 1: Propriétés physiques choisies des deux formes de l'acide oxalique. *Selected physical properties of both forms of oxalic acid.*

Nom	Formule	Apparence	Densité	T° de fusion	T° d'ébullition (sublimation)
Ac. oxalique	$H_2C_2O_4$	Poudre blanche cristalline	1.653	101-102 °C	
Ac. oxalique dihydrate	$H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$	Poudre incolore blanche ou cristalline	1.9	101-102 °C	149-160 °C

Propriétés chimiques

L'acide oxalique dihydrate, bien que constitué de deux groupes carboxyles, est souvent considéré comme un acide fort, ce qui n'est généralement pas le cas des autres acides organiques. Il a une masse moléculaire de 126.07 grammes par mole. Les constantes de dissociation des deux fonctions carboxyles sont respectivement $pK_1 = 1.27$ et $pK_2 = 4.28$. Cet acide est soluble dans l'eau, l'éthanol, l'éther et le glycérol, alors qu'il est pratiquement insoluble dans le chloroforme, le benzène et l'éther de pétrole (O'Neil et al. 2001). La présence des deux fonctions carboxyle sur l'acide oxalique en fait un ligand bidentique. Il a de ce fait une forte affinité pour les ions divalents tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , par exemple, et avec lesquels, il forme des sels quasiment insolubles dans l'eau ($K_{ps} = 4 \cdot 10^{-9} M^2$). Cette faible solubilité dans la phase aqueuse ($\simeq 63 \mu M$) est toutefois suffisante pour permettre la croissance de microorganismes. En effet, la constante d'affinité de ceux-ci pour différents substrats est de l'ordre du micromolaire. Néanmoins, ces sels restent solubles dans des acides forts comme l'acide nitrique (HNO_3) et l'acide chlorhydrique (HCl). L'acide oxalique perd son eau d'hydratation à une température de 100°C et se décompose en dioxyde de carbone (CO_2) et en acide formique (HCOOH) lorsqu'il est chauffé au-dessus de 180 °C (Hart et Conia 1995). L'acide formique produit lors de cette première étape se décomposera lui-même en dioxyde de carbone (CO_2) et en eau (H_2O). De même l'oxalate de calcium perd son eau d'hydratation à 200°C et se décompose en carbonate de calcium ($CaCO_3$), monoxyde et dioxyde de carbone (CO , CO_2) et en oxyde de calcium (CaO) lorsqu'il est brûlé (avec des températures supérieures à 500°C - Echigo et al. 2005).

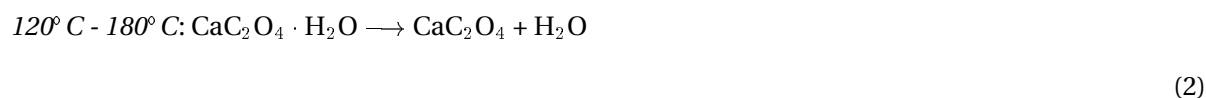
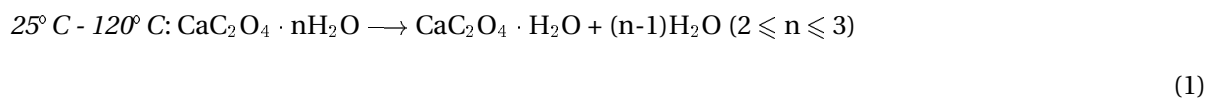
Table 2: Propriétés chimiques choisies des deux formes de l'acide oxalique. *Selected chemical properties of both forms of oxalic acid.*

Propriétés	Valeur
Mr de la forme anhydre	90.03 grammes par mole
Mr de la forme dihydrate	126.05 grammes par mole
pKs	$pK_1 = 1.27; pK_2 = 4.28$
pH en solution aqueuse 0.1 N	1.3
Solubilité	142.86 grammes par litre
Produits de solubilités des sels	$K_{ps} Ca\text{-oxalate} = 4 \cdot 10^{-9} M^2$ $K_{ps} Mg\text{-oxalate} = 7 \cdot 10^{-7} M^2$ $K_{ps} Sr\text{-oxalate} = 4 \cdot 10^{-7} M^2$

Propriétés minéralogiques

Les deux formes de l'acide oxalique ainsi que de nombreux sels de l'acide oxalique sont décrits comme minéraux (Table 3 ; Sterling 1964a, 1964b, Deganello et al. 1981, Tazzoli et Domeneghetti 1980, Wilson et al. 1980). Parmi ceux-ci, les sels de calcium sous forme d'oxalate de calcium anhydre (CaC_2O_4), de whewellite ($CaC_2O_4 \cdot H_2O$), de weddellite ($CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$) et de caoxite ($CaC_2O_4 \cdot$

3H₂O) ainsi que l'oxalate de magnésium sous forme de glushinskite (MgC₂O₄ · 2H₂O) sont les plus fréquents. Les principales caractéristiques minéralogiques de ces cristaux sont résumées dans le tableau 4. La figure 2 représente quant à elle les diffractogrammes des formes les plus fréquentes. Il est possible pour les oxalates de calcium de passer d'une minéralogie à une autre lors de l'exposition à des températures élevées. En effet, chauffés, les oxalates perdent leur eau d'hydratation (équations 1 - 4 ; Echigo et al. 2005)



Nd: Pour être rigoureux du point de vue chimique, la distinction entre l'acide oxalique anhydre et l'acide oxalique dihydrate a été faite dans cette partie. Néanmoins, pour des raisons de simplification, cette distinction ne sera plus faite par la suite. De même le terme oxalate désignera par la suite l'ensemble des anions oxalates (acide oxalique + oxalate de métaux).

L'oxalate dans la biosphère

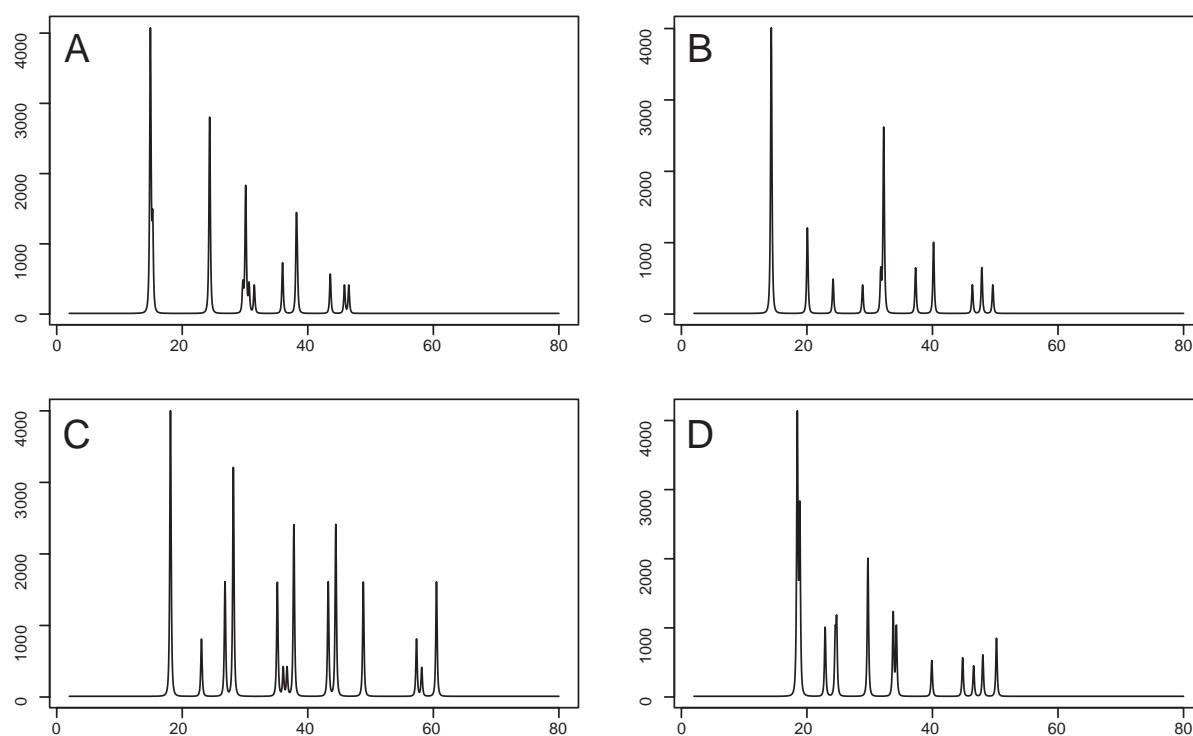
L'acide oxalique ainsi que les oxalates de calcium ou de magnésium, sont très répandus dans la biosphère. On peut qualifier la molécule d'oxalate d'ubiquiste. On trouve des oxalates aussi bien dans certaines roches que chez les végétaux, les animaux et certains unicellulaires. Les prochains paragraphes montrent les différentes origines possibles des oxalates, leur production et leur dégradation.

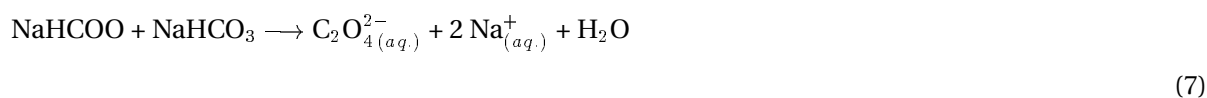
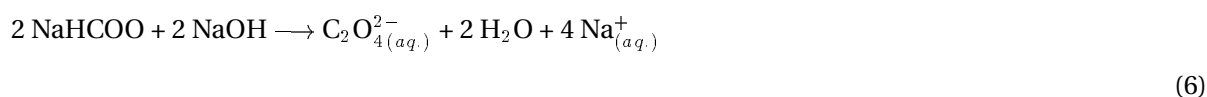
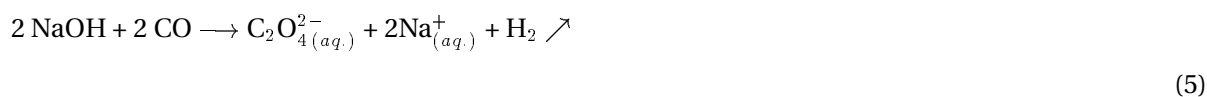
Oxalates abiotiques

L'acide oxalique peut se former de manière complètement abiotique par réaction du monoxyde de carbone avec une base telle que l'hydroxyde de sodium (NaOH) (équ. 5) ou par réaction à chaud de l'acide formique (HCOOH) avec des sels basiques de sodium comme le carbonate de sodium (Na₂CO₃) ou l'hydroxyde de sodium (équ. 6 - 7). Ces réactions utilisées dans l'industrie sont tout à fait susceptibles d'expliquer la présence d'oxalates associés à des fluides hydrothermaux, ou à des phénomènes diagénétiques (Hofmann et Bernasconi 1998, O'Neil et al. 2001). A l'exception de la production industrielle, l'oxalate produit de manière abiotique dans la biosphère ne représente qu'une faible proportion en regard de ce qui est produit par des organismes.

Table 3: Propriétés minéralogiques de quelques oxalates. *Mineralogical properties of selected oxalate minerals.*

Nom	Whewellite	Weddellite	Caoxite	Glushinskite	Novgorodovaite	Humboldtine	Natroxalate
Formule	CaC_2O_4 $\circ H_2O$	CaC_2O_4 $\circ 2H_2O$	CaC_2O_4 $\circ 3H_2O$	MgC_2O_4 $\circ 2H_2O$	$Ca_2C_2O_4Cl_2$ $\circ 2H_2O$	FeC_2O_4 $\circ 2H_2O$	$Na_2C_2O_4$
Couleur	Incolore Blanc Brun Brun jaune	Incolore Blanc Brun Brun jaune	Incolore	Incolore Blanc	Incolore	Brun jaune Jaune	Incolore Blanc Jaune clair
Trace	Blanche	Blanche	Blanche	Blanche	Blanche	Jaune clair	Blanche
Transparence	Transparent Translucide	Transparent	Transparent		Transparent	Transparent Terne	Transparent
Lustre	Vitreux	Vitreux	Vitreux		Vitreux	Terreux	Vitreux
Dureté	2.5 - 3.0	4.0	2.0 - 2.5	2.0	2.5	1.5 - 2.0	3.0
Clivage	[101] Bon [010] Bon [110] Bon	[010] Bon		[010] Bon	[100] Bon [010] Bon	[110] Parfait [100] Indistinct [010] Indistinct	[100] Parfait [001] Indistinct
Fracture	Friable		Inégale		Fragile		Fragile
Habitus	Granulaire Prismatique		Sphérique Tabulaire	Pyrammidal	En agrégats	Prismatique	
Densité	2.21 - 2.23	2.02	1.85	1.85	2.38	2.28	2.32

Figure 2: Diffractogrammes des oxalates courants: A) whewellite, B) weddellite, C) glushinskite, D) humboldtine. En abscisse l'angle (2θ) en ordonnée l'intensité relative. *X-Ray Diffractograms of common oxalate minerals : A) whewellite, B) weddellite, C) glushinskite, D) humboldtine. The angle (2θ) is shown on the x-axis and the relative intensity on y-axis.*



Oxalates associés aux systèmes biologiques

On trouve de l'acide oxalique associé à tous les grands groupes vivants: les animaux, les plantes, les mycètes et les procaryotes. Les fonctions de l'acide oxalique et des oxalates de calcium dans les organismes peuvent être très diverses. Chez les plantes, l'acide oxalique sert à la régulation du calcium libre dans le cytoplasme des cellules (McLaughlin et Wimmer 1999, Robert et Roland 1989) et à la nutrition lorsqu'il est sécrété par des racines (Jones 1998). Les cristaux d'oxalate de calcium servent à la protection contre le broutage, au renforcement mécanique des cellules végétales (Ruiz et al. 2002, Schneider 1901), ainsi qu'à la diffusion de la lumière aux chloroplastes entourant la vacuole (Franceschi 2001). Chez les champignons, l'acide oxalique est essentiellement considéré comme un agent pathogène; il affaiblit la lamelle moyenne des parois végétales en chélatant le calcium de celles-ci (Dutton et Evans 1996). Chez les animaux, l'acide oxalique est considéré comme toxique (LD50rat = 1450 mg / kg - LDX = N; X% de rat morts après l'absorption de la dose N de produit), et les cristaux d'oxalate de calcium ont le plus souvent une origine pathologique. Néanmoins chez certains insectes, la cuticule peut être renforcée par des incrustations d'oxalate de calcium. Pour finir une "fonction" indirecte des oxalates est de fournir aux bactéries capables de l'utiliser une source de carbone et d'énergie (Tamer et Aragno 1980). De manière simpliste, on peut donc diviser les organismes vivants en deux catégories: les producteurs et les consommateurs d'oxalate.

Les producteurs d'oxalates

Les plantes

On trouve de l'acide oxalique et des oxalates de calcium en quantité variable dans quasiment tous les grands groupes de plantes (Annexe 1). L'acide oxalique se trouve dans le cytoplasme, la sève et les exsudats racinaires, alors que les cristaux d'oxalate de calcium se trouvent essentiellement dans le vacuome des cellules végétales. Chez certaines plantes comme *Cactus senilis*, l'oxalate de calcium peut représenter jusqu'à 85% du poids sec de la plante (Robert et Roland 1989). On le trouve en quantité plus modeste dans beaucoup de plantes comestibles (Table 4); ceci permet de se rendre compte des quantités d'oxalates présentes dans l'environnement. Chez les plantes, la biosynthèse de l'acide oxalique est associée à la photosynthèse. Elle se fait à partir de l'acide glycolique produit lors de la réaction de photorespiration (Figure 3). L'acide glycolique produit dans les chloroplastes est transporté dans le peroxysome où il est transformé en acide glyoxylique par la glycolate deshydrogénase (EC : 1.1.99.14) ou par la glyoxylate réductase (EC : 1.1.1.26). Le glyoxylate est ensuite transformé en acide oxalique par la glyoxylate oxydase (EC : 1.2.3.5), avant d'être transféré à la vacuole (Robert et Roland 1980). La synthèse d'acide oxalique peut aussi se faire à partir d'ascorbate, mais cette voie reste assez mal connue (Franceschi et Nakata 2005). Les oxalates de calcium que l'on trouve chez les plantes peuvent avoir différentes minéralogies et morphologies (Figure 4), ce qui fait des oxalates de calcium un critère taxonomique intéressant (Monje et Baran 2002, 2004). Généralement, la forme minéralogique la plus commune chez les plantes est la whewellite.

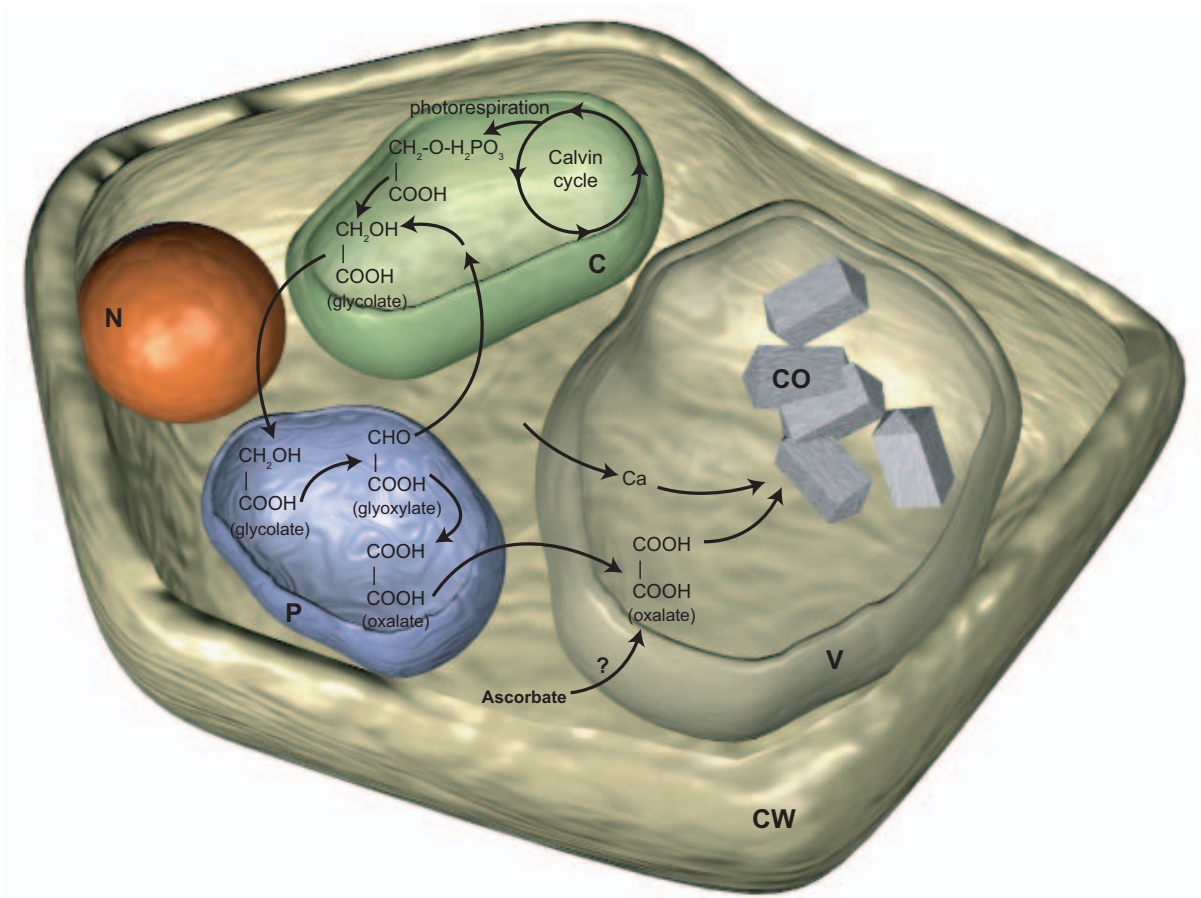


Figure 3: Voie de synthèse de l'acide oxalique dans les cellules végétales. N) noyaux, C) chloroplaste, P) peroxyssome, V) vacuole, CW) paroi cellulaire, CO) cristaux d'oxalate de calcium. *Oxalate synthesis pathway in vegetal cells. N) noyaux, C) chloroplaste, P) peroxyssome, V) vacuole, CW) cell wall, CO) calcium oxalate crystals.*

Table 4: Quantités d'oxalates et de calcium dans quelques plantes comestibles. Les quantités d'oxalates et de calcium sont exprimées en milligramme pour 100 grammes de plante. *Oxalate and calcium concentrations in selected edible vegetables, expressed in milligramms per 100 grams of plants.*

Nom vernaculaire	Nom latin	Oxalate	Calcium
Brocoli	<i>Brassica italica</i>	610	42
Chou cavalier	<i>Brassica oleracea viridis</i>	450	218
Chou vert frisé	<i>Brassica oleracea fimbriata</i>	20	90
Carotte	<i>Daucus carotta</i>	500	30
Panais	<i>Pastinaca sativa</i>	40	70
Persil	<i>Petroselinum sativum</i>	1700	122
Laitue romaine	<i>Lactuca sativa romana</i>	330	20
Epinard	<i>Spinacia oleracea</i>	970	51
Courges	<i>Cucurbita spp.</i>	20	36
Patate douce	<i>Ipomoea batatas</i>	240	29
Cresson	<i>Nasturtium officinale</i>	310	53

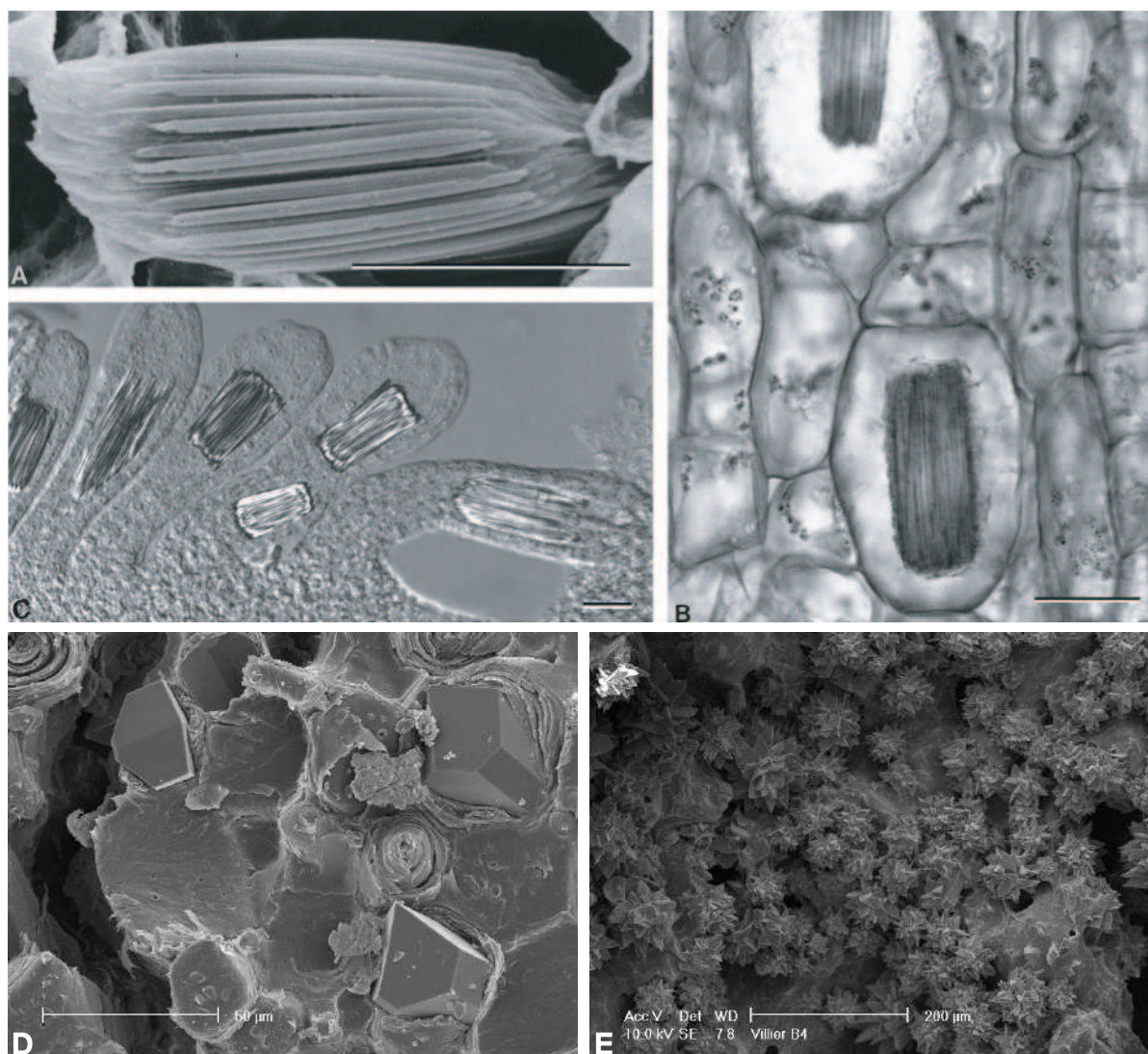


Figure 4: Morphologies des cristaux d'oxalate de calcium chez les plantes. A-C) Raphides dans des tissus végétaux, d'après Prychid et Rudall 1999 (échelle = 20 μm). A) Microscopie électronique d'un faisceau de cristaux dans le parenchyme de *Lachenalia bulbifera*. B) Microscopie optique de cristaux trouvés chez *Liriope platyphylla*. C) Microscopie optique d'un fagot de cristaux dans les tépales de *Conanthera campanulata*. D) Microscopie électronique de cristaux euhédraux trouvé dans l'écorce de *Milicia excelsa*. E) Microscopie électronique de druses trouvée dans les tissus parenchymateux d'*Opuntia* sp. Calcium oxalate crystal morphologies in different plants. A-C) Raphides found in plant tissues, after Prychid et Rudall 1999 (scale bar = 20 μm). A) Electron microscopy of a raphide bundle in parenchymatous tissues from *Lachenalia bulbifera*. B) Light microscopy of crystals found in *Liriope platyphylla*. C) Light microscopy of a raphide bundle in the tepals of *Conanthera campanulata*. D) Electron microscopy of euohedral crystals found in *Milicia excelsa* wood bark. E) Druse crystals found in the parenchyma of *Opuntia* sp.

Les champignons

La production d'acide oxalique est commune chez beaucoup de champignons saprophytes (Arnott 1995, Dutton et Evans 1996, Gadd 1999, Verrecchia 2000). Chez ceux-ci, la synthèse de l'oxalate semble dépendre de la présence de glucose ou de citrate dans le milieu. Deux voies peuvent mener à la production d'oxalate, la première est l'hydrolyse d'une molécule d'oxaloacétate par l'oxaloacétate acétylhydrolase (EC : 3.7.1.1), la seconde passe par l'oxydation du glyoxylate en oxalate par la glyoxylate oxydase (EC : 1.2.3.5) (Figure 5). L'acide oxalique ainsi produit est ensuite sécrété. Il résulte de cette sécrétion la formation de cristaux d'oxalate de calcium sur les hyphes du mycélium fongique (Arnott 1995). Ces cristaux ont des morphologies bien distinctes, de telle sorte qu'il est souvent possible d'identifier la minéralogie au microscope électronique à balayage (MEB ou SEM).

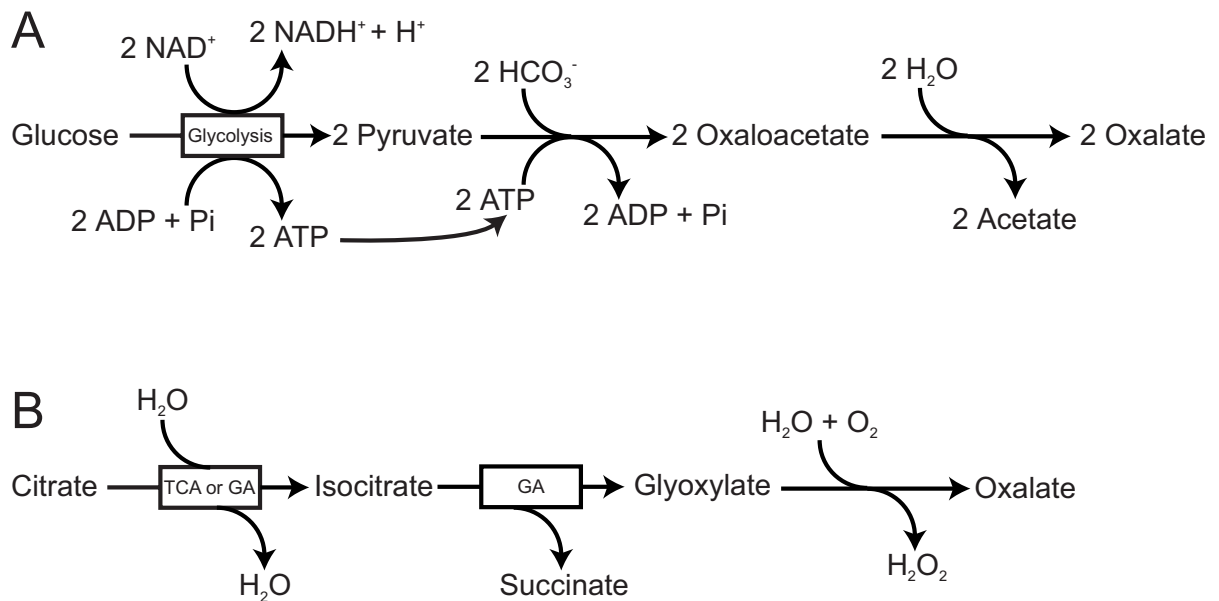


Figure 5: Voie de synthèse de l'acide oxalique chez les champignons. A) synthèse à partir du glucose. Dans ce cas la première étape est la glycolyse. Le pyruvate ainsi produit est transformé en oxaloacétate par la pyruvate-carboxylase (EC: 6.4.1.1). Finalement l'oxaloacétate produit est hydrolysé pour former de l'oxalate et de l'acétate. B) synthèse à partir du citrate. Dans ce cas le citrate est transformé en isocitrate puis en glyoxylate, partageant ainsi des étapes du cycle des acides tricarboxyliques et du cycle du glyoxylate. Le glyoxylate est finalement oxydé en oxalate par la glyoxylate oxydase (EC: 1.2.3.5) *Oxalic acid synthesis pathway in fungi. A) synthesis from glucose. The first step here is the production of pyruvic acid through the glycolysis. The pyruvic acid produced is transformed in oxaloacetic acid by the pyruvate-carboxylase (EC: 6.4.1.1). Finally the oxaloacetic acid is hydrolyzed into oxalic acid and acetic acid. B) synthesis from citrate. In this case, citric acid is transformed into isocitric acid and glyoxylic acid. This step uses enzymes from the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylic acid cycle. Finally the oxalic acid is formed by the oxydation of glyoxylic acid by the glyoxylate-oxydase (EC: 1.2.3.5)*

Les bactéries

Chez les procaryotes la production d'oxalate n'a été que rarement signalée. Deux cas ont été décrits par Hamel et al. (1999) chez *Pseudomonas fluorescens* où la production d'oxalate sert à la détoxification de l'aluminium, et par Kasai et al. (1962) chez *Acinetobacter dioxeticus*.

Les dégradeurs d'oxalates

Les plantes et les champignons

Bien que les champignons et les plantes ne soient pas capables de consommer l'oxalate au sens strict, ils possèdent des enzymes capables de dégrader l'acide oxalique. La fonction la plus probable de ces enzymes étant de détoxifier l'acide oxalique produit par ces organismes. Chez les végétaux, l'oxalate oxydase (EC : 1.2.3.4) transforme l'oxalate en dioxyde de carbone et peroxyde d'hydrogène (équ. 8). Le peroxyde d'hydrogène est lui-même détoxifié par une catalase ou une peroxydase. Chez les champignons, l'enzyme responsable de la dégradation de l'oxalate est l'oxalate décarboxylase (EC : 4.1.1.2). Elle transforme l'acide oxalique en acide formique (équ. 9). L'acide formique ainsi produit sera dégradé par une formiate déshydrogénase (EC : 1.2.1.2).



Les bactéries

Seul un nombre limité de bactéries est capable de croître en utilisant de l'oxalate (Chandra et Shethna 1975, Dijkhuisen et al. 1977, Harder et al. 1974, Sahin 2003, Tamer et Aragno 1980 - table 5). Néanmoins ce sont les véritables consommatrices d'oxalate. Chez ces bactéries dites oxalotrophes, l'oxalate sert de source d'énergie et de source de carbone. La dégradation de molécules d'acide oxalique (catabolisme - Figure 6) va fournir l'énergie nécessaire à l'assimilation du carbone présent dans d'autres molécules d'acide oxalique (anabolisme - Figure 7,8). Chez les bactéries aérobies, la première étape de la dégradation de l'acide oxalique est effectuée par la formyl-CoA transférase (EC : 2.8.3.16). Cette enzyme transfère le coenzyme A sur l'oxalate produisant ainsi de l'oxalyl-CoA. L'oxalyl-CoA est ensuite transformé en formyl-CoA et CO_2 par l'oxalyl-CoA décarboxylase (EC : 4.1.1.8). La formyl-CoA transférase intervient une seconde fois, elle transfère le coenzyme A du formyl-CoA produit à l'étape précédente sur une nouvelle molécule d'oxalate formant ainsi du formate. Finalement, le formiate est transformé en CO_2 par la formiate déshydrogénase. C'est cette dernière étape qui, en réduisant le NADP en $\text{NADPH} + \text{H}^+$, va permettre la production d'énergie. Il existe une variante de cette voie où la formyl-CoA transférase est remplacée par la succinyl-CoA transférase (EC : 2.8.3.2). Chez les bactéries anaérobies comme *Oxalobacter formigenes*, la dégradation de l'oxalate commence de façon similaire à ce qui a été décrit précédemment. En revanche, la production d'énergie se fait de manière différente (Alisson et al. 1980, Lengeler et al. 1999 - figure 6). Chez *Oxalobacter* cette dégradation commence avec l'entrée d'un anion oxalate dans la cellule via l'oxalate-formiate antiporteur. Une molécule de coenzyme A est ensuite ajoutée à l'oxalate par la formyl-CoA transférase (EC : 2.8.3.16). L'oxalyl-CoA ainsi formé est décarboxylé par l'oxalyl-CoA décarboxylase (EC : 4.1.1.8) pour produire du formyl-CoA, et du CO_2 . Durant cette étape un proton est consommé diminuant ainsi la concentration de ceux-ci dans la cellule. Ce dernier va être utilisé par la formyl-CoA transférase de la deuxième étape, recyclant ainsi le coenzyme A en le plaçant sur une nouvelle molécule d'oxalate et libérant du formiate. Le formiate ainsi produit ressort de la cellule par la même voie qui a permis l'entrée de l'oxalate, c'est-à-dire, via l'oxalate-formiate antiporteur. Le proton consommé lors de la décarboxylation de l'oxalyl-CoA assure une différence de pH entre les milieux intra- et extracellulaire. Le maintien de cette différence assure la production d'énergie cellulaire par l'intermédiaire de l'ATPase.

L'assimilation du carbone de l'oxalate commence aussi avec l'adjonction du coenzyme A à l'oxalate par la succinyl-CoA transférase (EC: 2.8.3.16). L'oxalyl-CoA ainsi formé va être transformé en glyoxylate par l'Oxalyl-CoA réductase (EC: 1.2.1.17). A ce stade deux voies d'assimilation divergent

Table 5: Bactéries oxalotrophes connues au commencement de cette thèse (modifié d'après Sahin 2003). *Oxalotrophic bacteria known at the beginning of this Ph. D. thesis (modified from Sahin 2003)*.

Nom	Synonymes	Anabolisme	Collection n°	Références
<i>Acinetobacter</i> sp.				Naasema et al. 1998
<i>Agrobacterium</i> bv 1			LMG 196	Lajudie et al. 1999
<i>Agrobacterium</i> sp.			NEU 1212	Sahin 2001
<i>Alcaligenes</i> sp.			NEU 45, 47, 105	Jenni et al. 2000
			CCM 2765	Chandra et Shethna 1975
<i>Ammoniphilus oxalaticus</i>	<i>Bacillus oxalophilus</i>	voie de la sérine	DSM 11538	Zaitsev et al. 1998
<i>Ammoniphilus oxalativorans</i>		voie de la sérine	DSM 11537	Zaitsev et al. 1998
<i>Ancylobacter</i> sp.			NEU 1210, 1211	Sahin 2001
<i>Azospirillum brasiliense</i>			ATCC 29145	Weber et al. 1999
<i>Azospirillum</i> sp.			NEU 1208	Sahin 2001
<i>Bacillus licheniformis</i>				Morris et Allen 1994
<i>Beijerinckia indica</i>			ATCC 9039	Becking et al. 1984
<i>Burkholderia glathei</i>	<i>Pseudomonas glathei</i>		ATCC 29195	Paleroni 1994, Zolg et Ottow 1975
<i>Burkholderia</i> sp.			NEU 1209	Sahin 2001
<i>Carbophilus carboxydus</i>	<i>Alcaligenes carboxydus</i>		DSM 1086	Meyer et al. 1993
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>			NCIMB 9442	Postgate 1963
<i>Eggertella lenta</i>	<i>Eubacterium lentum</i>		ATCC 25559	Ito et al 1996, Kageyama et al. 1999
<i>Enterococcus faecalis</i>				Hokama et al. 2000
<i>Hyphomicrobium vulgare</i>			ATCC 15444	Hirsch 1989
<i>Mesorhizobium</i> sp.				Tan et al. 1999
<i>Methylobacterium extorquens</i>	<i>Bacillus extorquens</i>		DSM 1337	Bassalik 1913
	<i>Pseudomonas extorquens AM1</i>	voie de la sérine		Blackmore et Quayle 1970
<i>Moorella thermoacetica</i>	<i>Clostridium thermoaceticum</i>		DSM 521	Collins et al. 1994, Daniel et Drake 1989
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	<i>Clostridium thermoautotrophicum</i>		DSM 1974	Collins et al. 1994, Daniel et Drake 1989
<i>Mycobacterium komossense</i>			ATCC 33013	Wayne et Kubica 1986
<i>Mycobacterium smegmatis</i>			ATCC 19420	Wayne et Kubica 1986
<i>Mycobacterium sphagni</i>			ATCC 33027	Wayne et Kubica 1986
<i>Nocardia</i> sp.	<i>Proactinomyces</i> sp.			Morris et Allen 1986, Müller 1950
<i>Oligotropha carboxydovorans</i>	<i>Pseudomonas carboxydovorans</i>		DSM 1227	Meyer et al. 1983
<i>Oxalicibacterium flavum</i>		voie du glycolate	LMG 21571	Tamer et al. 2002
<i>Oxalobacter formigenes</i>		voie du glycolate	ATCC 35274	Allison et al. 1985
<i>Oxalobacter vibrioformis</i>			DSM 5502	Dehning et Schink 1989, Smith et al. 1985
<i>Oxalophagus oxalicus</i>	<i>Clostridium oxalicum</i>		DSM 5503	Dehning et Schink 1989
<i>Providentia</i> sp.				Hokama et al. 2000
<i>Pseudomonas carboxydohydrogena</i>	<i>Seliberia carboxydohydrogena</i>		DSM 1083	Meyer et al. 1989, Palleroni 1984
<i>Pseudomonas rimaefaciens</i>			ATCC 23377	Khambata et Bhat 1953
<i>Pseudomonas</i> sp.			CCM 2765, 2766, 2767	Chandra et Shethna 1975
<i>Pseudomonas</i> sp.	OD1, OX53			Jayasuriya 1955, Koyama 1988
<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	voie du glycolate	DSM 531	Friedrich et al. 1979, Jenni et al 1988
<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	voie du glycolate	DSM 4182	Tamer et Aragno 1980, Tamer 1982
<i>Ralstonia oxalatica</i>	<i>Pseudomonas oxalaticus</i>	voie du glycolate	DSM 1105	Sahin et al. 2000, Khambata et Bhat 1953
<i>Saccharotrix aerocolonigenes</i>	<i>Nocardia aerocolonigenes</i>		NRRL B3298	Labeda 1992
<i>Saccharotrix cryophilis</i>	<i>Nocardia aerocolonigenes</i>		NRRL 16238	Labeda 1992
<i>Saccharotrix waywayandensiy</i>			NRRL B16134	Labeda 1992
<i>Saccharotrix albidocapillata</i>	<i>Lentza albidocapillata</i>		DSM 4403	Lee et al. 2000
<i>Starkeya novella</i>	<i>Thiobacillus novellus</i>	voie du glycolate	ATCC 8093	Chandra et Shethna 1975
<i>Streptomyces</i> spp.				Robel et Kutzner 1973, Knutson et al. 1980
<i>Variovorax paradoxus</i>	<i>Alcaligenes paradoxus</i>		DSM 645	Tamer et Aragno 1980
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>			DSM 431	Tamer et Aragno 1980
<i>Xanthobacter flavus</i>			DSM 338	Jenni et al. 1987
<i>Xanthobacter</i> sp.			DSM 338	Sahin 2000

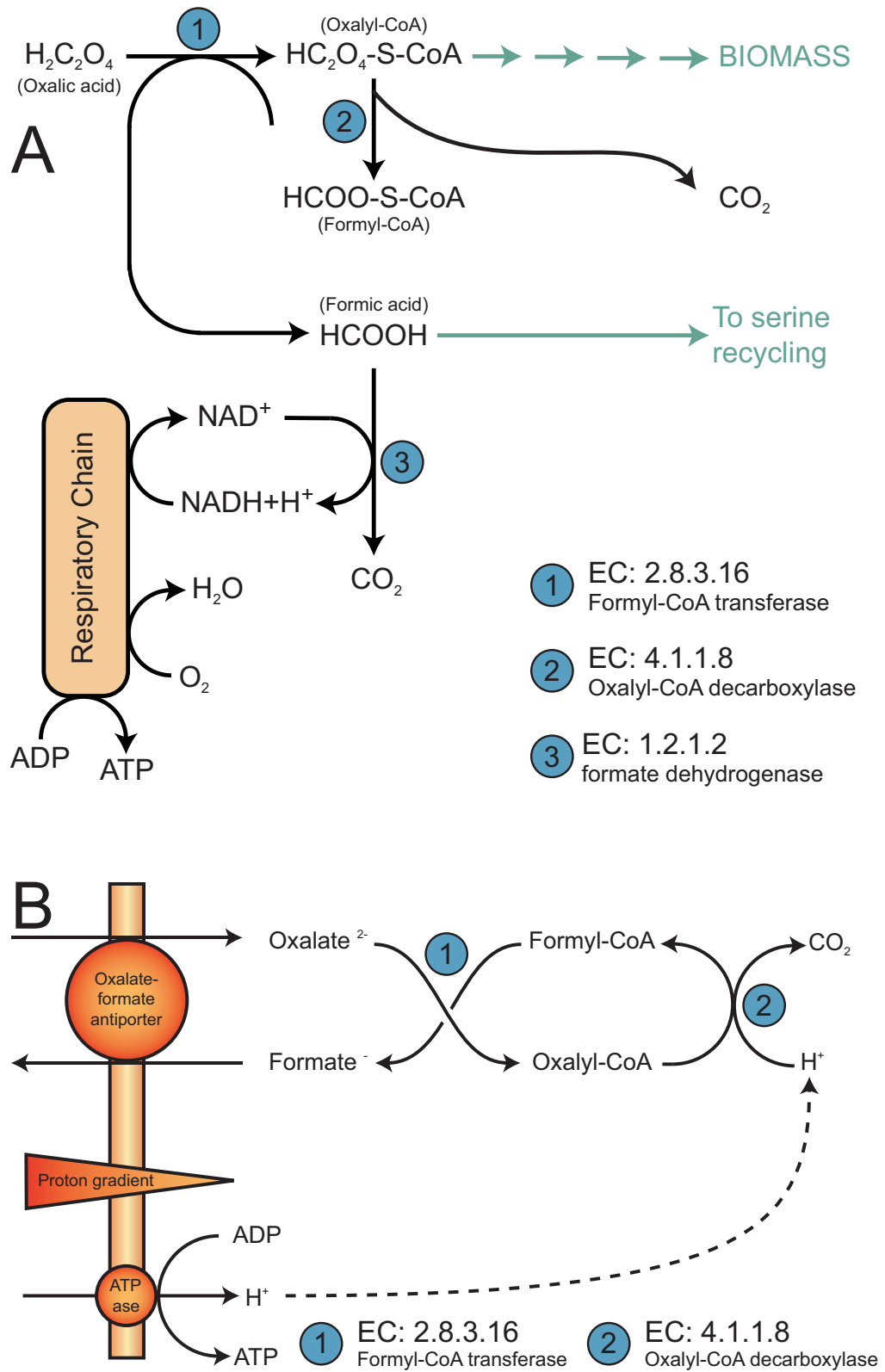


Figure 6: Voies de dégradation de l'oxalate chez les bactéries. A: Cas des bactéries aérobies. B: Cas d'*Oxalobacter formigenes*, une bactérie anaérobie (d'après Lengeler et al. 1999). *Oxalate degrading pathways in bacteria. A: pathway for aerobic bacteria. B: pathway for Oxalobacter formigenes, an anaerobic bacteria (after Lengeler et al. 1999).*

; la voie du glycolate et la voie de la sérine (Figure 7,8 - Sahin 2003). La voie du glycolate, la plus commune, commence avec la glyoxylate carboligase (EC: 4.1.1.47), qui va transformer le glyoxylate en semialdéhyde de tartronate. Puis l'action de la tartronic semialdéhyde réductase (EC: 1.1.1.60) va former du glycérate. Le glycérate sera lui-même transformé en 3-phospho-glycérate par la glycérate kinase (EC: 2.3.7.2). Le 3-P-glycérate est considéré comme le point de départ des mécanismes de biosynthèse. La voie de la sérine commence par la transformation du glyoxylate en hydroxypyruvate par la sérine-glyoxylate aminotransférase (EC: 2.6.1.45). L'hydroxypyruvate est réduit par l'hydroxypyruvate réductase (EC: 1.1.1.81) pour donner du glycérate. Finalement, on obtient du 3-P-glycérate de la même manière que pour la voie précédente. Une seule exception à ces voies métaboliques a été décrite à l'heure actuelle; la dégradation de l'oxalate par une oxalate oxidase sans utilisation de celui-ci par *Pseudomonas* OX53 (Koyama 1969).

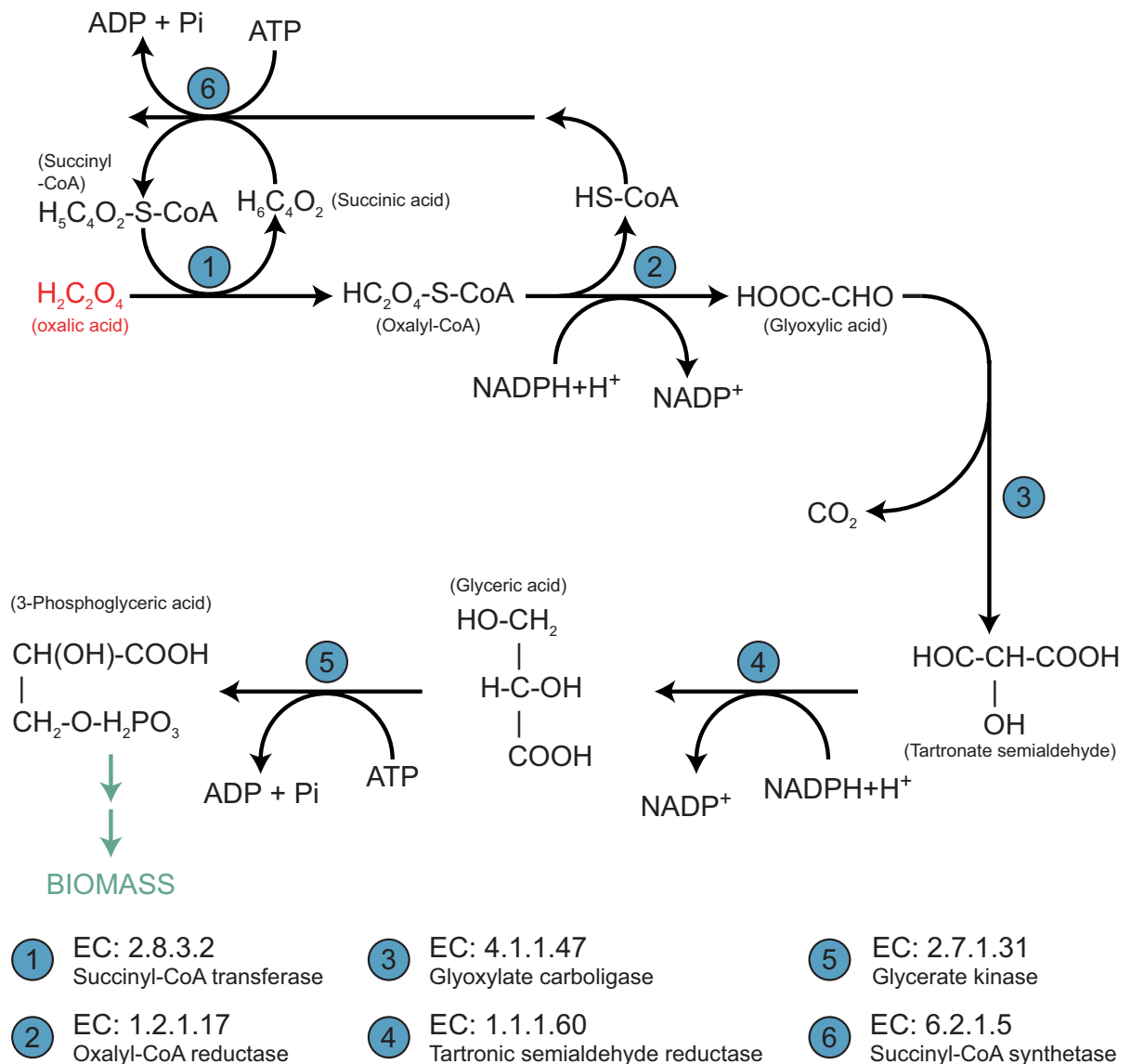


Figure 7: Voie du glycolate chez *P. oxalaticus* OX1 (modifié d'après Dijkhuizen et al 1977 et Sahin 2003).
Glycolate pathway in P. oxalaticus OX1 (modified from Dijkhuizen et al 1977 and Sahin 2003.)

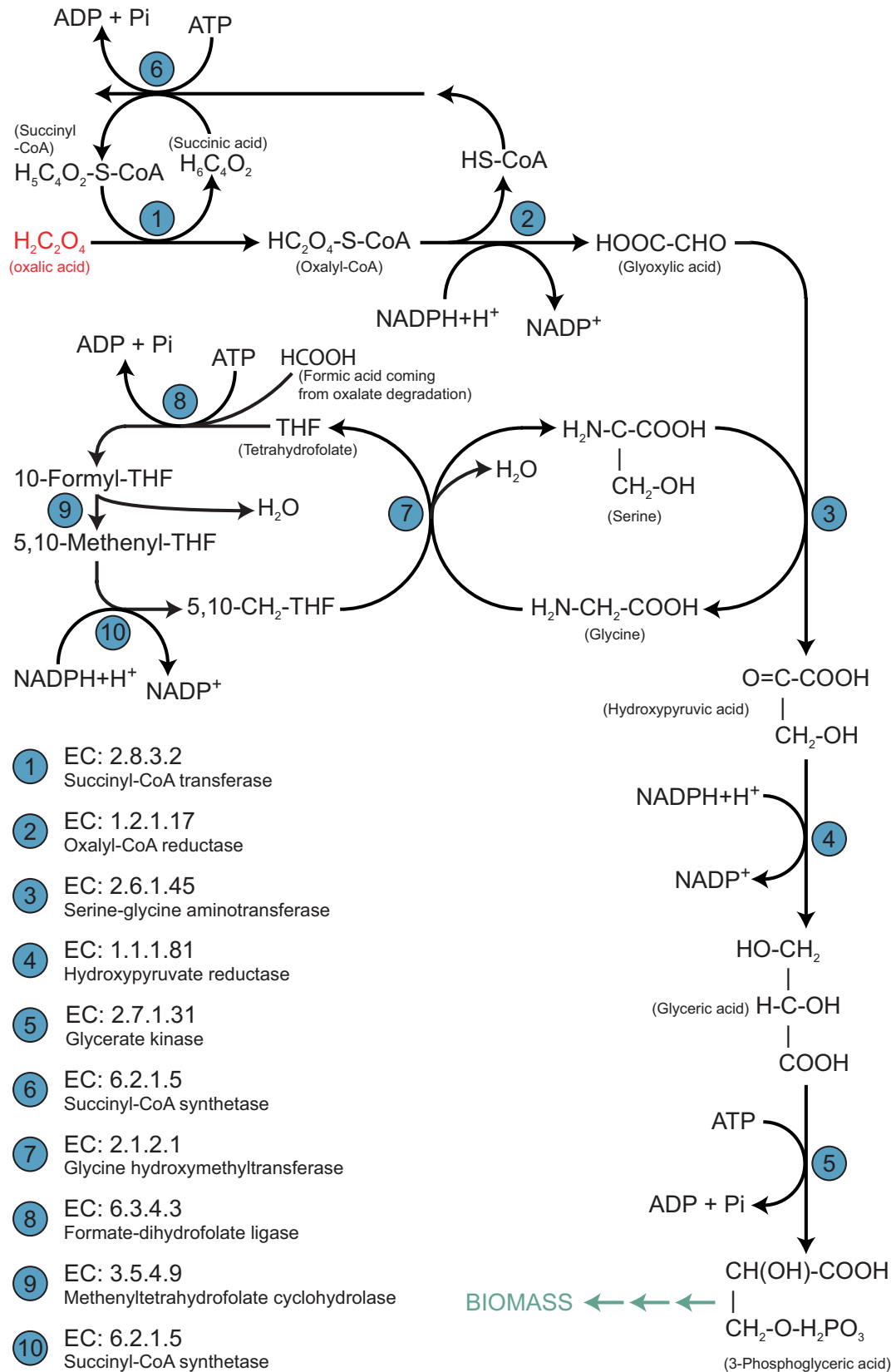
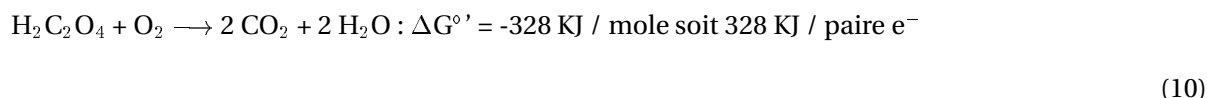


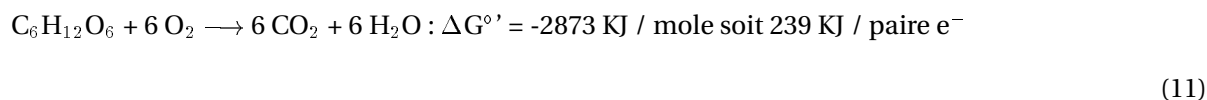
Figure 8: Voie de la sérine chez *Pseudomonas* AM1 (modifié d'après Blackmore et Quayle 1970). Serine pathway in *Pseudomonas* (modified from Blackmore and Quayle 1970.)

D'un point de vue thermodynamique, il est possible à une bactérie de tirer de l'énergie et de croître de ces réactions (équ. 10). Mais la consommation d'oxalate fournit très peu d'énergie par mole de substrat si l'on compare avec le glucose. (équ. 10 et 11). En revanche l'acide oxalique est un très bon donneur d'électrons. Si l'on compare le glucose qui donne 12 paires d'électrons et l'oxalate qui n'en fournit qu'une seule, on s'aperçoit que par paire d'électrons l'oxalate est un substrat intéressant. En effet l'oxalate fournit 328 kJ par paire d'électrons alors que le glucose n'en fournit que 239 kJ (2873 kJ / 12 paires d'électrons - ici par abus de langage, paire d'électrons = 2 moles d'électrons).

Oxydation de l'acide oxalique



Oxydation du glucose



Le cycle oxalate-carbonate

Le cycle oxalate-carbonate fait le lien entre la partie biologique et la partie géologique de ce travail. Au cours de ce cycle, les oxalates sont transformés en carbonates. La production et la consommation des oxalates relèvent de la biologie. En revanche, les carbonates produits semblent relever du domaine de la géologie en première approximation. Cette partie va décrire rapidement le cycle oxalate-carbonate et le replacer dans son contexte biogéochimique. Par la suite ce cycle sera regardé du point de vue de la microbiologie, la partie plus géologique faisant l'objet d'une autre thèse (Cailleau 2005). Ces deux approches se complètent pour donner une vision globale et pluridisciplinaire de la transformation oxalate-carbonate.

Introduction au cycle oxalate-carbonate

La partie précédente a présenté la production et la dégradation des molécules d'oxalates dans les systèmes vivants. L'oxalate est issu à l'origine de CO_2 atmosphérique utilisé par la plante. Les champignons saprophytes, quant à eux, se nourrissent de tissus végétaux pour produire leur oxalate, cet oxalate provenant donc indirectement du CO_2 atmosphérique, via les plantes. L'ensemble de cet oxalate est dégradé par les bactéries redevant ainsi du CO_2 . Il existe donc un cycle biogéochimique de l'oxalate impliquant les plantes, les champignons et les bactéries. Ce cycle ne concerne pas que le CO_2 et les oxalates, mais aussi les carbonates, en particulier le carbonate de calcium (CaCO_3). En effet, une partie du CO_2 produit pendant la dégradation des oxalates peut réagir avec l'eau du sol pour former des ions carbonate (CO_3^{2-}) et hydrogénocarbonate (HCO_3^-). Ces ions vont ensuite réagir avec le calcium en solution pour former du carbonate de calcium (Figure 9 A). Par la suite, si les conditions du milieu changent, le carbonate de calcium peut à nouveau être dissous selon le même principe et libérer à nouveau du CO_2 vers l'atmosphère. L'ensemble de ces réactions forme le cycle oxalate-carbonate (figure 9 A et B) postulé sous différentes formes par Cromack et al. (1977) et par Verrecchia (1990). Une des différences majeure entre ces 2 visions du cycle oxalate carbonate réside dans la formation du carbonate de calcium. En effet, si Verrecchia (1990) met en avant la formation de carbonate de calcium, ce n'est pas le cas de Cromack et al. (1977). Celui-ci intéressé à l'habitat particulier que sont les tractus digestifs de la microfaune du sol n'a peut-être pas eut l'occasion d'observer la formation de carbonate de calcium *in situ*.

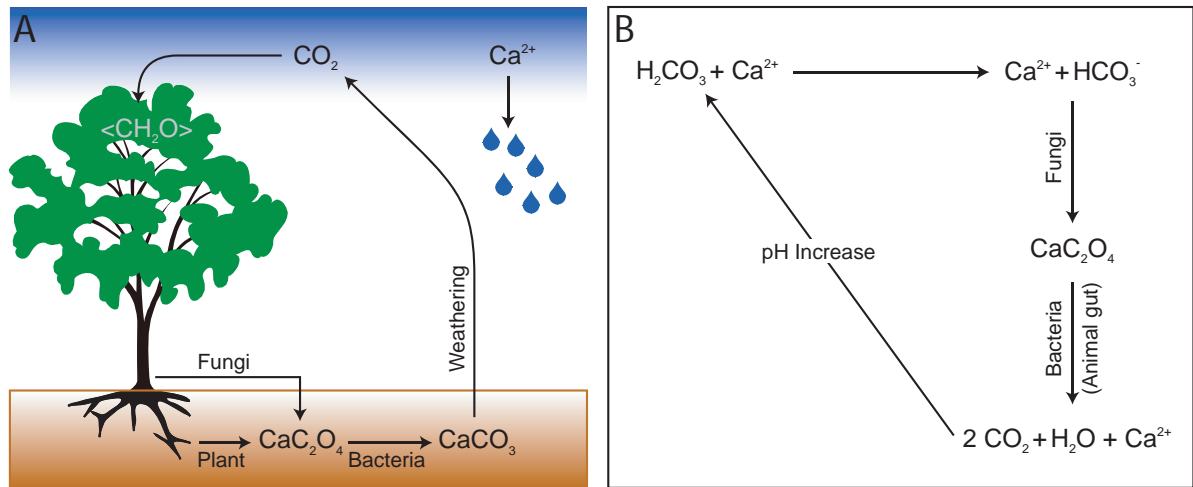


Figure 9: A: Cycle oxalate-carbonate impliquant les plantes, les champignons et les bactéries proposé par Verrecchia 1990. B: Cycle oxalate-carbonate impliquant la faune du sol, les champignons et les bactéries proposé par Cromack et al. 1977. A: *Oxalate-carbonate cycle involving plants, fungi and bacteria as proposed by Verrecchia 1990.* B: *Oxalate-carbonate cycle involving soil fauna, fungi and bacteria as proposed by Cromack et al. 1977.*

Importance du cycle oxalate-carbonate

Le cycle tel qu'il est décrit ci-dessus est très important, car il permet le stockage de CO_2 atmosphérique sous forme de carbonate de calcium dans les sols. Il s'agit donc d'un puits de carbone. Le cycle oxalate carbonate est de ce fait intimement lié au cycle du carbone (Figure 10), et donc aux problèmes de changement climatiques globaux. Le stockage du carbone dans les sols sous forme de carbonate de calcium n'est généralement pas pris en compte dans les modèles globaux (Prentice et al. 2001). Ceux-ci ne considèrent le stockage du carbone dans les sols que sous forme organique. Le stockage du carbone sous forme minérale présente pourtant l'avantage d'être une solution à long terme puisque le temps de résidence du carbone minéral dans les sols est 100 à 1000 fois supérieur à celui du carbone organique (Retallack 1990). L'importance du cycle oxalate-carbonate ne s'arrête toutefois pas au stockage du carbone dans les sols. Ce cycle a aussi une influence dans des domaines tels que l'agronomie, la pédologie, la géologie et la médecine. Pour le pédologue et l'agronome, la transformation des oxalates en carbonates implique une modification de la mobilité des ions métalliques dans les sols, car ceux-ci n'ont pas la même affinité pour les oxalates et les carbonates (Graustein et al. 1977). Ceci peut avoir une influence directe sur la fertilité de certains sols en modifiant la biodisponibilité d'ions toxiques comme l'aluminium et le cuivre, ou d'ions nutritifs comme le sodium et le calcium. Pour le géologue et le pédologue, la production de carbonate dans les sols peut participer à la genèse de calcrete (Verrecchia 1990). L'étude du cycle oxalate carbonate peut apporter des éléments nouveaux à la compréhension de la mise en place de ces systèmes. Finalement pour les médecins, le cycle oxalate carbonate a aussi un intérêt puisque autant les oxalates que les carbonates participent à la production de calculs rénaux et urinaires. La transformation des oxalates en carbonates, plus solubles dans l'urine, pourrait constituer une voie de recherche intéressante pour les urologues (Khan 1995). En plus de l'aspect scientifique, il existe aussi un intérêt industriel à l'étude de la transformation des oxalates en carbonates. En effet, bien que l'action des micro-organismes n'ait pas été évoquée directement, la transformation des oxalates en carbonates est soupçonnée de participer à la formation de blocs de carbonate de calcium dans des bois semi-précieux tel que *Milicia excelsa* (Harris 1933, Pobeguín 1943) Tous ces éléments font du cycle oxalate-carbonate un phénomène digne d'intérêt où l'aspect microbiologique tient une grande place. C'est cet aspect qui sera développé tout au long des chapitres suivants.

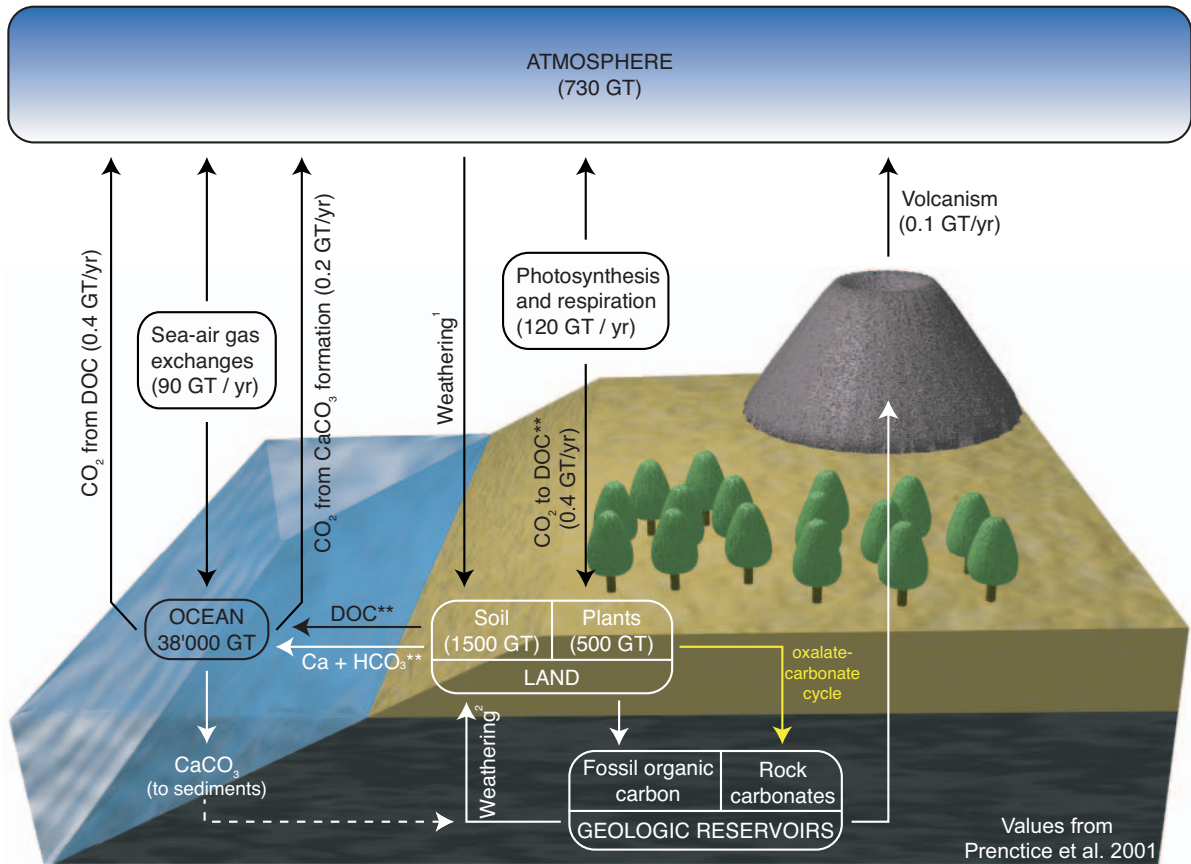


Figure 10: Echange de carbone entre l'atmosphère et la biosphère et relation entre le cycle du carbone et le cycle oxalate carbonate. Les deux principaux flux de carbone entre la biosphère (sens large) et l'atmosphère sont dûs aux échanges gazeux entre l'atmosphère et les océans ainsi qu'aux échanges entre les organismes terrestres et l'atmosphère. Ces derniers représentant 120 Gt par an se répartissent à raison de 60 Gt par an de carbone fixé via la photosynthèse et 60 Gt par an relâché via la respiration. Une faible proportion (0.4 Gt / an - **) du carbone fixé lors de la photosynthèse va former de la matière organique dissoute qui sera transportée jusqu'aux océans par les cours d'eau. Le carbone organique présent dans les océans peut être respiré à son tour pour redonner du CO₂. L'altération des roches contribue aussi au cycle du carbone. L'altération des roches silicatées (1) fixe du CO₂ selon la réaction: $\text{CaSiO}_3 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{SiO}_2$. En revanche l'altération de roche carbonatée (2) relargue du CO₂. Finalement la flèche jaune indique la position du cycle oxalate-carbonate dans le cycle du carbone. Notez que les processus biologiques menant à la formation de carbonate de calcium dans les sols ne sont pas pris en compte dans la vision actuelle du cycle du carbone. *Simplified sketch showing the exchanges of carbon between atmosphere and biosphere. The relation between the carbon cycle and the oxalate carbonate cycle are also shown. The two major carbon fluxes between the biosphere (sensus lato) and the atmosphere are due to gas exchange between atmosphere and oceans as well as to exchanges between the terrestrial organisms. These latter represent 120 Gt per year which are distributed as follows: 60 Gt of carbon are fixed through photosynthesis as 60 Gt of carbon are released as CO₂ to atmosphere by respiration processes. A small fraction (0.4 Gt / yr - **) of the carbon fixed through the photosynthesis are dissolved into surface water and transported to the ocean by the rivers. A part of the carbon present in the oceans is respired to CO₂. Rock weathering also contribute to the carbon cycle. Silicate rock weathering fixes CO₂ according to the equation: $\text{CaSiO}_3 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{SiO}_2$. As carbonate rock weathering releases CO₂. Finally the yellow arrow indicate the position of the oxalate-carbonate cycle in the global carbon cycle. Note that biological processes leading to the calcium carbonate accumulation in soil are not taken into account in the current view of the carbon cycle.*

Le carbonate de calcium

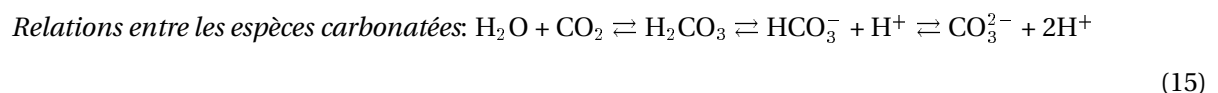
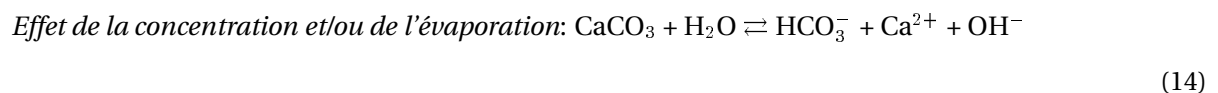
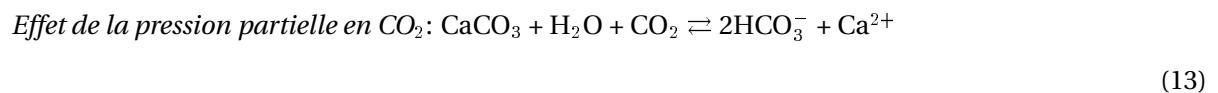
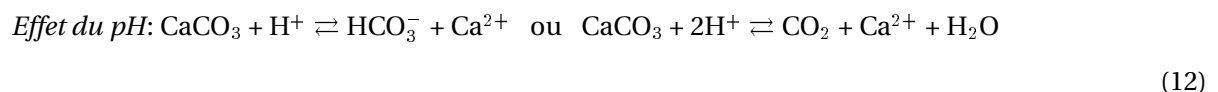
C'est le produit "final" du cycle oxalate-carbonate. Comme pour les oxalates, il est fondamental de connaître les propriétés physiques et chimiques des différentes formes du carbonate de calcium produites lors du cycle oxalate-carbonate pour des raisons méthodologiques. De plus, il est important de pouvoir relier des échantillons de carbonate de calcium aux processus du cycle oxalate-carbonate étudiés au laboratoire. Pour cela il est essentiel d'avoir de bonnes connaissances des différentes espèces de carbonate de calcium produites par des microorganismes ou lors de processus abiotiques. Parmi ces connaissances, la chimie, la minéralogie, et la morphologie des cristaux produits permettent d'obtenir des indices faisant un lien entre les carbonates prélevés sur le terrain, ceux obtenus en laboratoire, et les processus menant à leur précipitation. Ce sont ces propriétés qui sont détaillées dans les paragraphes suivants.

Propriétés physiques

Il existe plusieurs espèces minérales du carbonate de calcium anhydre (CaCO_3) ainsi que des formes hydratées ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ou $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La calcite, la forme la plus courante du carbonate de calcium anhydre existe sous forme de poudre blanche ou sous forme cristalline. Sa densité est de 2.71 ($d_{25,2} = 2.71$). Chauffé au-delà de 825°C , le carbonate de calcium se décompose en dioxyde de carbone (CO_2) et oxyde de calcium (CaO). Le carbonate de calcium partage cette dernière étape avec les oxalates de calcium vus précédemment.

Propriétés chimiques

Le carbonate de calcium est un sel formé d'acide carbonique et de calcium. Il a une masse moléculaire de 100.09. Il est pratiquement insoluble dans l'eau, par contre il est soluble dans des acides dilués (O'Neil et al. 2001). Le pH de stabilité du carbonate de calcium en solution aqueuse en équilibre avec l'atmosphère et à 25°C est de 8.4 environ ; à ce pH le carbonate de calcium précipité est en équilibre avec la solution. La précipitation et la dissolution du carbonate de calcium en solution dépendent essentiellement de la concentration du calcium, des espèces carbonatées, du pH du milieu (équ. 12 - 15) et de la pression partielle en dioxyde de carbone dans cette solution (équ. 13 - Stumm et Morgan 1996, Verrecchia 2002).



Minéralogie

Il existe 213 minéraux appartenant à la classe des carbonates (Klein 2002). Seuls les 7 rencontrés le plus fréquemment au cours de ce travail seront décrits dans ce paragraphe (Table 6). De même, seuls les diffractogrammes des formes les plus courantes seront montrés ici (Figure 11). Un des critères diagnostiques des carbonates est le dégagement de CO_2 produisant une effervescence visible en présence d'une goutte d'acide dilué (HCl 5% à 10% par exemple). Les minéraux de la classe des carbonates, et la calcite en particulier, peuvent avoir de très nombreux habitus (Lacroix 1962). Selon la taille des cristaux on distingue toutefois la micrite, qui a une taille inférieure à $4 \mu\text{m}$, la microsparite avec des cristaux de 4 à $16 \mu\text{m}$, et la sparite dont les cristaux ont une taille supérieure à $16 \mu\text{m}$ (Tucker et Wright 1992). La taille des cristaux des différentes catégories peut toutefois varier légèrement selon les auteurs.

Table 6: Propriétés minéralogiques de quelques carbonates. *Mineralogical properties of selected carbonate minerals.*

Nom	Calcite	Aragonite	Vatérite	Monohydrocalcite	Ikaïte	Dolomite	Magnésite
Formule	CaCO_3	CaCO_3	CaCO_3	$\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$	MgCO_3
Couleur	Incolore Blanc Rose	Incolore Blanc Grise	Incolore	Grise Gris pâle Blanc	Blanc	Incolore Blanc Jaune	Incolore Blanc Gris clair
Trace	Blanche	Blanche	Blanche	Blanche	Blanche	Blanche	Blanche
Transp.	Transparent à opaque	Transparent Translucide	Transparent			Transparent à opaque	Transparent à opaque
Lustre	Vitreux	Vitreux		Terne	Terne	Vitreux Nacré	Vitreux
Dureté	3.0	3.5 - 4.0	3.0	2.0 - 3.0		3.5 - 4.0	4.0
Clivage	[1011] Parfait [1011] Parfait [1011] Parfait		[1011] Bon			[1011] Parfait [1011] Parfait [1011] Parfait	[1011] Parfait
Fracture	Friable Conchoïdale	Friable sub-conch.				Friable Conchoïdale	Friable Conchoïdale
Habitus	Cristallin Rhomboèdres Stalagmitique Massif	Pseudo-hex. En colonnes Fibreux		Cryptocristallin	Tabulaire En colonne	Rhomboèdres à faces incurvées Massif	Massif Granulaire Fibreux
Densité	2.71	2.93	2.54	2.38	1.78	2.85	3.00

Le carbonate de calcium dans la biosphère

Le carbonate de calcium et les autres carbonates naturels sont des minéraux très répandus à la surface de la planète. On retrouve les différentes formes du carbonate de calcium (au sens large) dans les roches calcaires, qui sont très importantes parmi les roches sédimentaires (Folk 1974, Dardenne 2001). Le carbonate de calcium trouvé dans les roches, sédimentaires ou non, peut avoir plusieurs origines. Une origine physico-chimique est invoquée lorsque les conditions dans lesquelles le carbonate de calcium va précipiter ne sont induites que par des facteurs cinétiques indépendants de la vie. Une origine biologique qui est elle invoquée lorsque l'activité d'organismes vivants produit directement du carbonate de calcium comme biominéral ou lorsque ceux-ci modifient suffisamment le milieu pour permettre la précipitation de celui-ci (Cojan et Renard 1999). On parle alors de minéralisation biologiquement contrôlée ou de minéralisation biologiquement induite selon la terminologie de Lowenstam et Weiner (1989). On peut aussi parler plus simplement de biominéralisation.

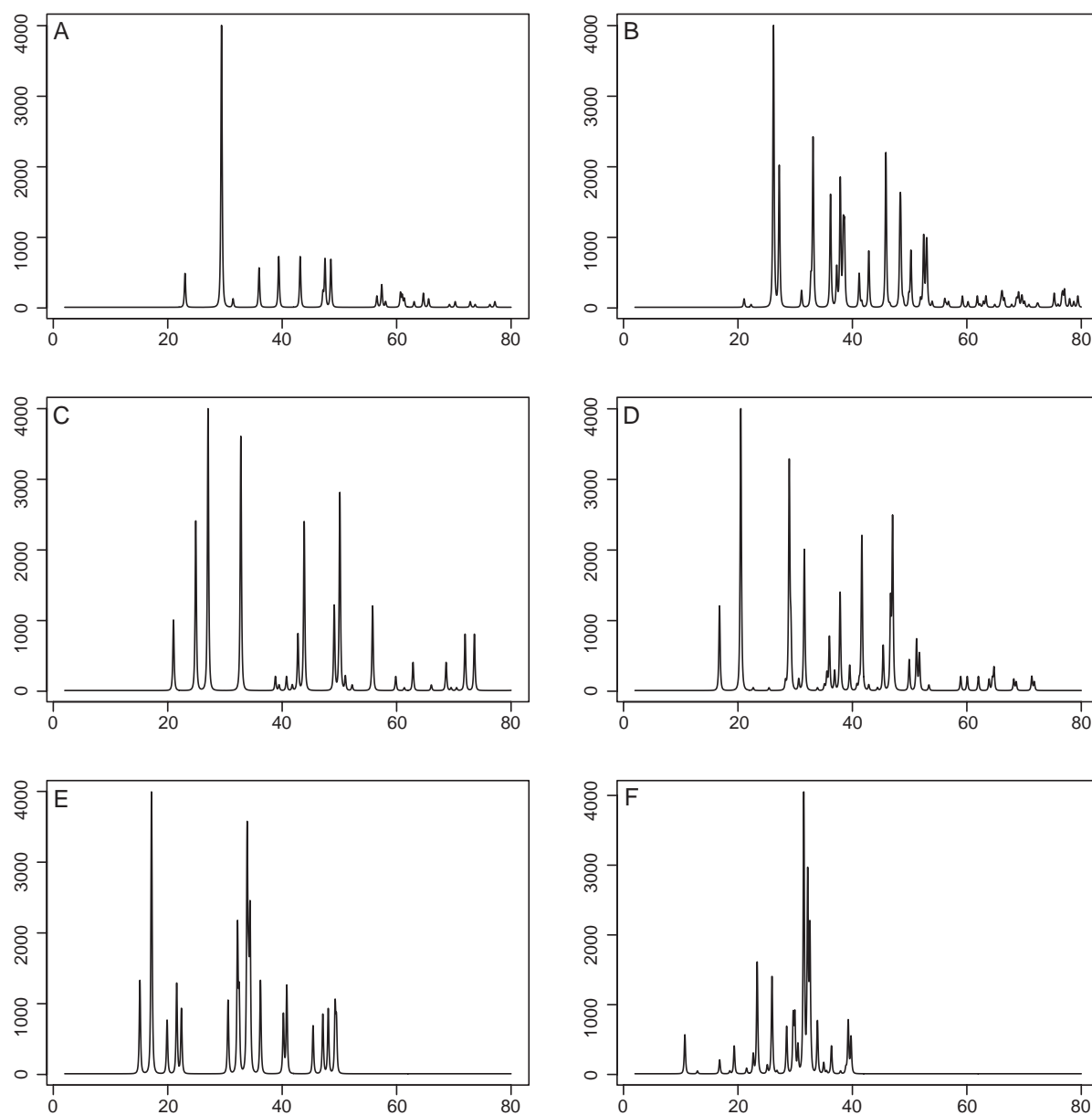


Figure 11: Diffractogrammes de quelques formes du carbonate de calcium, A: Calcite, B: Aragonite, C: Vatérite, D: Monohydrocalcite, E: Ikaite, F: Calcium phosphate carbonate. En abscisse l'angle (2θ) en ordonnée l'intensité relative. *Diffractograms of selected carbonate minerals, A: Calcite, B: Aragonite, C: vaterite, D: Monohydrocalcite, E: Ikaite, F: Calcium phosphate carbonate. Angle (2θ) shown on the x-axis and relative intensity on the y-axis.*

Le carbonate de calcium d'origine abiotique

Le carbonate de calcium est fréquent dans les grottes, à proximité de résurgences karstiques, ou en relation avec l'hydrothermalisme. Dans ce cas, il se forme le plus souvent par dégazage du CO_2 de la solution aqueuse on parle alors de la formation de travertins. Les travertins sont définis par Pentecost (2005) comme des calcaires continentaux précipités de manière physico-chimique proche d'infiltrations, de sources, le long de cours d'eau, ou plus rarement dans des lacs. Dans les environnements vadoses et phéatiques peu profond, les travertins sont caractérisés par une faible porosité intercrystalline mais par une grande porosité structurale ou moldique. La précipitation dans les travertins est essentiellement liée au transfert du CO_2 de la solution à l'atmosphère, menant à la sursaturation et à la précipitation de carbonate de calcium sur des surfaces submergées (exemple - figure 12 A). Cette définition très large inclut aussi bien les spéléothèmes que les tufs et bien d'autres dépôts carbonatés. Finalement Pentecost (2005) propose dans son ouvrage une classification des différentes formes de travertins selon l'origine du CO_2 . Ainsi il définit les travertins météogènes comme des travertins dont le CO_2 a une origine météorique essentiellement liée au sol, et les travertins thermogènes chez lesquels le CO_2 provient de processus thermiques ayant lieu dans ou sous la croûte terrestre.

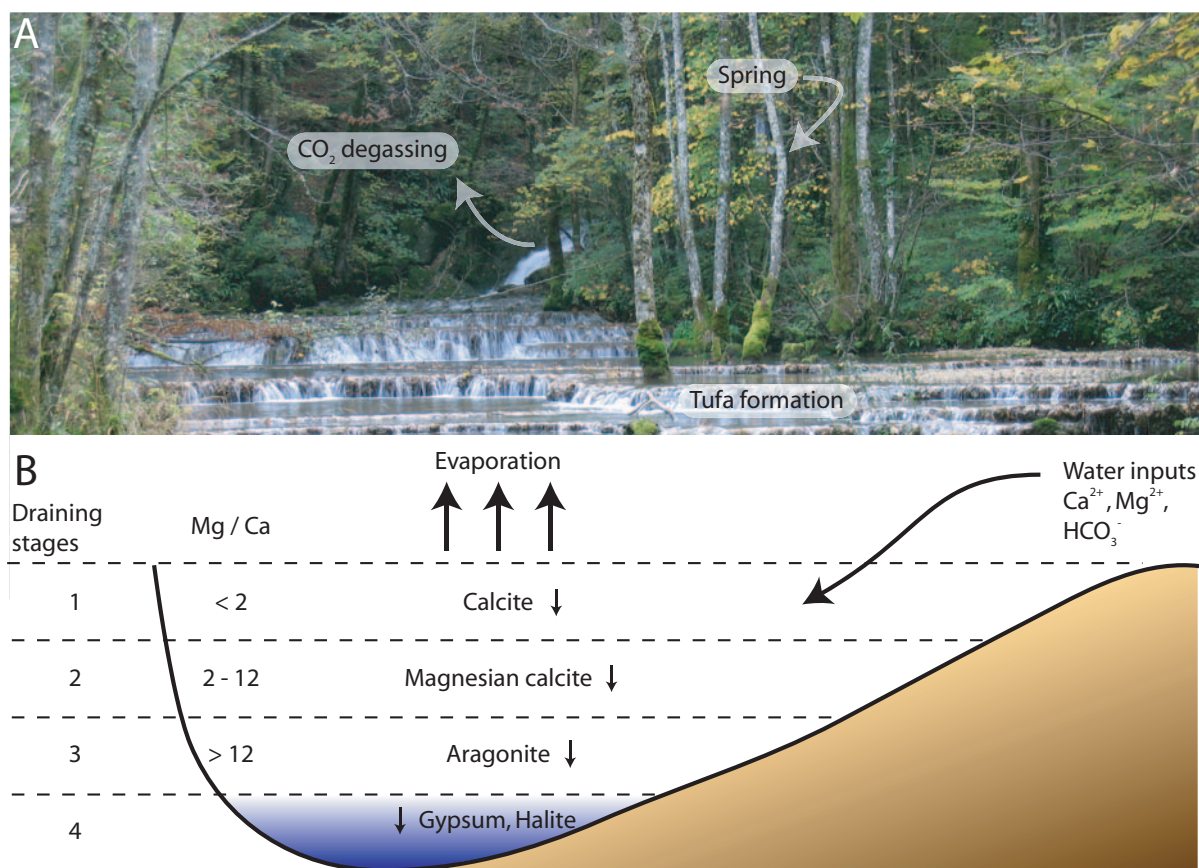


Figure 12: A: Précipitation de carbonate de calcium formant un tuf à la sortie d'une source karstique (photo: Cyril Dommergues). B: Exemple de précipitation de différents carbonates et d'évaporites dans un lac fermé (figure modifiée d'après Einsele 1992 et Eugster et Hardie 1978). A: *Precipitation of calcium carbonate forming a tufa near a karstic spring (photograph: Cyril Dommergues)*. B: *Example of the precipitation of different carbonate minerals associated with evaporites in a closed lake (figure modified after Einsele 1992 and Eugster and Hardie 1978)*.

Le carbonate de calcium se trouve aussi associé à des systèmes évaporitiques. C'est le cas par exemple, de certains lacs fermés "temporaires" en zone aride. Ces lacs sont soumis à une forte évaporation qui augmente la concentration des différents ions en solution jusqu'à la précipitation de minéraux évaporitiques. Les minéraux les moins solubles tel que les carbonates vont précipiter en premier, alors que les minéraux les plus solubles tels que l'halite vont précipiter en dernier. L'apport ponctuel d'eau chargée en ions divers permet le maintien du système. (Figure 12 B). En bordure des systèmes marins on trouve aussi des "sabkhas". Il s'agit là de systèmes évaporitiques dominés par le sédiment. Dans ce cas, c'est l'eau interstitielle qui est soumise à une forte évaporation. Celle-ci conduit à la précipitation de carbonate de calcium et d'autres minéraux évaporitiques à l'intérieur et à la surface du sédiment.

Le carbonate de calcium d'origine biotique

Le carbonate de calcium est associé à de nombreux organismes vivants (table 7, Lowenstam 1981, Tucker and Wright 1992). Chez les métazoaires, sa précipitation est généralement contrôlée par l'organisme, formant des spicules (spongiaires), des septes (cnidaires) des coquilles (mollusques), des carapaces (arthropodes), et des os (chordés). Chez les unicellulaires la précipitation est le plus souvent induite par l'organisme, formant des cristaux de minéralogie et de morphologie variées. Néanmoins chez certains unicellulaires, comme les foraminifères, la précipitation peut-être contrôlée pour produire des tests (coquilles) dont la morphologie est caractéristique des espèces (Beaumont et Cassier 1981).

Table 7: Répartitions des différentes formes du carbonate de calcium à travers le monde vivant (modifié d'après Lowenstam 1981). *Distribution of calcium carbonate biomineralisation among living and fossil organisms.*

	calcite	aragonite	vaterite	monohydrocalcite	Carbonate de calcium amorphe
Bactéries	+	+	+	+	
Dinoflagellés	+				
Haptophytes	+	+			
Phaeophytes		+			
Rhodophytes	+	+	+		
Chlorophytes		+			
Siphonophytes	+	+			
Charophytes	+	+	+		
Radiolaires	+	+			
Mixomycètes	+				
Spongiaires	+	+			
Cnidaires	+	+			
Plathelminthes	+				+
Brachiopodes	+				
Annélides	+	+			
Mollusques	+	+	+	+	+
Arthropodes	+	+	+		+
Siponculiens	+	+			
Echinodermes	+				
Chordés	+	+	+	+	+
Bryophytes	+				
Tracheophytes	+	+			

Le carbonate de calcium comme biominéral chez les micro-organismes

Le terme biominéralisation se réfère aux processus par lesquels des organismes peuvent produire des minéraux. On distingue la biominéralisation induite, où la précipitation d'un minéral est le résultat des interactions entre les organismes et leur milieu, et la biominéralisation contrôlée où la formation d'un minéral est contrôlée par des processus cellulaires. Les biominéraux sont plus que leurs contreparties inorganiques (c'est-à-dire les mêmes minéraux précipités par des processus abiotiques - Weiner et Dove 2003). Ils sont le reflet d'une activité biologique; ce sont donc des indicateurs précieux si l'on est capable de les reconnaître comme tels. Parmi les biominéraux, le carbonate de calcium occupe une place très importante de par son abondance dans la biosphère et sa répartition à travers le monde vivant. Il n'est donc pas surprenant de voir ce biominéral produit par de nombreux micro-organismes. Chez les bactéries et les champignons, la biominéralisation est le plus souvent induite; la diversité du monde microbien peut toutefois s'exprimer au travers des nombreux types de métabolisme et de structures pariétales menant à la nucléation et à précipitation de différentes formes de carbonate de calcium.

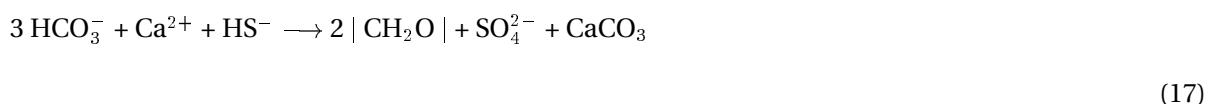
Processus métaboliques menant à la carbonatogénèse

Les processus métaboliques menant à la biominéralisation sont divers (Mann et al. 1989). Dans le cas de la carbonatogénèse bactérienne, plusieurs processus menant à la précipitation de carbonate de calcium ont été mis en évidence (Visscher et Stolz 2005, Verrecchia 2003, Ferris 2000). Bien que la liste des processus qui va suivre ne soit pas exhaustive, elle suffit à montrer que la diversité métabolique permet la précipitation du carbonate de calcium dans de nombreux environnements. Les organismes capables de photosynthèse oxygénique comme les cyanobactéries et anoxygénique tels que les bactéries sulfureuses pourpres et vertes (équ. 16 - 17) alcalinisent le milieu car celles-ci consomment le CO_2 dissous. Cette alcalinisation conduit à la précipitation de carbonate de calcium comme ceux observé par Verrecchia et al. (1995). Dans le cas de la photosynthèse anoxygénique il faut toutefois noter que l'oxydation du HS^- contribue à faire diminuer le pH contrebalançant ainsi pour partie l'alcalinisation globale. La sulfato-réduction (équ. 18), très importante dans les milieux marins (Canfield et al. 1993), participe elle aussi à l'augmentation du pH en utilisant le pouvoir réducteur du carbone organique. Il faut noter que dans l'équation 18, l'ions HS^- peut réagir avec une molécule d'eau puis dégazer avec le CO_2 . La dégradation des composés azotés, la déamination d'acides aminés ou l'hydrolyse de l'urée (équ. 19), produit de l'ammoniaque et du dioxyde de carbone. Alors que le CO_2 dégaze, l'ammoniaque produit est une base faible qui va réagir avec l'eau pour former des ions NH_4^+ et OH^- , il résulte donc de ces processus une alcalinisation du milieu. Finalement la ferro-réduction (équ. 20) et la méthanogénèse (équ. 21) sont aussi des processus capables de mener à la précipitation de carbonate de calcium par l'intermédiaire d'une alcalinisation du milieu. Il faut toutefois noter que si le nombre de processus métaboliques menant à la carbonatogénèse est élevé, il en existe probablement au moins autant menant à la dissolution des carbonates (Visscher et Stolz 2005). Pour que la carbonatogénèse soit effective, il faut donc que dans un système donné la production de carbonate excède sa mise en solution.

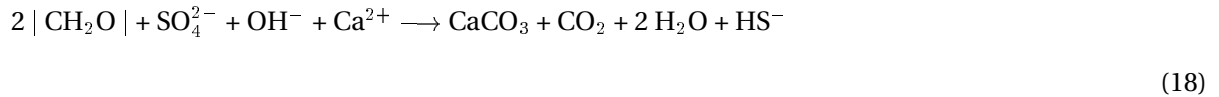
Photosynthèse oxygénique



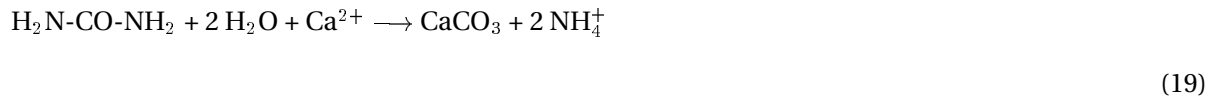
photosynthèse anoxygénique



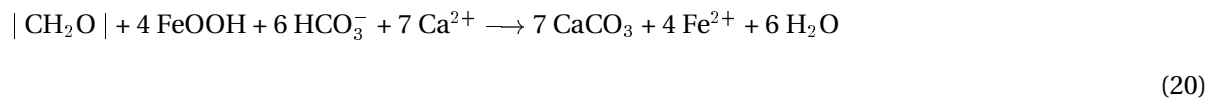
Sulfato-réduction



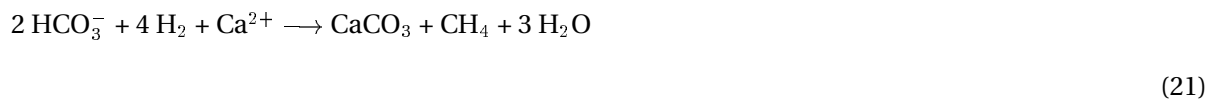
Déamination - cas de l'urée



Ferro-réduction



Méthanogénèse



Influence du facteur biologique sur la précipitation de carbonate de calcium

De par leur proximité géométrique avec celui-ci, les organismes ont une grande influence sur le type de carbonate de calcium produit quel que soit le type de biominéralisation (induite ou contrôlée). Cette influence s'exerce surtout par l'action de ligands biologiques tels que les groupements carboxyles et phosphates (Ferris 2000) sur le calcium. On trouve les groupes carboxyles associés essentiellement aux protéines ainsi qu'à certains sucres (les sucres acides et les acides uroniques), deux classes de molécules ubiquistes dans les cellules. Le groupement carboxyle, de par sa proximité structurale avec l'anion carbonate, a une grande influence sur la précipitation du carbonate de calcium (Figure 13 - Mitterer et Cunningham 1985, Addadi et al. 1990). Les phosphates eux peuvent être associés à la paroi des micro-organismes sous formes de poly-glycérol-phosphate ou de poly-ribitol-phosphate dans les acides teichoïques et lipoteichoïques des bactéries gram positives. De même chez les bactéries gram négatives, les lipopolysaccharides associées à la membrane externe sont souvent porteurs de groupes phosphates (Prescott et al. 1995). Toutefois, les carboxyles et les phosphates n'interagissent pas avec les ions métalliques au même pH (Phoenix et al. 2002). L'affinité des ions métalliques, et du calcium en particulier, pour ces ligands fait des structures bactériennes des lieux préférentiels de nucléation du carbonate de calcium (Ferris 2000). De plus la répartition de ces ligands sur les différentes structures biologiques peut faire de celles-ci des "modèles" pour la précipitation des différentes formes de carbonate de calcium (Falini 2000). Il résulte de toutes ces interactions de nombreuses morphologies et minéralogies différentes du carbonate de calcium à travers le monde vivant (Lowenstam 1981). Outre la forme et la minéralogie, les organismes vivants laissent une empreinte chimique dans les cristaux qu'ils produisent. Cette empreinte peut se trouver sous forme isotopique (Schidlowski 2000), de biomarqueurs tels que l'acide meso-diaminopimélique (Borruat 2000, Borruat et al. 2001), ou sous forme de différences dans la composition chimique (Rivadeneira et al 1996). Une des tâches à laquelle cette thèse va se consacrer sera la caractérisation des cristaux de carbonate de calcium produit lors du cycle oxalate-carbonate, et des interactions entre bactéries et minéral menant aux différents types de cristaux produits. Ceci a pour objectif d'établir des liens entre les échantillons provenant de systèmes naturels et ceux produits en laboratoire.

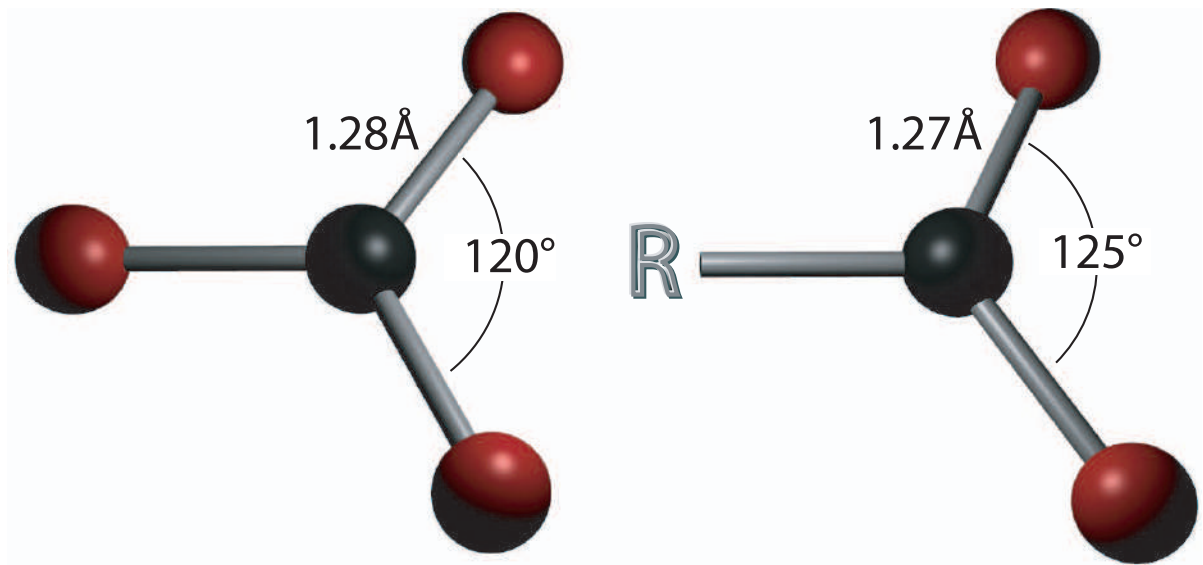


Figure 13: Similarité entre les groupements carbonate (gauche) et carboxyl (droite) (figure modifiée d'après Mitterer et Cunningham 1985). *Similarity between carbonate group (left) and carboxyl group (right) (modified after Mitterer and Cunningham 1985)*

Résumé - Summary

- Les plantes et les champignons produisent de l'acide oxalique et des oxalates de calcium. *Plants and fungi produce oxalic acid and calcium oxalate.*
- Un certain nombre de bactéries est capable d'utiliser les oxalates comme source de carbone et d'énergie. *A limited number of bacteria are able to use oxalates as carbon and energy source.*
- La consommation d'oxalate de calcium peut mener à la précipitation de carbonate de calcium. *Consumption of calcium oxalate can lead to the precipitation of calcium carbonate.*
- Les différentes bactéries produisent différentes formes du carbonate de calcium. *Different bacteria produce different forms of calcium carbonate.*
- Il existe un cycle biogéochimique impliquant les oxalates et les carbonates. Ce cycle peut avoir des répercussions sur le stockage de CO₂, la fertilité et la structure des sols. *A biogeochemical cycle involving oxalate and carbonate exist. This cycle can have influence on carbon dioxide storage, soil fertility and structure.*

Chapitre 2: Méthodes

Ce chapitre est destiné à donner une description générale des méthodes couramment utilisées lors de ce travail, ainsi que les bases théoriques nécessaires à la compréhension de certaines techniques analytiques. Les conditions précises de chaque manipulation seront données dans les chapitres correspondants.

Microbiologie classique

Les techniques de microbiologie classique se fondent essentiellement sur la mise en culture de bactéries sur différents milieux. Certaines souches bactériennes utilisées lors de ce travail provenaient de collections de micro-organismes suisses ou étrangères. Cette partie va donc se porter sur la description et l'origine des souches oxalotrophes disponibles, la composition des milieux de cultures utilisés en routine, et ceux utilisés lors d'expériences de biominéralisation.

Description des souches

La description des souches ci-dessous, n'est de loin pas complète. Elle permet néanmoins d'avoir un aperçu des principales caractéristiques des différents genres. Le lecteur pourra compléter les informations données ci-dessous avec celles citées au chapitre 1 et la littérature associée.

Le genre *Streptomyces*

Les streptomycètes sont largement répandus dans les sols et les composts. Ce sont des bactéries gram positives, chimioorganotrophes, aérobies capables d'utiliser un grand nombre de substrats organiques, y compris des substrats réputés difficiles à dégrader. Ces bactéries ont une morphologie végétative en mycélium le plus souvent pigmenté (violet, rouge, orange, brun gris). Les hyphes de ce mycélium ont un diamètre compris entre 0.5 μm et 2 μm . L'aspect des colonies peut être pulvérulent, floconneux, granulaire, ou encore soyeux. A maturité, le mycélium produit des spores non motiles et généralement pigmentées elles aussi. Les spores forment généralement des chaînes spiralées caractéristiques de ce genre. Les températures et pH optimaux de croissance des streptomycètes sont compris entre 25°C - 35°C et 6.5 - 8.0, respectivement (Holt et al. 1994). Les souches types utilisées dans ce travail étaient *Streptomyces coelicolor* (DSMZ 46492) et *Streptomyces avermitilis* (DSMZ 40783), leur oxalotrophie a été vérifiée lors de cultures sur milieu Schlegel additionné d'oxalate de calcium. Les génomes de ces deux souches ont été totalement séquencés et sont disponibles dans la base de donnée du NCBI. Au sein de ce genre, plusieurs autres espèces oxalotrophes ont été isolées et identifiées. *Streptomyces griseoluteus*, *S. anulatus*, *S. fulvissimus*, *S. halstedii*, *S. glaucescens*, *S. rochei*, *S. cellulosa*, *S. olivaceoviridis* et *S. violaceusniger* ont été décrit par Sahin (2004). Knutson et al. (1980) quant à eux ont identifié *S. collinus*, *S. parvulus* et *S. rochei* comme étant des streptomycètes oxalotrophe. Finalement Khambata et Bhat (1954), ont isolé des Streptomyces oxalotrophes, mais sans les identifier au-delà du genre. Finalement Cromack et al. (1977) a décrit de nombreux actinomycètes capable de dégrader l'oxalate, parmi ceux-ci il est probable qu'il y ait un certain nombre de bactéries appartenant au genre Streptomyces.

Le genre *Ralstonia*

Les bactéries de ce genre ont subi de nombreux changements de nomenclature, une grande partie a appartenu au genre *Pseudomonas* et *Alcaligenes* (Kerstens et al. 1996, Sahin et al. 2000). Les bactéries du genre *Ralstonia* sont des gram négatives, motiles, chimioorganotrophes ou chimiolithoautotrophes (via l'oxydation de l'hydrogène gazeux). Les cellules mesurent de 0.5 μm à 1 μm de diamètre, pour des longueurs comprises entre 0.5 μm et 2.6 μm . Elles sont capables d'utiliser une large gamme d'acides organiques et d'acides aminés comme source de carbone et d'énergie. La dégradation de ces substrats peut résulter en la production d'alcali. La majorité des bactéries appartenant à ce genre est considérée comme aérobie stricte, même si quelques souches sont capables d'avoir une respiration anaérobie en présence de nitrates ou de nitrites (Holt et al. 1994). Le genre *Ralstonia* est commun dans l'eau et les sols, néanmoins de nombreuses souches proviennent d'échantillons médicaux. Certaines souches semblent d'ailleurs faire partie de la flore intestinale saprophyte de nombreux vertébrés et invertébrés (Krieg et al. 1984, Khambata et Bhat 1953). La souche de *Ralstonia* utilisée dans ce travail était *Ralstonia eutropha* (Syn : *Pseudomonas oxalaticus*, *Alcaligenes eutrophus* - ATCC 17699, DSMZ 428, NEU 49). Le génome de cette bactérie n'est que partiellement séquencé à l'heure actuelle. Dans ce genre, les bactéries oxalotrophes sont représentées par *R. oxalatica* (syn : *P. oxalaticus* OX1) et *R. eutropha* (syn : *A. eutrophus*). Ces deux espèces ont été décrites par Bhat et Barker (1948) et par Jenni et al. (1988) respectivement.

Le genre *Bradirhizobium*

Ce groupe était auparavant associé au genre *Rhizobium*; aujourd'hui un certain nombre de ceux-ci sont transférés dans le genre *Bradirhizobium* (Kerstens et al. 1996). Dans ce genre, on trouve des bactéries gram négatives, aérobies, et chimioorganotrophes. Les cellules mesurent de 0.5 μm à 0.9 μm de diamètre et de 1.5 μm à 3.0 μm de long. On peut y observer des granules de poly- β -hydroxybutyrate. Les colonies sont généralement petites, mesurant moins d'un millimètre de diamètre. Celles-ci sont le plus souvent blanches, opaques et convexes. De plus, ces colonies peuvent avoir une texture granulaire. De manière courante, ces bactéries utilisent les hydrates de carbone, les pentoses en particulier, comme source de carbone. La croissance sur un milieu de culture riche en hydrates de carbone s'accompagne généralement de la production d'exopolysaccharides (mucilage). On trouve ces bactéries associées aux nodules racinaires de certaines plantes ainsi que sous forme de cellules isolées dans les sols (Holt et al. 1994). La souche utilisée dans ce travail est *Bradirhizobium japonicum* (JCM 10833). L'oxalotrophie supposée de cette souche (au vu de son génome) a été vérifiée sur milieu Schlegel additionnée d'oxalate.

Le genre *Methylobacterium*

Ce genre, tout comme le précédent, a subi un certain nombre de remaniements taxonomiques (Kerstens et al. 1996). Dans ce genre, on trouve des bactéries formant des colonies ayant une couleur pouvant aller du rose pâle au rouge orange. Les cellules sont des bâtonnets gram négatifs de 0.8 μm à 1.0 μm de diamètre qui contiennent souvent des inclusions. Ces cellules sont généralement motiles. Dans ce genre, on trouve des chimioorganotrophes capables d'assimiler les composés à un seul carbone; ce sont donc des méthylotrophes facultatifs ou obligatoires. Les températures optimales de croissance de ces bactéries se situent entre 25°C et 30°C. Ces bactéries ont été isolées du sol et de nombreux autres environnements tels que l'eau douce, les sédiments lacustres, les poussières, et des surfaces de feuilles (Holt et al. 1994). La souche testée ici est *Methylobacterium extorquens* (NEU 44). Dans ce genre, *Methylobacterium extorquens* décrit originellement par Bassalik (1913) puis étudié plus en détail par Blackmore et Quayle (1970 - sous l'appellation *Pseudomonas* AM1), semble être la seule espèce oxalotrophes décrite à ce jour.

Le genre *Burkholderia*

Les organismes de ce genre appartenaient précédemment au genre *Pseudomonas* (Kerstens et al 1996). Il s'agit d'un genre où l'on trouve des bactéries gram négatives chimioorganotrophes capables d'utiliser des substrats récalcitrants comme les PCBs. Les cellules mesurent de 0.3 μm à 0.8 μm de diamètre et de 1.6 μm à 2.0 μm de long. La souche utilisée ici est *Burkholderia fungorum* LB400 (ARS NRRL B-18064 - Syn: *Burkholderia xenovorans*). Bien qu'aucune des cultures lyophilisées n'ait poussé, cette description est conservée car certains aspects de la génétique de cette bactérie seront discutés par la suite. Son génome est complètement séquencé et disponible sur le site du JGI. Celui montre que cette bactérie est pourvue des gènes nécessaire à la dégradation de l'oxalate. La description d'un isolat identifié au genre comme *Burkholderia* par Sahin et al. (2002) semble être une indication positive concernant l'oxalotrophie de la souche *B. fungorum* LB400.

Le genre *Xanthobacter*

Les bactéries du genre *Xanthobacter* sont des bâtonnets gram négatifs qui mesurent de 0.4 μm à 1.0 μm de diamètre, pour 0.8 μm à 6.0 μm de long. Bien que la paroi de ces bactéries soit de type gram négatif, dans ce genre une couche de peptidoglycane plus épaisse que chez les autres bactéries gram négatives fait que la coloration de gram est souvent positive à variable (Wiegel 1991). Les colonies formées par les bactéries de ce genre sont jaunes, opaques, et visqueuses (à l'exception de quelques unes qui ne produisent pas de mucus). Ce sont des bactéries chimiolithoautotrophes aussi bien que chimioorganotrophes. Elles sont capables d'utiliser des alcools (méthanol, éthanol, n-propanol, n-butanol) et de nombreux acides organiques comme source de carbone. En revanche, elles ne font qu'une utilisation limitée des hydrates de carbone. La fixation de l'azote est aussi courante dans ce genre. Les optima pour la croissance de ces bactéries sont compris entre 5.8 et 9.0 pour le pH et entre 25°C et 30°C pour la température. On trouve généralement ces bactéries dans les sols humides contenant de la matière organique en décomposition (Holt et al. 1984, Kandler et al. 1983, Wiegel 1991). Dans cette thèse la souche utilisée est *Xanthobacter autotrophicus* (DSMZ 432, ATCC 35674, NEU 2137). En plus de la souche de *X. autotrophicus* dont l'oxalotrophie avait été mise en évidence par Tamer et Aragno (1980), il faut noter que *X. flavus* est aussi une bactérie oxalotrophe. De même un isolat de *Xanthobacter* identifié au genre est décrit dans Sahin et al. (2002)

Le genre *Xanthomonas* (utilisé comme contrôle)

Il s'agit d'un genre où l'on trouve des bactéries aérobies, chimoorganotrophes, capables d'utiliser un large spectre d'hydrates de carbone et d'acides organiques. Les colonies peuvent être pigmentées et ont souvent un aspect visqueux à cause de la production de mucilage (xanthane). Les cellules mesurent de 0.4 μm à 0.7 μm de diamètre pour 0.7 μm à 1.8 μm de long. Comme pour tous les genres associés aux *Pseudomonas*, il a subi plusieurs remaniements taxonomiques (Kerstens et al 1996).

Le genre *Bacillus* (utilisé comme contrôle)

Le genre *Bacillus* est composé de bactéries gram positives, sporulantes, chimioorganotrophes et motiles. Les cellules mesurent de 0.5 μm à 2,5 μm de diamètre, pour une longueur variant entre 1.2 μm et 10 μm . Dans une cellule, on trouve une spore au plus. La position de cette spore est variable. Dans ce genre, on trouve des bactéries aérobies et anaérobies facultatives capables d'utiliser une très large gamme de substrats. Ces bactéries peuvent croître dans de nombreux habitats avec des conditions de pH, température et salinité très différentes. Dans ce travail, les souches utilisées furent *Bacillus subtilis* 168 et *Bacillus megaterium* (NEU 16). Ces deux souches ont surtout été utilisées comme contrôles dans de nombreuses expériences ainsi que pour toutes les manipulations de biologie moléculaire. Le génome complètement séquencé de *Bacillus subtilis* 168 est disponible sur le site du NCBI.

Composition des milieux de cultures

Milieu Schlegel, DSM 81

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.0 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, NH_4Cl 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, citrate de fer ammoniacal 0.005 g/L, CaCl_2 0.01 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 $\mu\text{g/L}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 150 $\mu\text{g/L}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 $\mu\text{g/L}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 $\mu\text{g/L}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 $\mu\text{g/L}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 $\mu\text{g/L}$. Ce milieu minéral de base est additionné de 4 g/L d'oxalate de potassium pour les cultures en milieu liquide. Pour les cultures en double couche sur boîtes de Petri, 15 g/L d'agar sont ajoutés au milieu de base pour former la première couche. De même, 15 g/L d'agar et 4.0 g/L d'oxalate de calcium sont ajoutés pour faire la deuxième couche.

Milieu Angle (modifié)

NH_4NO_3 0.2 g/L, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.69 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.41 g/L, extrait de levure 250 mg/L, KOH 28 mg/L, Fe-EDTA 0.5 mg/L, KH_2PO_4 0.68 mg/L, Tris-HCL 1M 20 ml/L, CaCl_2 1.0 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 $\mu\text{g/L}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 150 $\mu\text{g/L}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 $\mu\text{g/L}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 $\mu\text{g/L}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 $\mu\text{g/L}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 $\mu\text{g/L}$.

Extrait de sol synthétique (en double couche)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g/L, KH_2PO_4 0.03 g/L, NH_4Cl 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L, $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 mg/L, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, agar 15 g/L, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4.0 g/L (uniquement dans la seconde couche).

Extrait de sol (en double couche)

Extrait de sol 1L, Agar 15 g/L, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4.0 g/L (uniquement dans la seconde couche). L'extrait de sol est préparé selon Paraga et al. (1998), soit 1 kg de sol pour un litre d'eau déionisée. La solution ainsi obtenue est ensuite filtrée à 0.2 μm , puis stérilisée à l'autoclave. Elle est ensuite stockée à 4°C jusqu'à utilisation.

Milieu B4 selon Boquet et al. (1973)

Extrait de levure Merck 4.0 g/L, acétate de calcium Merck 2.5 g/L, agar Merck 15 g/L.

Microbiologie moléculaire

Sous l'appellation "microbiologie moléculaire" sont regroupées toutes les techniques ayant recours à l'utilisation d'ADN bactérien, ou de séquences nucléotidiques. Parmi ces techniques, on trouve l'extraction d'ADN génomique, l'amplification par "réaction de polymérisation en chaîne" (PCR) de fragment d'ADN, le séquençage d'ADN et la comparaison de séquences d'ADN par un algorithme mathématique (BLAST).

Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN génomique des souches bactériennes isolées ont été faites à l'aide des kits d'extraction Wizard (Promega, Suisse). Un à deux millilitres de culture congelée ont été utilisés pour ces extractions.

PCR gradient

Les PCR gradient ont été effectuées avec les amorces "universelles" 27f (5' - AGA GTT TGA TC(AC) TGG C - 3') et 520r (5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3'), de manière à optimiser les PCRs suivantes. Les températures du gradient étaient les suivantes : 44.1°C, 44.4°C, 45.1°C, 46.4°C, 47.8°C, 49.5°C, 51.2°C, 53.0°C, 54.9°C, 56.1°C, 56.8°C, 57.2°C. Chaque tube de réaction PCR contenait : MgCl₂ 1.2 µL, Tampon 10x 1 µL, dNTP 0.2 µL, 0.25 µL de chaque amorce (MGW biotech, Allemagne), Taq ADN polymérase 0.1 µL (5U/µL), H₂O nanopure (≥18 MΩ) stérile 6 µL. 1 µL d'ADN génomique de *B. megaterium* dilué 10 fois (témoin positif) a été ajouté à chaque tube comme modèle. Un témoin négatif a été préparé avec d'eau nanopure (≥18 MΩ) stérile. A l'exception des amorces, tous les produits ont été achetés chez Promega (Suisse). Les amplifications ont été faites sur un thermocycleur PX2 (ThermoHybaid, Catalys AG, Suisse). Le programme et les résultats de cette PCR sont résumés dans la figure 14. La température d'hybridation retenue pour les PCRs suivantes fut 51.2°C.

PCR

Les PCR ont été effectuées avec les amorces "universelles" 27f (5' - AGA GTT TGA TC(AC) TGG C - 3') et 520r (5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3'), de manière à amplifier un fragment d'environ 500 paires de bases des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S. Chaque tube de réaction PCR contenait: MgCl₂ 6 µL, Tampon 10x 5 µL, dNTP 1 µL, 1.25 µL de chaque amorce (MGW Biotech, Allemagne), Taq ADN polymérase 0.5 µL (5U / µL), H₂O nanopure (≥18 MΩ) stérile 30 µL. 5 µL d'ADN génomique des souches isolées dilués entre 5 et 20 fois ont été ajoutés à chaque tube comme modèle. Un témoin positif et un témoin négatif furent préparés avec de l'ADN génomique de *B. megaterium* et de l'eau nanopure (≥18 MΩ) stérile respectivement. A l'exception des amorces, tous les produits ont été achetés chez Promega (Suisse). Les amplifications ont été faites sur un thermocycleur PTC-200 (MJ-Research, Bioconcept, Suisse). Le programme de ces PCRs et un exemple de résultats sont donnés dans la figure 15.

Electrophorèse

Le contrôle de l'amplification des produits PCR a été fait par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2%. Le gel d'agarose est préparé en dissolvant 1.2 gramme d'agarose (Eurobio, France) dans 100 ml de TBE 0.5x (Tris 0.045M, H₃BO₃ 0.045M, EDTA 1mM, Qbiogene, Suisse) à chaud. Le gel est ensuite refroidi, additionné de 50 µl de bromure d'éthidium 0.1%, puis mis à polymériser. Les échantillons à tester sont préparés en ajoutant 2 µL de TE (Tris-HCL 10mM, EDTA 1 mM) et 11 µl de LB (Bleu de bromophenol 0.25%, saccharose 40%) à 1 µL de la réaction PCR à tester. Une fois chargés dans le gel, les échantillons sont laissés à migrer pendant 50 à 60 minutes sous une tension constante de 80 volts. Les échelles de masse "100bp DNA mass ladder" (Bioconcept, Suisse) et "100bp DNA ladder" (Promega, Suisse) ont été utilisées pour mesurer la taille des fragments d'ADN amplifiés et pour mesurer leurs concentrations.

Séquençage

Cent nanogrammes de chaque fragment de 500 paires de bases d'ADN à séquencer ont été envoyés à MGW biotech (Allemagne). Les séquences obtenues nous ont été livrées aux formats, SCF, FASTA et TXT.

BLAST

Le BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est un algorithme qui permet de comparer des séquences de protéines ou des séquences nucléotidiques entre elles. Les acides aminés ou les nucléotides de ces séquences sont comparés deux à deux, ce qui permet de calculer la similarité entre deux séquences. Cet algorithme permet aussi de rechercher la ou les séquences les plus proches de celle introduite dans de grandes bases de données (RDP et NCBI par exemple).

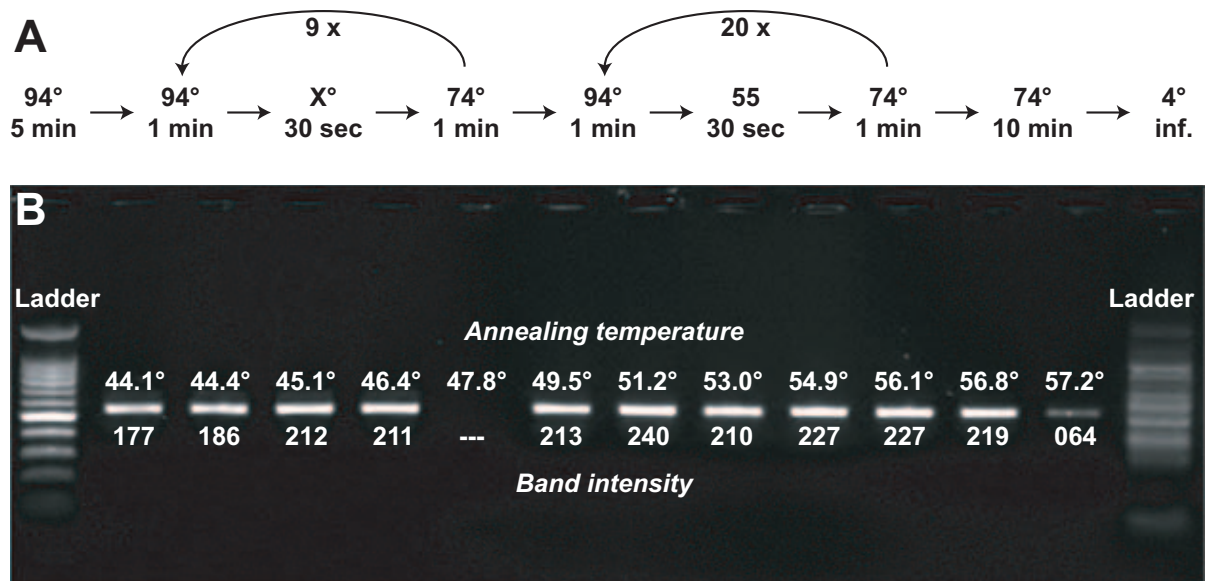


Figure 14: A: Schéma du programme utilisé pour la PCR gradient. X est l'une des températures testées lors de cette réaction. B: Résultat obtenu; pour chaque produit PCR, la température d'hybridation et l'intensité de la bande sont indiquées. A: *The gradient-PCR program used.* B: *Results indicating annealing temperature and band intensity for each PCR product.*

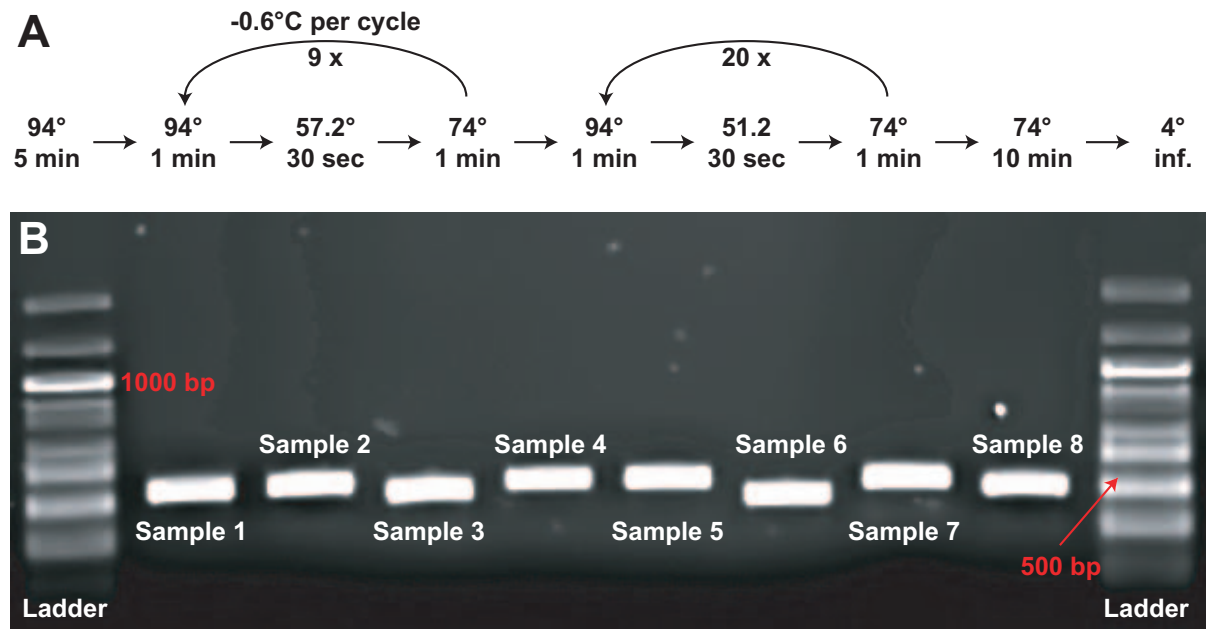
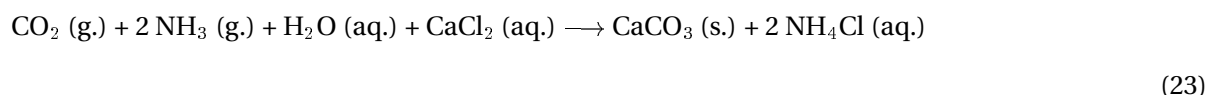
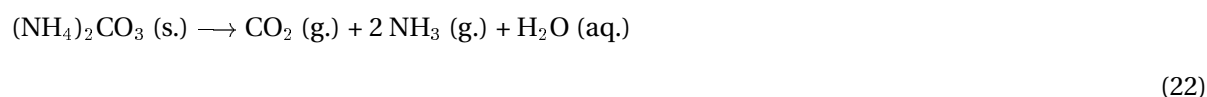


Figure 15: A: Schéma du programme utilisé pour la PCR. B: Exemple de résultats. A: *The PCR program used.* B: *Example of results.*

Expérience de (bio)minéralisation abiotique

Les parois bactériennes sont des systèmes très complexes. Pour tester les influences des structures bactériennes tels que les EPS et les acides aminés, un système abiotique a été mis en place. Des solutions de CaCl₂ 5% ont été additionnées avec des quantités croissantes de xanthane (0.1%, 0.5%, et 1.0% - un exopolysaccharide commercial) et des acides aminés (l-glutamine 1%, ou l-glutamate 1%, ou l-aspartate 1%) . Ces solutions ont été placées dans des boîtes de Pétri, et mises à réagir avec du (NH₄)₂CO₃ dans un dessiccateur fermé. Ici le principe est de laisser le carbonate d'ammonium se dissocier en dioxyde de carbone, eau et ammoniacque. Le dioxyde de carbone et l'ammoniacque vont ensuite envahir l'enceinte close du dessiccateur puis diffuser dans la solution de CaCl₂ contenant le xanthane. Le CO₂ en réagissant avec l'eau va produire des ions carbonates, alors que l'ammoniacque se comportant en base faible, va alcaliniser le milieu. L'objectif de cette manipulation était de forcer la précipitation de CaCO₃ à partir de la réaction entre le (NH₄)₂CO₃ et le CaCl₂ (équ. 22 et 23) dans un milieu simulant un biofilm.



Chimie et pédologie

Mesure du pH H₂O

Le pH des échantillons de sol a été mesuré avec une électrode à pH Metrohm (Suisse). 25 mL d'eau déionisée sont ajoutés à 10 g d'échantillon. Le pH est mesuré après 16 heures d'agitation. Pour la mesure du pH, les échantillons ne sont pas broyés.

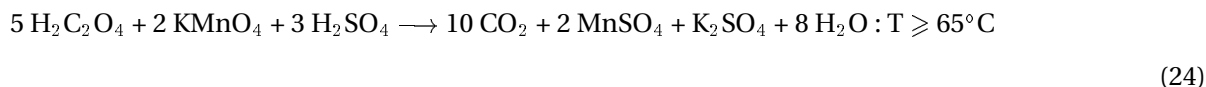
Dosage des carbonates

La quantité totale de carbonate est mesurée par titration en retour de l'acide sulfurique. 125 mL d'eau déionisée et 25 mL d'H₂SO₄ 1N sont ajoutés à 1 g d'échantillon broyé. L'acide sulfurique est ensuite titré avec une solution de NaOH 0.5N. Deux blancs sont effectués par série en remplaçant l'échantillon par de l'eau.

Dosage des oxalates

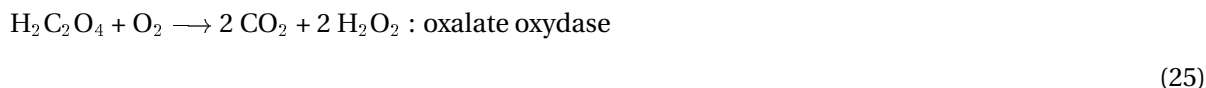
Méthode chimique

Le dosage chimique de l'oxalate s'effectue sur des milieux de cultures dans lesquels il n'y a que de l'oxalate comme source de carbone organique. Ce dosage utilise la réaction du KMnO₄ avec l'oxalate en milieu acide (équ. 24). Avant le dosage, 10 ml de milieu de culture sont filtrés avec un filtre à seringue de 0,2 μm de manière à retirer les débris de cellules qui pourraient interagir avec la titration. 5 ml d'échantillon et 5 ml d'H₂SO₄ 10% sont ensuite placés dans un erlenmeyer et chauffés à 70°C. Finalement, du KMnO₄ 0.01 M est ajouté jusqu'à ce que la coloration violette de celui-ci reste dans la solution.



Méthode enzymatique

Le dosage enzymatique de l'oxalate s'effectue sur des échantillons de sol ou de plantes secs et broyés. Dans un tube de 50 ml, 25 ml d'HCl 1N sont ajoutés à 10 grammes d'échantillons. Les échantillons sont ensuite laissés une nuit sous agitation lente. Après agitation, le pH des solutions est abaissé à 2, si nécessaire, avec de l'HCl 6N. Les échantillons sont ensuite filtrés avec des filtres à seringues de 0.2 μm (Nalgène). Le filtrat obtenu est ensuite analysé avec des kits de détermination de l'oxalate (Sigma, Suisse). Ces kits utilisent l'action d'une oxalate oxydase couplée à une peroxydase pour obtenir une mesure colorimétrique de la concentration d'oxalate en solution (équ. 25 et 26).



MBTH: 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone - DMAB: 3-(diméthylamino)-benzoate

(26)

Analyse des anions et cations

Les anions et les cations en solution ont été analysés par chromatographie ionique sur des chromatographes Dionex DX500 et Dionex DX120 (Dionex, Suisse), équipés de détecteurs ampérométriques. Les cations ont été analysés sur une colonne CS12A (4 x 250 mm, Dionex, Suisse), en utilisant de l'acide méthylsulfonique 20 mM comme éluant. Les anions ont été analysés sur une colonne AS11-HC (4 x 250 mm, Dionex, Suisse). Un gradient de KOH de 20 à 40 mM a été utilisé pour séparer les anions.

Diffraction des rayons X

Les minéraux cristallisés ont la propriété de diffracter les rayons X selon la loi de Bragg. La mesure des rayons diffractés par un diffractomètre permet l'identification des minéraux. Dans la pratique on analyse des échantillons réduits en poudre. Dans cette poudre, la position au hasard des différentes particules assure statistiquement la représentation de toutes les orientations possibles des minéraux susceptibles de diffracter les rayons X. Ceci permet d'obtenir un spectre de diffraction complet (Pansu et Gauteyrou, 2003). Dans ce travail, le diffractomètre utilisé est un diffractomètre Scintag XDS 2000. L'analyse des spectres obtenus et la déconvolution de certaines portions de ces spectres ont été faites à l'aide du logiciel MacDiff 5.4.1 (Dr. Rainer Petschick).

Microscopie

Microscopie optique

Les échantillons ont été observés à l'aide de plusieurs microscopes optiques. Les échantillons minéraux ont été observés avec un microscope polarisant (Leitz, Suisse). Pour les échantillons biologiques,

on a utilisé un microscope optique standard ou à contraste de phase (Zeiss, Allemagne). Finalement la microscopie à fluorescence a été utilisée de manière ponctuelle sur certains échantillons. Des colorants comme le 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) et l'acridine orange ont été utilisés pour mettre en évidence l'ADN. Si le DAPI est spécifique de l'ADN, l'acridine orange, elle, l'est nettement moins. Cette dernière peut aussi mettre en évidence l'ARN ainsi que d'autres polymères.

Microscopie électronique

La microscopie électronique permet d'obtenir des images ayant une résolution de l'ordre de quelques nanomètres en utilisant des électrons pour former une image (Figure 16 A). De plus, les nombreuses interactions ayant lieu entre le faisceau d'électrons et l'échantillon permettent d'obtenir des informations sur la nature chimique de l'échantillon par différentes méthodes spectrométriques (Figure 16 B) que l'on peut coupler à la microscopie électronique. Néanmoins, l'utilisation d'électrons ne peut se faire que sous un vide poussé. Ceci implique souvent que les échantillons doivent être préparés de manière à pouvoir résister à ce vide. De même l'utilisation des électrons qui sont des particules chargées implique que l'échantillon doit le plus souvent être rendu conducteur. Des techniques telles que la microscopie électronique à basse température (Cryo-SEM) ou la microscopie électronique "environnementale" (ESEM) permettent toutefois de s'affranchir de certaines contraintes imposées par les techniques de microscopie électronique classiques (Dykstra et Reuss 2003).

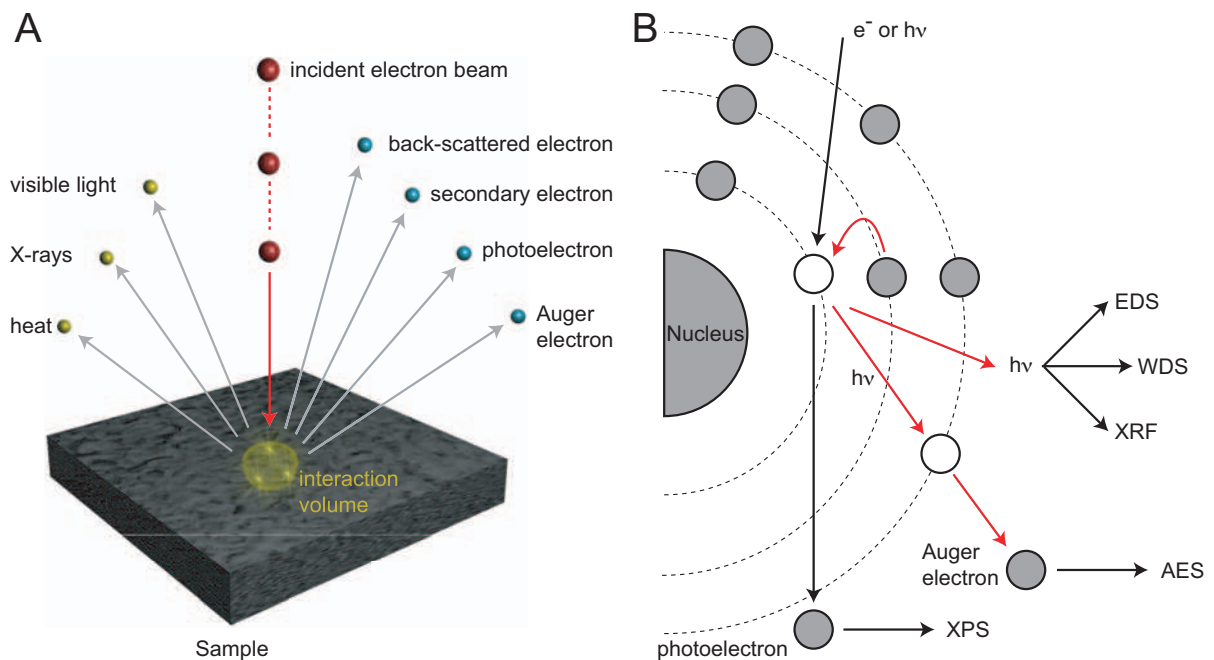


Figure 16: A: Schéma simplifié des particules produites dans un microscope électronique. Dans le cas de cette thèse, seuls deux types de particules ont été utilisés: les électrons secondaires qui servent à former l'image et les rayons X permettant d'obtenir la composition chimique de l'échantillon. B: Schéma simplifié de l'origine et de l'utilisation des particules produites dans un microscope électronique. Dans notre cas, l'analyse des rayons X s'est faite par EDS (Energy Dispersive Spectroscopy). A: Simplified sketch of the particles produced in an electron microscope. During this study only 2 types of particles were used: secondary electron forming the image, and X-rays for chemical analyses. B: Simplified sketch of the origin and use of the particles produced in an electron microscope. X-rays analysis was performed by EDS (Energy Dispersive Spectroscopy).

Préparation des échantillons

Une grande partie des échantillons n'a pas nécessité de préparation avant d'être observée au microscope électronique. Néanmoins, un certain nombre d'échantillons ont été préparés suivant différentes méthodes. Les échantillons de bois ont été fixés avec des vapeurs de tetroxyde d'osmium (OsO_4). Ces échantillons ont ensuite été lyophilisés pendant une nuit. Finalement, une couche d'or de 20 à 35 nm a été déposée sur ces échantillons avant l'observation. Les échantillons provenant de cultures bactériennes sur gélose ont été fixés en déposant une goutte (env 50 μl) de glutaraldéhyde 25% à la base d'un bloc de gélose et en laissant diffusé celui-ci environ 20 minutes. Une seconde fixation a ensuite été effectuée avec des vapeurs de tetroxyde d'osmium dans une enceinte close de petit volume. Ensuite, les échantillons ont été déshydratés dans de l'éthanol à 4°C (100%), puis dans de l'acétone à 4°C (100%). L'acétone a été remplacée par du tetramethylsilane (TMS) à 4°C. Le tetramethylsilane est ensuite évaporé à l'air en dessous de 10°C. Comme pour les échantillons de bois, une couche d'or de 20 à 35 nm est déposée sur les échantillons avant l'observation. Cette méthode bien que "brutale" permet de ne pas altérer les cristaux et de conserver aussi bien que possible les structures bactériennes.

Artéfacts

Toutes les préparations que doivent subir les échantillons impliquent souvent des artéfacts. Dans le cas de cette thèse, la technique retenue ci-dessus permet d'éviter la dissolution des cristaux que l'on observe avec la technique classique décrite par Ryter et Kellenberg (1958); en revanche les bactéries sont parfois légèrement déformées (Figure 17).

Masque flou

Le but du masque flou est de rehausser les contrastes d'une échelle de détails. Les détails de l'image sont donc extraits puis ajoutés à l'image initiale. Ceci les rendra donc plus évidents sur l'image finale. Bien qu'applicable à des photos argentiques, cette technique se prête particulièrement bien aux photos numériques. C'est une technique qui a été développée essentiellement pour l'astronomie, mais qui paradoxalement peut s'appliquer aux images de microscopie. La première étape de cette technique est l'extraction des détails. Pour ce faire, on va soustraire l'image initiale rendue floue à l'image initiale; ceci permet d'obtenir le "masque de détails". Une fois le masque des détails obtenu, il suffit de l'ajouter à l'image originale pour obtenir une image traitée. On a donc :

$$\text{Masque des détails} = \text{Image initiale} - \text{Image initiale rendue floue}$$

$$\text{Image traitée} = X \cdot \text{Image initiale} + Y \cdot \text{Masque des détails}$$

X et Y sont choisis arbitrairement pour faire ressortir au mieux les détails

Dans la pratique, on utilise les logiciels Photoshop[®] (Adobe[®]), Gimp (Free Software Foundation) ou Graphic Converter[®] (Lemke Software GMBH) pour réaliser toutes les opérations d'un masque flou. Ci-dessous un exemple de traitement de l'image par la technique du masque flou (Figure 18).

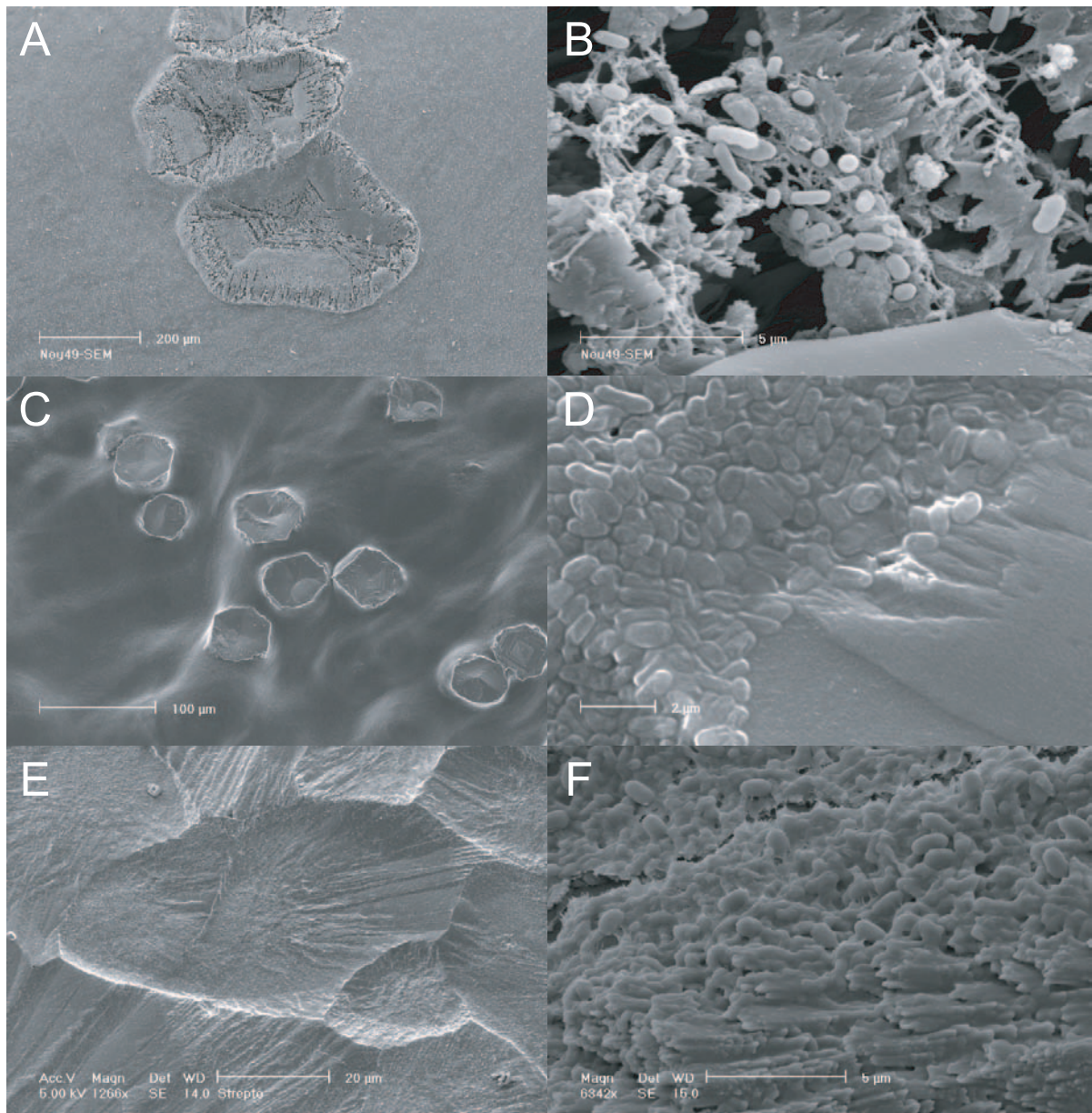


Figure 17: A: Photos au microscope électronique à balayage montrant les artéfacts produits sur des surfaces minérales et des bactéries par différentes techniques de préparation des échantillons. A,B: Cristaux de carbonate de calcium sur une colonie bactérienne préparé selon la méthode de Ryter et Kellenberg (1958). Les cristaux ont subi une forte dissolution (A), alors que les bactéries sont parfaitement conservées (B). C,D: Cristaux de carbonate de calcium sur une colonie bactérienne préparée selon la méthode décrite dans la section précédente. Les surfaces minérales sont intactes (C), alors que les bactéries sont relativement bien préservées mais légèrement déformées ou écrasées (D). E,F: cristaux de carbonate de calcium associés à une colonie bactérienne préparée par cryofixation. Les surfaces minérales sont parfaitement intactes (E), de même les bactéries sont parfaitement préservées (F). *Scanning electron microscope image showing artefact produced on mineral surfaces and bacteria using different preparation techniques. A,B: Calcium carbonate crystals on a bacterial colony prepared according to the method described by Ryter and Kellenberg (1958). Important dissolution traces can be seen on the crystals (A), as bacteria are perfectly preserved (B). C,D: Calcium carbonate crystals on a bacterial colony prepared according to the method described in the previous section. Mineral surfaces remain unaltered (C) as bacteria are relatively well preserved but slightly deformed or squashed (D). E,F: Calcium carbonate crystals associated with a bacterial colony prepared by cryofixation. Minerals surfaces (E) and bacteria (F) are perfectly preserved.*

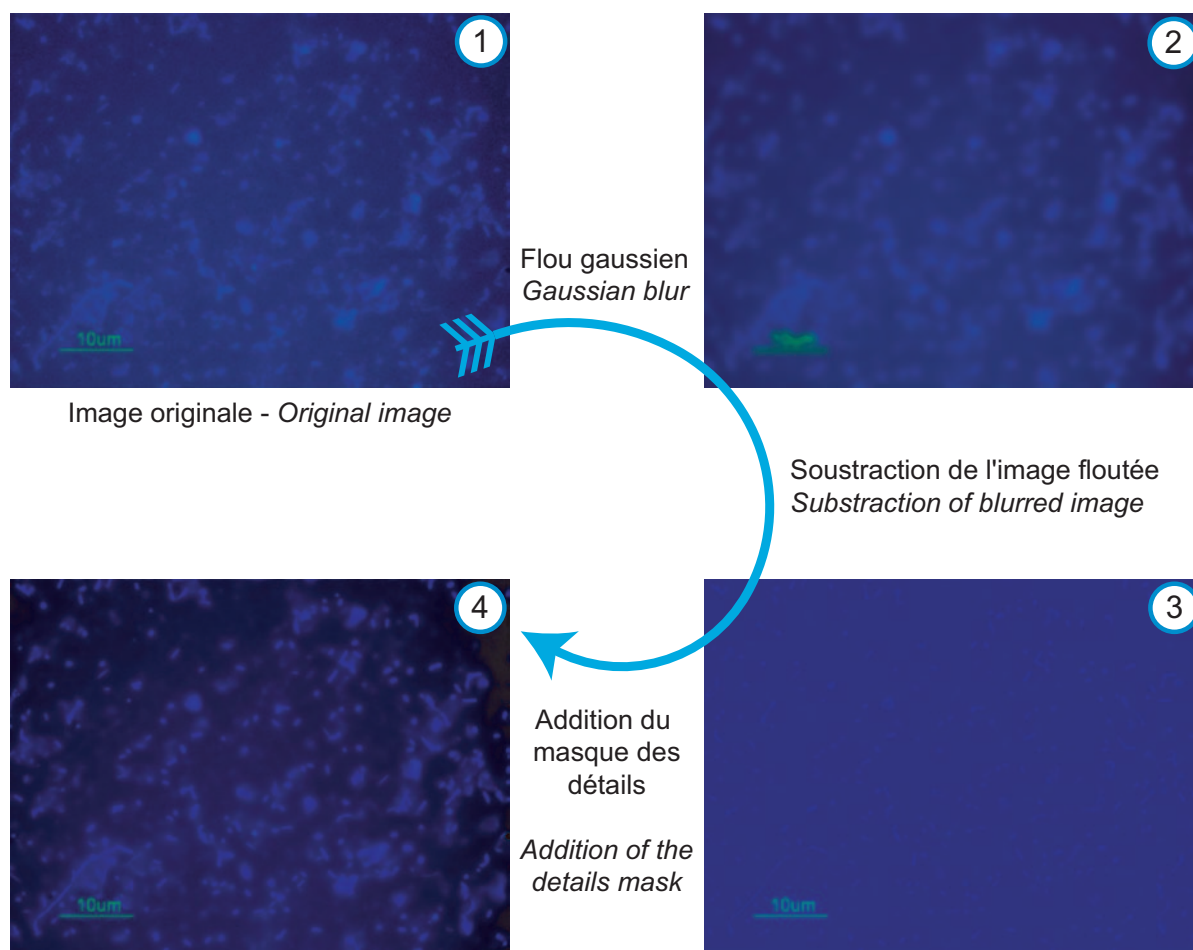


Figure 18: Exemple de traitement d'une image par la technique du masque flou. 1) Image originale. 2) Image rendue floue. 3) "Masque de détails", (luminosité augmentée 2 fois pour rendre les détails visibles). 4) Image finale *Example of an image treated with the "blurred mask" technique. 1) Original image. 2) Blurred image. 3) "Details mask" (brightness has been increased 2 times to render details visible). 4) Treated image.* Photo: Etudiants BGS 2005 and J. Zopfi.

Le Débruitage des images

Certaines images bruitées ont été débruitées à l'aide un algorithme commercial, NeatImage[®]. Cet algorithme gratuit se trouve sous forme de plug-in pour Photoshop[®].

Résumé - Summary

- Les techniques de microbiologie classique ont été utilisées afin d'isoler, de purifier et de travailler avec les différentes bactéries oxalotrophes. Ce type de méthodes est aussi à la base de toutes les expériences de biominéralisation. *Classical microbiology technique techniques have been used to isolate, purify and work with the different oxalotrophic bacteria. These techniques were also used in all biomineralization experiments.*
- Les techniques de biologies moléculaires ont été utilisées essentiellement pour identifier les bactéries oxalotrophes isolées et afin de mettre en évidence les relations entre celles-ci. *Molecular biology tools have been used to identify oxalotrophic strains isolated and to show the relations*

between these bacteria.

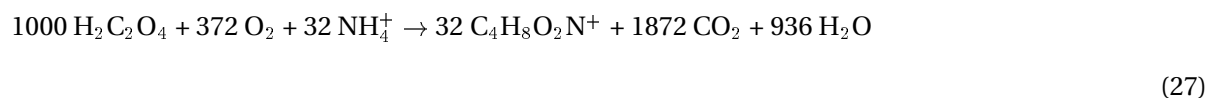
- Les techniques de chimie et de pédologie ont été utilisées pour estimer les paramètres physico-chimiques des divers sols étudiés. *Chemistry and pedology techniques were used to estimate physico-chemical parameters from studied soils.*
- L'observation des échantillons a été faite avec des microscopes optiques et électroniques. Les images obtenues ont souvent été traitées avec des techniques simples de traitement de l'image. *Sample were observed with light and electron microscope. The images obtained were treated with basic image treatment techniques.*

Chapitre 3: Carbonatogénèse bactérienne à partir d'oxalate

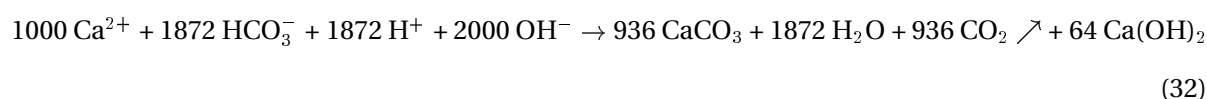
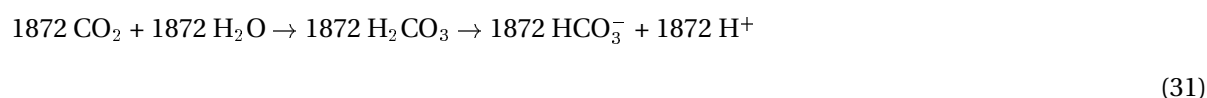
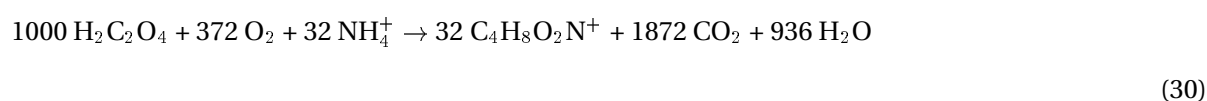
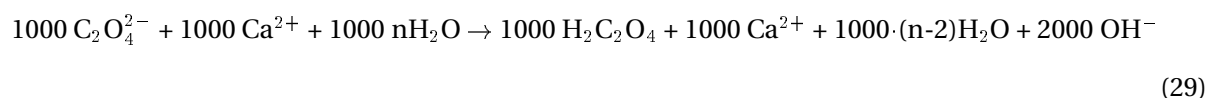
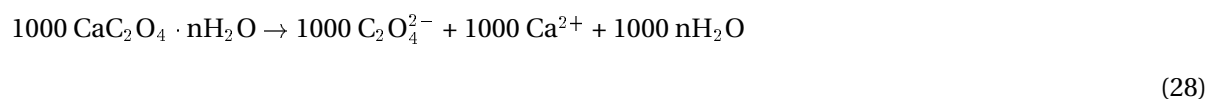
Dans ce chapitre se trouvent réunies les observations sur la carbonatogénèse bactérienne à partir d'oxalate obtenues lors d'expérimentations faites en laboratoire. L'approche du cycle oxalate-carbonate utilisée ici est donc essentiellement réductionniste et a pour but de mettre en évidence et de décrire les processus importants de ce cycle dans des conditions connues. Les résultats exposés dans ce chapitre serviront par la suite à interpréter les données obtenues sur le terrain, autour de plantes produisant de l'oxalate.

Introduction

La carbonatogénèse bactérienne à partir d'oxalate a été postulée précédemment dans de nombreux travaux (Cromack et al. 1977, Verrecchia 1990, Guillet 1993, Garvie 2003). Néanmoins aucune expérience démontrant la capacité de bactéries à transformer l'oxalate de calcium en carbonate de calcium n'a été réalisée. Dans ce chapitre, on va donc aborder le cycle oxalate carbonate du point de vue des bactéries et en particulier du métabolisme bactérien. Bien que la consommation d'oxalate soit une propriété répartie dans 40 genres bactériens environ (Sahin 2003), seules quelques souches bactériennes ont été étudiées en détail (Dijkhuizen et al. 1977, Chandra et Shethna 1977, Blackmore et Quayle 1968, Tamer et Aragno 1980). L'étude de ces souches a néanmoins fourni une grande quantité d'informations utiles pour ce travail. Outre l'étude du métabolisme bactérien de l'oxalate (voir chapitre 1, pages 9 à 12), ces études ont permis d'estimer le rendement de croissance de certaines souches oxalotrophes et par là de connaître la quantité de CO₂ produit lors de la consommation d'une quantité donnée d'oxalate (équ. 27 - Harder et al. 1974).



Comme le montre l'équation ci-dessus, seul 6.4% environ du carbone de l'oxalate est transformé en biomasse, alors que les 93.6% restant sont transformés en CO₂. Des rendements similaires ont été observés chez d'autres bactéries (Dijkhuizen et al. 1977, Chandra et Shethna 1977, Blackmore et Quayle 1968, Tamer et Aragno 1980), ce qui n'est pas surprenant au vu du peu d'électrons que fournit l'oxalate par rapport à d'autres substrats (voir chapitre 1). En solution aqueuse, le CO₂ ainsi produit va réagir avec l'eau pour former des ions hydrogénocarbonates (HCO₃⁻) et carbonates (CO₃²⁻) qui vont précipiter en présence de calcium pour former du carbonate de calcium. Dans des conditions favorables, les bactéries oxalotrophes ont donc le potentiel pour produire de grandes quantités de carbonate de calcium. Ce potentiel est d'autant plus important que dans la nature, l'acide oxalique se trouve essentiellement sous forme d'oxalate de calcium, celui-ci fournissant donc le calcium nécessaire à la précipitation des carbonates (équ. 28 à 32).



Les équations ci-dessus montrent le processus de transformation des oxalates en carbonates d'un point de vue global; il s'agit donc d'un bilan construit autour de l'équation du métabolisme de l'oxalate originalement proposée par Harder et al. (1974 - équ. 29). Dans ce contexte, l'équation 32 montre au final la précipitation de carbonate de calcium, le dégazage de CO_2 , la formation d'eau et au final un excédent de calcium et d'ions hydroxyde. Suivant les conditions du milieu, il est probable qu'une partie du Ca(OH)_2 réagisse avec le CO_2 pour former un peu plus de CaCO_3 . Ici nous considérerons que le CO_2 est complètement dégazé.

Ce chapitre va donc s'intéresser au potentiel que les bactéries oxalotrophes ont de produire du carbonate de calcium, et à la manière dont celui-ci s'exprime dans différentes conditions de cultures en laboratoire. La consommation d'oxalate, le pH, et la production de carbonate seront examinés afin de comprendre en détail les modalités de la carbonatogénèse bactérienne à partir de l'oxalate. De même, les cristaux produits lors des différentes cultures seront étudiés avec soin. En effet, par la suite, il sera important de connaître l'influence des bactéries et des conditions de culture (i.e. des conditions du milieu) sur les cristaux produits. Ceci de manière à pouvoir relier les différents types de carbonate observés sur le terrain à des processus étudiés au laboratoire.

Méthodes

L'évolution du pH en fonction de la consommation d'oxalate et de la croissance bactérienne a été suivie lors de cultures dans du milieu Schlegel additionné d'oxalate de potassium (4 g/L). Les cultures ont été faites à 30° C dans des erlenmeyers de 1 L contenant 500 mL de milieu. Des échantillons de 6 mL ont été prélevés à intervalles réguliers de 4 heures. La densité optique à 600 nm de l'échantillon a été mesurée, puis celui-ci a été filtré à 0,2 μm . La mesure du pH et le dosage de l'oxalate par le KMnO_4 ont été effectués sur l'échantillon filtré. Deux souches ont été utilisées pour ces cultures : *Ralstonia eutropha* et *Xanthobacter autotrophicus*.

Les tests de production de cristaux de carbonate de calcium ont été réalisés sur différents milieux de culture additionnés d'oxalate de calcium (Schlegel, extrait de sol, extrait de sol synthétique, Angle - sans glucose et sans extrait de levure -). De manière générale, la production de cristaux sur ces différents milieux prenant beaucoup de temps, des cultures sur milieu B4 (un milieu "riche" ne contenant pas d'oxalate, mais de l'acétate dont l'oxydation provoque aussi une alcalinisation du milieu) ont été effectués de manière à obtenir de grandes quantités de cristaux. Les souches utilisées pour ces cultures étaient *Ralstonia eutropha*, *Xanthobacter autotrophicus* et *Streptomyces sp.* Ce dernier a été isolé très tôt dans cette thèse; il a été choisi car il a montré un fort potentiel à dégrader l'oxalate de calcium sur milieu Schlegel.

Les cristaux produits sur les différents milieux de culture ont été récupérés à l'aide de brucelles, ou par fusion de la gélose dans une solution d'hypochlorite de calcium saturée. Ils ont ensuite été nettoyés dans une solution d'hypochlorite de calcium saturée, puis ils ont subi plusieurs analyses. Les observations ont été faites avec un microscope optique polarisant ou avec un microscope électronique à balayage couplé à une microsonde EDS. La minéralogie de ces cristaux a été déterminée par diffraction des rayons X. La chromatographie ionique a été utilisée pour déterminer la composition des cristaux en cations majeurs. Des analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Laurent Emmanuel (Université Pierre et Marie Curie, Paris, France) afin de déterminer la composition en isotopes stables du carbone et de l'oxygène de ces cristaux. Le même type d'analyse a été effectué en collaboration avec le Dr. Bernasconi (Institut de Géologie, ETHZ, Zürich, Suisse), en couplant la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse, pour déterminer la composition en isotopes stables du carbone de l'oxalate de calcium utilisé dans les milieux de culture.

Résultats

Evolution du pH en fonction de la croissance bactérienne et de la consommation d'oxalate

Les cultures de *Ralstonia eutropha* et de *Xanthobacter autotrophicus* en milieu liquide contenant de l'oxalate commencent tout d'abord par une longue phase de latence pouvant durer jusqu'à 30 heures environ. La longueur de cette phase de latence semble raisonnable dans la mesure où l'inoculum pour chaque culture provenait de précultures en phase stationnaire tardive réalisées dans le même milieu et à la même température. Ensuite, pendant la phase exponentielle, on observe la consommation de l'oxalate et une augmentation du pH qui passe de 7.0 à 9.0. Les temps de doublement mesurés durant cette phase étaient de 3 h 17 min \pm 1 min pour *R. eutropha* et 4 h 50 min \pm 2 min pour *X. autotrophicus*. De manière à comparer la consommation d'oxalate entre les deux souches, un indice de consommation maximum d'oxalate (équ. 33) a été calculé comme suit :

$$q_{max} = - (dS / dt) / OD_{600} \quad (33)$$

Cet indice permet de rapporter la consommation d'oxalate par unité de temps à la biomasse (mesurée indirectement par la densité optique). Dans le cas de *Ralstonia eutropha*, on obtient une valeur de $-1.16 \text{ (g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \pm 0.01 \text{ (g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ alors que pour *Xanthobacter autotrophicus* on obtient $-1.81 \text{ (g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \pm 0.1 \text{ (g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$. Ceci suggère que *Xanthobacter* consomme plus d'oxalate par unité de biomasse que *Ralstonia eutropha*. L'entrée dans la phase stationnaire est marquée par une diminution brutale de la densité optique. Cette baisse de la densité optique peut être expliquée par une diminution de la taille des cellules ou par la consommation des réserves de poly- β -hydroxybutyrate très réfringentes présentes dans les cellules. Ces deux phénomènes peuvent influencer les propriétés optiques des cellules et donc de la solution dont l'absorbance est mesurée. De même, la disparition d'un précipité au cours de la culture pourraient expliquer une chute de la densité optique; néanmoins l'observation attentive des cultures à permis d'exclure ce dernier cas. Par la suite, la

diminution faible mais régulière de la densité optique peut être attribuée à la lyse des cellules. Celle-ci se prolonge tout au long de la phase stationnaire. Le pH quant à lui continue d'augmenter jusqu'à atteindre des valeurs comprises entre 9.3 et 9.4 à la fin de la culture. Ces résultats sont résumés dans la table 8 et la figure 19.

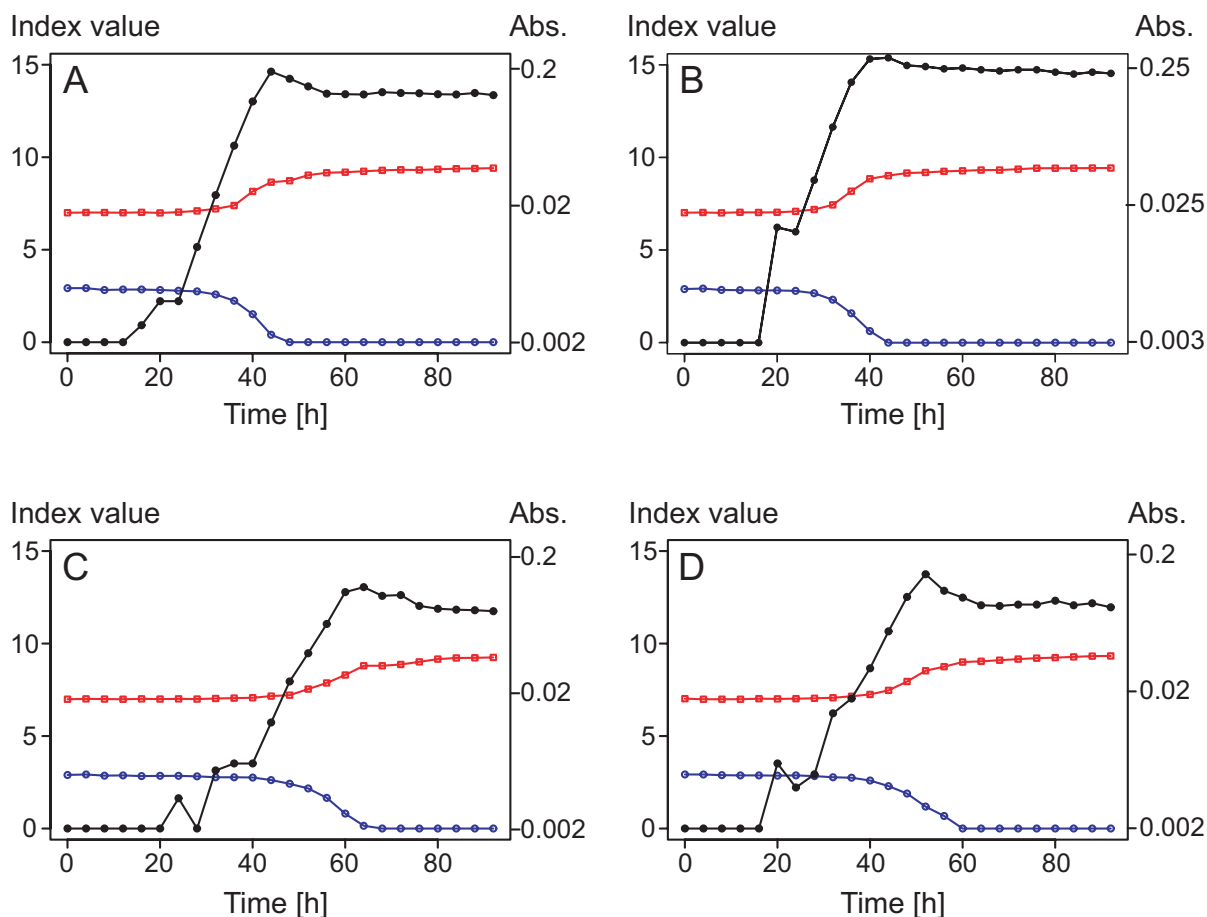


Figure 19: Croissance en milieu liquide, consommation de l'acide oxalique et évolution du pH lors de culture en milieu liquide de *Ralstonia eutropha* (A,B) et de *Xanthobacter autotrophicus* (C,D). ● (noir): OD₆₀₀ (OD: densité optique, représentée sur une échelle logarithmique), ○ (bleu): Concentration d'oxalate en g/L, □ (rouge): pH. Growth, oxalate consumption and pH evolution during liquid culture of *Ralstonia eutropha* (A,B) and *Xanthobacter autotrophicus* (C,D). ● (black): OD₆₀₀ (OD: optical density, represented on a logarithmic scale), ○ (blue): oxalate concentration in g/L, □ (red): pH.

Il faut noter deux phénomènes particuliers à propos des courbes de croissances ci-dessus. Pour commencer il faut noter que les maxima de croissance sont atteints avant que l'oxalate ne soit totalement consommé. Ceci peut s'expliquer par une inhibition de la croissance bactérienne liée à l'augmentation du pH qui atteindrait ici une valeur trop élevée pour que les deux souches utilisées puissent se développer. Ensuite il faut aussi noter que l'utilisation du substrat résiduel semble ralentie et ne semble plus s'accompagner d'une augmentation de la biomasse. Ce dernier point est difficile à expliquer, en effet il semble probable que les bactéries utilisent l'oxalate gratuitement (i.e: "que le métabolisme patine"). On peut toutefois imaginer que l'oxalate consommé sert à alimenter en énergie des processus liés à la survie des ces bactéries dans des conditions de pH hostiles.

Carbonates de calcium et autres minéraux produits lors de cultures bactériennes sur oxalate de calcium.

Sur tous les milieux inoculés avec l'une ou l'autre des souches oxalotrophes, des cristaux sont apparus. Ces cristaux appartenait à plusieurs espèces minéralogiques différentes ; les carbonates, les phosphates, et les sulfates. Toutes ces classes n'ont pas précipité dans les mêmes milieux, c'est pourquoi une description des cristaux produits sur chaque milieu est utile ici. Sur tous les milieux inoculés, après dissolution de l'oxalate et apparition des premiers cristaux, le pH (révélé par une goutte de thymolphtaleïne déposée sur le milieu) était supérieur à 9.0 dans la zone de dissolution de l'oxalate. Par la suite seuls les cristaux de carbonate de calcium produits seront détaillés du point de vue chimique.

Milieu Schlegel additionné d'oxalate de calcium

Sur ce milieu, seuls des phosphates précipitent. Ceux-ci précipitent dès qu'une zone de dissolution apparaît (c'est-à-dire: après 5 à 10 jours de culture). Une des espèces phosphatées a été identifiée par diffraction des rayons X comme de la struvite ($\text{Mg}(\text{NH}_4)(\text{PO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Figure 20). Sur le milieu Schlegel, la struvite se trouve sous forme de cristaux euhedraux massifs d'une taille pouvant aller jusqu'à 3 mm. Les observations au microscope électronique à balayage montrent que la struvite pourrait être associée à de très rares carbonates. L'autre espèce phosphatée n'a pas pu être identifiée par diffraction des rayons X. Néanmoins l'observation au microscope électronique et l'analyse à la microsonde EDS montrent qu'il s'agit d'une forme de calcium-phosphate-carbonate. Les cristaux produits sur le milieu de culture ont des morphologies aplaties, parfois en aiguille, ayant des tailles inférieures au mm. Les cristaux de calcium-phosphate-carbonate occupent l'ensemble de la zone de dissolution de l'oxalate de calcium, alors que les cristaux de struvite se trouvent majoritairement sur le bord extérieur de celle-ci. Les cristaux produits sur le milieu Schlegel sont les mêmes quelle que soit la souche mise en culture.

Extrait de sol

Les cultures réalisées sur extrait de sol ont produit plusieurs types de cristaux: des carbonates, des phosphates, et des sulfates. Sur ce milieu, les carbonates étaient majoritaires alors que les sulfates et les phosphates étaient plus rares. Les carbonates se trouvaient sous forme d'agrégats micritiques bruns et sphéroïdaux, de bâtonnets micritiques (Figure 21) ou de petites sphères fibroradiées (Figure 21). Les agrégats micritiques et les sphérules étaient constitués de calcite et mesuraient de 10 μm à 100 μm de diamètre. Les sphères fibroradiées, celles formées par les agrégats micritiques, et les bâtonnets étaient parfois coalescents au point de former des structures centimétriques. Les sulfates se trouvaient sous forme de gypse. La morphologie des cristaux de gypse était celle d'une rose des sables (Figure 21), à ceci près que la taille de ces roses des sables n'excédait pas 20 μm . Finalement les phosphates, comme pour le milieu précédent, n'ont pas pu être identifiés; néanmoins au vu de la morphologie de ceux-ci, il est probable qu'il s'agisse des mêmes calcium-phosphates-carbonates que ceux observés sur le milieu Schlegel (Figure 21). Il est difficile de parler de la répartition des sulfates et des phosphates par rapport aux colonies car ceux-ci étaient rares. Au contraire, les carbonates, beaucoup plus abondants, précipitaient, soit en halo autour des colonies de *Streptomyces*, soit sur/dans les colonies de *Xanthobacter autotrophicus* et *Ralstonia eutropha*. Les carbonates apparaissaient généralement après environ 1 mois de culture, longtemps après la formation d'un halo de dissolution de l'oxalate de calcium.

Extrait de sol synthétique

Sur l'extrait de sol synthétique, seuls des carbonates précipitent. Ceux-ci se trouvent en paquets blancs répartis aléatoirement sur la boîte de Pétri. Ces paquets sont eux-mêmes formés d'agrégats micritiques en forme de sphères et de bâtonnets. Les sphères ont le plus souvent une structure fibroradiée et un diamètre compris entre 10 μm et 100 μm . Les bâtonnets ont un diamètre maximal

Table 8: Paramètres de croissance des souches oxalotrophes en milieu Schlegel liquide à 30°C.
Growth parameters of oxalotrophic bacteria in liquid Schlegel medium at 30° C.

Souche	Temps de doublement	Indice de consommation maximale d'oxalate
<i>Ralstonia eutropha</i>	3 h. 17 min. ± 1 min	- 1.16 ± 0.01 (g · l ⁻¹ · h ⁻¹)
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	4 h. 50 min. ± 2 min	- 1.81 ± 0.10 (g · l ⁻¹ · h ⁻¹)

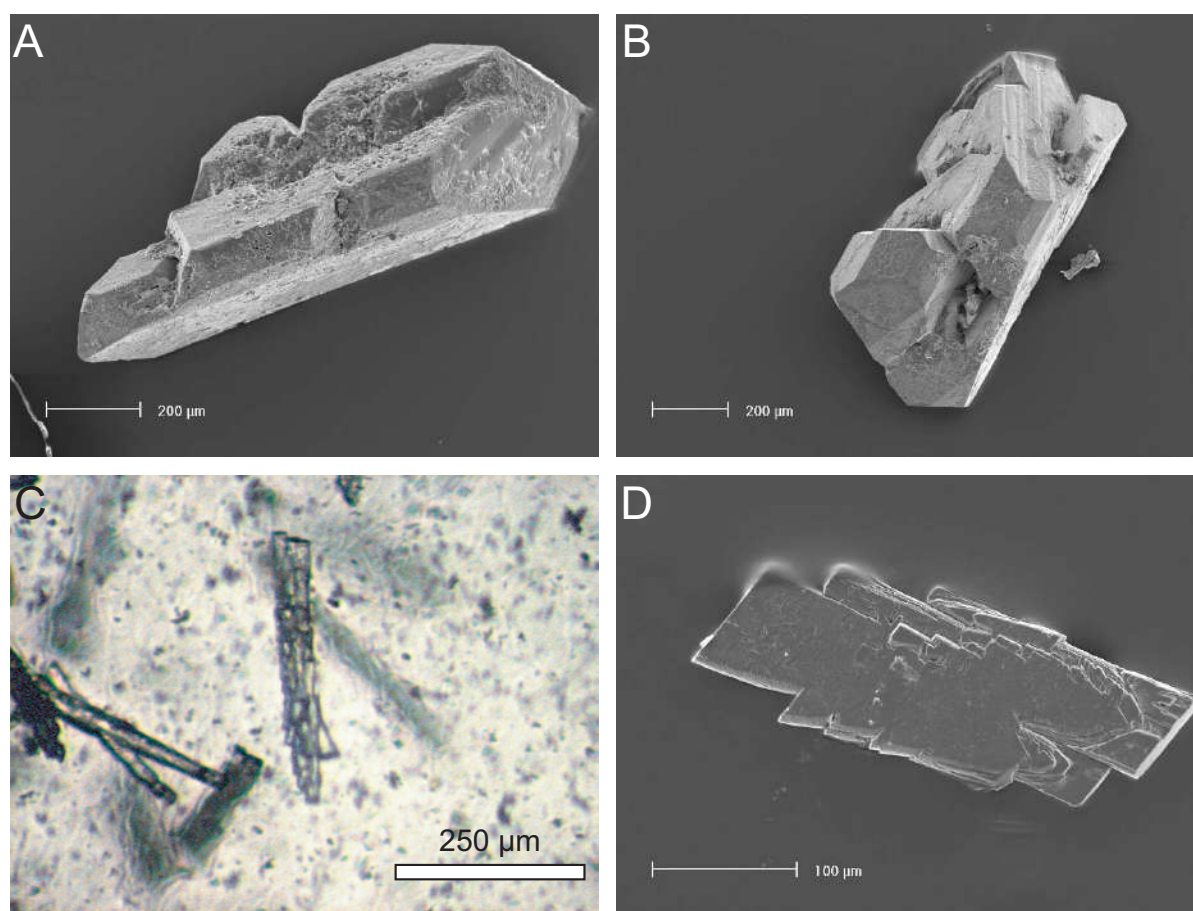


Figure 20: Cristaux produits lors de cultures de bactéries oxalotrophes sur milieu Schlegel gélosé additionné d'oxalate de calcium en double couche. A,B: Image au microscope électronique à balayage (MEB) de cristaux de struvite ($Mg(NH_4)(PO_4) \cdot 6H_2O$). C: photo prises à l'aide d'une loupe binoculaire d'un cristal de calcium-phosphate-carbonate. D: Image au MEB d'un cristal de calcium-phosphate-carbonate. *Crystals produced during oxalotrophic bacteria culture on solid Schlegel media to which was added calcium oxalate in double layer. A,B: Scanning electron microscope (SEM) image of a Struvite ($Mg(NH_4)(PO_4) \cdot 6H_2O$) crystal. C: Microphotograph of a calcium-phosphate-carbonate crystal taken with a binocular. D: SEM image of a calcium-phosphate-carbonate crystal.*

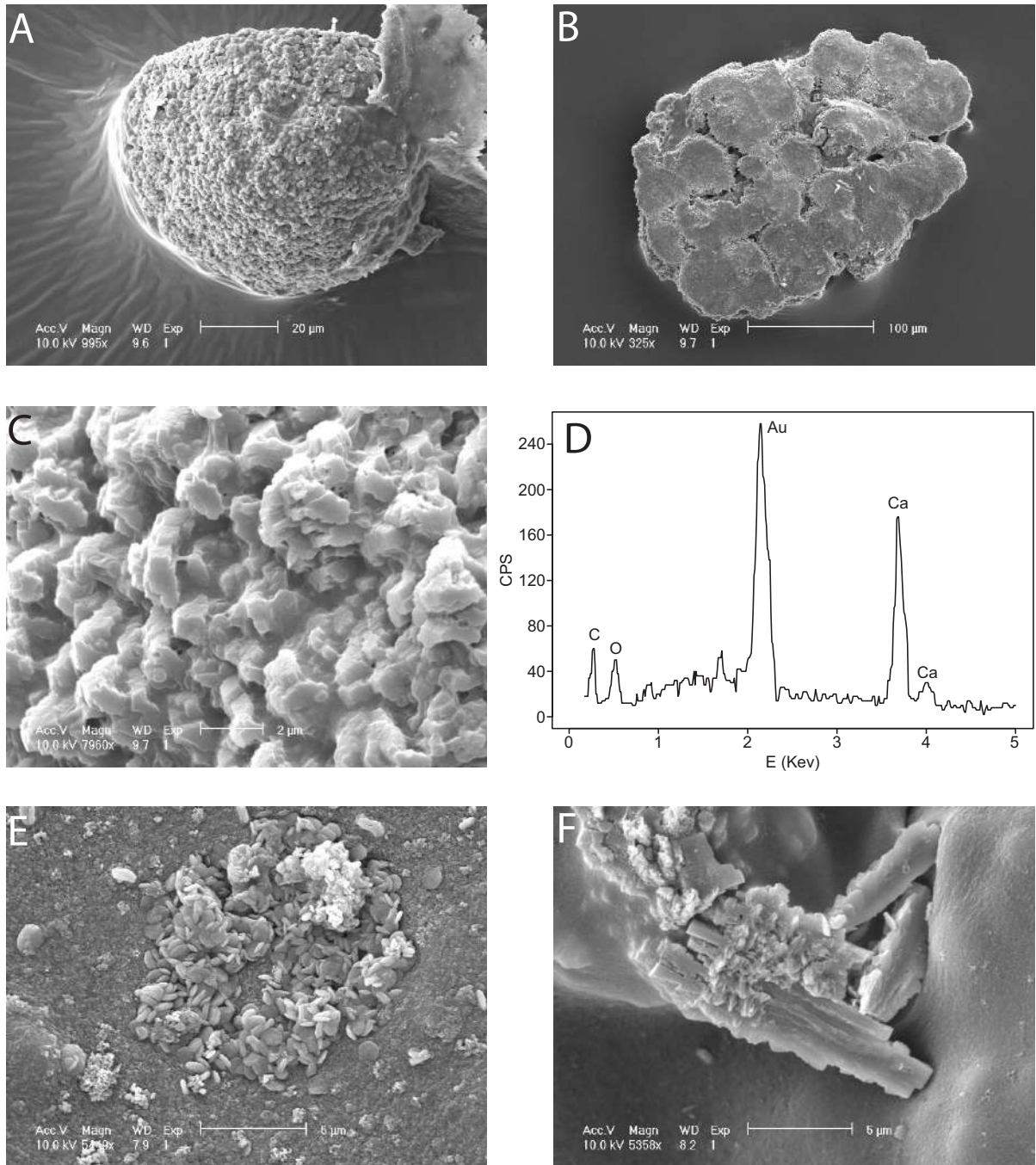


Figure 21: Observation au microscope électronique des cristaux produits par les différentes souches oxalotrophes sur extrait de sol additionné d'oxalate de calcium. A,B,C: carbonate de calcium. A: agrégat micritique sphéroïde. B: coalescence de petits agrégats micritiques. C: détail d'un agrégat micritique, la présence de matière organique se traduit par la présence d'un film entre les cristaux. D: spectre EDS d'un agrégat micritique. E: cristaux de gypse en rose des sables. F: cristaux de calcium-phosphate-carbonate. *Scanning electron microscope image of crystals produced during oxalotrophic strains culture on soil extract to which calcium oxalate was added. A,B,C: calcium carbonate. A: spheroid composed of micritic aggregates. B: coalescent micritic aggregates. C: close-up of a micritic aggregate showing the presence of a thin film of organic matter between the crystals. D: EDS spectrum of a micritic aggregate. E: a sand rose of gypsum crystals. F: Calcium-phosphate-carbonate crystals*

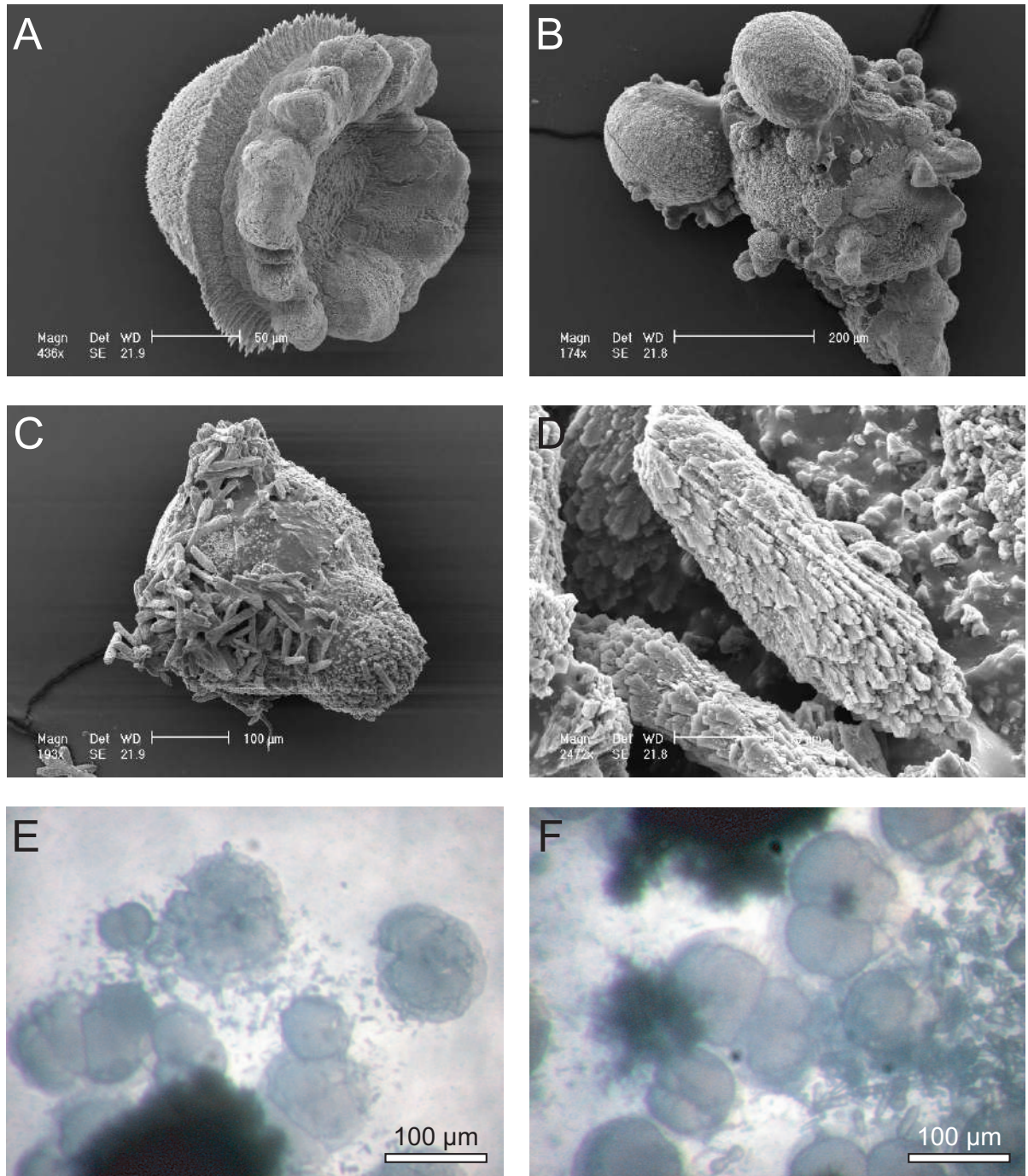


Figure 22: Microscopie électronique (A,B,C) et optique (E,F) des cristaux de carbonate de calcium produits par les différentes souches oxalotrophes sur extrait de sol synthétique. A: agrégat micritique hémisphérique surmonté d'épitaxies. Ces épitaxies se sont formées à l'interface agar/air. Notez qu'un disque fibroradié se forme exactement à cet emplacement. B: coalescence de nombreux agrégats micritiques. C: coalescence d'agrégats micritiques et de bâtonnets micritiques. D: détail d'un bâtonnet micritique. E,F: vue générale des cristaux produits et des colonies de *Streptomyces*. *Electron (A,B,C) and light (E,F) microscopy of calcium carbonate crystals produced by oxalotrophic bacteria on synthetic soil extract. A: spheroid micritic aggregate showing epitaxies at the agar/air interface. A fibroradiated disc forms exactly at this interface. B: coalescent spheroid micritic aggregates. C: coalescent spheroid and rod-shaped micritic aggregates. D: close-up of a rod-shaped micritic aggregate. E,F: general view of the crystals produced and of the Streptomyces colonies.*

de $20\mu\text{m}$ pour une longueur comprise entre $40\mu\text{m}$ et $80\mu\text{m}$ (Figure 22). Encore une fois les carbonates apparaissent longtemps après la formation du halo de dissolution de l'oxalate de calcium, soit après environ 1 mois.

Milieu Angle (modifié : sans glucose, sans extrait de levure, + 4g/L d'oxalate de calcium)

Sur le milieu Angle, seuls des carbonates précipitent. Ceux-ci se trouvent en paquets brun clair répartis aléatoirement sur la boîte de Pétri. Parfois ceux-ci semblent s'organiser autour des colonies. Comme sur l'extrait de sol, les paquets de carbonate de calcium sont eux-mêmes formés d'agrégats de sphères calcitiques d'un diamètre compris entre $10\mu\text{m}$ et $100\mu\text{m}$ (Figure 23). L'apparition des cristaux de carbonate suit le même déroulement chronologique que sur l'extrait de sol et l'extrait de sol synthétique.

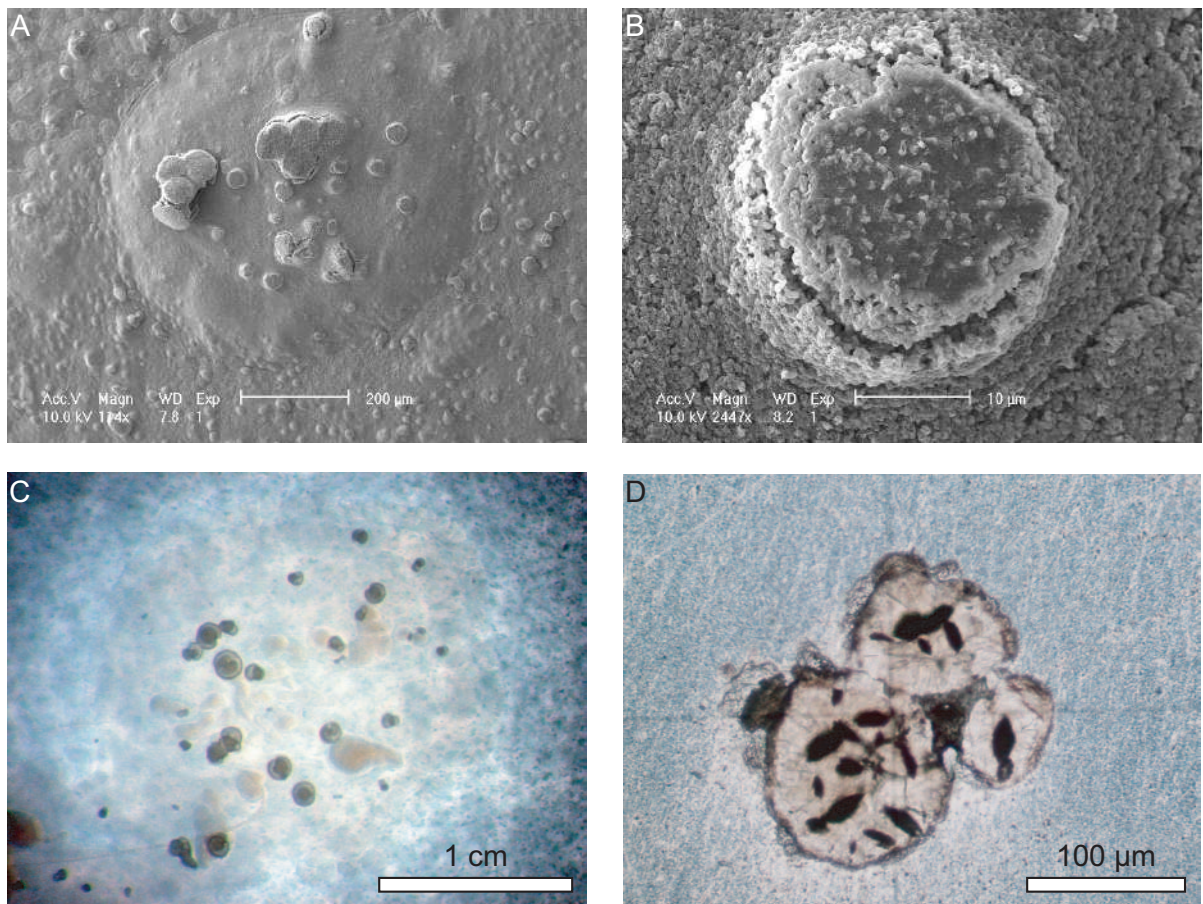


Figure 23: Photo en microscopie électronique (A,B) et optique(C,D) des cristaux de carbonate de calcium produits par les différentes souches oxalotrophes sur milieu Angle additionné d'oxalate de calcium. A: agrégats micritiques sphéroïdaux sur une colonie de *Xanthobacter autotrophicus*. B: détail d'un agrégat micritique émergeant de la colonie. C: Vue générale des cristaux produits sur une boîte de Pétri. D: cristaux produit par *Streptomyces* observés en lame-mince. Notez les inclusions plus sombres probablement dues aux pigments des bactéries. *Electron (A,B) and light microscopy (C,D) of calcium carbonate crystals produced by different oxalotrophic strains on angle media to which calcium oxalate was added. A: spheroid micritic aggregates on a Xanthobacter autotrophicus colony. B: close-up of micritic aggregate growing at the surface of the colony. C: general view of the crystal produced on a Petri dish. D: Spheroid aggregates produced by Streptomyces observed in thin section. Note the dark inclusion probably due to the pigment produced by this bacteria.*

Chimie des carbonates produits lors de cultures bactériennes sur oxalate

En ce qui concerne les cations majeurs, les cristaux de carbonate de calcium produits sur chaque milieu étaient très similaires. Seules de très légères différences pouvaient être notées entre les souches. Les cristaux produits par *Ralstonia eutropha* étaient composés d'une calcite quasiment pure; seules quelques traces de magnésium et de potassium y ont été détectées par chromatographie ionique (Table 8). En ce qui concerne les cristaux produits par la souche de *Streptomyces*, ceux-ci pouvaient être considérés comme de la calcite faiblement magnésienne. En effet, celle-ci contenait entre 1% et 2% de magnésium. Outre le magnésium, des traces de sodium ont été trouvées dans les cristaux produits par *Streptomyces* (Table 9).

Table 9: Propriété chimique des cristaux de carbonate de calcium produits par les différentes souches sur les milieux solides. *Chemical properties of calcium carbonate crystals produced by oxalotrophic strains on solid media.*

Milieu	Souche	Formule	Traces ($\ll 1\%$)	$\delta^{13}\text{C}$ (PDB)	$\delta^{18}\text{O}$ (PDB)
Extrait de sol	<i>Streptomyces</i>	$\text{Ca}_{0.99}\text{Mg}_{0.01}\text{CO}_3$	Na^+	-1.8 ‰	-7.05 ‰
	<i>Ralstonia</i>	CaCO_3	$\text{Mg}^{2+}, \text{K}^+$	—	—
Extrait de sol synthétique	<i>Streptomyces</i>	$\text{Ca}_{0.99}\text{Mg}_{0.01}\text{CO}_3$	Na^+	—	—
	<i>Ralstonia</i>	CaCO_3	$\text{Mg}^{2+}, \text{K}^+$	—	—
Angle	<i>Streptomyces</i>	$\text{Ca}_{0.98}\text{Mg}_{0.02}\text{CO}_3$	Na^+	-0.29 ‰	-6.89 ‰

Les isotopes stables du carbone et de l'oxygène ont été mesurés pour les cristaux produits par *Streptomyces*. Sur l'extrait de sol, les δ (PDB) étaient de -1.80‰ pour le carbone et de -7.05‰ pour l'oxygène. Sur le milieu Angle modifié, les valeurs mesurées étaient de -0.29‰ et -6.89‰, pour le carbone et l'oxygène respectivement. En elles-mêmes ces valeurs ne sont qu'indicatives, elles prennent leur sens quand on les compare aux valeurs du produit de départ, l'oxalate, pour lequel le δ (PDB) ^{13}C a été mesuré à +6.8‰. Dans ce cas le fractionnement des isotopes du carbone par les bactéries est compris entre +5.0‰ (oxalate - CaCO_3) produit sur extrait de sol) et +6.6‰ (oxalate - CaCO_3) produit sur milieu Angle).

Carbonates de calcium produit sur milieu B4

Sur le milieu B4 (sans oxalate) les cristaux de carbonate de calcium apparaissent très rapidement, après 4 à 5 jours seulement. Contrairement à ce qui a été observé sur les autres milieux, d'importantes différences sont visibles entre les cristaux produits par les différentes souches mises en culture sur le milieu B4. Ces différences sont d'ordre morphologique et minéralogique. Les cristaux produits par les trois souches tests seront détaillés souche par souche.

Cristaux produits par *Ralstonia eutropha*

Sur ce milieu, *Ralstonia eutropha* produit des cristaux de calcite euhédraux et incolores. Ceux-ci ont une taille variant entre 100 μm et 600 μm (Figure 24). Ils se forment en premier sur les colonies; par la suite, on peut en trouver sur toute la boîte de Pétri.

Cristaux produits par *Xanthobacter autotrophicus*

Les cultures de *Xanthobacter autotrophicus* produisent essentiellement des cristaux de vatérite, un polymorphe de la calcite. Ces cristaux se présentent sous forme de sphérulites brunes ayant un diamètre maximal de 200 μm . Comme pour *Ralstonia eutropha*, ces cristaux se forment en premier sur les colonies. Ces sphérulites sont toujours associées à des colonies même sur des boîtes de Pétri âgées de plus de 10 jours (Figure 25). Sur certaines boîtes de Pétri, des traces de calcite peuvent être détectées. Cette calcite n'a pas pu être observée, mais a été relevée lors de l'analyse par diffraction des rayons X.

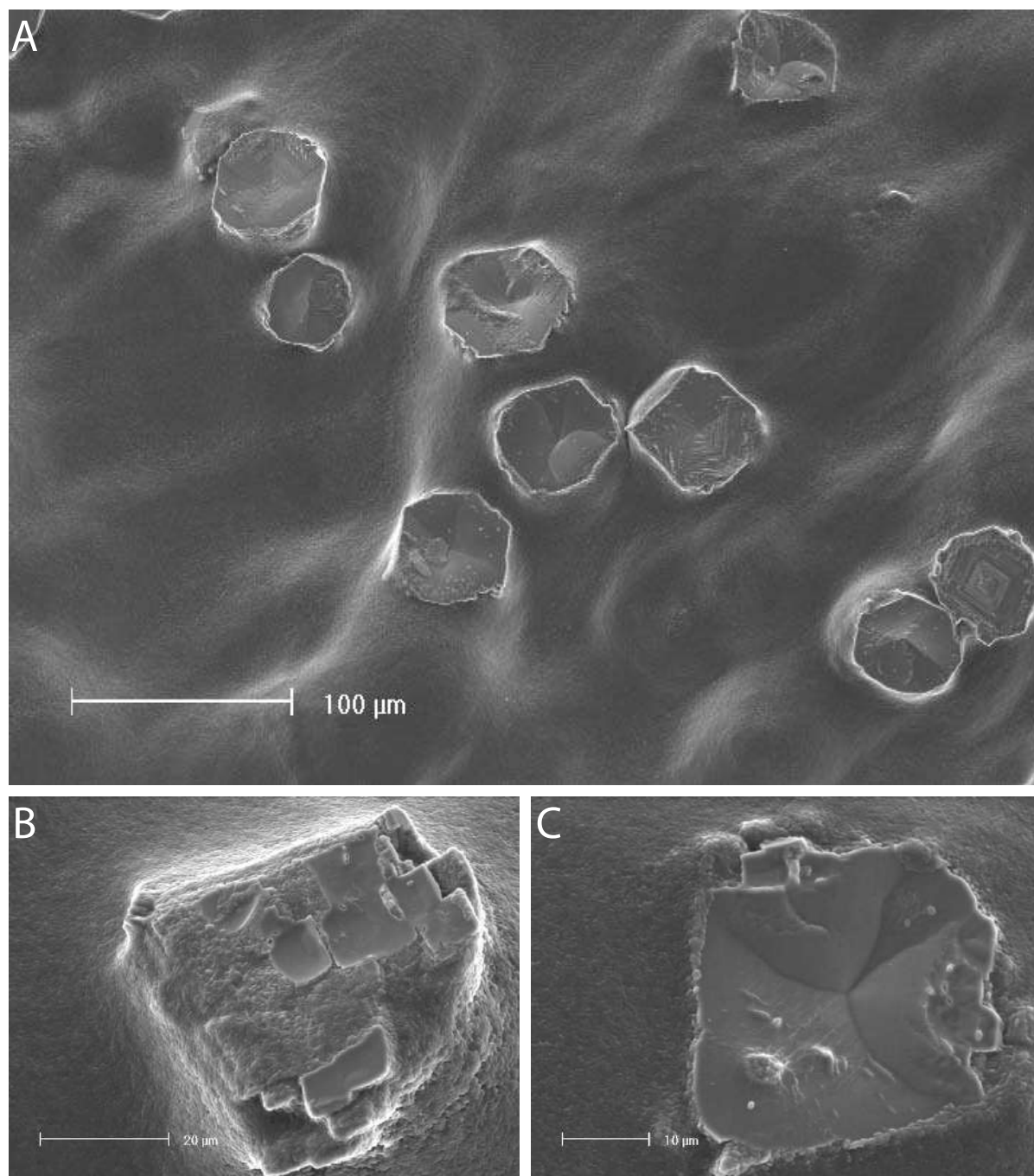


Figure 24: Image MEB des cristaux de calcite produits par *Ralstonia eutropha*. A: vue générale de la colonie et des cristaux s'y trouvant. Notez les stries de croissance suivant des faces de rhomboèdres sur certains cristaux. B,C: détails de l'interface colonies / cristal. Notez le développement des cristaux en "plaquettes anguleuses" ou en "éventails". SEM view of calcite crystals produced by *Ralstonia eutropha*. A: general view of the colony bearing crystals. Note that growth strias exhibiting rhombohedra may be seen on crystals. B,C: close-up of the colony / crystal interface. Note that crystals develop in "angular plates" or in a "fan".

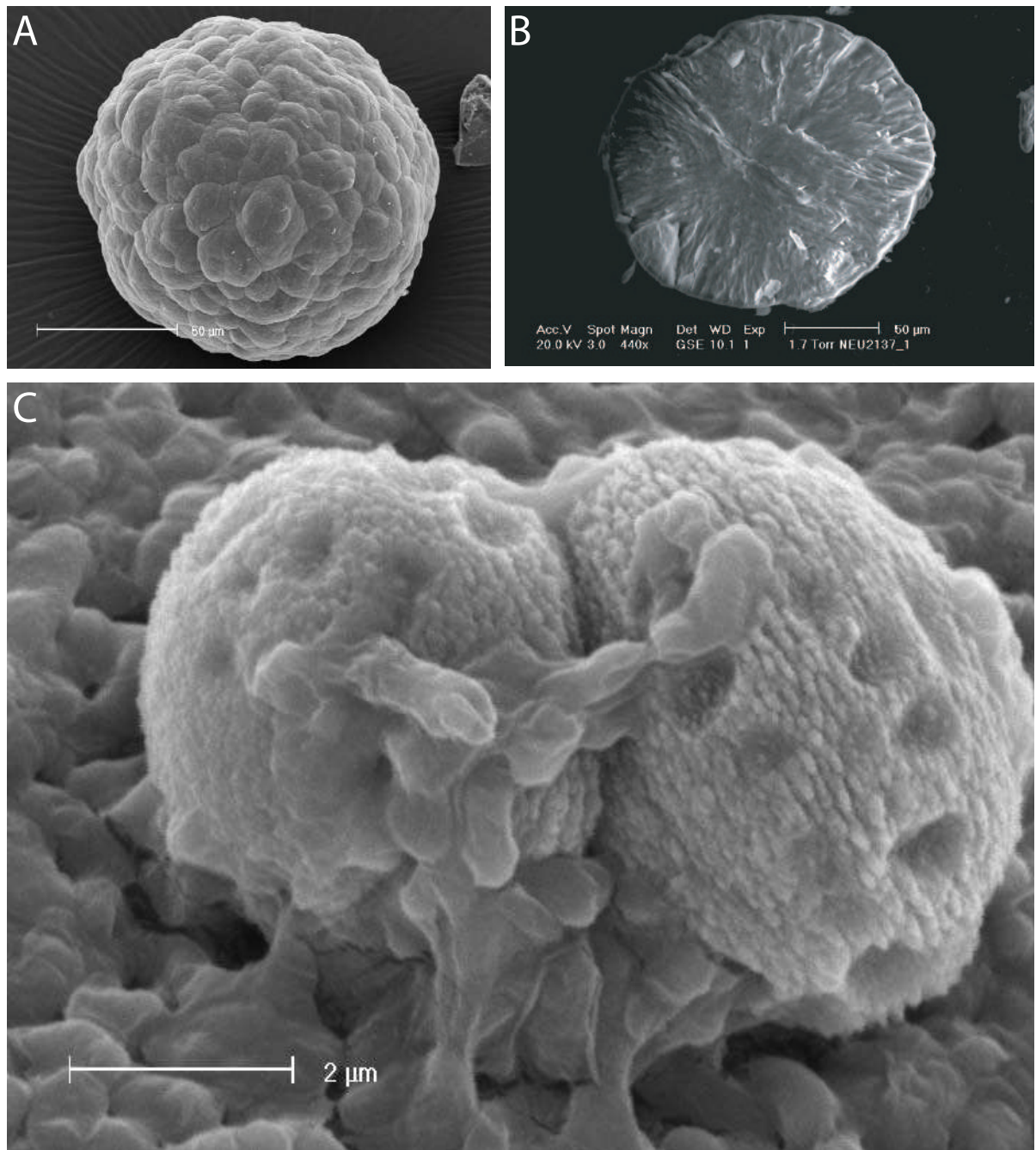


Figure 25: Image MEB des cristaux de vaterite produits par *Xanthobacter autotrophicus*. A: sphérolite de vaterite formée dans une colonie. B: sphérolite fracturée laissant apparaître sa structure fibroradiée. C: stade précoce de la formation d'une sphérolite à la surface d'une colonie bactérienne. On peut noter la présence de trous dans ces cristaux correspondant à la présence de bactéries. *SEM view of vaterite crystals produced by Xanthobacter autotrophicus. A: vaterite spherulite formed inside a colony. B: crushed vaterite crystal showing its fibroradial structure. C: Early precipitation stage of a vaterite spherulite on a bacterial colony. Holes indicating the presence of bacteria can be seen in the crystal.*

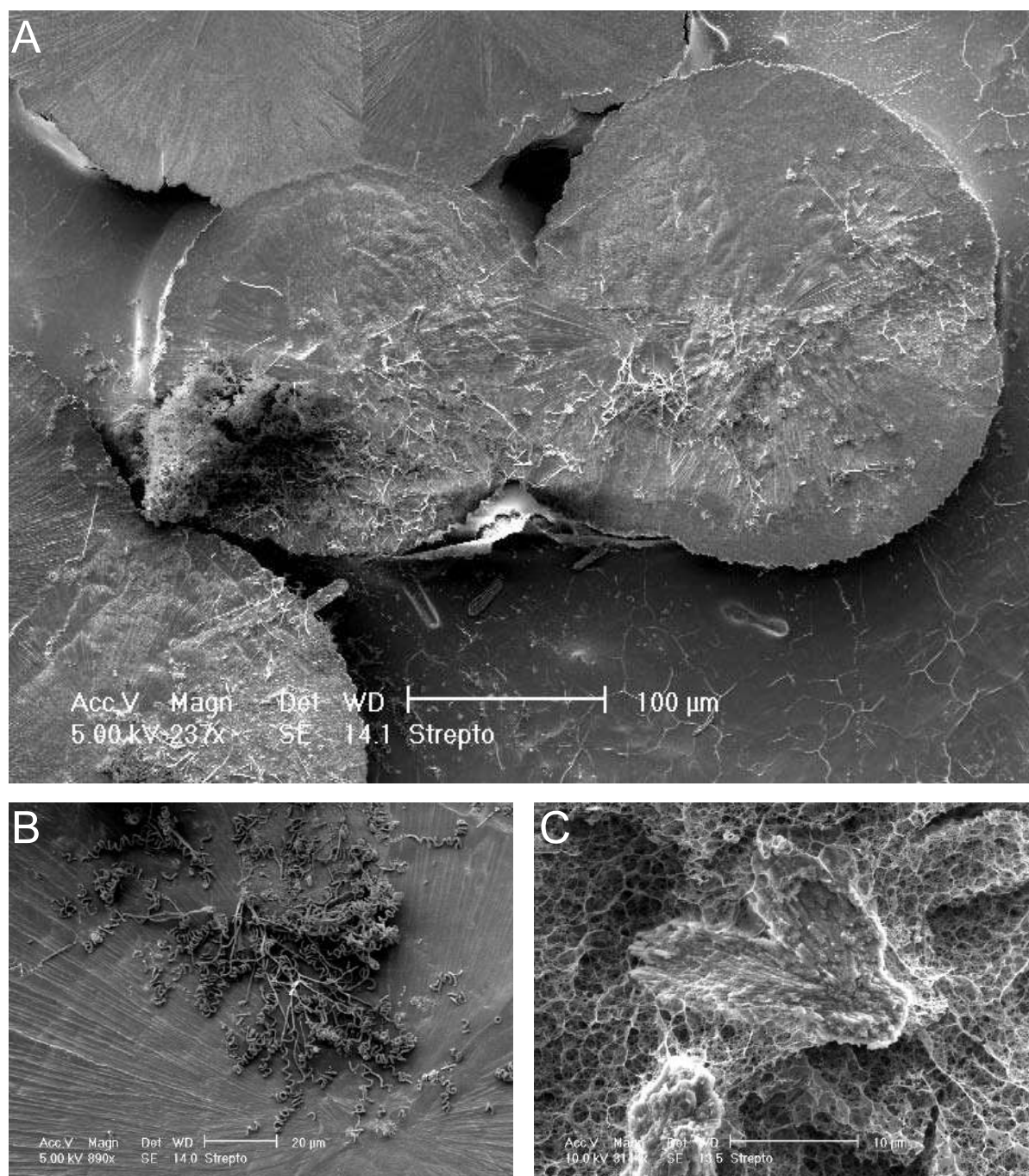


Figure 26: Image MEB des cristaux de calcite produits par *Streptomyces* sp. A: vue générale des cristaux associés aux cultures de *Streptomyces*. B: détail d'un cristal montrant sa structure fibroradiée. Notez les structures typiques en spirales de *Streptomyces* à la surface du cristal. C: détail d'un bâtonnet micritique. SEM view of calcite crystals produced by *Streptomyces* sp. A: general view of crystals associated with *Streptomyces* cultures. B: close-up of a crystal showing its fibroradial structure. Note the typical spirals formed by *Streptomyces* on the surface of the crystal. C: close-up of a rod-shaped micritic aggregate.

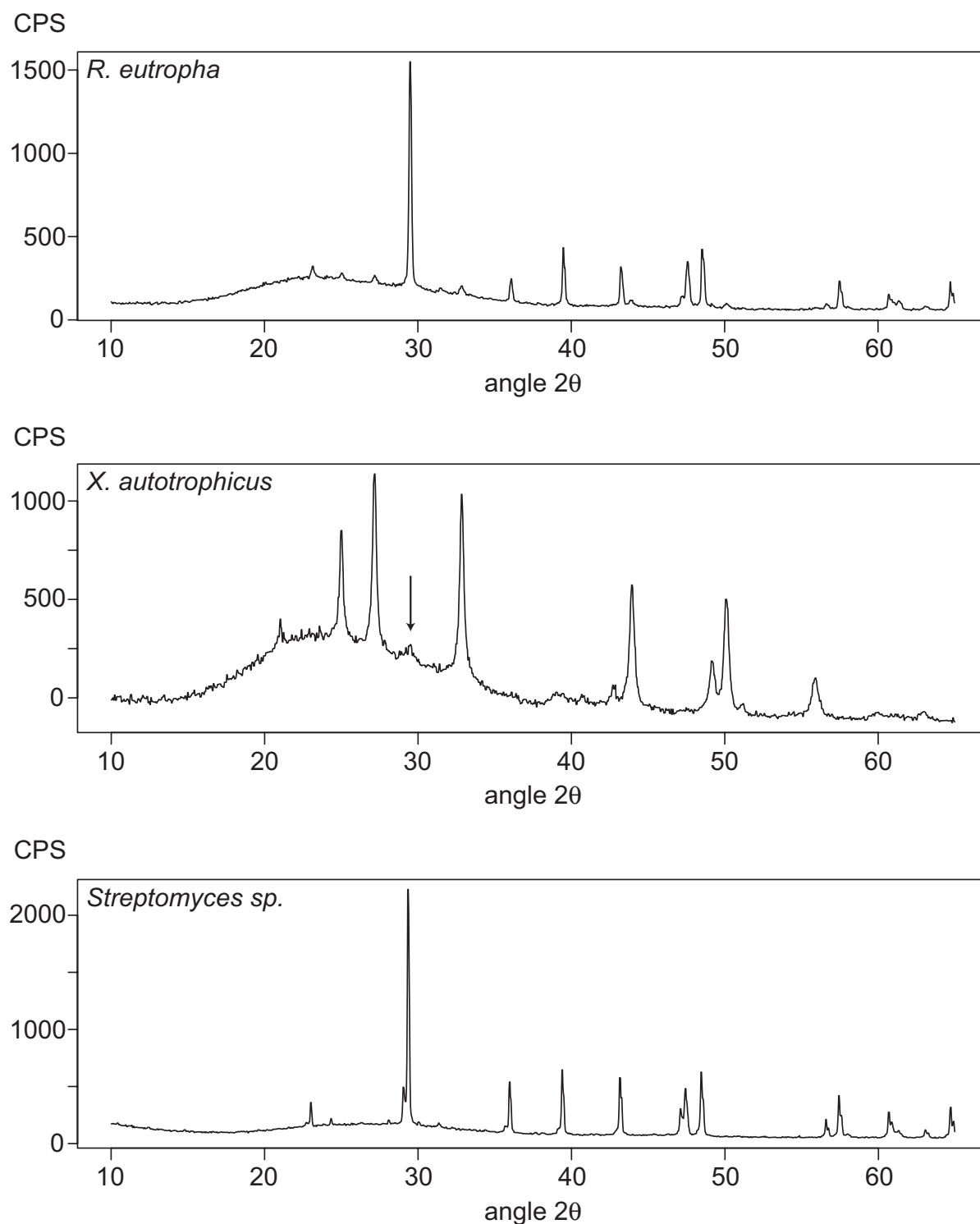


Figure 27: Diffractogrammes des cristaux produits par les différentes souches oxalotrophes sur le milieu B4. Haut: calcite produite par *Ralstonia eutropha*. Milieu: vaterite produite par *Xanthobacter autotrophicus*; la flèche indique le pic principal de la calcite. Bas: calcite produite par *Streptomyces sp.*
Diffractograms of crystals produced by the different oxalotrophic strains on B4 medium. Top: calcite produced by *Ralstonia eutropha*. Middle: vaterite crystals produced by *Xanthobacter autotrophicus*; arrow indicates the principal calcite peak. Bottom: calcite crystals produced by *Streptomyces sp.*

Cristaux produits par *Streptomyces sp.*

Sur le milieu B4, la souche de *Streptomyces* produit des cristaux de carbonate de calcium ayant de nombreuses morphologies; la minéralogie, quant à elle est toujours calcitique. Parmi les morphologies obtenues, on observe des agrégats micritiques formant des sphérulites, et parfois des agrégats micritiques en bâtonnets courts (Figure 26 - pages précédentes). Cette souche produit aussi de nombreuses autres morphologies de manière plus exceptionnelle, parmi celles-ci des hyphes indurées. Ces hyphes indurées ne seront pas détaillées ici vu le nombre d'observations limité dont nous disposons.

Les analyses par diffraction des rayons X des cristaux produits par les 3 souches sont détaillés dans la figure 27 - page précédente.

Discussion

Un pH de 8,4 est nécessaire à la précipitation et à la stabilité du carbonate de calcium à 25°C et 1 atm de pression. Les cultures en milieu liquide ont montré que la consommation d'oxalate permettait d'atteindre ce pH sans difficulté. Les bases théoriques démontrant que la consommation d'oxalate permet d'alcaliniser le milieu suffisamment pour promouvoir la précipitation de carbonate de calcium sont discutées dans les paragraphes suivants. De plus les cultures sur milieux solides ont montré que la morphologie, la minéralogie, et la chimie des cristaux produits présentent de nombreuses variations en fonction du milieu de culture et de la souche cultivée. Les paragraphes suivants ont pour but d'expliquer les relations qui existent entre les milieux de cultures, les souches, et le cristal produit.

Liens entre la consommation de l'oxalate et l'augmentation du pH dans les cultures bactériennes

L'augmentation du pH dans les cultures réalisées va de pair avec la consommation de l'oxalate ($r^2 = 0.98$). Intuitivement, il est simple de concevoir que la consommation d'un acide organique va contribuer à l'augmentation du pH (i.e. en rendant le milieu moins acide). Dans le cas de ces cultures, l'acide oxalique est consommé, et il en résulte la production d'un acide plus faible: l'acide carbonique. Les équations ci-dessous ont pour but de démontrer que la consommation des oxalates et la production de CO_2 , HCO_3^- et CO_3^{2-} qui en résulte suffisent à faire augmenter le pH suffisamment pour faire précipiter du carbonate de calcium (Verrecchia et al., soumis).

Estimation du pH dans le milieu initial (t = 0) - d'après Verrecchia et al., (soumis).

L'estimation du pH (i.e. de la concentration en H^+) initial du milieu est basée sur l'équation de neutralité électrique du milieu.

$$|\text{H}_2\text{PO}_4^-| + 2|\text{HPO}_4^{2-}| + 3|\text{PO}_4^{3-}| + |\text{HC}_2\text{O}_4^-| + |\text{C}_2\text{O}_4^{2-}| + |\text{Cl}^-| + |\text{OH}^-| = |\text{NH}_4^+| + |\text{K}^+| + |\text{Na}^+| + |\text{H}^+| \quad (34)$$

Néanmoins les concentrations des différents ions en solutions doivent être préservées par rapport à la composition du milieu. On obtient donc les équations suivantes:

$$|\text{H}_3\text{PO}_4| + |\text{H}_2\text{PO}_4^-| + 2|\text{HPO}_4^{2-}| + 3|\text{PO}_4^{3-}| = C_{\text{PO}_4\text{-tot}} = 3.617 \cdot 10^{-2} \text{ M} \quad (35)$$

$$|\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4| + |\text{HC}_2\text{O}_4^-| + |\text{C}_2\text{O}_4^{2-}| = C_{\text{C}_2\text{O}_4\text{-tot}} = 2.410 \cdot 10^{-2} \text{ M} \quad (36)$$

$$|\text{NH}_4^+| + |\text{NH}_3| = C_{\text{NH}_x\text{-tot}} = 1.870 \cdot 10^{-2} \text{ M} \quad (37)$$

Les concentrations de chacun des ions ci-dessus dépendent directement de leurs équations d'équilibres respectives. Ces équations d'équilibres sont exprimées ci-dessous.

$$\frac{|\text{H}_2\text{PO}_4^-| \cdot |\text{H}^+|}{|\text{H}_3\text{PO}_4|} = K_1 = 10^{-2.2} \text{ pour } \text{H}_3\text{PO}_4 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}^+ \quad (38)$$

$$\frac{|\text{HPO}_4^{2-}| \cdot |\text{H}^+|}{|\text{H}_2\text{PO}_4^-|} = K_2 = 10^{-7.2} \text{ pour } \text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+ \quad (39)$$

$$\frac{|\text{PO}_4^{3-}| \cdot |\text{H}^+|}{|\text{HPO}_4^{2-}|} = K_3 = 10^{-12.3} \text{ pour } \text{HPO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{PO}_4^{3-} + \text{H}^+ \quad (40)$$

$$\frac{|\text{HC}_2\text{O}_4^-| \cdot |\text{H}^+|}{|\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4|} = K_1 = 10^{-1.46} \text{ pour } \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \rightleftharpoons \text{HC}_2\text{O}_4^- + \text{H}^+ \quad (41)$$

$$\frac{|\text{C}_2\text{O}_4^{2-}| \cdot |\text{H}^+|}{|\text{HC}_2\text{O}_4^-|} = K_2 = 10^{-4.27} \text{ pour } \text{HC}_2\text{O}_4^- \rightleftharpoons \text{C}_2\text{O}_4^{2-} + \text{H}^+ \quad (42)$$

$$\frac{|\text{NH}_3| \cdot |\text{H}^+|}{|\text{NH}_4^+|} = K = 10^{-9.3} \text{ pour } \text{NH}_4^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}^+ \quad (43)$$

$$|\text{Cl}^-| = 1.870 \cdot 10^{-2} \text{ M}; |\text{K}^+| = 5.923 \cdot 10^{-2} \text{ M}; |\text{Na}^+| = 5.028 \cdot 10^{-2} \text{ M} \quad (44)$$

La résolution du système de 13 équations à 13 inconnues ci-dessus permet de calculer la concentration en H^+ et donc le pH. Cette résolution étant fastidieuse il est possible de simplifier le système en supposant un pH initial compris entre 6.0 et 8.0. Ceci est justifié car le pH mesuré de la solution de Schlegel lors de l'expérience était de 7.0. En ce qui concerne la concentration en phosphates on utilise l'équation 35 en mettant $|\text{HPO}_4^{2-}|$ en évidence. On obtient :

$$C_{\text{PO4-tot}} = |\text{HPO}_4^{2-}| \left\{ \frac{|\text{H}_3\text{PO}_4|}{|\text{HPO}_4^{2-}|} + \frac{|\text{H}_2\text{PO}_4^-|}{|\text{HPO}_4^{2-}|} + 1 + \frac{|\text{PO}_4^{3-}|}{|\text{HPO}_4^{2-}|} \right\} \quad (45)$$

En utilisant les équations d'équilibres 38, 39 et 40, on obtient:

$$C_{\text{PO4-tot}} = |\text{HPO}_4^{2-}| \left\{ \frac{|\text{H}^+|^2}{K_1 \cdot K_2} + \frac{|\text{H}^+|}{K_2} + 1 + \frac{|K_3|}{|\text{H}^+|} \right\} \quad (46)$$

En introduisant les valeurs de pH dans l'équation précédente ($10^{-6} \leq \text{H}^+ \leq 10^{-8}$), on a:

$$\frac{|\text{H}^+|^2}{K_1 \cdot K_2} = \frac{(10^{-8})^2}{(10^{-7.2} \cdot 10^{-2.2})} = \frac{10^{-16}}{10^{-9.4}} = 10^{-6.6} \quad (47)$$

et

$$\frac{|\text{H}^+|^2}{K_1 \cdot K_2} = \frac{(10^{-6})^2}{(10^{-7.2} \cdot 10^{-2.2})} = \frac{10^{-12}}{10^{-9.4}} = 10^{-2.6} \quad (48)$$

Les trois termes contenus dans la parenthèse de l'équation 45 sont donc compris dans les intervalles suivants:

$$10^{-6.6} \leq \frac{|\text{H}^+|^2}{K_1 \cdot K_2} \leq 10^{-2.6}; 10^{-6.3} \leq \frac{K_3}{|\text{H}^+|} \leq 10^{-4.3}; 10^{-0.8} \leq \frac{|\text{H}^+|}{K_2} \leq 10^{1.2} \quad (49)$$

Considérant la contribution respective de chaque terme, on peut simplifier l'équation 45 de la manière suivante:

$$C_{\text{PO4-tot}} \simeq |\text{HPO}_4^{2-}| \left\{ \frac{|\text{H}^+|}{K_2} + 1 \right\} \quad (50)$$

De la même manière, la quantité totale de phosphates est obtenue à partir de l'équation de neutralité électrique.

$$|\text{H}_2\text{PO}_4^-| + 2|\text{HPO}_4^{2-}| + 3|\text{PO}_4^{3-}| = |\text{HPO}_4^{2-}| \left\{ \frac{|\text{H}_2\text{PO}_4^-|}{|\text{HPO}_4^{2-}|} + 2 + 3\frac{|\text{PO}_4^{3-}|}{|\text{HPO}_4^{2-}|} \right\} \quad (51)$$

$$|\text{H}_2\text{PO}_4^-| + 2|\text{HPO}_4^{2-}| + 3|\text{PO}_4^{3-}| = |\text{HPO}_4^{2-}| \left\{ \frac{|\text{H}^+|}{K_2} + 2 + 3\frac{K_3}{|\text{H}^+|} \right\} \quad (52)$$

$$|\text{H}_2\text{PO}_4^-| + 2|\text{HPO}_4^{2-}| + 3|\text{PO}_4^{3-}| = |\text{HPO}_4^{2-}| \left\{ \frac{|\text{H}^+|}{K_2} + 2 \right\} \quad (53)$$

En utilisant l'équation 56 d'où l'on tire $|\text{HPO}_4^{2-}|$, on obtient en remplaçant:

$$|\text{H}_2\text{PO}_4^-| + 2|\text{HPO}_4^{2-}| + 3|\text{PO}_4^{3-}| = \frac{C_{\text{PO4-tot}}}{\frac{|\text{H}^+|}{K_2} + 1} \cdot \left\{ \frac{|\text{H}^+|}{K_2} + 2 \right\} \quad (54)$$

On applique la même méthode avec l'oxalate et l'azote (NH_3 et NH_4^+) de manière à remplacer tous les termes de l'équation de neutralité électrique. En ce qui concerne les oxalates, on a:

$$C_{\text{C2O4-tot}} = |\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4| + |\text{HC}_2\text{O}_4^-| + |\text{C}_2\text{O}_4^{2-}| \quad (55)$$

$$C_{\text{C2O4-tot}} = |\text{HC}_2\text{O}_4^-| \left\{ \frac{|\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4|}{|\text{HC}_2\text{O}_4^-|} + 1 + \frac{|\text{C}_2\text{O}_4^{2-}|}{|\text{HC}_2\text{O}_4^-|} \right\} \quad (56)$$

$$C_{\text{C2O4-tot}} = |\text{HC}_2\text{O}_4^-| \left\{ \frac{|\text{H}^+|}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{|\text{H}^+|} \right\} \quad (57)$$

Comme auparavant, en considérant un pH compris entre 6 et 8, on peut simplifier l'équation précédente. Le résultat est:

$$C_{\text{C2O4-tot}} \simeq |\text{HC}_2\text{O}_4^-| \left\{ 1 + \frac{K_2}{|\text{H}^+|} \right\} \quad (58)$$

Comme pour les phosphates, la quantité totale d'oxalates est obtenue à partir de l'équation de neutralité électrique.

$$|\text{C}_2\text{O}_4^{2-}| = |\text{HC}_2\text{O}_4^-| + 2 \cdot \left\{ \frac{K_2}{|\text{H}^+|} \right\} = |\text{HC}_2\text{O}_4^-| \left\{ 1 + \frac{2K_2}{|\text{H}^+|} \right\} \quad (59)$$

En utilisant l'équation 64 d'où l'on tire $|\text{HC}_2\text{O}_4^-|$, et en remplaçant dans l'équation 65, on arrive au résultat suivant.

$$|\text{HC}_2\text{O}_4^-| + |\text{C}_2\text{O}_4^{2-}| = C_{\text{C2O4-tot}} \cdot \left\{ \frac{1 + 2 \cdot \frac{K_2}{|\text{H}^+|}}{1 + \frac{K_2}{|\text{H}^+|}} \right\} \quad (60)$$

On fait de même pour l'azote (NH_3 et NH_4^+)

$$C_{\text{NHx-tot}} = |\text{NH}_4^+| + \frac{K|\text{NH}_4^+|}{|\text{H}^+|} = |\text{NH}_4^+| \left\{ 1 + \frac{K}{|\text{H}^+|} \right\} \quad (61)$$

$$|\text{NH}_4^+| = \frac{C_{\text{NHx-tot}} |\text{H}^+|}{K + |\text{H}^+|} \quad (62)$$

En utilisant les résultats des équations 54, 60, et 62, et en considérant que $|\text{OH}^-| = (10^{-14} / (|\text{H}^+|))$, l'équation de neutralité électrique de la solution peut s'exprimer de la manière suivante. Les constantes et les concentrations connues sont ensuite remplacées par leurs valeurs numériques.

$$\left\{ \frac{C_{\text{PO4-tot}}}{\frac{|\text{H}^+|}{K_2} + 1} \cdot \left[\frac{|\text{H}^+|}{K_2} + 2 \right] \right\} + \left\{ C_{\text{C2O4-tot}} \cdot \left[\frac{1 + 2 \cdot \frac{K_2}{|\text{H}^+|}}{1 + \frac{K_2}{|\text{H}^+|}} \right] \right\} + |\text{Cl}^-| + |\text{OH}^-| = \left\{ \frac{C_{\text{NHx-tot}} |\text{H}^+|}{K + |\text{H}^+|} \right\} + |\text{Na}^+| + |\text{K}^+| + |\text{H}^+| \quad (63)$$

Ce qui correspond à:

$$\left\{ 3.617 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{10^{7.2} |\text{H}^+| + 2}{10^{7.2} |\text{H}^+| + 1} \right] \right\} + \left\{ 2.410 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{1 + 2 \cdot \frac{10^{-4.27}}{|\text{H}^+|}}{1 + \frac{10^{-4.27}}{|\text{H}^+|}} \right] \right\} + 1.870 \cdot 10^{-2} \\ + \left\{ \frac{10^{-14}}{|\text{H}^+|} \right\} - \left\{ \frac{1.870 \cdot 10^{-2} \cdot |\text{H}^+|}{10^{-9.3} + |\text{H}^+|} \right\} - 5.028 \cdot 10^{-2} - 5.923 \cdot 10^{-2} - |\text{H}^+| = 0$$

La solution de cette équation s'obtient graphiquement en traçant la fonction pour un intervalle de pH compris entre 6 et 8 (i.e.: pour une concentration en H^+ allant de 10^{-8} à 10^{-6}). La solution de cette équation est donc $|\text{H}^+| = 10^{-7.5405}$. Ce qui équivaut à un pH de 7.54. Cette valeur est plus élevée que la valeur de pH du milieu initial, néanmoins les calculs ne tiennent pas compte de la force ionique de la solution.

Correction du pH en fonction de la force ionique de la solution

La force ionique I d'une solution mesure les interactions entre les ions présents dans cette solution. Ces interactions résultent principalement des attractions et répulsions liées à la charge des ions (Stumm et Morgan 1981). La force ionique I d'une solution est définie par l'équation ci-dessous où z représente la valence des ions et c la concentration de ceux-ci. Cette somme s'exprime pour tous les anions et cations de la solution

$$I = \frac{1}{2} \sum z_i^2 \cdot c_i \quad (64)$$

$$I = \frac{(2^2 \cdot |\text{C}_2\text{O}_4^{2-}|)}{2} + \frac{(2^2 \cdot |\text{HPO}_4^{2-}|)}{2} + \frac{(1^2 \cdot |\text{H}_2\text{PO}_4^-|)}{2} + \frac{(1^2 \cdot |\text{NH}_4^+|)}{2} + \frac{(1^2 \cdot |\text{Cl}^-|)}{2} + \frac{(1^2 \cdot |\text{K}^+|)}{2} + \frac{(1^2 \cdot |\text{Na}^+|)}{2} + \frac{(2^2 \cdot |\text{Mg}^{2+}|)}{2} + \frac{(2^2 \cdot |\text{SO}_4^{2-}|)}{2} \quad (65)$$

Ce qui correspond à:

$$I = \frac{(4 \cdot 2.410 \cdot 10^{-2})}{2} + \frac{(4 \cdot 2.514 \cdot 10^{-2})}{2} + \frac{(1.103 \cdot 10^{-2})}{2} + \frac{(1.870 \cdot 10^{-2})}{2} + \frac{(1.870 \cdot 10^{-2})}{2} + \frac{(1.103 \cdot 10^{-2})}{2} \\ + \frac{(4 \cdot 2.410 \cdot 10^{-2})}{2} + \frac{(4 \cdot 2.514 \cdot 10^{-2})}{2} + \frac{(4 \cdot 8.120 \cdot 10^{-4})}{2} + \frac{(4 \cdot 8.120 \cdot 10^{-4})}{2} = 0.1807$$

Dans ce cas, la force ionique de la solution est trop élevée pour être négligée. En effet pour que les concentrations soient équivalentes aux activités, il faut que la force ionique de la solution soit inférieure à 10^{-2} . Dans notre cas cela implique que les valeurs de concentrations utilisées dans la première partie (équ. 34 à 63) doivent être corrigées par un facteur d'activité selon la relation suivante:

$$|i| = \frac{(i)}{f_i} \quad (66)$$

Pour des solutions ayant une force ionique inférieure à 0.5, la formule suivante permet de calculer f_i (Stumm et Morgan 1981). Dans cette formule A est une constante qui vaut $A = 1.82 \cdot 10^6 \cdot (\varepsilon T)^{-2/3} = 0.504$ où ε est la constante diélectrique de l'eau ($\varepsilon = 79$) et T la température exprimée en °K ($T = 298$).

$$\log_{10} f_i = -A \cdot z_i^2 \cdot \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.2 \cdot I \right) \quad (67)$$

En remplaçant les valeurs des concentrations par leurs valeurs corrigées, la concentration totale en phosphates s'exprime comme suit:

$$C_{\text{PO}_4\text{-tot}} = |\text{HPO}_4^{2-}| \cdot \left\{ \left[\frac{(\text{H}_3\text{PO}_4)}{(\text{HPO}_4^{2-})} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_3\text{PO}_4}} \right] + \left[\frac{(\text{H}_2\text{PO}_4^-)}{(\text{HPO}_4^{2-})} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \right] + 1 + \left[\frac{(\text{PO}_4^{3-})}{(\text{HPO}_4^{2-})} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{PO}_4^{3-}}} \right] \right\} \quad (68)$$

Comme pour l'équation 45, en utilisant les équations d'équilibres on a:

$$C_{\text{PO4-tot}} = |\text{HPO}_4^{2-}| \left\{ \left[\frac{(\text{H}^+)^2}{K_1 K_2} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_3\text{PO}_4}} \right] + \left[\frac{(\text{H}^+)}{K_2} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \right] + 1 + \left[\frac{K_3}{(\text{H}^+)} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{PO}_4^{3-}}} \right] \right\} \quad (69)$$

Qui se simplifie en:

$$|\text{HPO}_4^{2-}| \simeq \left\{ \frac{C_{\text{PO4-tot}}}{\left[\frac{(\text{H}^+)}{K_2} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \right] + 1} \right\} \quad (70)$$

De la même manière qu'avant, on tire $|\text{HPO}_4^{2-}|$ de l'équation ci-dessus, puis on l'insère dans la portion de l'équation de neutralité électrique exprimant la concentration en phosphates. On obtient donc:

$$|\text{H}_2\text{PO}_4^-| + 2 |\text{HPO}_4^{2-}| + 3 |\text{PO}_4^{3-}| = |\text{HPO}_4^{2-}| \left\{ \left[\frac{(\text{H}^+)}{K_2} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \right] + 2 \right\} \quad (71)$$

$$|\text{H}_2\text{PO}_4^-| + 2 |\text{HPO}_4^{2-}| + 3 |\text{PO}_4^{3-}| = C_{\text{PO4-tot}} \cdot \left\{ \frac{\left[\frac{(\text{H}^+)}{K_2} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \right] + 2}{\left[\frac{(\text{H}^+)}{K_2} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \right] + 1} \right\} \quad (72)$$

On pratique de la même façon avec les oxalates

$$|\text{HC}_2\text{O}_4^-| + 2 |\text{C}_2\text{O}_4^{2-}| = |\text{HC}_2\text{O}_4^-| \left\{ 1 + 2 \frac{K_2}{(\text{H}^+)} \frac{f_{\text{HC}_2\text{O}_4^-}}{f_{\text{C}_2\text{O}_4^{2-}}} \right\} \quad (73)$$

$$C_{\text{C2O4-tot}} = |\text{HC}_2\text{O}_4^-| + |\text{C}_2\text{O}_4^{2-}| = |\text{HC}_2\text{O}_4^-| \left\{ 1 + \frac{K_2}{(\text{H}^+)} \frac{f_{\text{HC}_2\text{O}_4^-}}{f_{\text{C}_2\text{O}_4^{2-}}} \right\} \quad (74)$$

$$|\text{HC}_2\text{O}_4^-| + 2 |\text{C}_2\text{O}_4^{2-}| = C_{\text{C2O4-tot}} \cdot \left\{ \frac{1 + 2 \frac{K_2}{(\text{H}^+)} \frac{f_{\text{HC}_2\text{O}_4^-}}{f_{\text{C}_2\text{O}_4^{2-}}}}{1 + \frac{K_2}{(\text{H}^+)} \frac{f_{\text{HC}_2\text{O}_4^-}}{f_{\text{C}_2\text{O}_4^{2-}}}} \right\} \quad (75)$$

et l'azote

$$|\text{NH}_4^+| = C_{\text{NHx-tot}} \cdot \left\{ \frac{1}{1 + \left(\frac{K}{(\text{H}^+)} + f_{\text{NH}_4^+} \right)} \right\} \quad (76)$$

Avec les valeurs corrigées pour les phosphates, les oxalates et l'azote (NH_3 et NH_4^+), l'équation de neutralité électrique devient:

$$C_{\text{PO4-tot}} \cdot \left\{ \frac{\left[\frac{(\text{H}^+)}{K_2} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \right] + 2}{\left[\frac{(\text{H}^+)}{K_2} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \right] + 1} \right\} + C_{\text{C2O4-tot}} \cdot \left\{ \frac{1 + 2 \frac{K_2}{(\text{H}^+)} \frac{f_{\text{HC}_2\text{O}_4^-}}{f_{\text{C}_2\text{O}_4^{2-}}}}{1 + \frac{K_2}{(\text{H}^+)} \frac{f_{\text{HC}_2\text{O}_4^-}}{f_{\text{C}_2\text{O}_4^{2-}}}} \right\} - C_{\text{NHx-tot}} \cdot \left\{ \frac{1}{1 + \left(\frac{K}{(\text{H}^+)} + f_{\text{NH}_4^+} \right)} \right\} + |\text{OH}^-| \cdot |\text{H}^+| = |\text{K}^+| + |\text{Na}^+| \cdot |\text{Cl}^-| = 9.081 \cdot 10^{-2} \quad (77)$$

$$3.617 \cdot 10^{-2} \cdot \left\{ \frac{\left[\frac{(\text{H}^+)}{10^{-7.2}} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \right] + 2}{\left[\frac{(\text{H}^+)}{10^{-7.2}} \cdot \frac{f_{\text{HPO}_4^{2-}}}{f_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \right] + 1} \right\} + 2.410 \cdot 10^{-2} \cdot \left\{ \frac{1 + 2 \frac{10^{-4.27}}{(\text{H}^+)} \frac{f_{\text{HC}_2\text{O}_4^-}}{f_{\text{C}_2\text{O}_4^{2-}}}}{1 + \frac{10^{-4.27}}{(\text{H}^+)} \frac{f_{\text{HC}_2\text{O}_4^-}}{f_{\text{C}_2\text{O}_4^{2-}}}} \right\} - 1.87 \cdot 10^{-2} \cdot \left\{ \frac{1}{1 + \left(\frac{10^{-9.3}}{(\text{H}^+)} + f_{\text{NH}_4^+} \right)} \right\} + |\text{OH}^-| \cdot |\text{H}^+| = 9.081 \cdot 10^{-2} \quad (78)$$

Cette équation peut être simplifiée en considérant que $(10^{-4.27} / H^+) \gg 1$ et que $(10^{-9.3} / H^+) \ll 1$, puisque H^+ est compris entre 10^{-8} et 10^{-6} . Cette simplification permet d'obtenir les équations suivantes:

$$3.617 \cdot 10^{-2} \cdot \left\{ \frac{\left[\frac{(H^+)}{10^{-7.2}} \cdot \frac{f_{HPO_4^{2-}}}{f_{H_2PO_4^-}} \right] + 2}{\left[\frac{(H^+)}{10^{-7.2}} \cdot \frac{f_{HPO_4^{2-}}}{f_{H_2PO_4^-}} \right] + 1} \right\} + (2.410 \cdot 10^{-2} \cdot 2) - (1.87 \cdot 10^{-2} \cdot 1) = 9.081 \cdot 10^{-2} \quad (79)$$

$$3.617 \cdot 10^{-2} \cdot \left\{ \frac{\left[\frac{(H^+)}{10^{-7.2}} \cdot \frac{f_{HPO_4^{2-}}}{f_{H_2PO_4^-}} \right] + 2}{\left[\frac{(H^+)}{10^{-7.2}} \cdot \frac{f_{HPO_4^{2-}}}{f_{H_2PO_4^-}} \right] + 1} \right\} \simeq 6.131 \cdot 10^{-2} \quad (80)$$

En utilisant la formule de Davis (équ. 67) on obtient les différents f, que l'on peut ensuite remplacer dans l'équation ci-dessus. On obtient donc:

$$\log_{10} f_{H_2PO_4^-} = -0.504 \cdot 1^2 \cdot \left(\frac{\sqrt{0.1807}}{1 + \sqrt{0.1807}} - [0.2 \cdot 0.1807] \right) = -0.1321 \quad (81)$$

$$\log_{10} f_{HPO_4^{2-}} = -0.504 \cdot 2^2 \cdot \left(\frac{\sqrt{0.1807}}{1 + \sqrt{0.1807}} - [0.2 \cdot 0.1807] \right) = -0.5285 \quad (82)$$

$$f_{H_2PO_4^-} = 0.7377 ; f_{HPO_4^{2-}} = 0.2961 \quad (83)$$

$$\frac{f_{HPO_4^{2-}}}{f_{H_2PO_4^-}} = 0.4014 \quad (84)$$

$$\frac{f_{HPO_4^{2-}}}{f_{H_2PO_4^-}} = 0.4014 = 10^{-0.3964} \quad (85)$$

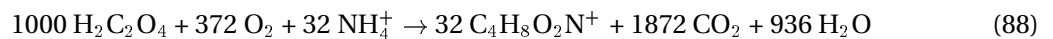
$$3.617 \cdot 10^{-2} \cdot \left\{ \frac{\left[\frac{(H^+)}{10^{-7.2}} \cdot \frac{10^{-0.3964}}{1} \right] + 2}{\left[\frac{(H^+)}{10^{-7.2}} \cdot \frac{10^{-0.3964}}{1} \right] + 1} \right\} \simeq 6.131 \cdot 10^{-2} \quad (86)$$

$$3.617 \cdot 10^{-2} \cdot \left\{ \frac{10^{-6.8036} \cdot (H^+) + 2}{10^{-6.8036} \cdot (H^+) + 2} \right\} \simeq 6.131 \cdot 10^{-2} \quad (87)$$

La résolution de cette dernière équation nous permet d'obtenir le pH. La valeur calculée pour ce dernier est de 7.16. Ce qui est en accord avec le pH mesuré de la solution de Schlegel.

Estimation du pH après transformation des oxalates en carbonates - d'après Verrecchia et al. soumis

Comme cela a été montré précédemment, la transformation des oxalates par des bactéries peut s'exprimer selon l'équation ci-dessous. Cette équation donne la quantité de CO_2 produit, soit 1.872 moles par mole d'oxalate consommée. Dans notre cas, on produit $4.511 \cdot 10^{-2}$ moles de CO_2 à partir de l'oxalate contenu dans le milieu initial. Il est donc possible de calculer la concentration des espèces carbonatées dans le milieu. Celui-ci est toutefois considéré comme un système ouvert où la pression partielle en CO_2 du milieu s'équilibre avec la pression partielle en CO_2 de l'atmosphère.



Comme pour les phosphates et les oxalates dans le calcul du pH initial, on utilise les équations d'équilibres suivantes afin de remplacer les termes correspondant aux carbonates dans l'équation de

neutralité électrique (le développement de cette partie n'est pas fait ici, car il est strictement similaire à la partie précédente). En considérant un système ouvert, on a donc:

$$|\text{CO}_2| = K_H \cdot 3 \cdot 10^{-4} \text{ où } (K_H = 33.88 \cdot 10^{-3}) \quad (89)$$

$$|\text{HCO}_3^-| = |\text{CO}_2| \cdot \frac{10^{-6.35}}{|\text{H}^+|} \quad (90)$$

$$|\text{CO}_3^{2-}| = |\text{HCO}_3^-| \cdot \frac{10^{-10.33}}{|\text{H}^+|} \quad (91)$$

L'équation finale peut donc s'écrire comme suit. Néanmoins pour simplifier les calculs, on pose les hypothèses suivantes. Pour commencer, la consommation de NH_4^+ est considérée comme négligeable car elle ne représente que 32 / 1000 de la consommation d'oxalate soit $7.712 \cdot 10^{-4}$ moles. Ensuite, la force ionique de la solution est considérée comme suffisamment faible pour ne pas être prise en compte; en effet l'oxalate est consommé et une partie du CO_2 dégaze puisque le système est ouvert.

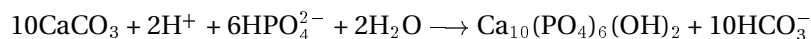
$$\left\{ 3.617 \cdot 10^{-2} \cdot \left[\frac{10^{7.2} |\text{H}^+| + 2}{10^{7.2} |\text{H}^+| + 1} \right] \right\} + \left\{ \frac{4.540 \cdot 10^{-12}}{|\text{H}^+|} + \frac{3.975 \cdot 10^{-22}}{|\text{H}^+|} \right\} + 1.870 \cdot 10^{-2} + \left\{ \frac{10^{-14}}{|\text{H}^+|} \right\} - \left\{ \frac{1.870 \cdot 10^{-2} \cdot |\text{H}^+|}{10^{-9.3} + |\text{H}^+|} \right\} - 5.028 \cdot 10^{-2} - 5.923 \cdot 10^{-2} - |\text{H}^+| = 0 \quad (92)$$

La solution de cette équation s'obtient graphiquement. Comme pour l'équation 69, on trace cette fonction pour un intervalle de pH compris entre 7 et 10 (i.e.: pour une concentration en H^+ allant de 10^{-10} à 10^{-7}). La solution de cette équation est donc $|\text{H}^+| = 10^{-9.6055}$. Ce qui équivaut à un pH de 9.6. Cette valeur est légèrement plus élevée que la valeur de pH du milieu final. Néanmoins, considérant les approximations successives réalisées lors de ces calculs, on peut estimer que cette valeur correspond parfaitement à ce qui est observé en culture. Pour rappel, à la fin des cultures liquides en milieu Schlegel, le pH était de 9.4. Ce qui montre bien de manière théorique cette fois que la transformation des oxalates en carbonates suffit à obtenir des pH suffisamment alcalins pour permettre la précipitation des minéraux appartenant à la classe des carbonates.

Cristaux produits lors de cultures bactériennes sur oxalate de calcium

Minéralogie des cristaux produits

Les équations ci-dessus montrent que la consommation de l'oxalate suffit à alcaliniser le milieu suffisamment pour permettre la précipitation des carbonates. En effet, sur extrait de sol, extrait de sol synthétique, et milieu Angle, on observe la précipitation de carbonates. En revanche, sur le milieu Schlegel additionné d'oxalate de calcium, les cristaux précipités sont des phosphates. De même, on retrouve des phosphates et des sulfates lors de cultures sur extrait de sol. La cristallisation de phosphates sur le milieu de Schlegel est facilement explicable par la grande quantité de phosphates qui entre dans la composition de ce milieu ($3.67 \cdot 10^{-2}$ moles/L). De même l'absence de carbonates a la même origine puisqu'en présence de phosphate dans le milieu, on observe une inhibition de la formation des carbonates par les phosphates (équ. 93, - Stumm et Morgan, 1996).



(93)

La quantité de phosphates dans l'extrait de sol étant beaucoup plus faible ($\simeq 3.16 \cdot 10^{-4}$ moles/L) que dans le milieu Schlegel, il est normal de ne trouver que des traces de minéraux phosphatés dans ce milieu. De même, la présence de sulfates dans ce milieu peut s'expliquer de manière simple. Pour commencer, les équations 28 à 32 montrent qu'il y a un excès de calcium dans le milieu après la précipitation des carbonates. Le calcium en solution dans le milieu peut donc réagir avec les sulfates et les phosphates présents, pour former du gypse, ou du calcium-phosphate-carbonate. La concentration de sulfates étant plus élevée que celle des phosphates dans ce milieu il est possible que, malgré sa solubilité plus élevée que les phosphates, le gypse puisse précipiter.

Retard de la cristallisation des carbonates par rapport à la dissolution de l'oxalate

Sur tous les milieux où la transformation des oxalates en carbonates a été observée, on note un décalage entre la dissolution de l'oxalate de calcium et la précipitation du carbonate de calcium. Dans ce cas précis, le retard de précipitation de la calcite peut être imputé au rééquilibrage de la pression partielle en CO_2 dans le milieu. En effet, du fait de la durée des cultures, les boîtes de Pétri ont été fermées avec plusieurs couches de parafilm afin d'empêcher leur déshydratation. Ce faisant, ces boîtes se sont comportées comme des systèmes semi-fermés où la pCO_2 a augmenté suffisamment pour empêcher la précipitation des carbonates. Le décalage entre la dissolution de l'oxalate de calcium et la précipitation de carbonate de calcium correspond donc au temps qu'il a fallu à la pCO_2 des boîtes de Pétri pour se rééquilibrer avec celle de l'atmosphère (les boîtes n'étant pas parfaitement étanches).

Chimie des carbonates produits

La composition en cations majeurs des carbonates produits lors de la transformation de l'oxalate de calcium ne montre quasiment pas de variation pour une même souche quel que soit le milieu (Angle, extrait de sol, extrait de sol synthétique). En revanche la différence entre les souches est marquée. Cette ségrégation des cations inclus dans les carbonates produits peut s'expliquer par des différences d'affinités des bactéries pour tel ou tel cation (dans notre cas, Mg^{2+} , Na^+ , et K^+). Cette différence d'affinité dépend des sites de liaisons disponibles sur la paroi de la bactérie, comme cela a été montré par Phoenix et al. (2002). De même, la nature chimique de ces sites de liaisons, groupements carboxyles, hydroxyles, alcools ou encore phosphates, fait que ceux-ci vont avoir une influence différente sur les cations présents en fonction du pH. Le faible nombre de données disponibles, fait qu'il n'est pas possible de comparer à d'autres processus métaboliques le fractionnement isotopique induit au niveau des carbonates par le métabolisme des bactéries oxalotrophes.

Morphologie des carbonates produits

Sur tous les milieux où la transformation oxalate carbonate a été testée, un nombre restreint de morphologies a été observé pour les cristaux de calcite produits. Ces morphologies étaient soit sphériques, soit en bâtonnets. L'influence des bactéries sur la morphologie de cristaux produits semble dans ce cas très restreinte. La faible croissance autorisée par l'oxalate ainsi que la précipitation différée due au temps de rééquilibrage de la pCO_2 font que l'influence que les bactéries peuvent avoir sur la précipitation du carbonate de calcium, au moment où elle se produit, est probablement fortement diminuée.

Cristaux produits sur le milieu B4

Le milieu B4 permet une forte croissance bactérienne, ainsi que la production d'exopolysaccharides pour les souches qui en sont dotées. Sur ce milieu, les cristaux de carbonate de calcium apparaissent

sur et dans les colonies. L'influence de la matière organique et la viscosité du milieu sur la cristallisation du carbonate de calcium a été montrée précédemment en de nombreuses occasions (Kitano and Hood 1965; Cailleau et al. 1979; Addadi et al. 1990; Buczynski and Chafetz 1991). Ceci est particulièrement important dans ce cas puisqu'une différence phénotypique majeure existe entre les colonies de *Xanthobacter autotrophicus* et celles des deux autres souches est la production d'un mucilage abondant chez *Xanthobacter autotrophicus*. Ce mucilage augmente la viscosité du milieu; ceci se traduit par des changements dans la minéralogie et la morphologie des cristaux. *Ralstonia eutropha* et *Streptomyces sp.*, qui ne sécrètent que peu ou pas de mucilage, produisent des cristaux de calcite thermodynamiquement plus stables, alors que *Xanthobacter autotrophicus*, qui en sécrète en grande quantité, produit des sphérulites de vatérite. L'augmentation de viscosité du milieu due à la production de mucilage par *Xanthobacter autotrophicus* permet donc d'expliquer la morphologie sphérique des cristaux de vatérite produits comme cela a déjà été décrit par Buczynski et Chafetz (1991). La formation de vatérite, un polymorphe métastable de la calcite, peut s'expliquer quant à elle par la présence de nombreux groupes carboxyles dans ce mucus composé de glucose, de mannose et d'acide glucuronique (Figure 28). Ces groupes, dont la structure est très proche de l'anion carbonate, sont susceptibles de favoriser la cristallisation de la vatérite. De plus *Xanthobacter autotrophicus* produit un polymère pariétal composé de polyglutamine (Kandler et al. 1983). La présence d'homopolymères ou d'hétéropolymères est connue pour favoriser la précipitation de vatérite (Falini 2000, Falini et al 2002, Manoli and Dalas 1999, 2001, Kanakis and Dalas 2000, Braissant et al. 2002, Braissant et al. 2003). Tous ces éléments réunis permettent d'expliquer la précipitation de sphérulites de vatérite par *Xanthobacter autotrophicus*. Finalement, la découverte récente de cristaux de vatérite associés à des colonies mucilagineuses de *Synechococcus* contenant du poly-aspartate (Giralt et al. 2002) semble confirmer les hypothèses développées ici. De la même manière, la plus grande stabilité thermodynamique de la calcite, l'absence de mucilage et de polymères d'acides aminés chez *Ralstonia eutropha* et *Streptomyces sp.* permet d'expliquer la précipitation de calcite chez celles-ci. Néanmoins les propriétés des structures pariétales particulières semblent rester primordiales du point de vue de la morphologie. Chez *Ralstonia eutropha*, ces structures ont une influence limitée, mais visible sur la cristallisation de la calcite. En effet les cristaux produits par cette souche se développent avec des faces et des angles proches de ce qu'on pourrait attendre de la calcite en milieu saturé abiotique. Il faut toutefois remarquer que les angles de ceux-ci sont souvent émoussés, ce qui trahit l'action des structures pariétales. En revanche, les "hyphes" indurées produites par *Streptomyces* suggèrent que la paroi de celui-ci est un site préférentiel pour la nucléation et la croissance de la calcite. Dans le cas de *Streptomyces*, la croissance de la calcite le long des hyphes de celui-ci ne produit ni face, ni angle rappelant un rhomboèdre de calcite. La différence de comportement de ces deux souches vis à vis de la cristallisation du carbonate de calcium montre que si certains types de structures pariétales n'influencent que peu la morphologie du carbonate de calcium, d'autres peuvent la contrôler de manière stricte.

Conclusion

La précipitation de carbonate de calcium par des bactéries du sol est un phénomène courant (Boquet et al. 1973, Rivadeneyra et al. 1994, 1996, 1998, 2004, Castanier 2000, Ferris et al. 2003). Les expériences et les résultats présentés ici montrent sans ambiguïté que la production de carbonate de calcium peut être obtenue lors de la dégradation bactérienne de l'oxalate de calcium. De même, les données présentées ci-dessus montrent l'influence du milieu et des bactéries sur la précipitation et la cristallisation du carbonate de calcium. La production de calcite, d'aragonite, de dolomite, et de monohydrocalcite, avaient déjà été obtenue lors de cultures bactériennes (Boquet et al. 1973, Castanier et al. 2000, Gonzalez-Munos et al. 2000, Parraga et al 1998, Rivadeneyra et al. 1998, Warthmann et al. 2000). Néanmoins la formation de vatérite en culture n'avait pas été décrite jusque là, bien qu'elle ait été souvent associée à la présence de bactéries (Sanchez-Moral et al. 2003). Toutefois, ce serait une généralisation abusive de penser que toutes les souches produisant des exopolysaccharides et des polymères pariétaux composés d'homopolymères peuvent produire de la vatérite. En effet, la diversité des exopolysaccharides et des polymères pariétaux à travers le monde bactérien est très importante (Kandler et al. 1983) et incite à la plus grande prudence avant de tirer des con-

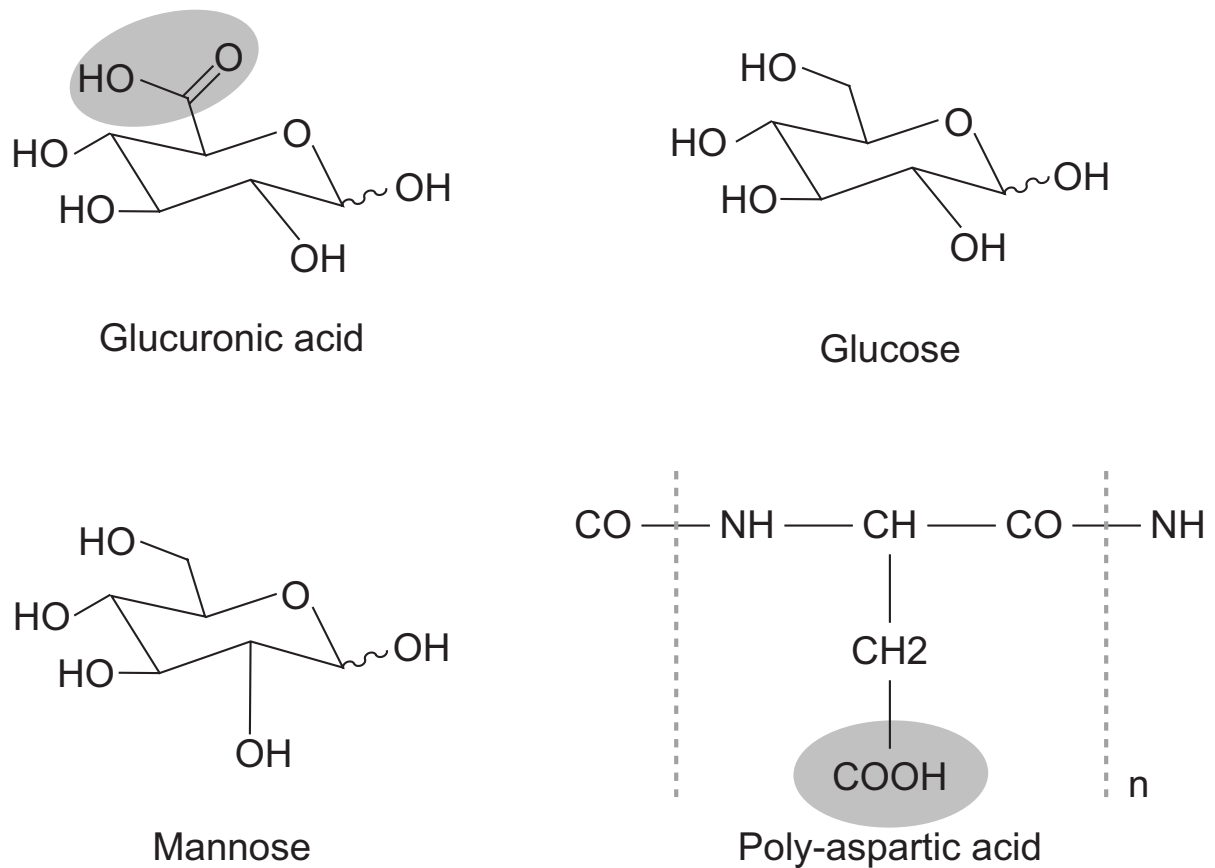


Figure 28: Représentation des quatre composants principaux de l'exopolysaccharide (EPS) de *X. autotrophicus* (acide glucuronique, glucose, mannose) et de son polymère pariétal (poly-aspartate). Notez que le poly-aspartate peut aussi être polymériser à l'aide du carboxyle de la chaîne latérale de cet acide aminé. Les groupes carboxyles libres susceptibles d'interagir avec la formation de carbonate de calcium sont indiqués en grisé. *Representation of the 4 major component of X. autotrophicus exopolysaccharide (glucuronic acid, glucose, mannose) and its cell wall polymer (poly-aspartic acid). Note that poly-aspartic acid can also polymerize using the lateral chain carboxyl group. Grey areas indicate the free carboxylic acid able to interact with the calcium carbonate precipitation.*

clusions hâtives. De même la diversité des biofilms naturels (Sutherland 2001 a,b,c) nous appelle à développer des techniques mieux adaptées à l'étude de la formation du carbonate de calcium dans ces derniers.

Résumé - Summary

- Les bactéries oxalotrophes augmentent notablement le pH de leur milieu en culture. Cette augmentation de pH correspond uniquement à la consommation des oxalates et à la production d'ions carbonates comme le montrent les équations 34 à 92. *Oxalotrophic bacteria increase the pH of their media. This pH increase is only due to the consumption of oxalate ions and their replacement by carbonate ions as it is shown in equations 34 to 92.*
- Les bactéries oxalotrophes sont capables de précipiter du carbonate de calcium à partir d'oxalate de calcium. Les carbonates produits se trouvent essentiellement sous forme d'agrégats micritiques sphériques et de bâtonnets micritiques. L'analyse de ces carbonates a montré qu'il s'agissait de calcite ou de calcite faiblement magnésienne. *Oxalotrophic bacteria are able to*

precipitate calcium carbonate from calcium oxalate. Carbonates produced are mainly found as spherical micritic aggregates and micritic rods. Analyses of these carbonates has shown that they are made of calcite or low magnesian calcite.

- Sur des milieux riches, les bactéries oxalotrophes testées ont montré que diverses morphologies et minéralogies de carbonate de calcium pouvaient être produites. Les exopolysaccharides et les polymères pariétaux semblent jouer un rôle important dans la formation des divers polymorphes du carbonate de calcium observés. *On rich culture media, oxalotrophic bacteria have shown that different morphologies and mineralogies of calcium carbonate can be precipitated. Exopolysaccharides and parietal polymers seem to play an important role in the formation of the different calcium carbonate polymorphs.*

Chapitre 4: Etude du cycle oxalate-carbonate en milieu naturel

Le chapitre précédent a montré les aspects physico-chimiques et biologiques du cycle oxalate-carbonate en laboratoire. Ce chapitre va s'intéresser au cycle oxalate-carbonate dans des sols naturels autour de plantes produisant de l'acide oxalique et de l'oxalate de calcium.

Introduction

De nombreuses plantes poussant dans des environnements très divers produisent de l'acide oxalique et/ou de l'oxalate de calcium. Néanmoins, toutes ces plantes ne peuvent être utilisées comme modèle pour l'étude du cycle oxalate-carbonate. Le choix des plantes étudiées dans ce travail a été fait de manière à pouvoir observer et mesurer au mieux les paramètres importants du cycle oxalate-carbonate. Dans un premier temps, nous avons étudié des plantes produisant de grandes quantités d'oxalate et poussant sur des sols ne contenant pas de minéraux carbonatés. Ces deux conditions assuraient de pouvoir détecter non seulement les oxalates produits par la plante, mais aussi les carbonates résultant de l'oxydation de ceux-ci. Ceci nous a conduit à étudier deux plantes modèles: *Milicia excelsa* (syn: *Chlorophora excelsa*) et *Opuntia* sp. *Milicia excelsa* appartient à la famille des Moracées (Aubréville 1936, Satabié 1985). Il s'agit d'un arbre tropical dioïque communément appelé "Iroko". D'autres noms vernaculaires locaux tels que Odoum, Abang, et Mandji lui sont parfois attribués en Afrique. Cet arbre mesure généralement 28 mètres de hauteur pour un diamètre de 1.70 mètres. Les feuilles et les fleurs étant souvent inaccessibles, les taches orangées caractéristiques que l'on peut voir sous l'écorce du tronc qui se délite, ainsi que sur les racines, permettent de reconnaître cet arbre en forêt. Les principales caractéristiques et la distribution de cet arbre sont résumées dans la figure 29. L'iroko est l'objet d'étude principal de ce travail.

Opuntia sp. appartient à la famille des cactacées. Le nom commun de ce cactus est "figuier de Barbarie". Cet arbuste succulent apprécie les sols sableux et caillouteux bien drainés. Il peut atteindre jusqu'à 5 mètres de hauteur. Les *Opuntia* sont originaires du continent américain et ont été importés en Europe où ils sont utilisés comme plantes ornementales ou pour faire des haies (Figure 30 - Heywood 1996, Spichiger et al. 2002).

Dans un second temps, nous avons étudié une plante produisant elle aussi de grandes quantités d'oxalate, mais sur un sol dans lequel se trouvaient des carbonates hérités. L'objectif étant d'observer la production de carbonates liés au cycle oxalate-carbonate afin de voir si ceux-ci pouvaient être discriminés des carbonates hérités. La plante choisie pour cette partie était *Vitis vinifera*, que l'on connaît sous le nom commun de "vigne". Le genre *Vitis* appartient à la famille des Vitacées. Il s'agit d'un arbuste grimpant muni de vrilles pouvant atteindre jusqu'à 5 mètres de haut (Heywood 1996).

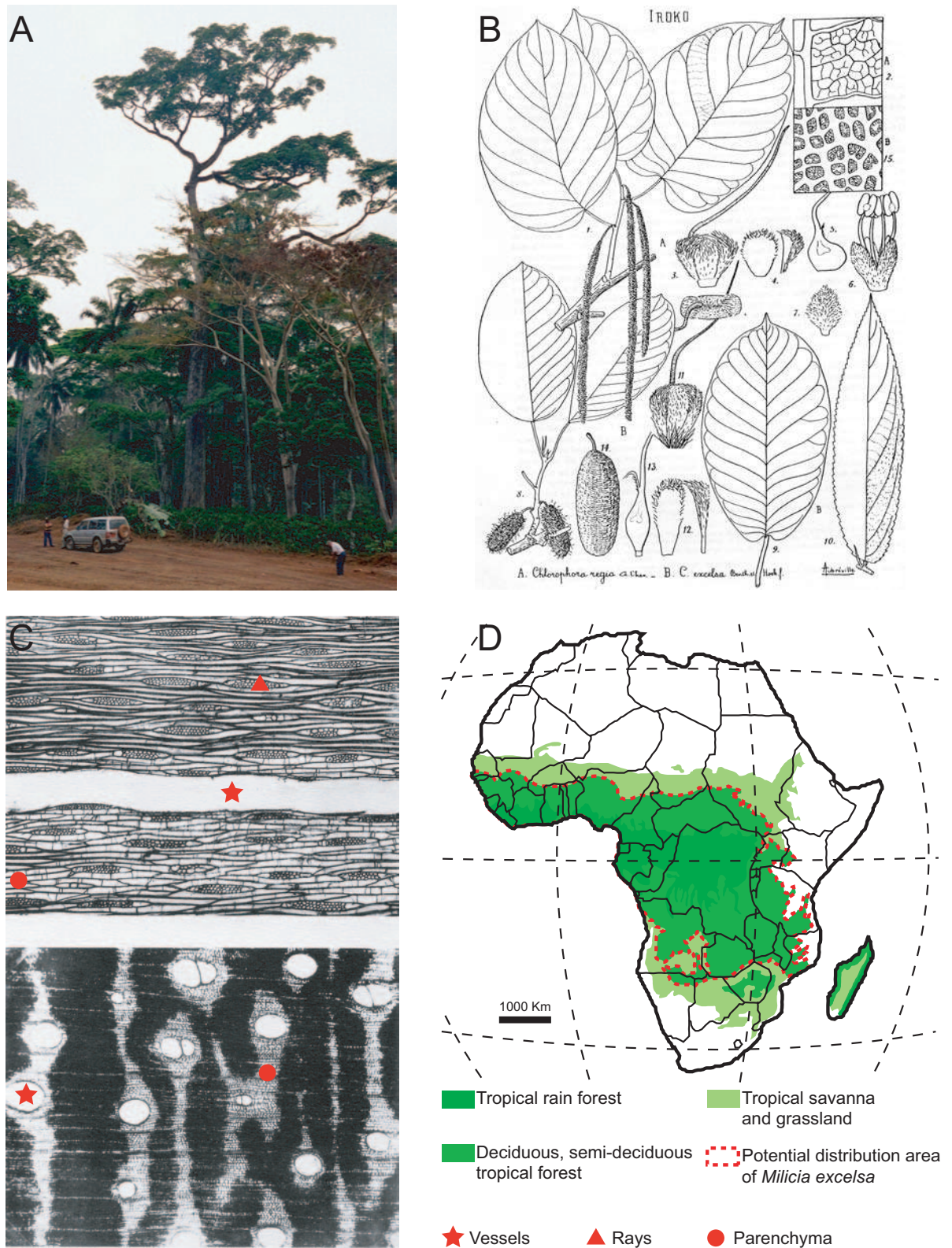


Figure 29: A: Photo d'un iroko près du village de Malantouem (Cameroun). B: Détails des feuilles et des fleurs des irokos mâles et femelles (d'après Aubréville 1936). C: Détails des tissus ligneux de l'iroko (d'après Aubréville 1936). D: Carte de répartition approximative de l'iroko A: An iroko tree near the village of Malantouem (Cameroon). B: Drawings of the leaves and flowers of the iroko tree (after Aubréville 1936). C: Optical microscope view of the woody tissues of the iroko tree (after Aubréville 1936). D: Map showing approximate distribution map of iroko trees.

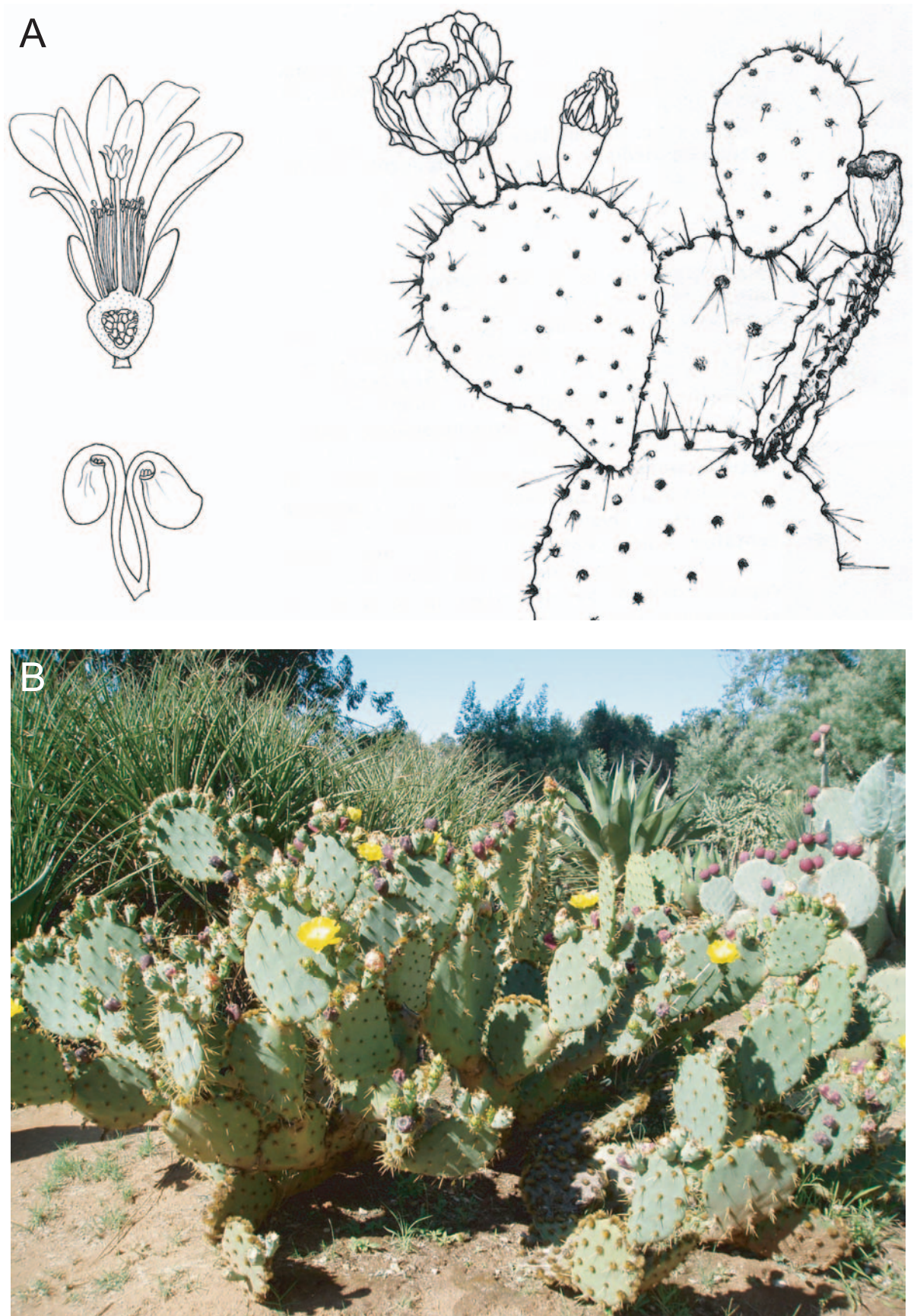


Figure 30: A: Détail des fleurs et des tiges des Opuntia. B: Photo d'un Opuntia en fleur. A: *Drawings of flower and stems of Opuntia*. B: *A flowering Opuntia*. (A: Spichiger et al. 2002)

Méthodes

Description des sites

Sites échantillonnés pour l'étude de l'iroko

L'étude du cycle oxalate-carbonate autour de *Milicia excelsa* s'est déroulée sur plusieurs sites. Des échantillons ont été collectés au Cameroun et en Côte d'Ivoire (Figure 31). Quatre sites ont été étudiés au Cameroun. Le premier est situé 10 km à l'ouest de la préfecture de Lolodorf (3°13'N, 10°47'E). Ce site se trouve sous un climat tropical humide (Figure 31) et sur un sol latéritique jaune (i.e. un sol ferrallitique) bien développé (≤ 3 m) sur roche mère granitique. La végétation qui se développe sur ce site est une forêt tropicale humide sempervirente.

Le deuxième site se situe dans la région de Leboudy (4°07'N, 11°30'E), environ 15 kilomètres au nord de Yaoundé. Cet endroit se situe sous un climat tropical humide avec une saison sèche plus marquée que sur le site précédent (Figure 31). Une fine couche (≤ 1 m) de sol latéritique rouge (i.e. sol ferrallitique) s'y développe sur inselberg granitique. La végétation qui recouvre cet inselberg est constituée d'une forêt tropicale sempervirente. Les deux derniers sites se situaient dans les villages de Mankaré (5°22'N, 11°06'E) et de Machatoum (10°59'N, 5°24'E), proches de la préfecture de Masingam (11°00'N, 5°25'E). Cette région est sous l'influence d'un climat tropical sec avec une saison sèche bien marquée (Figure 31). Le sol à Mankaré est un sol latéritique jaune développé sur alluvions. Mankaré se situe à l'intérieur de la forêt galerie bordant le fleuve Mbam. A Machatoum, le sol est un sol latéritique brun rouge typique. La végétation autour de ce site est une savane arborée.

Un seul site a été étudié en détail en Côte d'Ivoire et un second a été prospecté. Le site étudié se situe proche du village de Biga (6°36'N, 6°29'O). Un second site a toutefois été prospecté. Celui-ci se trouve dans la région de Kani, dans la forêt protégée n° 134 (Kani) qui a une superficie de 31'000 hectares (8°31'N, 6°32'O). Biga se trouve sous un climat tropical avec deux saisons sèches (Figure 31). Le sol à cet endroit est un sol latéritique brun rouge. La végétation dans cette région est une forêt tropicale semi-décidue bordant une forêt récemment exploitée.

Sites échantillonnés pour l'étude des Opuntiae

Les observations sur les Opuntiae ont été faites en Espagne (Figure 32). Le site choisi se trouve au nord du désert de Tabernas (33°03'N, 2°23'O) près du village de Tahal (37°13'N, 2°17'O). Le climat dans cette région est un climat semi-aride où les précipitations moyennes par année sont de 215 mm (Figure 32). Le sol sous les Opuntiae échantillonnés est un colluviosol isohumique se développant sur schistes argileux et schistes à la fois comme substrat et roche mère. La végétation dans cette zone est une végétation de type thermo-méditerranéenne (Peinado et al. 1992).

Sites échantillonnés pour l'étude de la vigne

Le site choisi pour cette dernière partie se trouve en Suisse (Figure 32) dans la localité de Bevaix (46°55'N, 6°50'E). Ce site est divisé en deux plantations de vignes, la première est cultivée avec des plants de vignes depuis 500 ans environ, alors que la seconde n'est en culture que depuis 20 ans environ. Le sol sur lequel se développent ces vignes est une moraine anthropisée. Le climat dans cette région est de type tempéré semi-continentale (Figure 32). Le travail sur ce site a été mené en collaboration avec le Dr. Jérôme Hamelin et le centre national de compétence et de recherche "survie des plantes" (NCCR-Plant survival).

Méthode d'échantillonnage

Les échantillons de sol pour les analyses bactériologiques et chimiques ont été pris à intervalles réguliers le long du profil de sol sous la plante productrice d'oxalate. Ils ont été collectés dans des récipients stériles à l'aide de matériel stérilisé à l'éthanol. Les échantillons ont ensuite été séparés en deux parties. La première partie a été utilisée immédiatement pour les analyses bactériologiques, alors que la seconde partie a été séchée dans une étuve en vue d'analyses chimiques ultérieures. Les

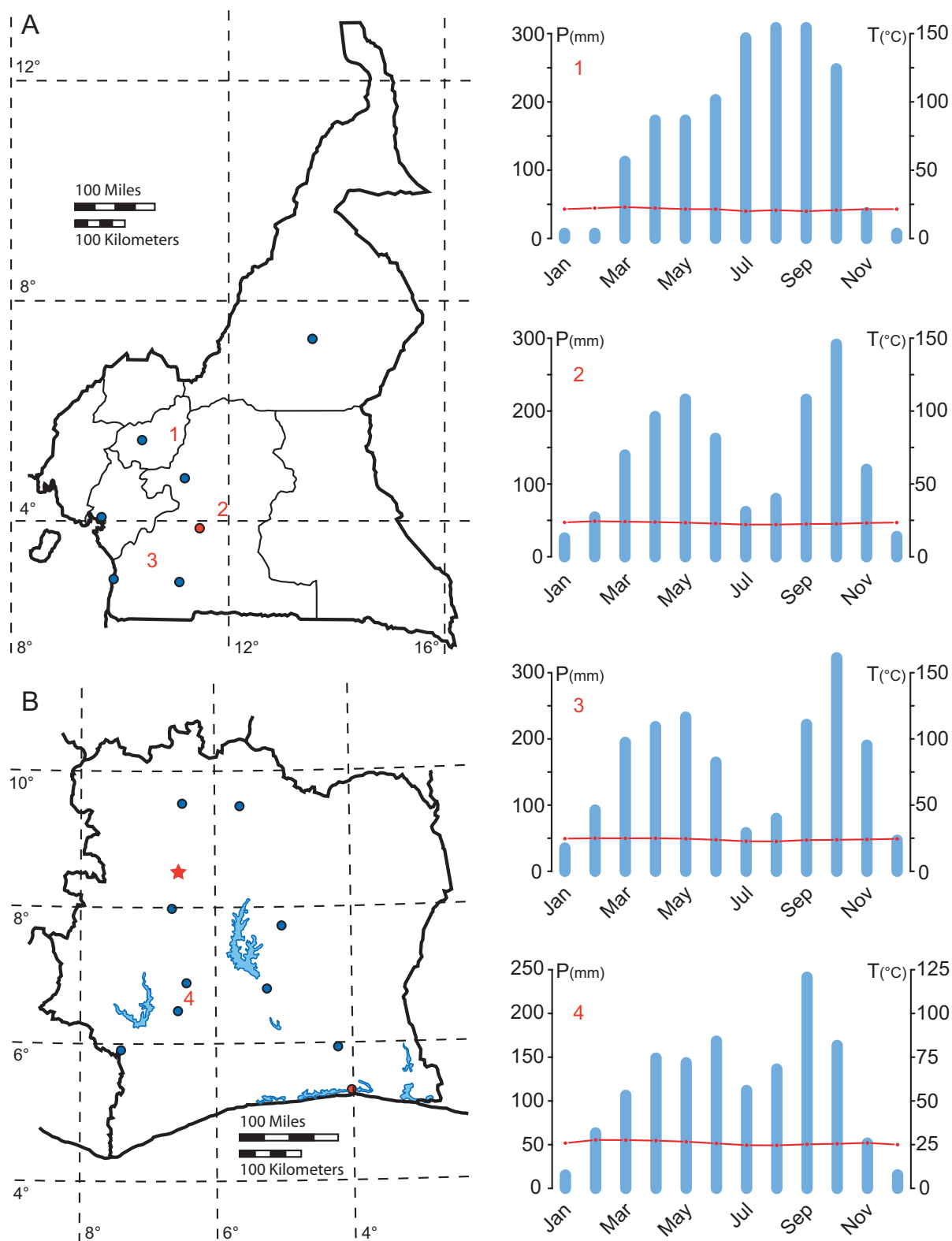


Figure 31: A: Carte du Cameroun indiquant les principales villes (○) et les sites échantillonnés (1,2,3). B: Carte de la Côte d'Ivoire indiquant les principales villes (○) et les sites échantillonnés (4, ★). 1: Climat de la région de Massangam. 2: Climat de la région de Yaoundé. 3: Climat de la région de Lolodorf. 4: Climat de la région de Daloa A: Map of Cameroon indicating important cities (○) and sampling sites (1,2,3). B: Map of Ivory Coast indicating important cities (○) and sampling sites (4, ★). 1: Climate in the Massangam area. 2: Climate in the Yaounde area. 3: Climate in the Lolodorf area. 4: Climate in the Daloa area.

échantillons conservés pour les analyses chimiques ont été broyés sauf pour l'analyse du pH(H₂O). Cette procédure garantit que les mêmes échantillons sont utilisés pour les analyses chimiques et bactériologiques.

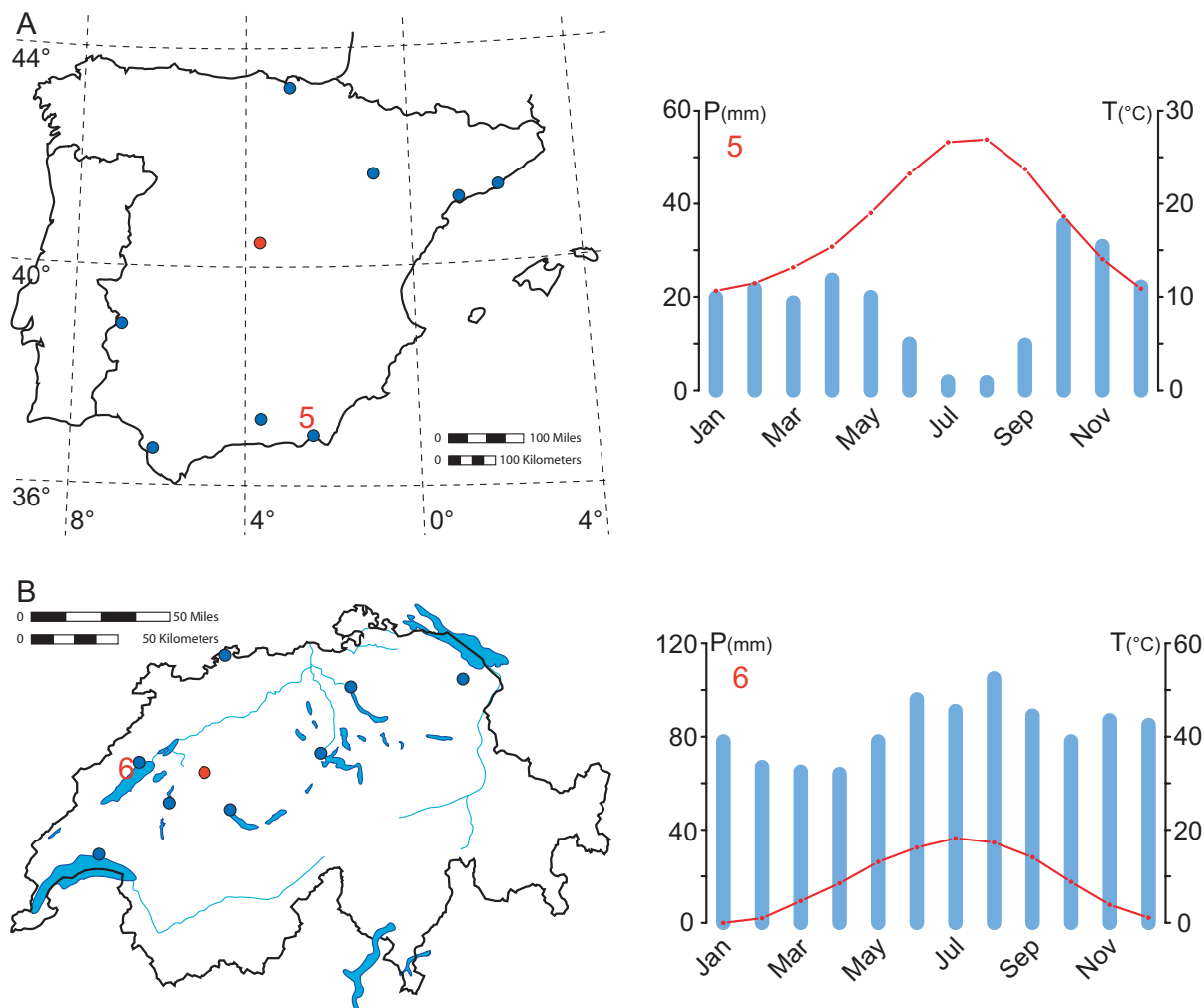


Figure 32: A: Carte de l'Espagne indiquant les principales villes (○) et le site échantillonné (5). B: Carte de la Suisse indiquant les principales villes (○) et le site échantillonné (6). 5: Climat dans la région de Tabernas. 6: Climat dans la région de Neuchâtel. A: Map of Spain indicating important cities (○) and sampling site (5). B: map of Switzerland indicating important cities (○) and sampling site (6). 5: Climate in the Tabernas area. 6: Climate in the Neuchâtel area.

Analyses microbiologiques

Le nombre de bactéries cultivables a été déterminé par comptage des colonies sur milieu Angle. De même, le nombre de bactéries oxalotrophes cultivables a été déterminé par comptage des colonies sur milieu Schlegel additionné d'oxalate de calcium (4 g / L). Pour chaque échantillon deux duplicats ont été réalisés et 4 à 6 boîtes de Pétri portant de 10 à 250 colonies ont été comptées. De plus, une inspection visuelle des boîtes de Pétri à la loupe binoculaire ou avec un microscope de terrain a permis d'estimer le nombre d'actinobactéries totales et d'actinobactéries oxalotrophes, en comptant les colonies filamenteuses. Cette approche a été complétée par des cultures d'enrichissement en milieu Schlegel liquide additionné d'oxalate de potassium (4 g / L). Dix microlitres de ces cultures

d'enrichissements ont ensuite été étalés sur du milieu Schlegel solide additionné d'oxalate de calcium (4 g / L). Les bactéries oxalotrophes montrant un fort halo de dissolution de l'oxalate de calcium ont ensuite été isolées et purifiées. L'identification des bactéries isolées a ensuite été faite soit en utilisant des systèmes d'identification api® 20NE (Biomérieux), soit par amplification et séquençage d'un segment de 500 paires de bases environ de l'ADN ribosomal 16S.

Analyses chimiques

La concentration d'oxalate dans les sols a été déterminée de manière enzymatique à l'aide de kits de détermination de l'oxalate (Sigma diagnostics, Suisse; ou Trinity biotech, Wicklow, Irlande). Le contenu en carbonate des sols a été mesuré par titration en retour de l'acide sulfurique. Finalement le pH a été mesuré à l'aide d'une électrode à pH.

Observations et analyses d'échantillons de plantes

Sur les différents sites, des échantillons de plantes saines et dégradées ont été prélevés. Ces échantillons ont ensuite été observés, soit en lames minces, soit à l'aide d'un microscope électronique à balayage. L'objectif de ces observations était de voir sous quelles formes se trouvaient les oxalates et les carbonates associés aux plantes, ainsi que d'observer la dégradation de ceux-ci. De même, ces échantillons ont été analysés par diffraction des rayons X afin de mettre en évidence la minéralogie des cristaux présents dans les tissus des plantes. Ces deux techniques sont utilisées ici de manière complémentaire puisqu'à elles deux, elles permettent de préciser la minéralogie et la localisation des cristaux observés.

Expérience de biominéralisation

Un grand nombre (n = 20) de souches oxalotrophes importantes a été mis en culture sur extrait de sol, et extrait de sol synthétique de manière à observer si la production de carbonate avait lieu dans chaque cas. Une partie des carbonates produits lors de cette expérience a été observée en lames minces ou à l'aide d'un microscope électronique (Philips XL30 ESEM).

Résultats

Observations autour des irokos

Profil de Mankaré

A Mankaré, on observe une diminution de la concentration d'oxalate de 70 mg / kg dans les couches de sols supérieures à 0 mg / kg en profondeur. Dans ce cas, la concentration d'oxalate maximale a été observée à 20 cm de profondeur (Figure 33). La concentration de carbonate décroît de manière similaire avec la profondeur. La partie supérieure du profil de sol contient entre 68 % et 70 % de carbonate de calcium, alors qu'on n'en observe plus que 1 % dans les échantillons prélevés le plus profondément (Figure 33). Le carbonate de calcium se trouve sous forme de blocs indurés similaires à ceux décrits par Cailleau (2005), Braissant et al. (2004) et Carozzi (1970) (Figure 33-34). Finalement, les valeurs de pH de ce profil varient entre 10.3 et 9.9 (Figure 33). De telles valeurs de pH, atypiques pour ce type de sol (les sols latéritiques typiques ont un pH qui varie entre 4.5 et 6.0 - Leneuf 1959), sont en accord avec d'autres études qui ont observé des pH compris entre 9.0 et 8.2 autour d'irokos (Cailleau 2005). Le nombre de bactéries cultivables et de bactéries oxalotrophes par gramme de sol décroît respectivement de 10^7 à 10^6 et de 10^6 à 10^5 avec la profondeur. L'observation des boîtes a montré que les actinobactéries représentent $89\% \pm 8\%$ des bactéries oxalotrophes, alors qu'elles ne représente que $9\% \pm 4\%$ des bactéries totales. La grande majorité des actinobactéries dénombrées dans cette étude semble donc être oxalotrophe. L'ensemble des isolats réalisés sur ce profil a été identifié comme appartenant au genre *Streptomyces* (l'identification a été réalisée dans un premier temps sur les caractères morphologiques des colonies puis par amplification et séquençage d'un

segment de l'ADN ribosomal 16S). Lors des observations au microscope électronique, une colonie d'actinomycètes a été identifiée comme appartenant potentiellement au genre *Nocardia* (ceci avec les réserves qu'implique ce genre d'identification).

Profil de Machatoum

Sur le site de Machatoum, on n'observe que très peu d'oxalate. La concentration de celui-ci avoisine les 3 mg / kg (Figure 34). De même, le taux de carbonate de calcium dans ce sol reste très faible et se situe à la limite de détection (Figure 34). En revanche, le pH montre à nouveau des valeurs supérieures à celles des sols latéritiques rouges typiques. Les pH mesurés le long de ce profil varient entre 7.5 et 7.9 (Figure 34). Néanmoins, des blocs de carbonate de calcium ont été trouvés dans l'arbre, et à quelques endroits, le sol a montré une faible effervescence lorsqu'une goutte d'HCl y était déposée. Les populations de bactéries cultivables et de bactéries oxalotrophes montrent une décroissance similaire à celle observée dans le profil de Mankaré. Le nombre de bactéries cultivables diminue de $10^{7.5}$ à 10^6 bactéries par gramme de sols avec la profondeur, alors que le nombre de bactéries oxalotrophes passe quant à lui de 10^7 bactéries par gramme de sol en surface à 10^6 bactéries par gramme de sol en profondeur. Dans ce profil, les actinobactéries représentent $94 \% \pm 4 \%$ des bactéries oxalotrophes, alors qu'elles ne représentent qu'une fraction de $18 \% \pm 8 \%$ des bactéries cultivables. Dans ce profil, toutes les souches oxalotrophes ont été identifiées comme appartenant au genre *Streptomyces* (l'identification a été réalisée dans un premier temps sur les caractères morphologiques des colonies puis par amplification et séquençage d'un segment de l'ADN ribosomal 16S).

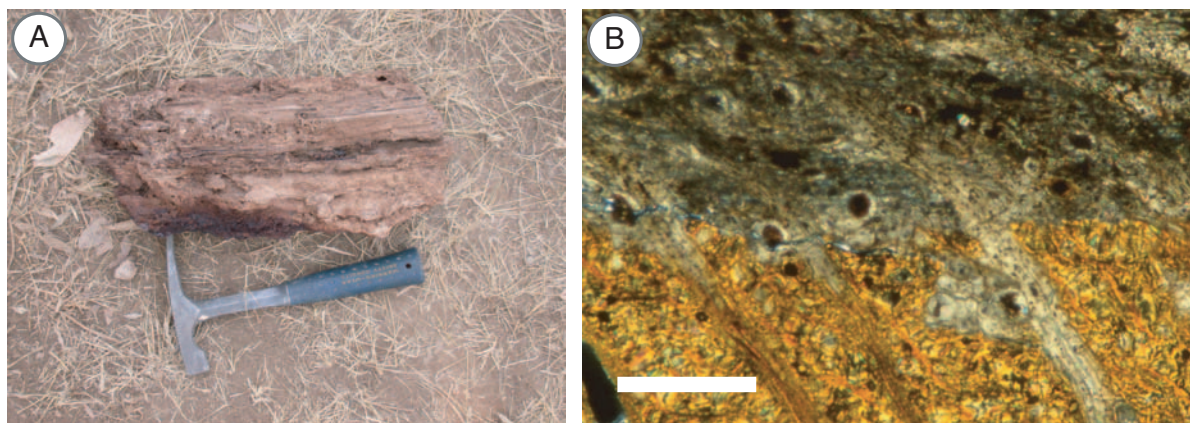


Figure 33: A: Photo de terrain montrant un bloc de bois fortement induré trouvé sur le site de Mankaré (Cameroun). Ce bloc était probablement une racine d'iroko avant sa carbonatation. B: Détail d'un morceau de bois induré observé en lumière polarisée. On peut observer une large zone minéralisée (sombre) au-dessus de tissus de bois bien préservés. A: *Field picture of an indurated wood bloc found in the Mankaré site (Cameroun). This bloc was probably a part of a root before it was mineralized.* B: *Detail of an indurated wood block observed in polarized light. A large mineralized area can be seen (dark) over well preserved organic tissues.*

Enrichissements réalisés sur les sols de Lolodorf, Leboudy et Biga

Sur ces trois sites, seules des cultures d'enrichissement ont été réalisées. Les isolats obtenus de ces cultures pour les sites camerounais appartiennent aux genres *Comamonas*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Azospirillum* et *Pandora*. De même, les genres *Comamonas*, *Delftia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Oxalicibacterium* ont été isolés à partir des cultures d'enrichissement réalisées à Biga, en Côte d'Ivoire.

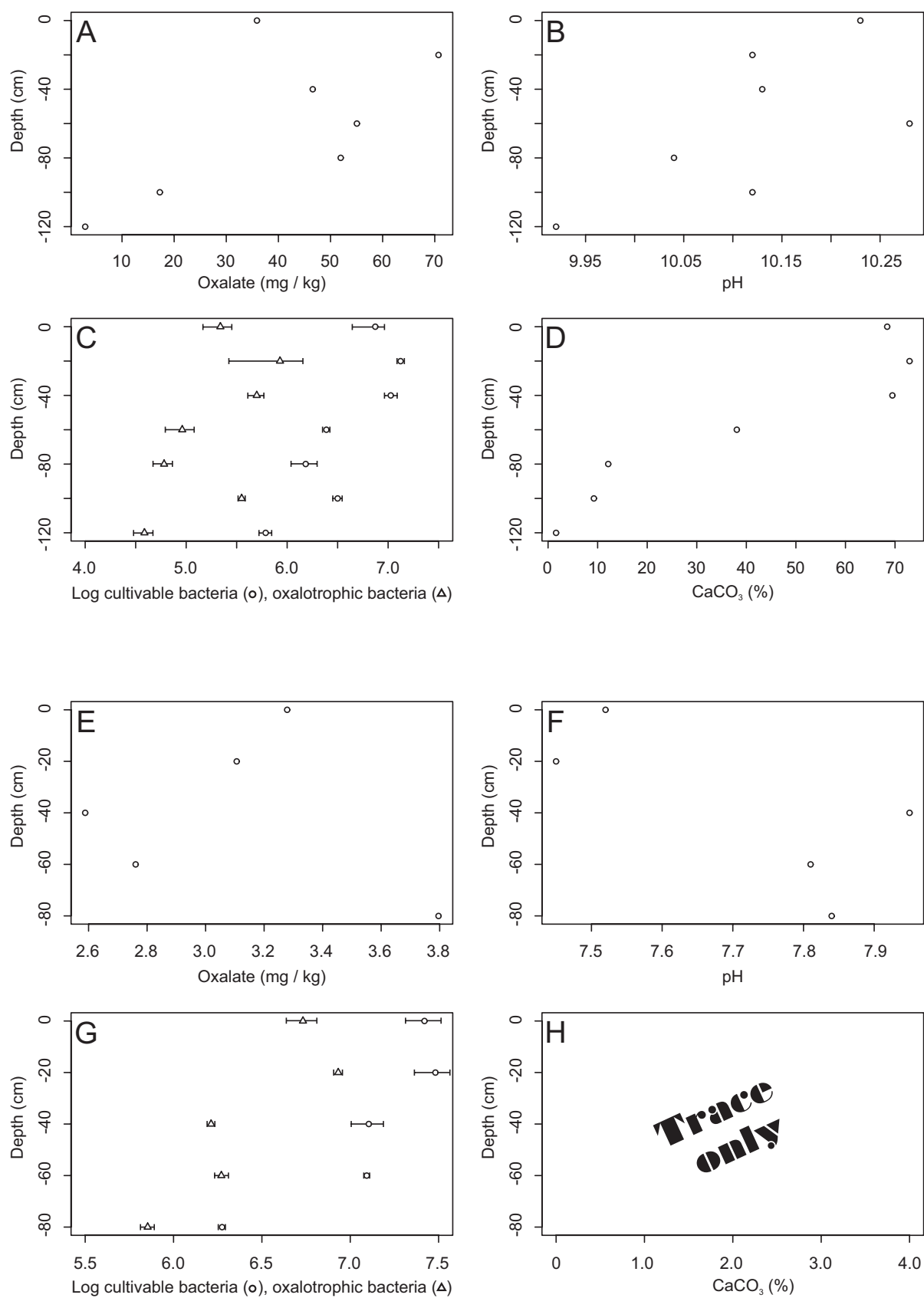


Figure 34: Concentration en oxalate, nbre de bactéries cultivables et oxalotrophes, pH et concentration en carbonate sur les sites Camérounais. A,B,C,D: profil de Massangam. E,F,G,H: Profil de Machatoum. Oxalate concentration, number of cultivable and oxalotrophic bacteria, pH and carbonate concentration at the Cameroon sites. A,B,C,D: Massangam profile. E,F,G,H: Machatoum profile

Minéralogie des cristaux associés à l'iroko

De nombreuses minéralogies d'oxalates et de carbonates ont été observées lors de l'analyse par diffraction des rayons X des différents échantillons de bois d'iroko. Ces différences permettent de préciser le rôle des différents acteurs du cycle oxalate-carbonate autour de l'iroko. L'analyse par diffraction des rayons X montre que les échantillons de bois sain contiennent uniquement de l'oxalate de calcium monohydrate et de la silice amorphe. En revanche dans les échantillons de bois dégradé, on trouve de l'oxalate de calcium monohydrate, de la silice amorphe, mais aussi de l'oxalate de calcium dihydrate, du carbonate de calcium ainsi que du calcium-phosphate-carbonate (Figure 35). L'observation au microscope électronique d'échantillons d'écorce et de bois sains fracturés montre que l'oxalate de calcium monohydrate se trouve sous forme de cristaux automorphes d'environ 50 μm . Ces cristaux sont enchâssés dans les tissus de bois, généralement près d'éléments conducteurs. L'observation de bois d'iroko dégradé montre la présence d'oxalate de calcium monohydrate et dihydrate. Comme auparavant, la forme monohydrate se trouve sous forme de cristaux automorphes enchâssés dans les tissus du bois. Néanmoins, ces cristaux montrent souvent des golfes de dissolution associés à la présence de bactéries (Figure 36). La forme dihydrate de l'oxalate de calcium n'est, quant à elle, pas associée aux tissus de l'iroko, mais à des hyphes fongiques. Ces cristaux se trouvent sous forme de baguettes de 10 μm visibles à la surface des hyphes. Sur un seul site, une croûte d'oxalate de calcium a pu être observée à la surface d'une racine, sous une fine cuticule (Figure 36). Le carbonate de calcium se trouve sous forme de calcite ou de calcite faiblement magnésienne. On observe plusieurs types de carbonate dans les tissus en décomposition. De larges portions de tissus minéralisés sont visibles en microscopie optique. Dans ces zones, le microscope électronique permet de distinguer des cellules et des fibres de cellulose minéralisées (fossilisées). De même, on trouve des cristaux de calcite xénomorphes à subautomorphes remplissant les vaisseaux conducteurs de ces zones. Finalement, les sécrétions de sève provenant de parties blessées de l'arbre contiennent des agrégats micritiques (Figure 37).

Observations autour des Opuntiae

Profil de Tabernas

Le long du profil levé sous les Opuntiae de Tabernas, on observe une très forte diminution de la concentration d'oxalate avec la profondeur. En effet celle-ci passe de 1330 mg / kg dans la partie supérieure du profil à 50 mg / kg dans les échantillons les plus profonds (Figure 38). La concentration en carbonate diminue de la même façon passant de 1 % dans les échantillons de surface à 0 % dans les échantillons prélevés en profondeur (Figure 38). Finalement, le pH décroît de 6.7 à la surface à des valeurs toujours inférieures à 5.7 dans le reste du profil (Figure 38). On observe le même type de décroissance pour tous facteurs mesurés lorsqu'on s'éloigne du pied du cactus (Figure 38). Les nombres de bactéries cultivables et de bactéries oxalotrophes montrent eux aussi une décroissance rapide en fonction de la profondeur. On observe une diminution de 10^7 à 10^5 bactéries cultivables par gramme de sol et une diminution de 10^5 à 10^3 bactéries oxalotrophes par gramme de sol des couches de surface vers les couches les plus profondes. Les actinobactéries représentent de 30 % à 35 % des bactéries oxalotrophes. Les isolats d'actinobactéries oxalotrophes appartiennent tous au genre *Streptomyces* (l'identification a été réalisée dans un premier temps sur les caractères morphologiques des colonies puis par amplification et séquençage d'un segment de l'ADN ribosomal 16S). Parmi les autres bactéries oxalotrophes, des représentants des genres *Agrobacterium* et *Burkholderia* ont pu être identifiés (à l'aide de galeries api® 20 NE).

Cristaux associés aux Opuntiae

L'analyse par diffraction des rayons X montre que les cactus contiennent de l'oxalate de calcium mono- et dihydrate. L'oxalate de calcium monohydrate se trouve sous la forme de druses ayant un diamètre de 150 μm (Figure 39). L'oxalate de calcium dihydrate, plus rare, se trouve quant à lui sous forme de bâtonnets bipyramidaux. L'oxalate est visible sous forme macroscopique à la surface des tiges d'Opuntiae en décomposition sur le sol. En effet, celui-ci forme une croûte blanche sur la trame

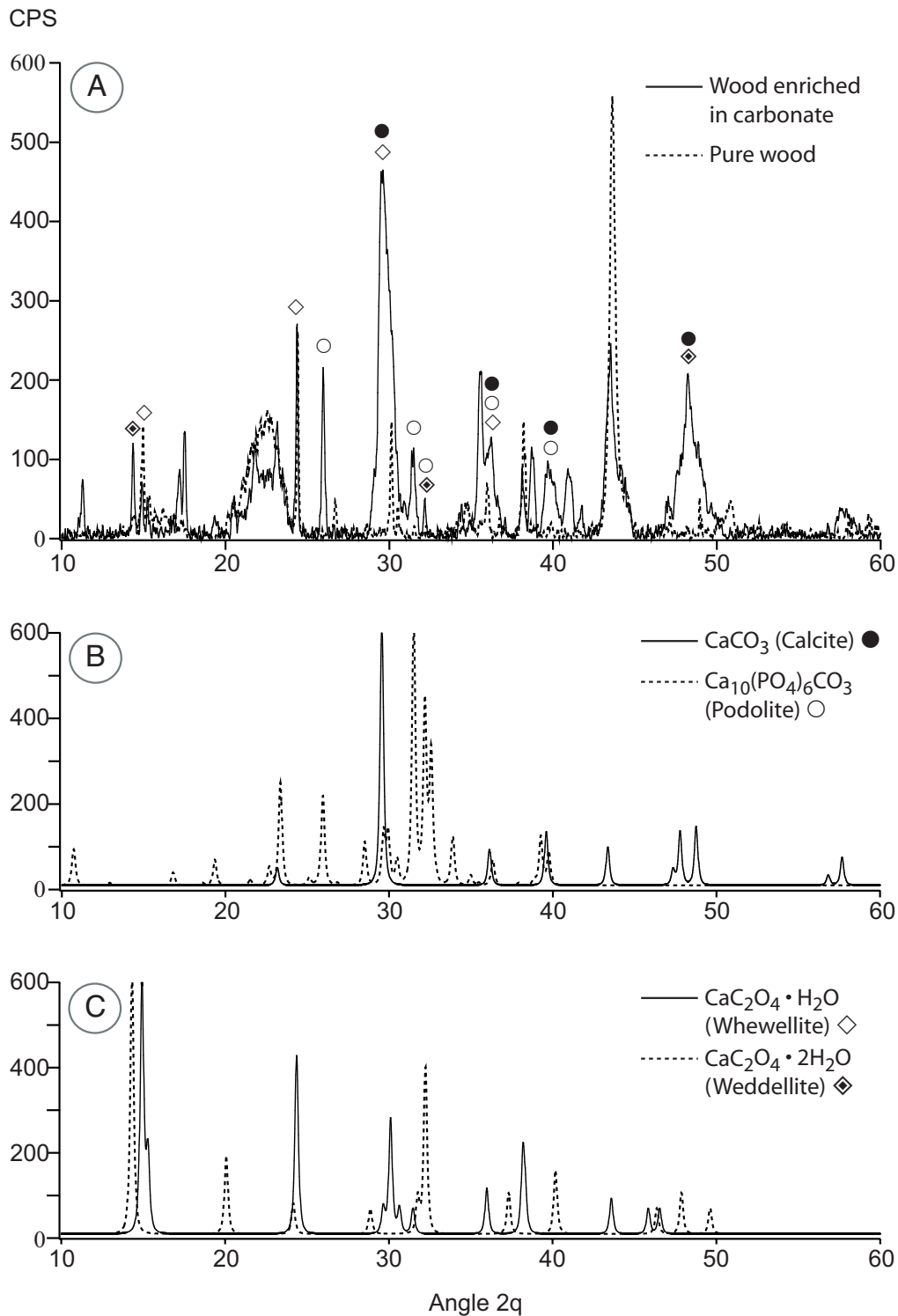


Figure 35: Diffractogrammes des rayons X. A: Echantillon de bois dégradé et enrichi en carbonate et échantillon de bois sain (Les symboles indiquent les pics principaux des différents minéraux). B: Diffractogramme typique de la calcite et du calcium-phosphate-carbonate [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$]. C: Diffractogramme typique de la whewellite et de la weddellite. *X-ray diffractograms. A: Wood sample enriched in carbonate and pure wood (symbols indicate minerals characteristic peaks). B: Reference diffractograms for calcite and calcium-phosphate-carbonate [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$]. C: Reference diffractograms for whewellite and weddellite.*

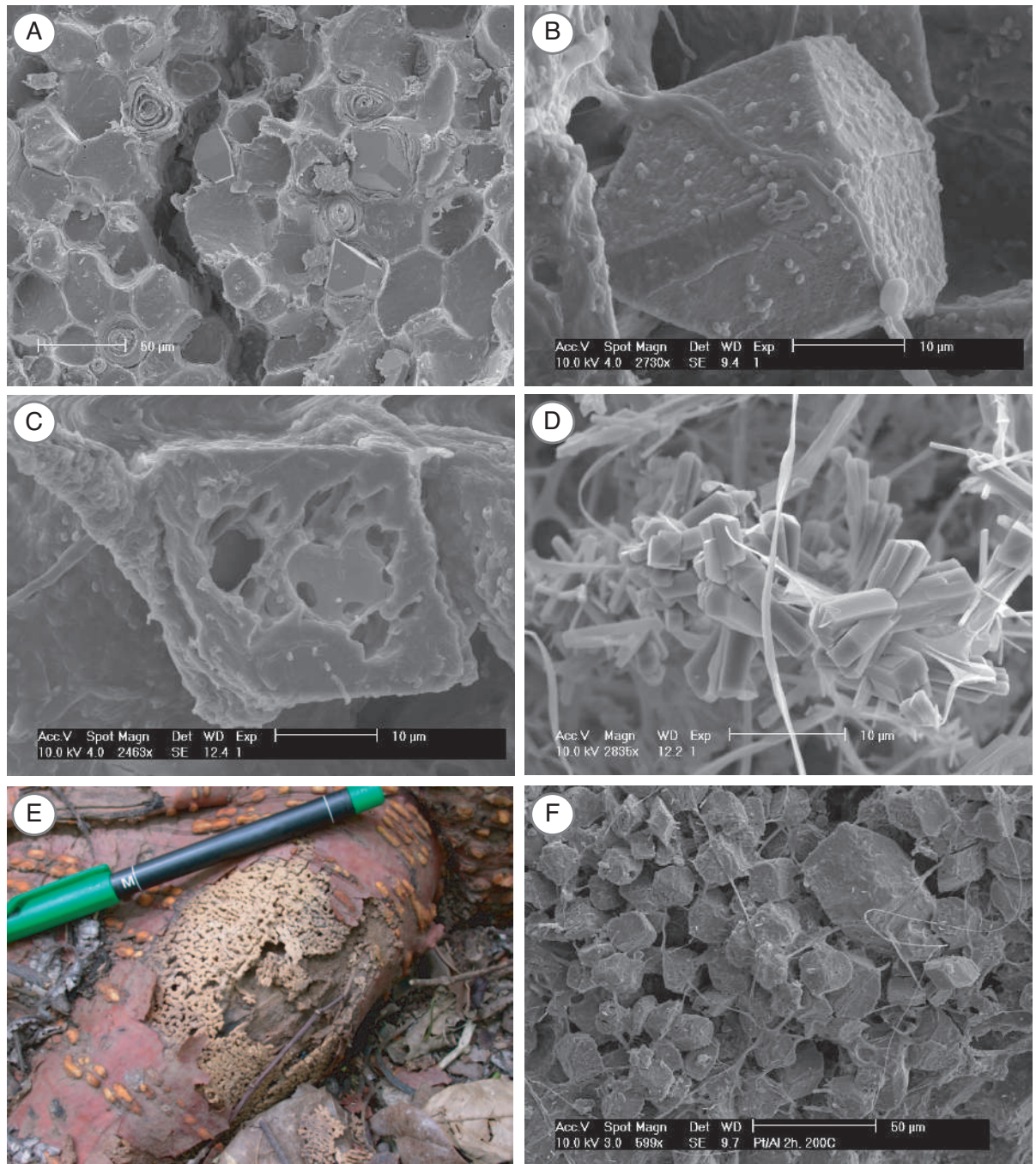


Figure 36: Photographie et observations au microscope optique et électronique de cristaux d'oxalate associés à l'iroko. A: Cristaux de whewellite enchâssés dans les tissus ligneux d'un morceau d'écorce fracturé. B: Bactéries sur un cristal de whewellite. C: Cristal de whewellite montrant de larges golfes de dissolution. D: Cristaux de weddellite associés à une hyphe fongique. E: Racine d'iroko recouverte d'oxalate de calcium. F: Détail de E montrant les cristaux de whewellite encroûtant la racine d'iroko. SEM images of calcium oxalate crystals associated with the iroko tree: A: View of fractured bark showing whewellite encased in woody tissues. B: Bacteria on a whewellite crystal. C: whewellite crystal showing large dissolution area. D: Weddellite associated with a fungal hypha. E: Iroko root encrusted with calcium oxalate. F: Close-up of E showing the whewellite crystals encrusting the root.

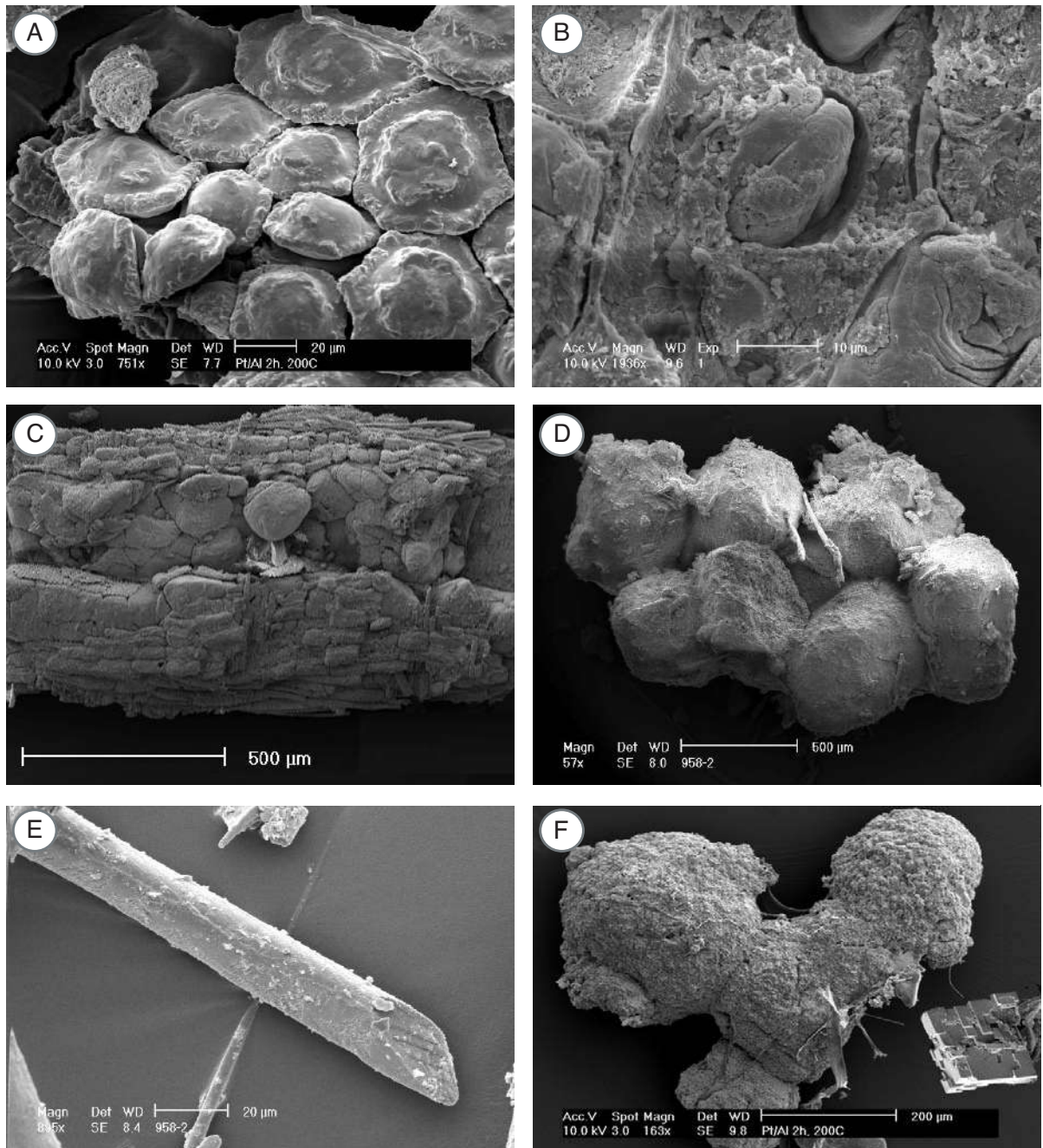


Figure 37: Cristaux de carbonate de calcium associé à l'iroko: A,B: Tissus minéralisés montrant des cellules remplacées par du carbonate de calcium. Notez les parois minéralisées ainsi que le fantôme de vacuole remplacé par du carbonate de calcium (B). C: Tissus conducteur rempli par des cristaux xénomorphes ou subautomorphes de carbonate de calcium. D: Cristaux de carbonate de calcium trouvés dans du bois décomposé. E: Fibre de cellulose minéralisée. F: Agrégats micritiques et rombohédres présents dans de la sève d'iroko. *Calcium carbonate crystals and carbonate-enriched tissues found in the iroko mineralized tree. A,B: Cells totally replaced by calcium carbonate. Note the indurated cell-walls and the ghost of vacuole filled with calcium carbonate in B. C: Conductive vessel infilled with anhedral to subhedral carbonate crystals. D: Calcium carbonate crystals found in decaying wood. E: Cellulose fibre replaced by calcium carbonate. F: Cellulose fibre entirely replaced by calcium carbonate.*

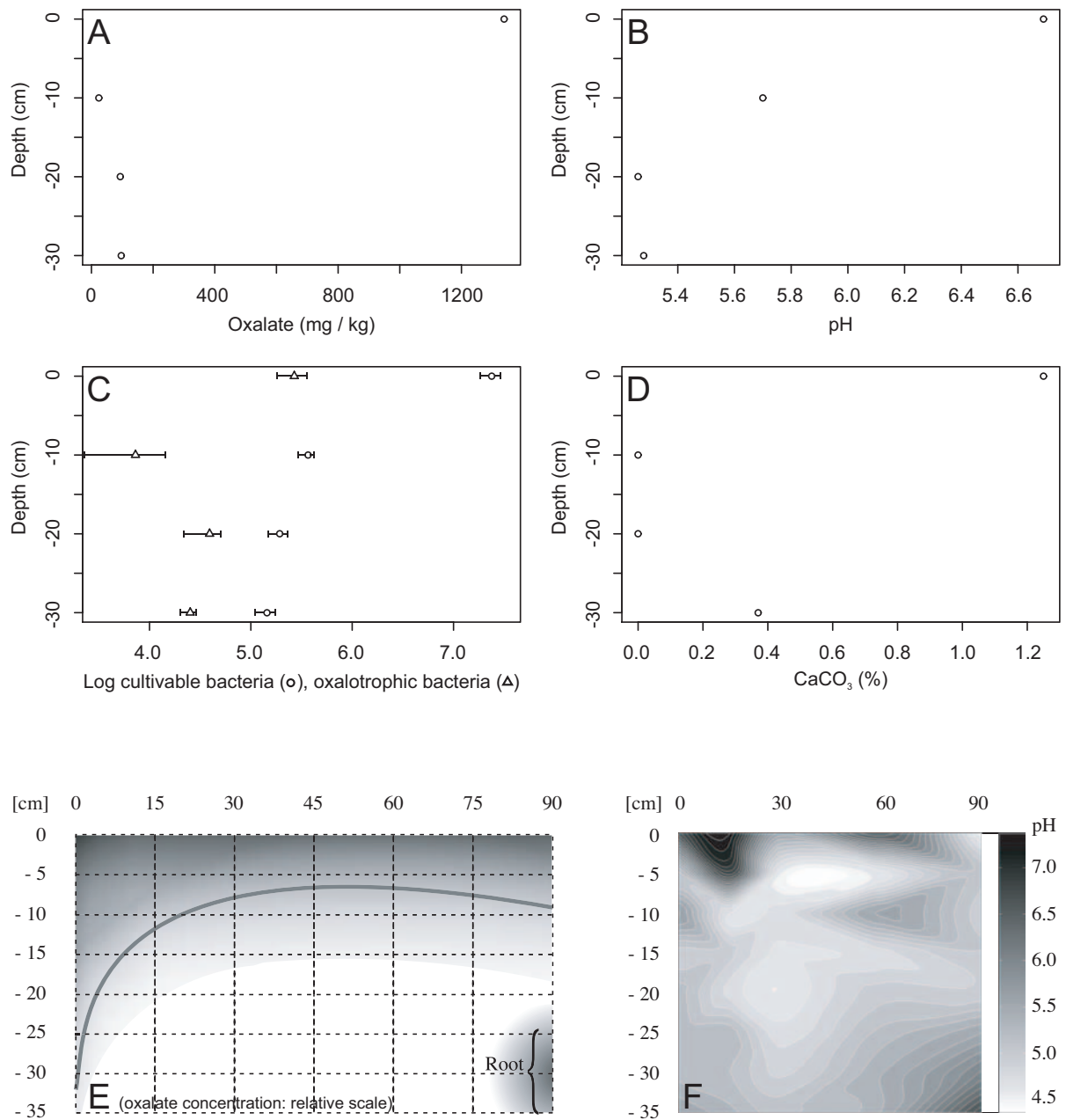


Figure 38: A,B,C,D: Concentration en oxalate, nombre de bactéries cultivables et oxalotrophes, pH et concentration en carbonate sur le site espagnol (profil de Tabernas). E,F: Essais de cartographie de la concentration d'oxalate (E) et du pH (F). En abscisse: la distance en centimètres depuis la base de l'*Opuntia* étudié; en ordonnée, la profondeur. Notez les valeurs élevées à la base de l'*opuntia*, en surface et proche des racines. Cette cartographie a été réalisée par interpolation bicubique des données de terrain à l'aide du logiciel Matlab A,B,C,D: Oxalate concentration, number of cultivable and oxalotrophic bacteria, pH and carbonate concentrations in Spain (Tabernas profile). E,F: Attempt to map the oxalate concentration and the pH around an *opuntia*. Note the higher value at the base of *opuntia*, in the surface samples and near the roots. This map has been done by bicubic interpolation of our data using Matlab

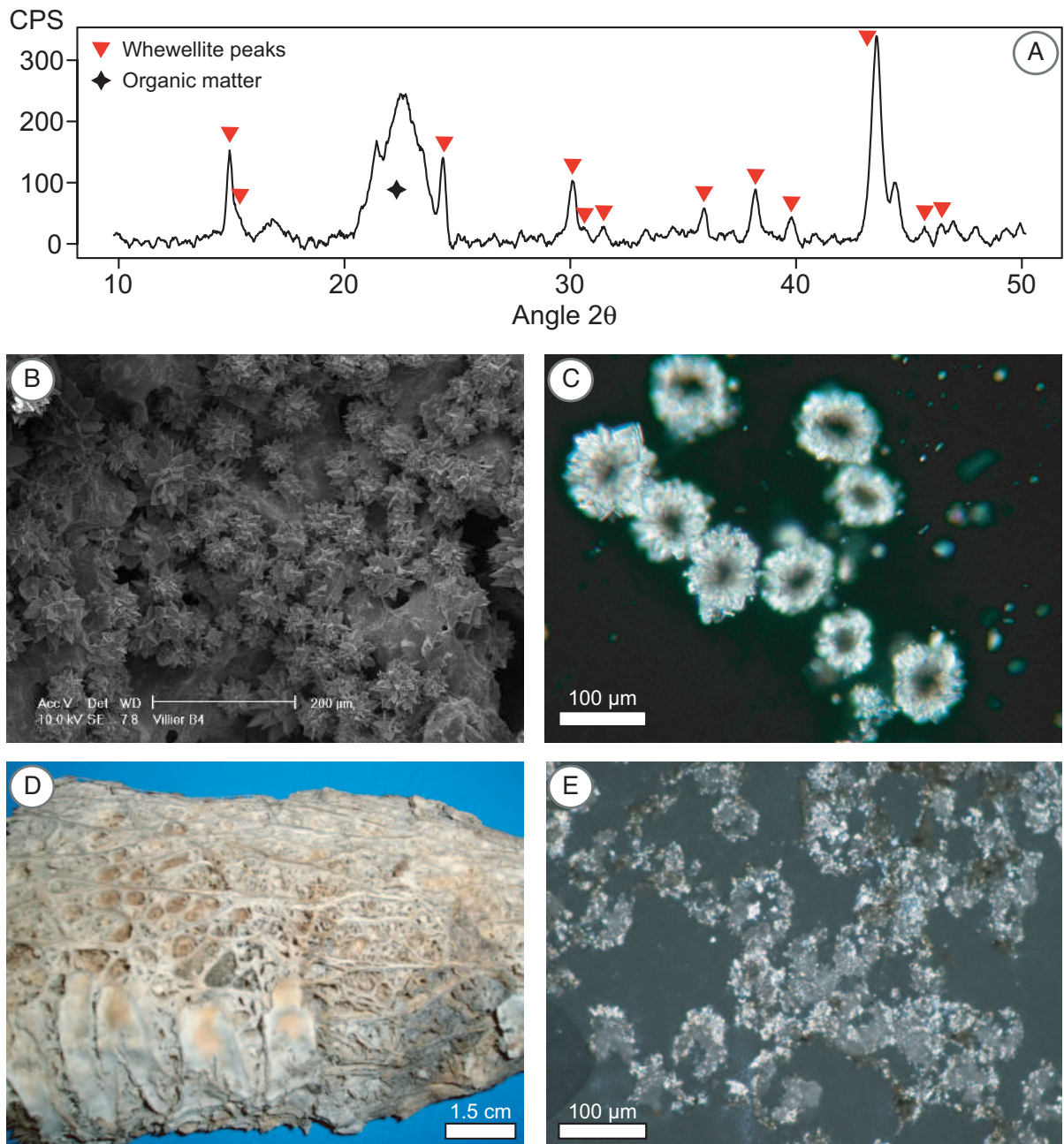


Figure 39: A: Diffractogrammes des rayons X d'un échantillon d'Opuntia montrant la présence de whewellite. B,C,D: Cristaux d'oxalates associés aux Opuntia. B,C: Cristaux de whewellite en druse observés au microscope électronique (B) et au microscope optique (C). D: Photographie montrant une couche blanche formée de cristaux d'oxalate sur une raquette d'Opuntia en décomposition. E: Cristaux de carbonate de calcium associé à de la matière organique d'Opuntia en décomposition. A: *X-ray diffractogram of an opuntia sample showing the presence of whewellite.* B,C,D: *Oxalate crystals associated with opuntiae.* B,C: *Whewellite crystals with a druse shape observed in electron (B) and light (C) microscopy.* D: *Picture of an opuntia rafter showing a white crust composed of calcium oxalate.* E: *Calcium carbonate crystals associated with decayed opuntia organic matter.*

organique plus résistante à la décomposition (Figure 39). La présence de carbonate de calcium est révélée par effervescence lorsque de l'HCl est déposé à la surface du sol ou d'une tige d'Opuntia en décomposition. En revanche, ces carbonates sont difficilement observables au microscope (optique ou électronique). On les trouve le plus souvent sous forme de petits cristaux microspartiques associés à de la matière organique en décomposition (Figure 39).

Observation dans une vigne

Profils de Bevaix

Dans le premier profil situé sous la "jeune" plantation de vigne, la concentration en oxalate augmente de 17 mg / kg à la surface du profil à 106 mg / kg en profondeur au niveau des racines fines. Le contenu en carbonate de calcium diminue quant à lui de 17 % à 0 % avec la profondeur, alors que dans le même temps le pH augmente de 7.4 à 8.3. Dans le second profil, situé dans les plantations "âgées", la concentration en oxalate varie entre 17 mg / kg et 9 mg / kg sans tendance visible. La concentration en carbonate de calcium augmente quant à elle avec la profondeur, passant de 16 % à 25 %. Finalement le pH suit la concentration en carbonate et montre une augmentation de 7.5 à 8.6. Dans les deux profils, le nombre de bactéries cultivables décroît de 10^7 bactéries par gramme de sol à la surface à 10^5 bactéries par gramme de sol dans les échantillons prélevés en profondeur. On observe la même diminution chez les bactéries oxalotrophes (Figure 41). Celles-ci voient leur nombre décroître de 10^6 à 10^4 bactéries par gramme de sol. Aucune identification n'a été effectuée sur ce profil; néanmoins de nombreuses colonies d'actinobactéries ont été observées lors des comptages.

Cristaux associés aux plants de vigne

Seul le carbonate de calcium a été recherché lors de l'étude autour des plants de vigne. Dans ce cas, il se trouve sous forme de concrétions se trouvant autour des racines fines (Figure 40). C'est le seul type de carbonate que nous avons pu associer ici à une activité biologique. Les autres carbonates présents sont des carbonates hérités de la moraine.

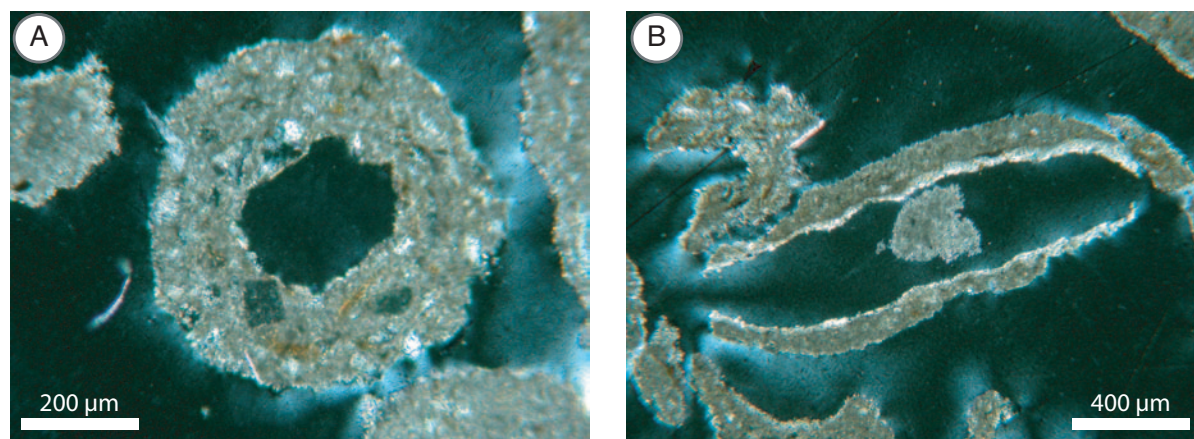


Figure 40: Observation au microscope optique des cristaux de carbonate de calcium associés aux plants de vigne. A: Coupe transversale d'un manchon de carbonate de calcium formé autour d'une racine fine. B: Coupe longitudinale d'un manchon de carbonate de calcium formé autour d'une racine fine. *Crystals of calcium carbonate associated with grape plant. A: Transverse section of a carbonated sheath encrusting a fine root. B: Longitudinal section of a carbonated sheath encrusting a fine root.*

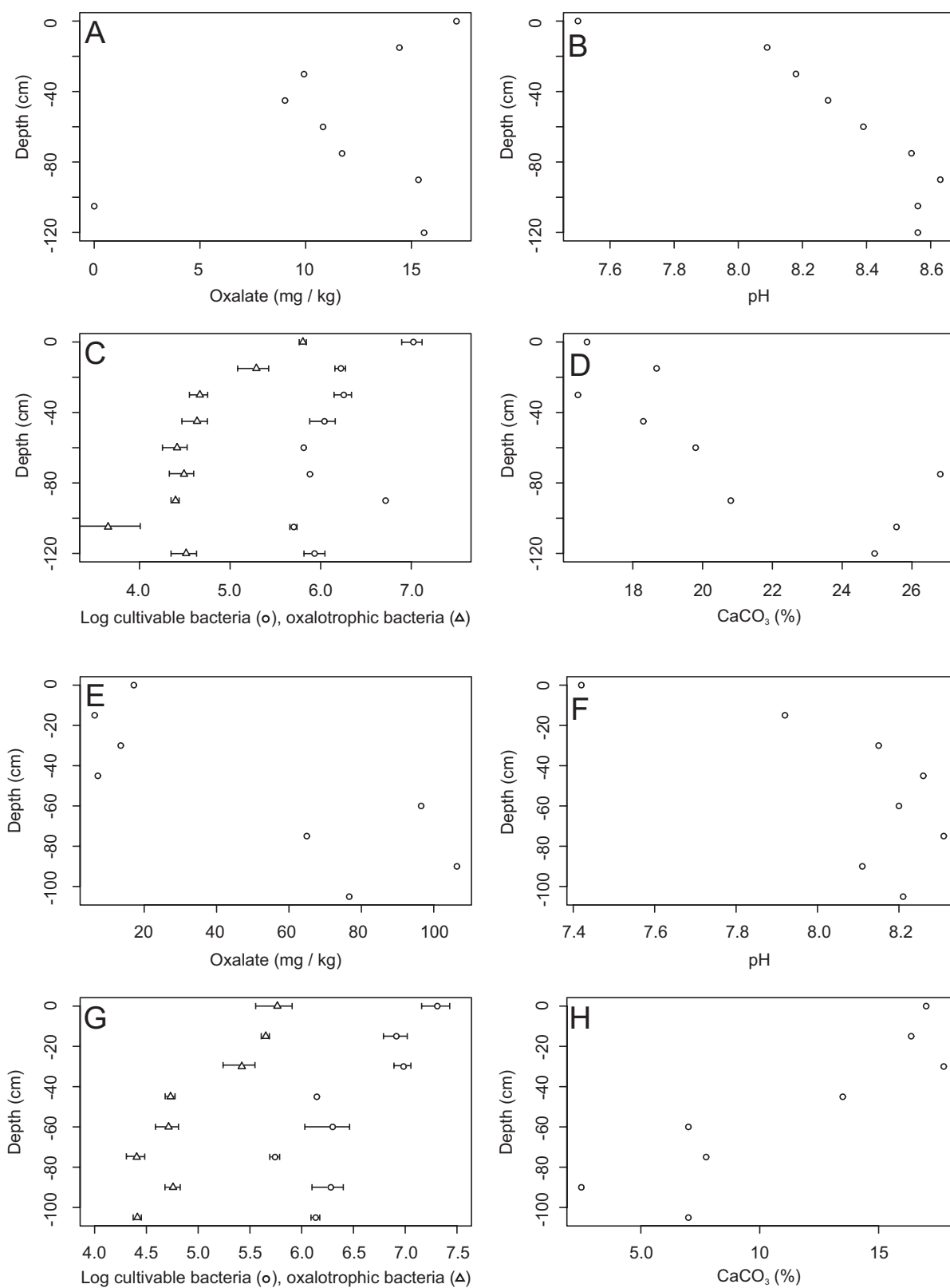


Figure 41: Concentration en oxalate, nombre de bactéries cultivables et oxalotrophes, pH et concentration en carbonate sur les sites suisses. A,B,C,D: "profil dans une vigne âgée". E,F,G,H: "profil dans une vigne jeune". Oxalate concentration, number of cultivable and oxalotrophic bacteria, pH and carbonate concentration at the Swiss sites. A,B,C,D: "old grape plant profile". E,F,G,H: "young grape plant profile".

Expérience de biominéralisation

Les cultures (n = 20) réalisées sur extrait de sol, et extrait de sol synthétique ont toutes mené à la dissolution de l'oxalate de calcium, et à la précipitation concomitante de carbonate de calcium. Les halos de dissolution de l'oxalate de calcium apparaissent après une semaine environ alors que les premiers cristaux de carbonate de calcium n'apparaissent qu'après 3 à 4 semaines. Les cristaux produits sont des agrégats micritiques sphéroïdaux ou en bâtonnets, similaires en tous points à ceux décrits dans le chapitre précédent. Ces agrégats peuvent être coalescents et former des blocs centimétriques. Les cristaux produits sont les mêmes pour toutes les souches testées. Néanmoins, il faut signaler que les halos de dissolution autour des colonies d'actinobactéries se forment plus vite et sont de plus grande taille que ceux formés par les autres bactéries. Ceci montre qu'il est raisonnable d'attribuer la formation de carbonate de calcium aux bactéries isolées du sol.

Discussion

Les résultats présentés ici montrent des variations importantes dans les paramètres étudiés (concentration d'oxalate, concentration de carbonate de calcium et pH). La variabilité de ces paramètres est discutée ici en tenant compte de l'influence des producteurs (les plantes et les mycètes) et des consommateurs d'oxalates (les bactéries).

Réservoirs / "Pools" d'oxalate dans les sols

La quantité d'oxalate dans les sols semble dépendre essentiellement de l'oxalate libéré par les plantes sous forme d'exudat racinaire ou dans la litière. Toutefois l'acide oxalique en solution ne représente probablement qu'une très faible fraction de l'oxalate total. Cette fraction comprise entre 1 % et 10 % s'explique facilement par la faible solubilité des oxalates de calcium. De grandes concentrations d'oxalate sont visibles sous les cactus dont le contenu en oxalate de calcium peut représenter entre 10 % et 85 % du poids sec (Robert et Roland 1980, Garvie 2003). A l'inverse, des concentrations plus faibles sont mesurables sous les irokos ainsi que sous la vigne qui contiennent respectivement 2,2 g / kg et 6.0 μ mole / kg (Ishida et al. 2004, Li et al. 2003). De plus, les sols des vignes étudiés sont régulièrement débarrassés de leur litière (afin de limiter les contaminations par *Botrytis cinerea*) et contiennent jusqu'à 300 ppm de cuivre. Ces deux facteurs contribuent probablement au maintien d'une faible concentration d'oxalate sur la partie supérieure des deux profils de Bevaix, en supprimant les oxalates d'origine végétale et fongique contenus dans la litière, et en diminuant l'activité fongique (McHargue et Calfee 1931). Finalement, les cristaux d'oxalate de calcium sont courants aux extrémités de racines ce qui peut expliquer l'augmentation des oxalates au-dessous de 50 centimètres de profondeur. Dans ce contexte, la contribution des champignons à la concentration d'oxalate dans les sols est difficile à estimer. De nombreuses études ont montré que les champignons produisaient de l'acide oxalique (Cochrane 1958, Gadd 2000); néanmoins aucune quantification n'a été réalisée dans un sol. Dans le cas des Opuntiae et des irokos, on peut toutefois estimer que la contribution des champignons est faible, en comparaison à celles des plantes comme l'ont montré Casarin et al. (2003). En ce qui concerne la vigne, l'entretien de celle-ci fait que l'influence des champignons est limitée. On peut toutefois se demander s'il en serait de même dans un système non anthropisé.

Dégradation bactérienne des oxalates

Dans tous les profils de sols étudiés, les comptages de bactéries indiquent que l'oxalate est probablement dégradé dans la partie supérieure des sols, de 0 cm à 30 cm de profondeur. C'est, en effet, à ces profondeurs que l'on observe le maximum de bactéries oxalotrophes. Il faut toutefois garder à l'esprit que ces comptages ne montrent que la présence de bactéries et non leur activité ; pour être parfaitement rigoureux, on devrait dire ici que le potentiel de dégradation de l'oxalate est maximal de 0 cm à 30 cm de profondeur. Ces observations sont en accord avec celles d'études précédentes dans lesquelles la dégradation de l'oxalate a été mesurée à l'aide d'acide oxalique marqué au ^{14}C

(van Hees et al. 2002, Jones 1998). Une dégradation rapide et importante des oxalates est aussi suggérée par la différence très marquée de la concentration d'oxalate entre l'échantillon de surface et les autres échantillons du profil de Tabernas. Ici, on observe la dégradation de 95 % de l'oxalate entre 0 cm et 10 cm de profondeur. En revanche au-delà de 10 cm, la concentration d'oxalate reste stable. Leur nombre élevé, ainsi que leur efficacité à dégrader l'oxalate de calcium, suggèrent que les actinobactéries, et en particulier le genre *Streptomyces*, assurent probablement la majeure partie de la dégradation des oxalates contenus dans les sols. Dans tous les profils, on observe une proportion plus ou moins constante de bactéries oxalotrophes qui représentent environ 10 % des bactéries cultivables quelle que soit la profondeur. Ceci suggère qu'il n'y a aucun enrichissement pour la fonction oxalotrophe en particulier. Ceci n'est pas surprenant dans la mesure où les bactéries oxalotrophes connues sont très versatiles quant à leurs potentialités métaboliques. Des proportions similaires d'actinobactéries et de bactéries appartenant à la famille des Oxalobacteriaceae ont été observées dans d'autres sols et dans des croûtes biologiques (Nagy et al. 2004, Fierer et al 2003). Bien que ces études n'aient pas porté sur le caractère oxalotrophe des bactéries, de nombreuses bactéries oxalotrophes appartiennent à ces deux grands groupes (Sahin 2003, 2004). Tous ces éléments suggèrent que l'acide oxalique et l'oxalate de calcium sont probablement des sources de carbone importantes dans les sols pour les actinobactéries et en particulier pour les streptomycètes. L'omniprésence des streptomycètes ne doit pas pour autant éclipser la présence et le rôle des protéobactéries isolées des cultures d'enrichissement. Dans ce travail, les bactéries ont été isolées à partir d'échantillons de sol par étalement direct et après culture d'enrichissement. L'utilisation de ces deux techniques complémentaires, l'une favorisant le dénombrement d'actinobactéries et l'autre favorisant le développement des protéobactéries, donne une image assez globale de ce à quoi peut ressembler une communauté oxalotrophe (Figure 42, Tables 10 et 11). Dans ce contexte, on peut rattacher les Protéobactéries à la rhizosphère de l'iroko. En effet, les genres de protéobactéries isolés ici sont fréquemment observés dans la rhizosphère de différentes plantes. (Roesti 2005, Hamelin 2003, Gaskins et al. 1984).

Augmentation du pH et précipitation de carbonate de calcium

Dans les sols ne contenant pas de carbonate hérité (i.e. Mankaré, Machatoum, et Tabernas), on observe une décroissance de la concentration de carbonate avec la profondeur. Cette décroissance va de pair avec la décroissance de la concentration d'oxalate. L'absence de carbonate hérité dans ces sols permet d'attribuer à la transformation oxalate-carbonate l'ensemble du carbonate de calcium présent sur ces sites. Les bactéries réalisent la quasi-totalité de cette oxydation. Néanmoins lors d'incendies (d'origine naturelle ou anthropique), des formes atypiques du carbonate de calcium peuvent se former par transformation thermique des oxalates de calcium en carbonate de calcium (Cailleau et al. 2005, Canti 2003, 2002). Ce processus n'affecte toutefois que les premiers centimètres de sol et les cristaux de carbonate de calcium qui en résultent sont des pseudomorphoses de cristaux d'oxalates de calcium originaux. Ces cristaux se trouvent essentiellement dans des débris de charbons et les cendres. La comparaison de la morphologie des cristaux de carbonate de calcium trouvés dans les sols avec ceux produits lors de l'expérience de biominéralisation et avec la littérature (Cailleau et al. 2005, Cailleau 2005) donne de nombreux arguments en faveur d'une origine biologiquement induite, au sens de Mann (2001), de ces carbonates. Sur les sites de Machatoum et de Tabernas où il y a peu de carbonate dans les sols (≤ 1 %), le pH plus élevé est aussi un indicateur pertinent de la dégradation bactérienne de l'oxalate. En Suisse, les deux profils sous vignes étudiés contenaient beaucoup de carbonate hérité. Dans ce type d'environnement, seules des formations carbonatées spécifiques telles que les encroûtements de racines, peuvent être associées directement à une activité biologique. L'absorption de l'eau par les racines est connue pour produire ce genre de carbonatation. La transformation des oxalates en carbonate peut être invoquée dans ce cas car la vigne sécrète beaucoup d'acide oxalique au niveau de ses racines, et de même renferme de nombreux cristaux d'oxalates dans la partie apicale de celles-ci (Ishida et al. 2004, Li et al. 2003). Dans ce cas, il faut toutefois relativiser l'importance de la transformation oxalate-carbonate. En effet, le sol contenant beaucoup de carbonates hérités, une partie de ceux-ci peut être dissoute et reprécipitée autour des racines lors de l'absorption de l'eau. La transformation dans ce cas peut favoriser la cristallisation des carbonates en augmentant le pH et en libérant le calcium initialement lié aux oxalates. De plus amples connaissances des biomarqueurs et de la signature isotopique des carbonates seront

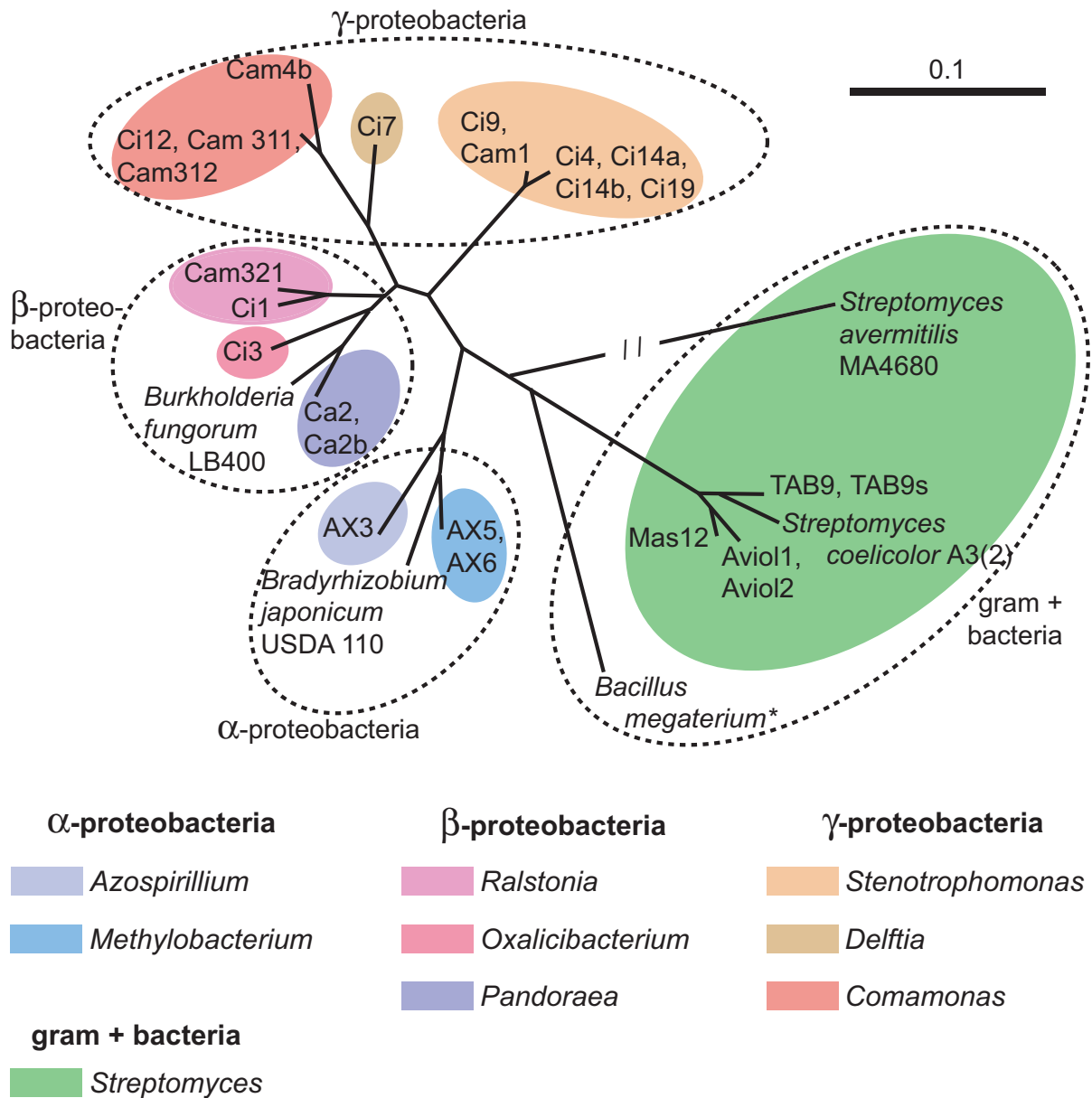


Figure 42: Estimation des relations phylogéniques existant entre les bactéries oxalotrophes isolées au cours de cette étude. Les séquences de bactéries oxalotrophes dont le génome a été séquencé ont été ajoutées (nom indiqué en entier sur fond blanc); de même la séquence de *Bacillus megaterium* qui a servi de contrôle positif dans toutes les manipulations de biologie moléculaire a été ajoutée aussi. Cette estimation se fonde sur les séquences ADN obtenues. L'alignement des différentes séquences a été fait avec le logiciel "Clustal X" et l'arbre a été dessiné avec le logiciel "Unrooted". Le détail de l'identification des échantillons et des souches de référence figure dans les tables 9 et 10. *Estimate of the phylogenetic relationships between the oxalotrophic bacteria isolated during this work. Sequences of oxalotrophic bacteria having their genomes completely sequenced have been added (Full names indicated). Moreover, B. megaterium sequence which was used as a control was also added. Sequences alignment and the phylogenetic tree were produced using Clustal X and Unrooted software respectively. Details about the samples and the references strains used here can be found in tables 9 and 10.*

Table 10: Liste des souches isolées au cours de ce travail et identifiées par séquençage du 16SrRNA. Les références aux échantillons correspondent aux indications de la figure 42. Le "genre attribué" correspond au genre dans lequel ont été classés les isolats. L'identité de l'espèce et/ou du clone environnemental le plus proche est indiqué, accompagné du numéro de la séquence correspondante sur le site du NCBI entre parenthèse. Finalement l'homologie entre la séquence de l'échantillon et la souche la plus proche est indiqué dans la dernière colonne. La nomenclature utilisée est celle utilisée par le NCBI. *List of the strains isolated and identified by 16SrDNA sequencing. The references to the samples are corresponding to those used in the figure 42. The name of the closest relative strain and/or environmental clone is indicated with the NCBI sequence accession number between brackets. The homology between the closest relatives and the strain isolated and is indicated in the last column. Bacterial names are used according to the NCBI taxonomy.*

Echantillons	Genre attribué	eEspèce ou clone le plus proche	Homologie
α - protéobactéries			
AX3	<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum</i> sp. TS18 (AB114196)	0.932
AX5	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium aminovorans</i> CCM 4612T	0.949
AX6	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium aminovorans</i> CCM 4612T	0.962
β - protéobactéries			
Ca2	<i>Pandoraea</i>	<i>Pandoraea</i> sp. G5084 (AF247693)	0.991
Ca2b	<i>Pandoraea</i>	<i>Pandoraea</i> sp. G5084 (AF247693)	0.988
Ci1	<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia</i> sp. 1265a (AB121226)	0.917
Cam321	<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia</i> sp. SKJH-4 (AY749435)	0.874
Ci3	<i>Oxalicibacterium</i>	<i>Oxalicibacterium flavum</i> (T) TA17, NEU98	0.880
γ - protéobactéries			
Cam1	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> alfa-2	0.976
Ci9	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> c20 (AJ293469)	1.000
Ci4	<i>Stenotrophomonas</i>	γ - protéobactérie non cultivée ou <i>Stenotrophomonas</i> sp. S3 (AJ002814)	1.000 0.988
Ci14a	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> c20 (AJ293469)	1.000
Ci14b	<i>Stenotrophomonas</i>	γ - protéobactérie non cultivée FTL204 ou <i>Stenotrophomonas</i> sp. S3 (AJ002814)	1.000 0.988
Ci19	<i>Stenotrophomonas</i>	γ - protéobactérie non cultivée FTL204 ou <i>Stenotrophomonas</i> sp. e-a23 (AJ293472)	0.978 0.962
Ci7	<i>Delftia</i>	<i>Delftia acidovorans</i> MC1 (AF149849)	0.959
Cam311	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas testosteroni</i> (T) (M11224)	0.959
Cam312	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas testosteroni</i> (T) (M11224)	0.988
Cam4b	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas</i> non cultivé KL27-1-15	0.725
Ci12	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas testosteroni</i> (T) (M11224) ou <i>Pseudomonas straminea</i> NGJ1 (AB127967)	1.000 1.000
bactéries gram \oplus			
Mas12	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i> sp. Y70014 (AY623722)	0.987
Tab9	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i> sp. C7655 (Y10843)	0.934
Tab9s	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i> sp. C7655 (Y10843)	0.941
Viol1	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces tuius</i> ATT509 (AY758195)	0.988
Viol2	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces tuius</i> ICSSB 1017 (AF503493)	0.946

Table 11: Liste des souches utilisées comme références pour construire l'arbre phylogénétique de la figure 42. Le nom des bactéries est accompagné du numéro NCBI de la séquence du gène codant pour l'ARN 16S. *: *Bacillus megaterium* n'est pas oxalotrophe, mais a été utilisé comme contrôle lors de toutes les manipulation de biologie moléculaire. *List of the strains used as references to construct the phylogenetic tree from figure 42. The bacterial name is noted with the NCBI sequence accession number of the 16S RNA gene. *: Bacillus megaterium is not oxalotrophic but was used as control in every molecular biology experiment.*

Nom	Groupe	n° séquence NCBI
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	gram \oplus	3134054
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	gram \oplus	29826540
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	α - protéobactéries	BA000040
<i>Burkholderia fungorum</i> LB400	β - protéobactéries	BA000040
<i>Bacillus megaterium</i> * NEU16	gram \oplus	

nécessaires pour discriminer plus précisément quelle part des carbonates de ce profil sont d'origine biologique. Dans ce contexte, l'absence de corrélation observée dans le "jeune" profil, peut être interprétée comme un argument de plus en faveur d'une transformation importante des oxalates en carbonate. Ce manque de corrélation entre les carbonates et le pH (généralement bien corrélés) a déjà été observé dans un contexte similaire lié à la transformation oxalate-carbonate par Cailleau et al. (2005). Finalement, il faut noter que les profils de vignes étudiés sont travaillés par labourage jusqu'à une profondeur de 50 cm environ. Les strates au dessous de celles travaillées où l'on trouve encore beaucoup de racines de vignes, sont donc plus représentatives d'une évolution à long terme. En dessous de 50 cm, la différence entre le contenu en carbonate de calcium du jeune profil (5%) et celui du profil âgé (21%-27%) peut être attribuée à des processus liés à la présence de la vigne et en particulier de ses racines. Le cycle oxalate-carbonate fait partie des processus qui pourraient être invoqués pour expliquer cette différence de contenu en carbonate de calcium.

Evolution vers un système carbonaté

L'ensemble des points développés ci-dessus permet de se faire une idée de la mise en place d'un système d'enrichissement en carbonate autour d'une plante. Un premier pool d'oxalate se forme dans les plantes qui produisent de l'acide oxalique. Cet acide oxalique va ensuite réagir avec le calcium pour former de la whewellite ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Un second pool d'oxalate est produit par les champignons saprophytes. Ceux-ci produisent de l'acide oxalique qui va réagir avec le calcium contenu dans la lamelle moyenne des cellules végétales, affaiblissant celles-ci, et formant ainsi de la weddellite ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). L'action des champignons ne s'arrête pas là, puisque ceux-ci contribuent aussi à libérer les cristaux d'oxalates contenus dans les tissus ligneux. Ces deux pools d'oxalate sont consommés au fur et à mesure de leur production par les bactéries oxalotrophes. Il résulte de cette consommation une augmentation du pH. Une fois que celui-ci atteint 8.4 environ (pH de stabilité des carbonates à température ambiante et pression atmosphérique), les carbonates précipitent sous forme de calcite ou de calcite faiblement magnésienne. Quand assez de carbonates ont précipité, le système peut se maintenir de lui-même, par dissolution et reprécipitation des carbonates. La concentration de carbonate continue quant à elle d'augmenter tant que la plante et les champignons alimentent le système en oxalate de calcium (Figure 43). Les carbonates que l'on trouve dans les plantes peuvent avoir quant à eux deux origines. La première est physico-chimique; quand la plante pompe de l'eau du sol, elle pompe aussi le calcium et les ions carbonates dissous. Une fois dans les vaisseaux des plantes, le carbonate de calcium peut précipiter, même à partir d'une solution sous-saturée, grâce à des phénomènes de capillarité (Wollast 1971). La seconde est liée aux blessures des plantes. Les blessures permettent probablement aux bactéries d'entrer dans les tissus d'une plante. Aidées de champignons saprophytes qui libèrent l'accès à l'oxalate de calcium, elles vont produire du carbonate de calcium directement à l'intérieur de la plante. Cela rejoint les observations de Harris (1935) et de Campbell et Fisher (1933) qui ont noté que les blocs de carbonate de calcium trouvés à l'intérieur des irokos se trouvaient le plus souvent associés à d'anciennes blessures. Les blocs formés à l'intérieur des plantes peuvent ensuite être incorporés aux sols lors de la dégradation de celles-ci (Figure 43).

Autour d'un iroko dont l'âge a été évalué à 200 ans, Cailleau et al. (2004) ont estimé qu'il pouvait y avoir jusqu'à 10 tonnes de carbonate de calcium. En considérant les taux de dégradation de l'oxalate indiqués dans la littérature (van Hees et al. 2002, Smith et Oremland 1983), on s'aperçoit que dans la zone vadose, le cycle oxalate-carbonate peut à lui seul assurer la précipitation de l'ensemble du carbonate. En effet, pour obtenir 10 tonnes de carbonate de calcium dans un volume de 18.9 m^3 (la surface du cylindre utilisée par Cailleau et al. (2005) dans leur estimation, multipliée par 30 cm de profond, la zone de dégradation maximale de l'oxalate) il faudrait avoir un taux de dégradation de l'oxalate de $0.036 \mu\text{mole}$ d'oxalate de calcium par gramme de sol et par jour (en considérant une densité de sol de 2185 kg/m^3). L'utilisation d'oxalate marqué au ^{14}C a montré que dans des sols sous forêt on pouvait obtenir des taux de dégradation variant entre $0.0024 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ et $0.912 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ (van Hees et al 2002). Le cycle oxalate-carbonate peut donc permettre à lui seul l'installation de systèmes carbonatés. Un des éléments pouvant influencer la mise en place de ces systèmes par ce processus est le pool de calcium présent. En l'absence de calcium, les ions des espèces carbonatées peuvent rester en solution et être dispersés.

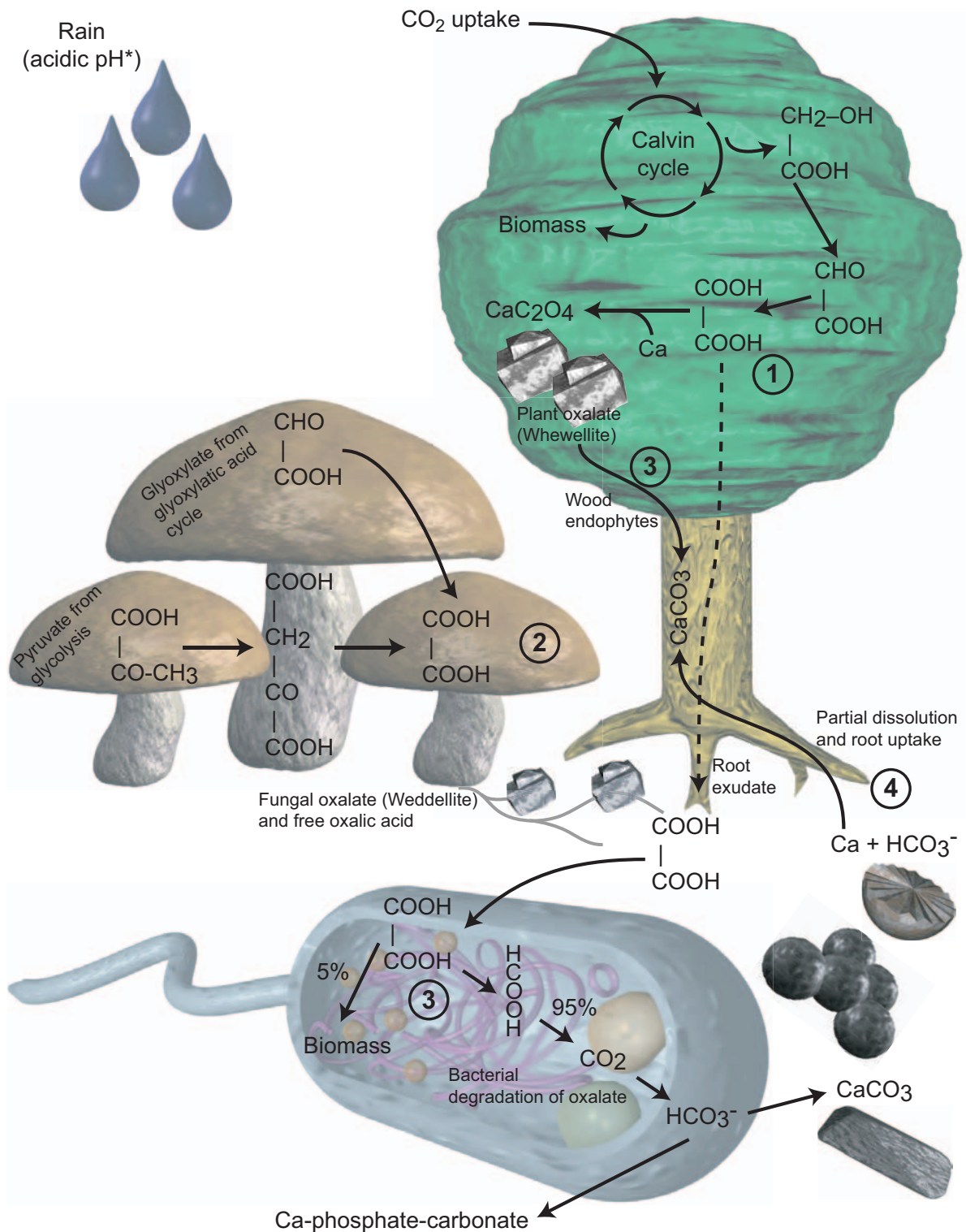


Figure 43: Modèle simplifié du cycle oxalate-carbonate autour des plantes étudiées: 1: Les plantes produisent un premier pool d'oxalate en utilisant le carbone fixé pendant la photosynthèse. 2: Les champignons saprophytes produisent un second pool d'oxalate lors de la dégradation des plantes. De plus leur action favorise la libération des cristaux d'oxalate enchâssés dans les tissus végétaux. 3: Les bactéries oxalotrophes consomment l'oxalate et produisent du CO_2 . Cette consommation mène à la précipitation de carbonate de calcium autour des plantes. 4: Une partie de ce carbonate de calcium peut passer en solution et être pompée par la plante; une fois dans les vaisseaux de la plante, il peut reprécipiter grâce à des phénomènes de capillarité. Ce processus mène probablement à l'accumulation de carbonate de calcium dans certaines plantes.

Figure 43: *Simplified sketch showing the oxalate-carbonate cycle involving the studied plants: 1: A first pool of oxalate is produced by plants using the carbon fixed during the photosynthesis. 2: Fungi produce a second pool of oxalate during the degradation of woody plant tissues. Moreover their action helps to release calcium oxalate crystals encased in plant tissues. 3: Oxalotrophic bacteria consume oxalic acid and calcium oxalate leading to CO₂ production. Such oxalate consumption and CO₂ production release lead to a pH increase and to calcium carbonate precipitation. 4: A part of the calcium carbonate produced may be dissolved. Once in solution carbonate ions may be pumped by the plant during water absorption. These anions reprecipitate in the tree even from an undersaturated solution because of strong capillary action. This process probably leads to secondary calcium carbonate deposition inside the tree through vessels.*

Conclusion

Dans les sols où il n'y a pas de carbonate hérité, les interactions entre les producteurs d'oxalates, les pools d'oxalates, et les bactéries oxalotrophes menant à l'augmentation de pH et à la précipitation de carbonates secondaires sont claires. De plus, les connaissances des compositions isotopiques (C et O) ainsi que de la morphologie des carbonates produits lors d'incendies permettent de ne pas faire d'erreur d'interprétation des résultats. Dans les sols contenant des carbonates hérités, il faudra à l'avenir développer des méthodes capables de discriminer les carbonates hérités des carbonates secondaires. Ce point est particulièrement important car les oxalates et les carbonates représentent d'importants réservoirs de carbone organique et minéral dans les sols. La compréhension des relations entre ces réservoirs sera d'une importance capitale pour estimer le puits de carbone qu'ils représentent potentiellement.

Résumé - Summary

- Les pools d'oxalates dans les sols sont très variables (3 - 1300 mg / kg) et semblent dépendre des plantes étudiées. *Oxalate pools in soils seem highly variable (3 - 1300 mg / kg) and seem to be linked to the studied plant.*
- Des bactéries ont été observées dans tous les systèmes étudiés. Elles représentaient environ 10 % des bactéries cultivables. Les bactéries oxalotrophes étaient majoritairement représentées par des actinobactéries et en moindre proportion par des protéobactéries. *Oxalotrophic bacteria have been found in every systems studied. These bacteria represent ≥ 10 % of the cultivable bacteria. Oxalotrophic bacteria were mostly represented by actinobacteria with a smaller fraction of proteobacteria.*
- Le pH et les quantités de carbonate observés dans les sols ne contenant pas de carbonates hérités sont souvent atypiques et sont facilement attribuables au cycle oxalate-carbonate. Une estimation fondée sur la littérature montre que les quantités de carbonate de calcium trouvées sont compatibles avec les taux de dégradation de l'oxalate observés par d'autres auteurs. *In soils that contain no inherited carbonate, pH and calcium carbonate concentrations observed are often atypical and can be easily attributed to the oxalate-carbonate cycle. Estimations based on the litterature shows that calcium carbonate concentrations observed are compatible with oxalate degradation rates measured by other authors.*

Chapitre 5: Influence des structures bactériennes sur le carbonate de calcium produit

Les chapitres précédents ont mis en évidence la formation de plusieurs morphologies et minéralogies du carbonate de calcium précipité par les bactéries oxalotrophes en laboratoire, comme en milieu naturel. Ce chapitre va dans un premier temps essayer de donner un inventaire des morphologies et des minéralogies produites en culture. Dans un second temps, il va s'attacher à examiner le rôle des exopolysaccharides et des acides aminés dans la cristallisation du carbonate de calcium. L'influence de ceux-ci avait en effet été suggérée au chapitre 3.

Introduction

La biominéralisation est un phénomène courant dans le monde bactérien (Ehrlich 1996, 1998, Ferris 1989). Les bactéries, de par leur métabolisme et la nature de leur paroi, interagissent avec la cristallisation du carbonate de calcium (Bosak et al. 2004, Dove et al. 2003). Il résulte de ces interactions de nombreuses morphologies et minéralogies. Parmi les minéralogies obtenues en laboratoire, la calcite et l'aragonite sont les plus courantes. La calcite est souvent liée à l'utilisation de milieux dopés simulant un environnement continental (tuf, travertin, sol, lac et rivière - Boquet et al. 1973, Monger et al. 1991, Pentecost et Terry 1988, Merz et Zankl 1993), alors que l'aragonite est associée à des milieux simulant un environnement marin (milieu intertidal, lagune et mer ouverte - Krumbein 1979, Castanier et al. 1989). Les résultats de ces expériences de laboratoire décrivent souvent la calcite et l'aragonite sous forme de sphérules, d'haltères ou de bâtonnets. L'aragonite apparaît aussi sous forme d'aiguilles ou de fagots. Des minéralogies métastables et hydratées du carbonate de calcium peuvent aussi être formées en laboratoire. La vatérite a été décrite dans cette thèse dans le chapitre 3 ainsi que dans Braissant et Verrecchia (2002). De même la production de monohydrocalcite a été obtenue lors de cultures de *Halomonas eurihalina* (Rivadeneira et al. 1998, 2004). La dolomite a elle aussi été produite en laboratoire récemment (Vasconcelos et al. 1995, Reid et al. 2000). Finalement aucune production bactérienne d'ikaïte en laboratoire n'a été relevée dans la littérature à ce jour. Les différences de morphologies et de minéralogies du carbonate de calcium sont donc un vaste sujet d'étude. Ce chapitre se limitera à dresser un inventaire des cristaux produits par les souches oxalotrophes, et à tenter d'expliquer certaines différences morphologiques et minéralogiques.

Méthode

De manière à réaliser un inventaire morphologique des cristaux de carbonate de calcium que les bactéries oxalotrophes peuvent produire, les souches oxalotrophes isolées des systèmes étudiés (voir chapitre 4) ont été mises en culture sur milieu B4 (pour rappel, ce milieu contient de l'acétate de calcium, mais pas d'oxalate - il est utilisé car il permet d'obtenir des grandes quantités de cristaux comme cela a été décrit par Boquet et al. 1973). Ces souches appartenaient aux genres: *Stenotrophomonas*,

Comamonas, *Ralstonia*, *Pandoraea*, *Azospirillum*, *Oxalicibacterium*, *Delftia*, *Streptomyces*. Une souche utilisée pour réaliser ces cultures reste non identifiée à ce jour. Les cristaux formés sur les colonies ont ensuite été prélevés à l'aide de brucelles et observés au microscope électronique à balayage.

Afin de mettre en évidence le rôle des exopolysaccharides et des polymères pariétaux dans la formation des différentes morphologies de vaterite et de calcite observées au chapitre 3, une expérience abiotique a été réalisée. La réaction du carbonate d'ammonium avec le chlorure de calcium (équ. 22 - 23) en milieu fermé a été utilisée pour faire cristalliser du carbonate de calcium dans un exopolysaccharide commercial: le xanthane (Figure 44). La synthèse de carbonate de calcium a été réalisée dans une solution de CaCl_2 0.05 M à laquelle a été ajoutée une quantité croissante de xanthane (0 %, 0.1 %, 0.5 %, 1 %) et 1 % d'acides aminés (L-aspartate, L-glutamate, L-glutamine). Les acides aminés utilisés ont été choisis car ils sont courants dans les parois bactériennes. En effet, on trouve du polyglutamate chez *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Sporosarcina halophila*, de même on trouve de la polyglutamine dans les genres *Xanthobacter* et *Flexithrix* (Kandler et al. 1982). Finalement le polyaspartate est associé au genre *Synechococcus*. Les cristaux produits ont été récupérés soit par centrifugation, soit à l'aide de brucelles. Dans certains cas, ils ont été lavés avec une solution d'hypochlorite de calcium saturée de manière à éliminer la matière organique restant autour du cristal sans risquer de dissolution. Les cristaux produits de manière abiotique ont été comparés avec des cristaux produits par *Xanthobacter autotrophicus* et *Ralstonia eutropha*. Tous les cristaux ont ensuite été observés au microscope électronique à balayage. Dans certains cas, les colonies ont été observées *in situ*, après préparation.

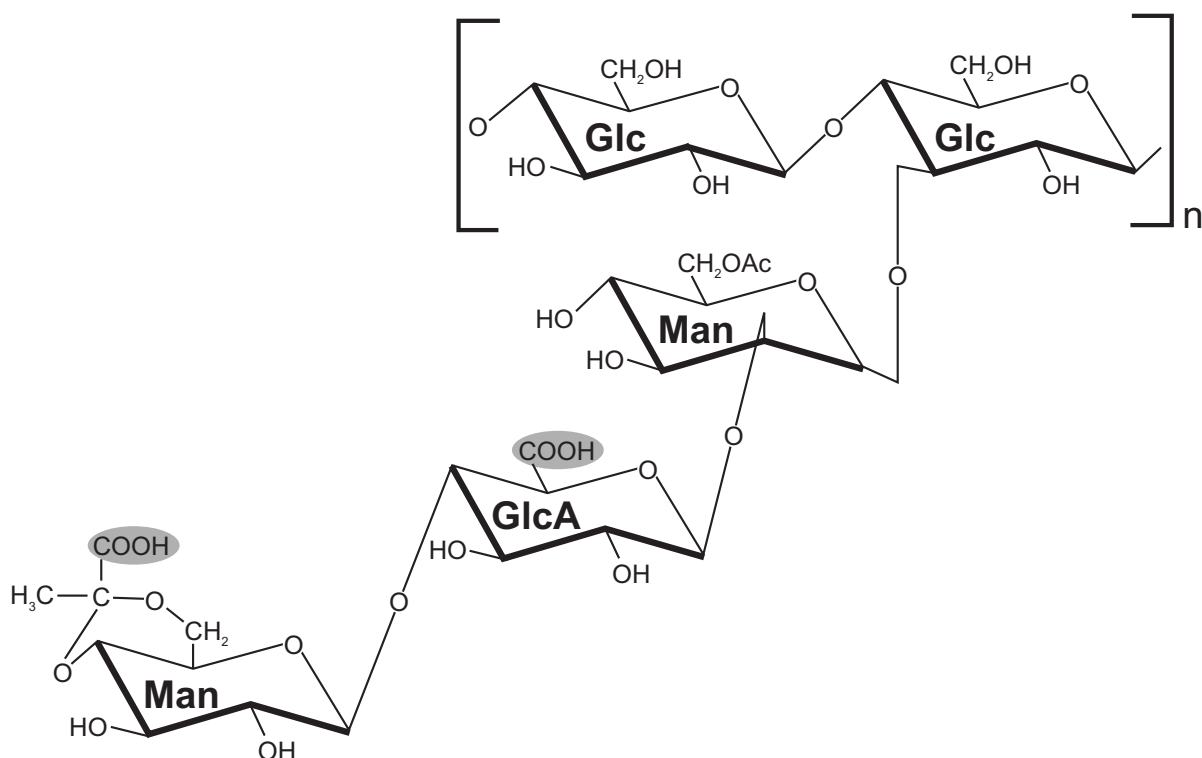


Figure 44: Monomère de xanthane. Les zones grisées indiquent les groupes carboxyles susceptibles de réagir avec des cations. *Xanthan monomer. Grey areas indicate carboxylic acid able to interact with cations.*

Finalement l'affinité du xanthane pour les différents cations a été mesurée en utilisant deux méthodes différentes. La première consistait à dialyser 1 mL d'une solution de xanthane 1.0 % contre 10 mL d'une solution de cations 5 ppm préparée à partir d'un sel de carbonate ou d'hydroxyde, et à mesurer les concentrations de cations après une journée (18 heures) par chromatographie ionique.

De même, la même expérience a été répétée avec une solution contenant plusieurs cations (Ca^{2+} 5 ppm, Mg^{2+} 5 ppm, et Sr^{2+} 5 ppm - sous forme de CaCO_3 , $\text{Mg}(\text{OH})_2$ et SrCO_3). La seconde expérience consistait quant à elle à mettre en contact une solution de xanthane 1.0 % et une solution saturée de carbonate de calcium à l'intérieur d'une cellule de mesure à deux compartiments séparés par une membrane de filtration (Figure 45). Ce dispositif permet de suivre les échanges entre la solution cationique et la solution de xanthane. Pour suivre ces échanges, on a enregistré l'évolution du pH et les concentrations en calcium, sodium, et potassium à l'aide d'une électrode pH et d'électrodes spécifiques aux différents cations couplées à un enregistreur de données (Squirrel, Eltek, Cambridge, Angleterre). Les électrodes spécifiques ont été calibrées dans des solutions standards de concentrations connues (0.3, 1.0, 3.0, 10.0 et 30 ppm). De même l'électrode pH a été calibrée en utilisant 3 tampons de pH connus (pH 4.0, pH 7.0 et pH 9.0). L'utilisation de ces deux méthodes avait pour but de déterminer un ordre d'affinité croissante des cations d'intérêt pour le xanthane, et dans un second temps d'estimer la cinétique de liaison du calcium au xanthane.

Résultats

Inventaire morphologique des cristaux produits par des bactéries oxalotrophes isolées

De manière générale, les cristaux produits sur le milieu B4 (sans oxalate) au sein d'un même genre sont très similaires. C'est pourquoi la description des cristaux obtenus lors des cultures va être donnée par genre.

Cristaux produits par les souches de *Streptomyces*

Les cristaux de calcite produits par *Streptomyces* ont des morphologies très variables. Dans l'agar à la limite de la colonie ou à proximité de celle-ci, on trouve des sphères fibroradiées similaires à celles décrites dans les chapitres précédents. Ces sphères ont un diamètre maximal de 200 μm et sont souvent coalescentes. Elles ont parfois une couleur brun clair. On peut noter la présence de cellules et de chaînes de spores montrant une morphologie typique du genre *Streptomyces* à l'intérieur de ce type de cristaux. Au centre de ces sphères, on peut voir un nucleus souvent arrondi, et plus rarement anguleux (Figure 46). Parmi l'ensemble des cristaux, on trouve quelques agrégats micritiques; il est possible que ceux-ci soient des stades précoces des "grandes sphères". Il semble que la précipitation de carbonate de calcium sur les colonies ne se fasse qu'après la précipitation des sphères en bordure de celles-ci. Sur les colonies, on peut noter la présence d'hyphes indurées. A un stade précoce, celles-ci forment des filaments allongés ayant un diamètre de 600 nm pour une longueur maximale de 40 μm (Figure 47), la distinction entre des structures organiques et minérales n'est pas encore très marquée. Sur les hyphes déjà fortement biominéralisées, on peut observer des épitaxies, donnant une morphologie de baguette indentée (Figure 47). Au final, ces hyphes sont entourées de cristaux formant une gaine de 2 à 3 μm autour de la structure originale (Figure 47). Finalement on observe des bâtonnets micritiques répartis aléatoirement sur la colonie. Ces bâtonnets donnent parfois l'impression de s'organiser en fagots.

Cristaux produits par les souches de *Comamonas*

Les cristaux produits par les souches de *Comamonas* sont des cristaux de calcite anguleux mesurant jusqu'à 600 μm . La surface supérieure de ces cristaux (exposée côté air) se présente sous forme d'un polyèdre tronqué, plat ou concave. Il faut noter que ce polyèdre adopte souvent les angles de la calcite (Figure 48). La face inférieure de ces cristaux (exposée côté colonie) est constituée d'un agrégat micritique arrondi. La morphologie de celui-ci peut varier de la sphère à l'étoile (Figure 48). A la limite de la colonie, on trouve des cristaux ayant la morphologie de la "calcite de Framont" (Lacroix 1962 - Figure 48). On trouve de plus rarement des agrégats de cristaux styloïdiques (Figure 48). L'observation en détail de ces cristaux montre que ceux-ci semblent avoir une croissance dendritique (Figure 48).

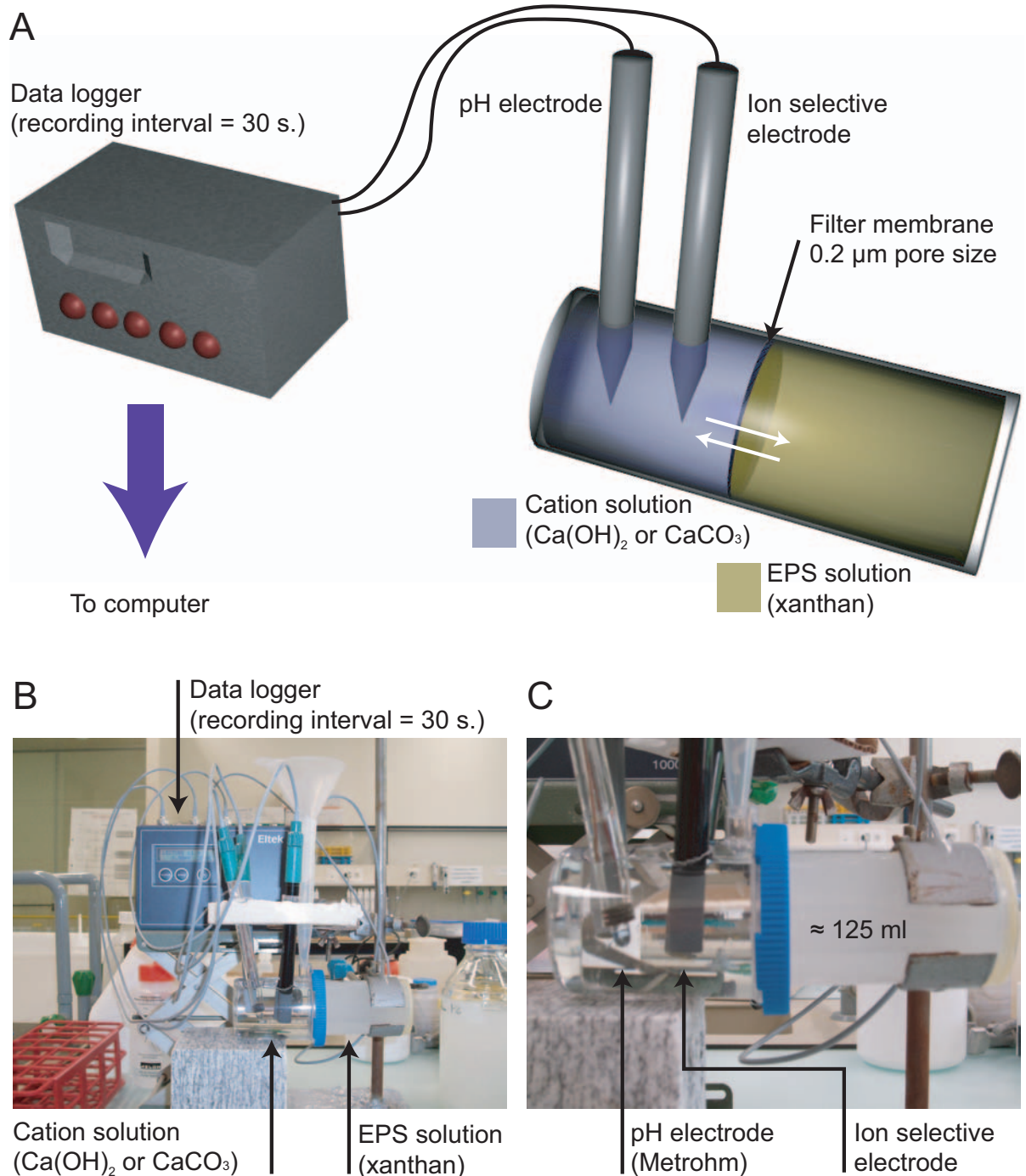


Figure 45: Photo de l'installation utilisée pour estimer l'affinité des cations pour les exopolysaccharides. A: Vue générale montrant l'enregistreur de donnée et la cellule de mesure contenant la solution d'exopolysaccharide et la solution cationique. B: Détail de la cellule de mesure montrant les électrodes cations spécifiques. *The device used to estimate cation affinity for exopolysaccharides. A: The datalogger and the measurement cell containing the cation solution and the exopolysaccharides. B: Close-up of the measurement cell showing the different electrodes.*

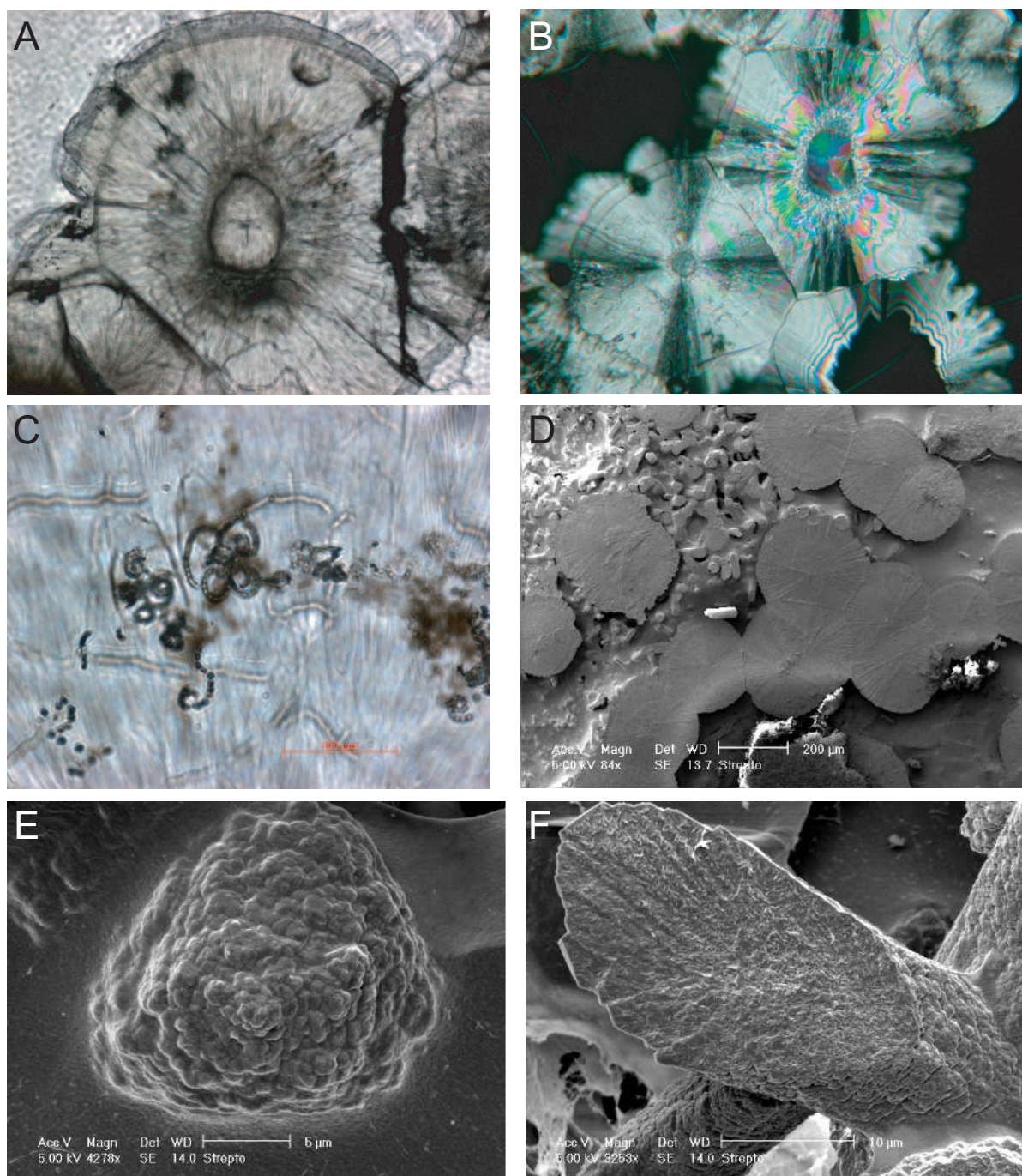


Figure 46: Cristaux produits par les souches de streptomycètes observés en microscopie optique (A,B,C) et électronique (D,E,F). A,B: Sphères fibroradiées montrant un nucléus central. C: Détail montrant une chaîne de spores typiques emprisonnées dans le cristal. D: Sphères fibroradiées et bâtonnets micritiques. E: Agrégats micritiques sphéroïdes. F: Détail d'un bâtonnet micritique. *Crystals produced by streptomycetes strains observed in light (A,B,C) and electronic microscopy (D,E,F). A,B: Fibroradial spheres showing a central nucleus. C: Close-up showing a typical spore chain entombed in the crystal. D: Fibroradial spheres and micritic rods. E: Spheroid micritic aggregate. F: Close-up of a micritic rod.*

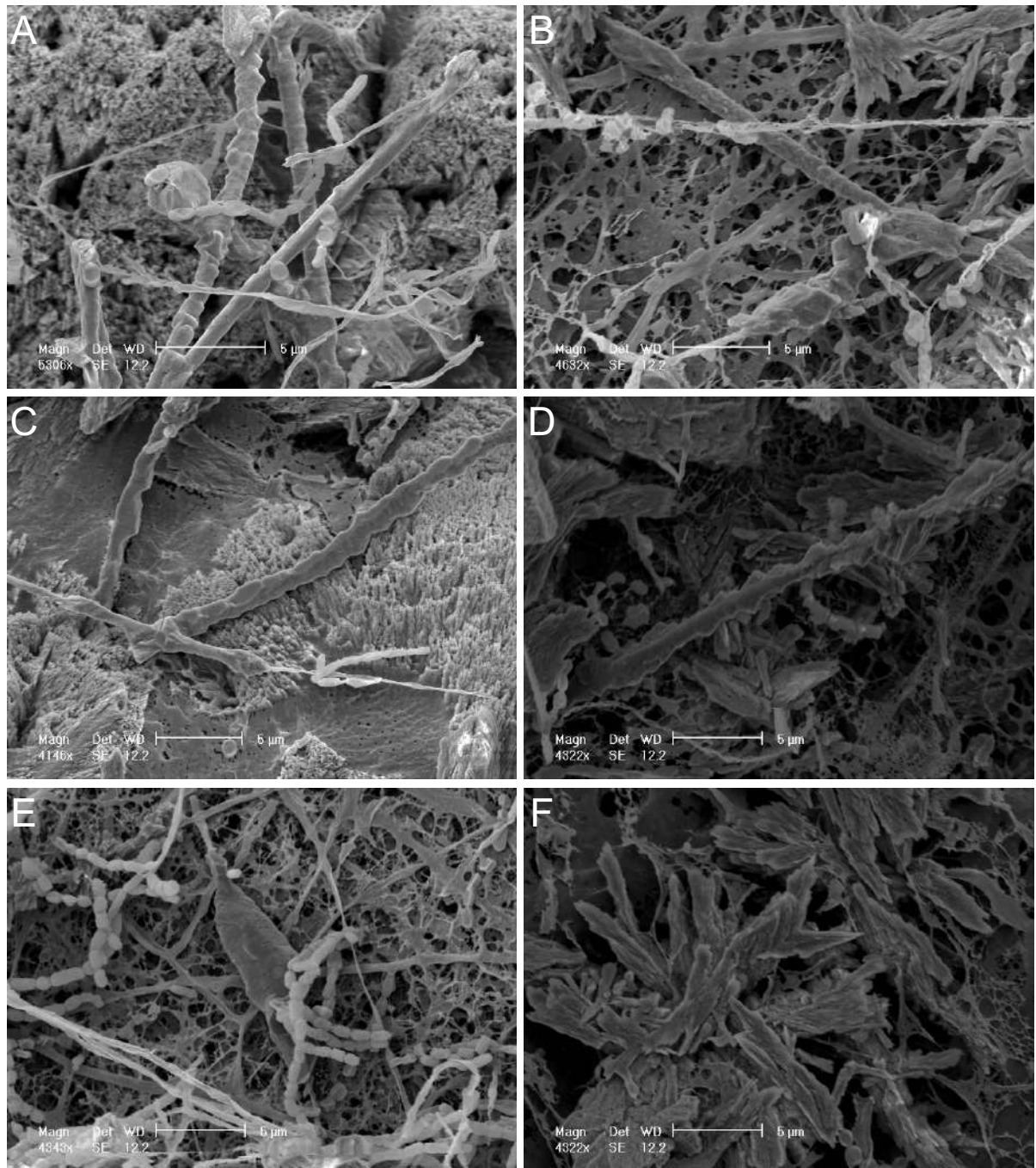


Figure 47: "Hyphes indurées" produites par les souches de streptomycètes observés en microscopie électronique. A,B: Hyphes recouvertes d'un manchon de carbonate de calcium. C,D: Hyphes minéralisées montrant des épitaxies formant des indentations. E: Epitaxies formant un cristal massif embroché sur l'hyphe indurée. F: autres types de cristaux en aiguilles." *Indurated hyphae* produced by the streptomycetes strains. A,B: *Hyphea* covered with a calcium carbonate sheath. C,D: Mineralized *hyphae* showing indentations due to epitaxial growth of calcium carbonate. E: Epitaxy forming a large crystal around a mineralized *hypha*. F: other needle like crystals.

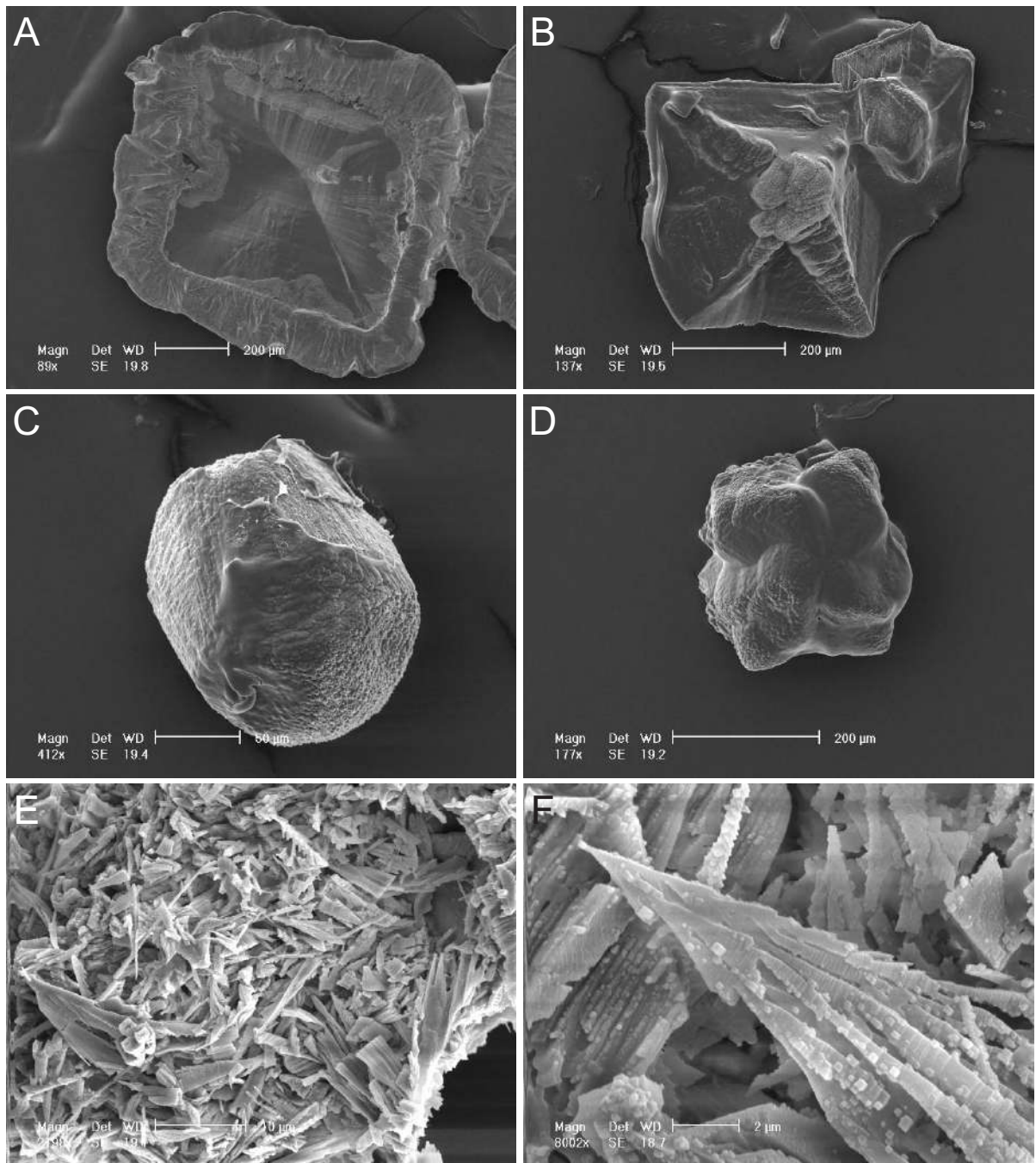


Figure 48: Cristaux produits par les souches de *Comamonas* observés en microscopie électronique. A,B: Cristaux polyédriques montrant les angles typiques de la calcite. A: Face exposée à l'air. B: Face exposée vers la colonie, montrant un agrégat micritique central. C,D: Agrégats micritiques en forme de calcite de Framont (C) et en étoile (D). E,F: Cristaux stiloïdiques. F: Détail d'un cristal stiloïdique montrant sa croissance en dendrite. *Crystals produced by Comamonas strains observed in electronic microscopy. A,B: Polyedric crystals showing typical calcite angles. A: Face exposed to the air. B: Face exposed to the colony, showing micritic aggregate as central nucleus. C,D: Micritic aggregates having a Framont calcite or a star shape. E,F: Stiloidic crystals. F: Close-up of a styloidic crystal showing its dendritic growth.*

Cristaux produits par les souches de *Stenotrophomonas*

Les cristaux produits par *Stenotrophomonas* sont sensiblement identiques à ceux produits par *Comamonas*. Il s'agit de cristaux calcitiques en polyèdres tronqués, plats ou légèrement concaves ayant à leur base un agrégat micritique sphéroïde ou en étoile. Ces cristaux mesurent jusqu'à 600 μm et sont souvent coalescents au point de donner des plaques centimétriques (Figure 49). La formation de telles structures est probablement due à la forte croissance des souches de *Stenotrophomonas* sur le milieu B4. En revanche, contrairement à *Comamonas*, les agrégats de cristaux stiloïdiques n'ont pas été observés.

Cristaux produits par la souche de *Delftia*

La souche de *Delftia* a produit des cristaux en bâtonnets micritiques épais mesurant 20 μm de largeur pour une longueur d'environ 50 μm . Ces cristaux adoptent souvent une morphologie proche de celle de la "calcite de Framont" (Lacroix 1962). Ces cristaux sont coalescents mais ils ne forment que de petits polyèdres aplatis à la surface de la colonie (Figure 50).

Cristaux produits par les souches de *Ralstonia*

Les isolats de *Ralstonia* ont produit des cristaux très similaires à ceux observés dans le chapitre 3. Ces cristaux de calcite anguleux sont comme les précédents des polyèdres tronqués concaves. Comme chez les autres souches, on peut observer sous la base de ces polyèdres des agrégats micritiques sphériques ou en étoiles (Figure 51). Sur certaines des faces de ces cristaux, on observe une inhibition de la croissance du cristal se traduisant par la croissance d'aiguilles à la surface du cristal. Ce type de structure est toujours associé à la présence de bactéries sur la face en question.

Cristaux produits par la souche d'*Oxalicibacterium*

Parmi les cristaux produits par *Oxalicibacterium*, on trouve beaucoup d'agrégats micritiques adoptant la morphologie de la "calcite de Framont" (Lacroix 1962). Ces agrégats se forment à l'intérieur de la colonie; néanmoins si une extrémité de ceux-ci atteint la surface, le cristal s'étale alors en disque (Figure 52). Un autre type de cristaux se forme dans les colonies d'*Oxalicibacterium*. Il s'agit d'agrégats sphéroïdaux de petits polyèdres micritiques (Figure 52).

Cristaux produits par les souches de *Pandoraea*

Les souches de *Pandoraea* isolées ont produit plusieurs types de cristaux. Des sphères mamelonnées rappelant les cristaux de vatérite produits par *Xanthobacter autotrophicus*. Ces sphères formées à l'intérieur de la colonie peuvent s'étaler en disques fibroradiés si elles se forment à la surface de la colonie (Figure 53). Les sphères mesuraient entre 80 et 300 μm de diamètre. Ces souches ont aussi formé des agrégats micritiques plus grossiers d'apparence calcitique. A la surface de la colonie, ces cristaux se développent aussi en disque, néanmoins ceux-ci ne montrent aucune structure fibroradiée (Figure 53). Les deux types de cristaux ont été observés au sein d'une même structure formée par la coalescence de ceux-ci. (Figure 53).

Cristaux produits par la souche d'*Azospirillum*

Cette souche forme principalement des cristaux sphériques mamelonnés d'un diamètre moyen de 100 μm (Figure 54). Ces cristaux rappellent les cristaux de vatérite produits par *Xanthobacter autotrophicus*. L'observation en détail de ces cristaux suggère qu'il s'agit de vatérite. Néanmoins, en l'absence d'analyse par diffraction des rayons X, ce dernier point ne peut être tenu pour sûr. On trouve aussi des agrégats de cristaux sphériques plus petits qui coalescent. Ces deux types de cristaux sont généralement brun clair. Un dernier type de cristaux très rare a été observé. Il s'agit de bâtonnets fins ayant une croissance en dendrites. Le diamètre de ces bâtonnets n'excède pas 1 μm . L'ensemble du cristal forme une masse rose correspondant à la couleur des pigments d'*Azospirillum*.

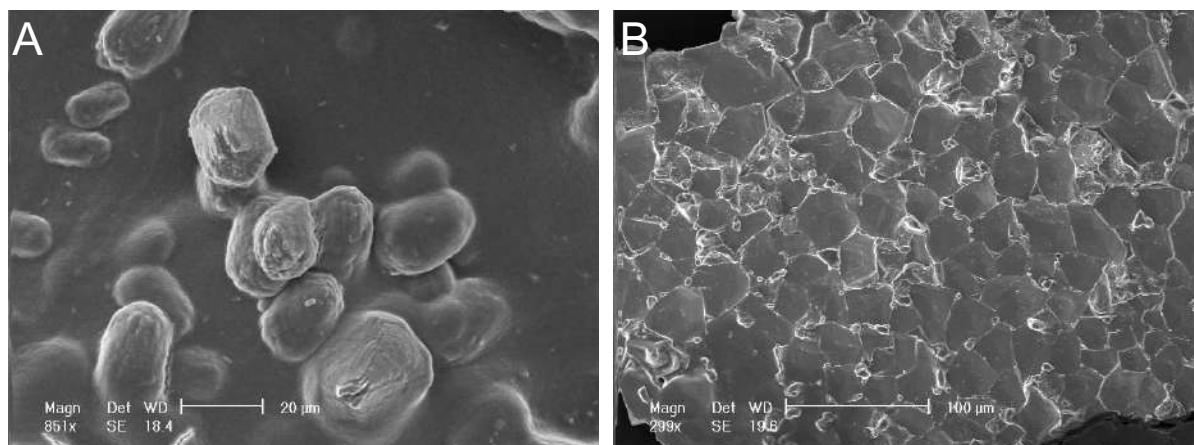


Figure 49: Cristaux produits par les souches de *Stenotrophomonas* observés en microscopie électronique. A: Agrégats micritiques en forme de calcite de Framont. B: Polyèdres coalescents formant des structures centimétriques. *Crystals produced by Stenotrophomonas strains observed in electronic microscopy. A: Micritic aggregates with a Framont calcite shape. B: Large portion of calcium carbonate constituted by coalescent polyedric crystals*

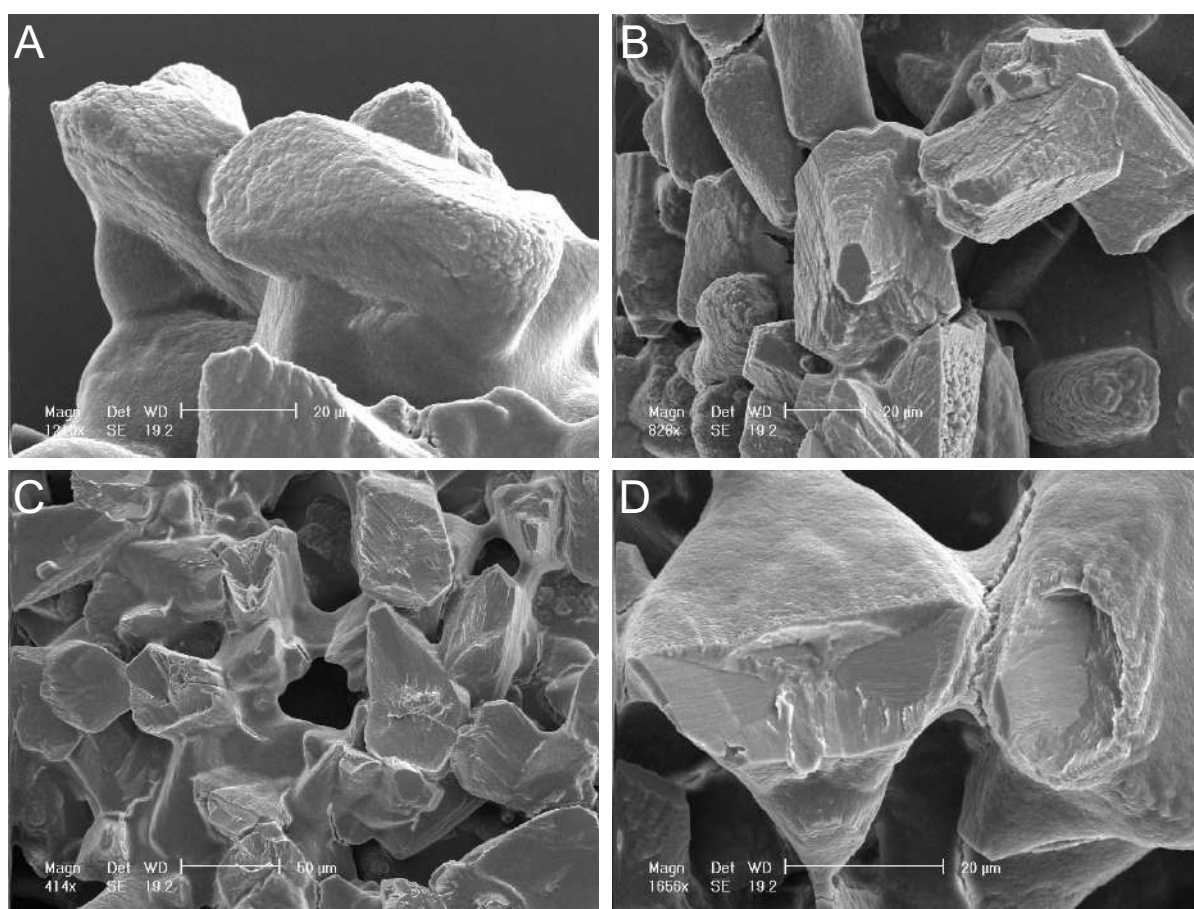


Figure 50: Agrégats micritiques (A,B) et petits polyèdres coalescents (C,D) formés par la souche de *Delftia*. *Micritic aggregates (A,B) and small coalescent polyedra (C,D) formed by the Delftia strain.*

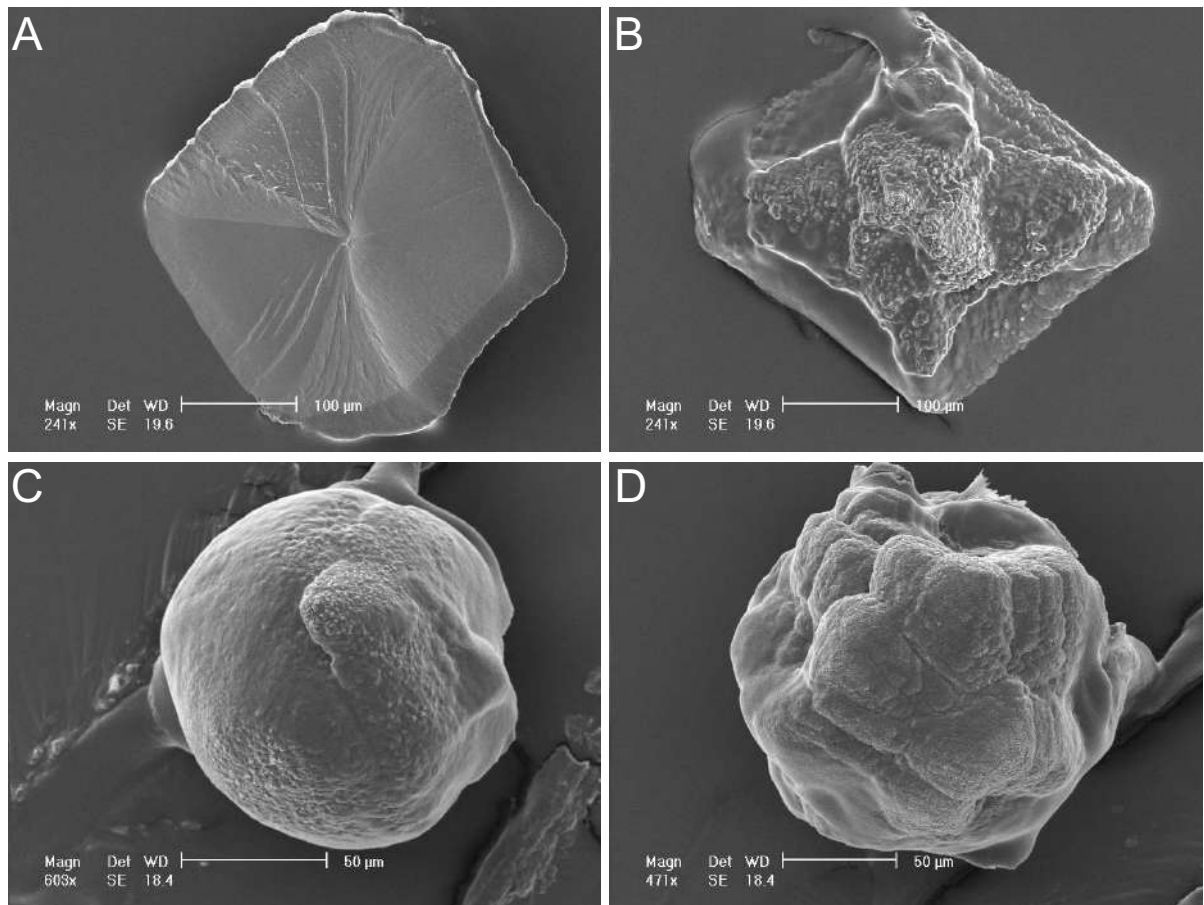


Figure 51: Cristaux produits par les souches de *Ralstonia*. A,B: Vue de la face supérieure (A) et de la face immergée dans la colonie (B) de cristaux polyédriques. Notez l'agrégat micritique au centre de la face inférieure. Agrégats micritiques sphéroïdes (C), et en forme d'étoile (D). *Crystals produced by the Ralstonia strains. A,B: Upper face (A) and colony face (B) of polyedric crystals. Note the micritic aggregate on the colony face of the crystal.*

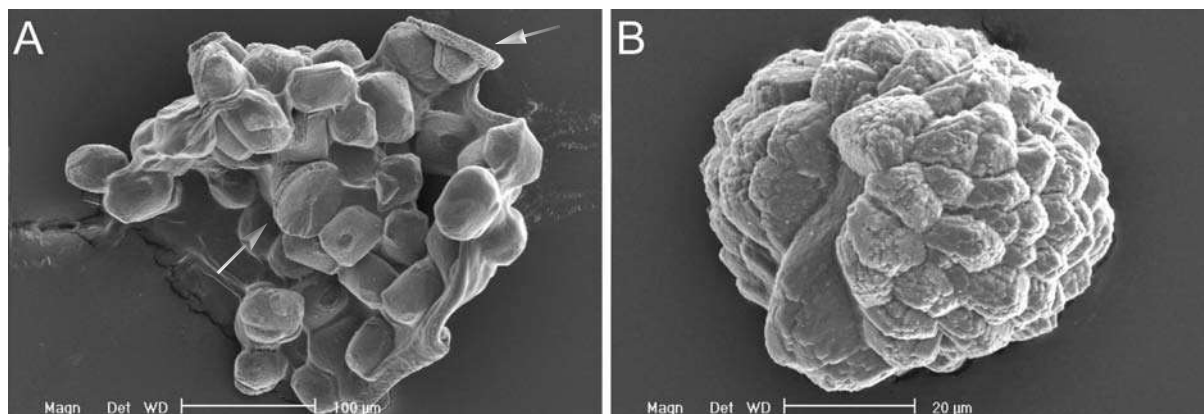


Figure 52: Agrégats micritiques produits par la souche d'*Oxalicibacterium*. A: Notez les deux disques formés à la surface de la colonie (flèches). B: Agrégat micritique en étoile. *Micritic aggregates formed by the Oxalicibacterium strains. A: Note the two discs formed at the colony surface (arrows). B: Star-like micritic aggregate.*

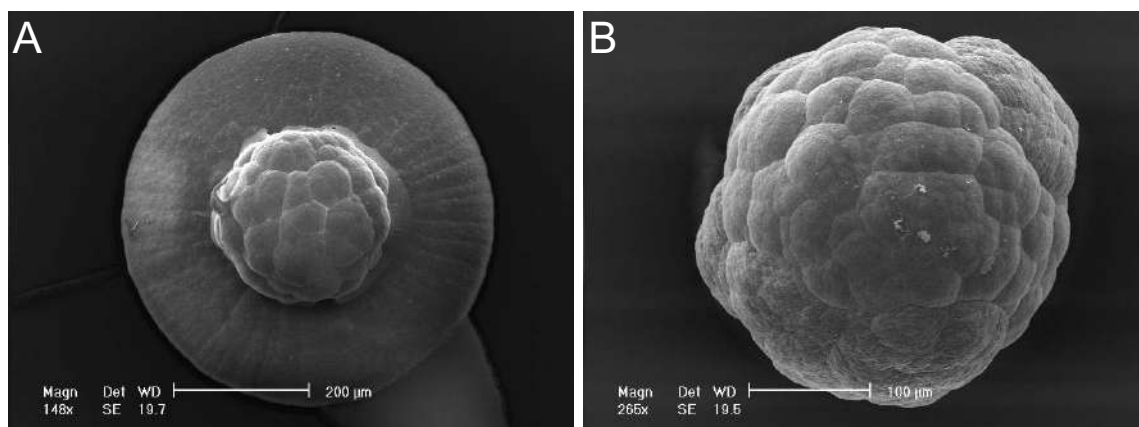


Figure 53: Cristaux produits par les souches de *Pandoraea*. A: Sphérulite probablement vatéritique surmontée d'un disque fibroradié formé à la surface de la colonie. B: Sphérulite formée à l'intérieur d'une colonie. *Crystals produced by Pandoraea strains. A: Spherulite (probably vaterite) covered by a fibroradial disk formed at the surface of the colony. B: Spherulite precipitated inside a colony.*

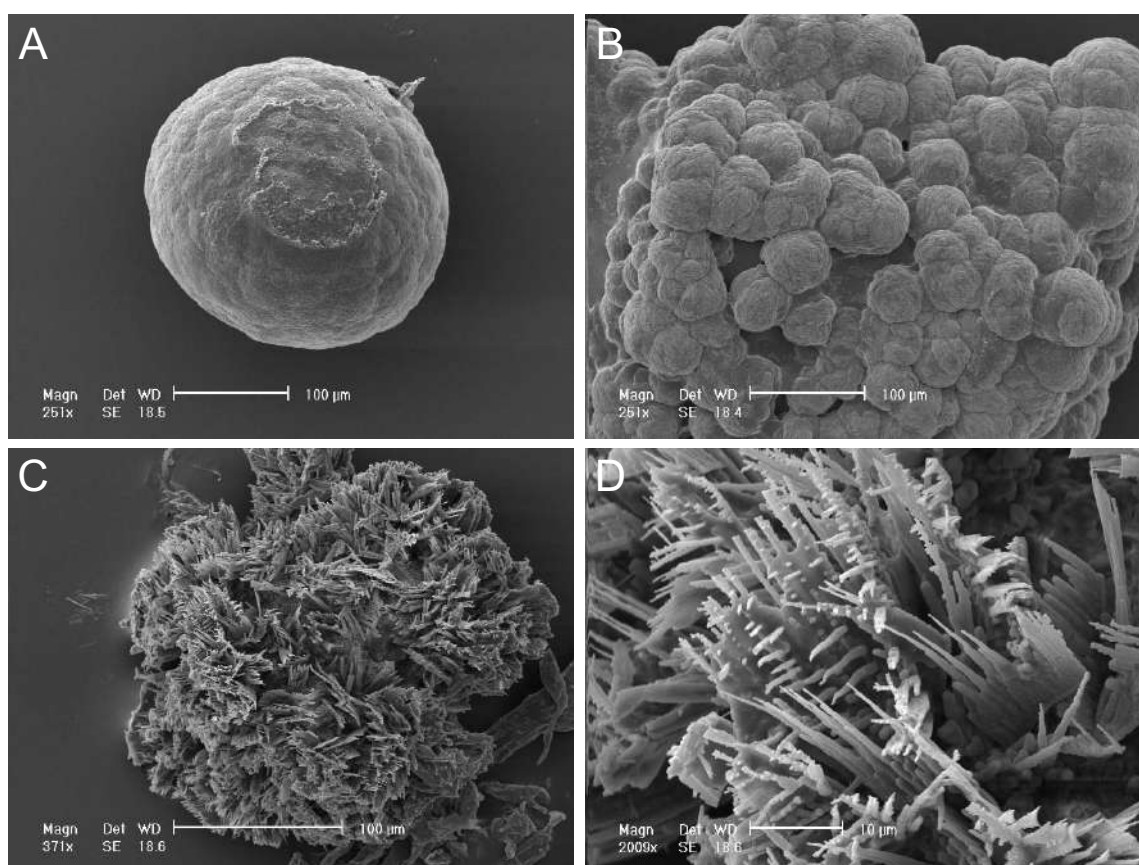


Figure 54: Cristaux produits par les souches d'*Azospirillum*. A,B: Sphérulites, probablement vatéritiques, formées dans une colonie. A: Sphérulite massive. B: Agrégats de petites sphérulites. C,D: Cristaux dendritiques formés en bordure d'une colonie. D: détail d'un cristal dendritique. *Crystals produced by the Azospirillum strains. A,B: Spherulites, probably of vateritic nature, formed inside the colonies. A: Massive spherulite. B: Small spherulite aggregates. C,D: Dendritic crystals formed at the border of the colonies. D: detail of a dendritic crystal.*

Cristaux produits par la souche non identifiée

Cette souche comme beaucoup des souches mises en culture a produit des polyèdres tronqués de nature calcitique. La base de ces polyèdres enfoncée dans les colonies est constituée d'un agrégat micritique. Cet agrégat peut adopter des formes comprises entre la sphère et l'étoile.

Rôle des exopolysaccharides

Cristaux produits en culture par *Ralstonia eutropha* et *Xanthobacter autotrophicus*

Les cristaux produits par *Xanthobacter autotrophicus* sont composés de plusieurs types de sphères ayant un diamètre compris entre 50 μm et 200 μm (Figure 55). Les monocristaux composant ces sphères peuvent être en éventails, en pétales ou en aiguilles (donnant lieu à des sphères fibroradiées - Figure 55). La minéralogie de ces sphères est vatéritique dans la plupart des cas. Néanmoins, il n'est pas possible de faire la différence entre les sphères fibroradiées formées de calcite ou vatérite uniquement sur la base d'observations microscopiques (Dedek 1966). Dans ce cas, l'indication de la nature minéralogique des sphères ne peut être établie que par diffraction des rayons X. Outre les sphères, *Xanthobacter autotrophicus* produit aussi des morphologies accessoires, plus rares (Figure 55). Parmi ces morphologies, on trouve des associations de structures plates, en disques, formées à la surface de la colonie, avec des structures sphéroïdales formées à l'intérieur de la colonie. L'observation au microscope optique et électronique révèle que la nature minéralogique de ces structures est souvent mixte; la vatérite s'associant facilement à la calcite. En effet, en observant la partie centrale de ces morphologies en "oeuf au plat", on peut voir le détail des cristaux de vatérite formant de petits hexagones typiques. La partie extérieure est quant à elle formée de "plaques de calcite". Une autre des morphologies accessoires observées se trouve sous la forme d'agrégats sphéroïdaux formés de cristaux de calcite imbriqués les uns dans les autres. Ces cristaux représentent probablement la fraction de calcite qui n'a pas pu être observée au chapitre 3.

Ralstonia eutropha produit des cristaux polyédriques plats ou légèrement concaves. Ces cristaux de calcite ont une taille maximale de 600 μm . Parfois les cristaux produits par *Ralstonia eutropha* prennent une forme de fleur. On peut noter la présence d'un germe central arrondi. Celui-ci correspond aux agrégats micritiques formés sur la partie inférieure de cristaux similaires décrits dans l'inventaire ci-dessus.

Cristaux produits lors de l'expérience abiotique

La réaction entre la solution de CaCl_2 et le $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ sans addition de xanthane ou d'acide aminé donne lieu à la précipitation de rhomboèdres de calcite. En revanche, l'addition d'acides aminés ou de xanthane mène à un grand nombre de morphologies différentes. L'addition de xanthane à raison de 0.1 % mène à la précipitation de cristaux en dendrites. Ces dendrites peuvent avoir une morphologie ordonnée le long des trois axes de croissance de la calcite ou être désordonnées et similaires à ce que l'on obtiendrait dans un système à diffusion limitée. Néanmoins à cette concentration, les rhomboèdres subautomorphes restent la forme majoritairement précipitée. Lorsqu'une concentration de 0.5 % de xanthane est ajoutée, on obtient majoritairement des formes dendritiques formées d'empilements de rhomboèdres. Ces cristaux représentent environ 90 % des cristaux précipités. Les 10 % restant se partagent entre des rhomboèdres (5 %) et des agrégats de rhomboèdres imbriqués les uns dans les autres formant des structures sphéroïdales (5 %). Quand la concentration de xanthane atteint 1 %, de plus en plus de rhomboèdres entremêlés se forment allant jusqu'à construire des structures subsphériques. Quelque soit la concentration de xanthane ajoutée, la minéralogie est toujours calcitique (Figure 56). L'ajout d'acides aminés complique beaucoup ce tableau. En effet, un grand nombre de morphologies différentes apparaît. De plus, deux minéralogies sont produites, de la calcite et de la vatérite. Néanmoins l'observation de chaque minéralogie en fonction de l'acidité relative de l'acide aminé ajouté permet de déduire une séquence morphologique pour chacun des deux polymorphes du carbonate de calcium. En ce qui concerne la calcite, la séquence commence avec les rhomboèdres formés dans un milieu exempt de xanthane mais contenant de la glutamine (Figure 56). L'addition de xanthane et d'acides aminés (glutamate et aspartate) provoque un

”lissage” des angles des rhomboèdres et la formation de nombreux macles s’agglomérant autour d’un point central. Au final, ce sont des sphères calcitiques fibroradiées qui se forment (Figure 56). La séquence de la calcite peut se résumer de la manière suivante: une diminution de la taille, des monocristaux constituant chaque forme du rhomboèdre unique aux nombreux cristaux en aiguilles formant une sphère fibroradiée (Figure 56). En ce qui concerne la séquence de la vatérite, l’habitus sphérulitique est préservé tout au long de celle-ci. Dans un milieu sans xanthane contenant de la glutamine, la vatérite se trouve sous forme de sphérules composées de monocristaux en aiguille. Dans ce milieu, quelques sphérules montrent des monocristaux légèrement plus grossiers, mais toujours très petits (Figure 56). La taille des monocristaux augmente avec l’addition d’acide glutamique et d’acide aspartique. Dans ces milieux, des sphérules constituées par agrégation de cristaux automorphes se forment. Néanmoins en présence de xanthane et d’acides aminés, des sphérulites fibroradiées de vatérite finissent par précipiter (Figure 56). Comme pour les cristaux d’origine biologique, seule la diffraction des rayons X permet de distinguer les sphérulites de calcite des sphérulites de vatérite. Dans ce travail, c’est le recoupement des informations obtenues par diffraction des rayons X, l’observation au microscope électronique à balayage, et les données de la littérature qui ont permis d’établir la minéralogie des cristaux observés.

Pour résumer ces résultats, on peut dire que l’addition de xanthane et d’acides aminés tend à donner des morphologies sphériques. Le xanthane en augmentant la viscosité du milieu force physiquement cette morphologie, comme on peut le voir avec les cristaux de calcite et de vatérite. Les acides aminés, quant à eux, vont interagir chimiquement avec la formation du carbonate de calcium, formant l’un ou l’autre des polymorphes observés, et influençant la croissance, donc la taille des cristaux produits.

Affinité du xanthane pour différents cations

Mesure par dialyse

Le pourcentage de cations absorbés par la solution de xanthane a été calculé en tenant compte de la dilution induite par l’addition de la solution de xanthane de la manière suivante:

$$\% \text{absorbé} = \frac{C_{\text{finale}}}{C_{\text{initiale}} \cdot \frac{V_{\text{initial}}}{V_{\text{final}}}} \quad (100)$$

Pour les cations testés individuellement, les pourcentages d’absorption ont permis d’obtenir l’ordre d’affinité suivant : Mg^{2+} (44.8 % \pm 0.5 %), Sr^{2+} (36.5 % \pm 2.2 %), Ca^{2+} (19.1 % \pm 4.0 %), Na^+ (7.9 % \pm 2.2 %), et K^+ (-11.1 % \pm 3.3 %). Le cas du potassium est particulier. En effet, le xanthane contient du potassium; celui-ci est relargué par le xanthane, quelles que soient les conditions. Pour les cations divalents en compétition, cet ordre se modifie légèrement et l’on obtient : Sr^{2+} (42 %), Mg^{2+} (41 %), et Ca^{2+} (38 %). L’ordre obtenu pour les cations individuellement n’est que peu indicatif. En effet, pour ne pas introduire de cations ou d’anions parasites dans cette expérience, les différents sels sont utilisés seuls. Il en résulte des différences de pH entre les solutions de cations testées. Cette différence affecte directement le comportement du xanthane dont les groupements carboxyles vont être plus ou moins protonés (i.e. sous forme $-\text{COO}^-$ ou $-\text{COOH}$). Ceci affecte donc directement la capacité de liaison d’un cation au xanthane. On peut toutefois estimer que l’affinité du xanthane pour les cations monovalents est plus faible que son affinité pour les cations divalents. En revanche, en compétition, le pH est le même pour tous les cations, ce qui implique que les ordres d’affinités déterminés sont eux, représentatifs, pour le pH testé.

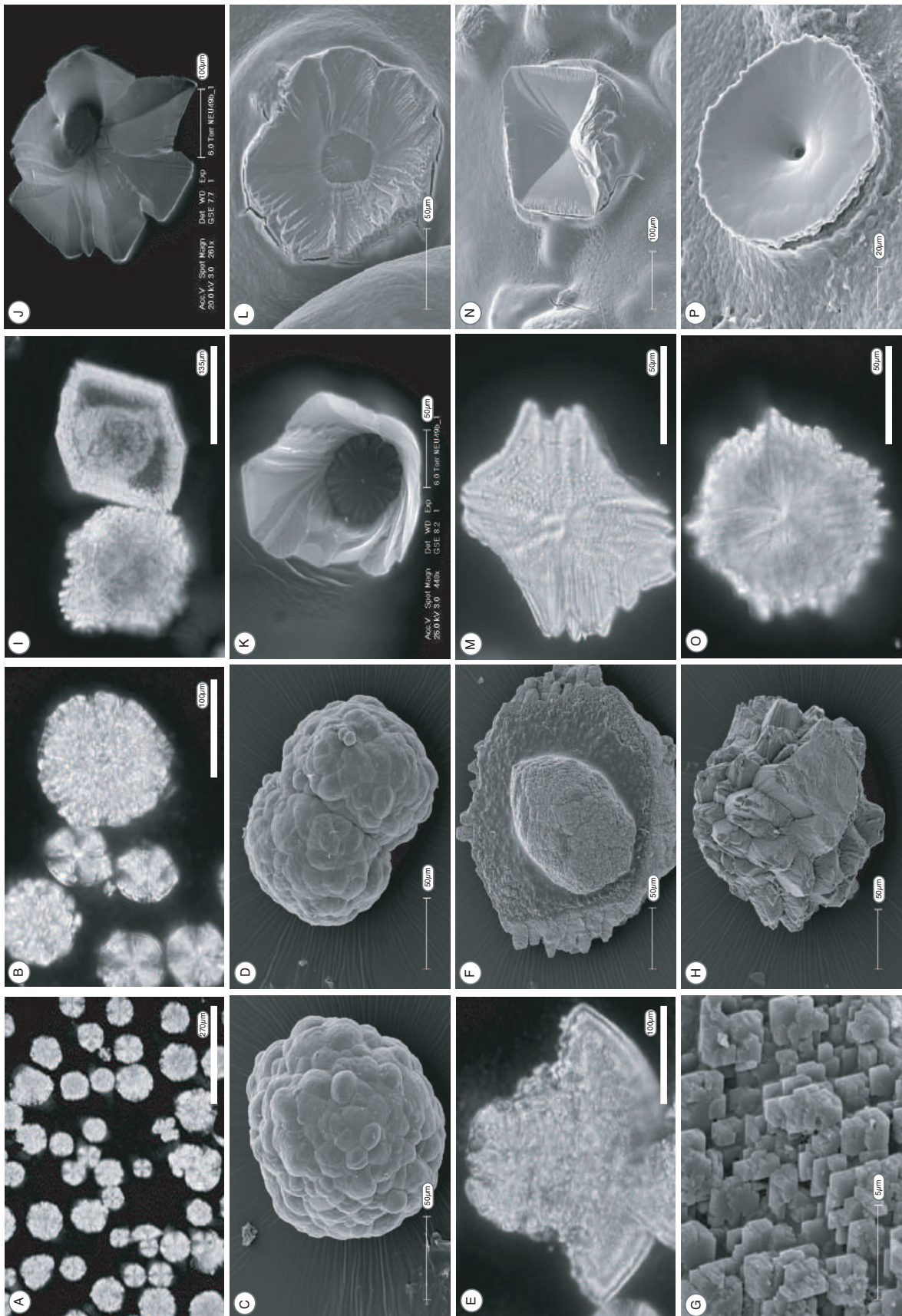


Figure 55: Figure de grande taille et légende complète dans l'annexe 2. *Full size picture with caption in annex 2.*

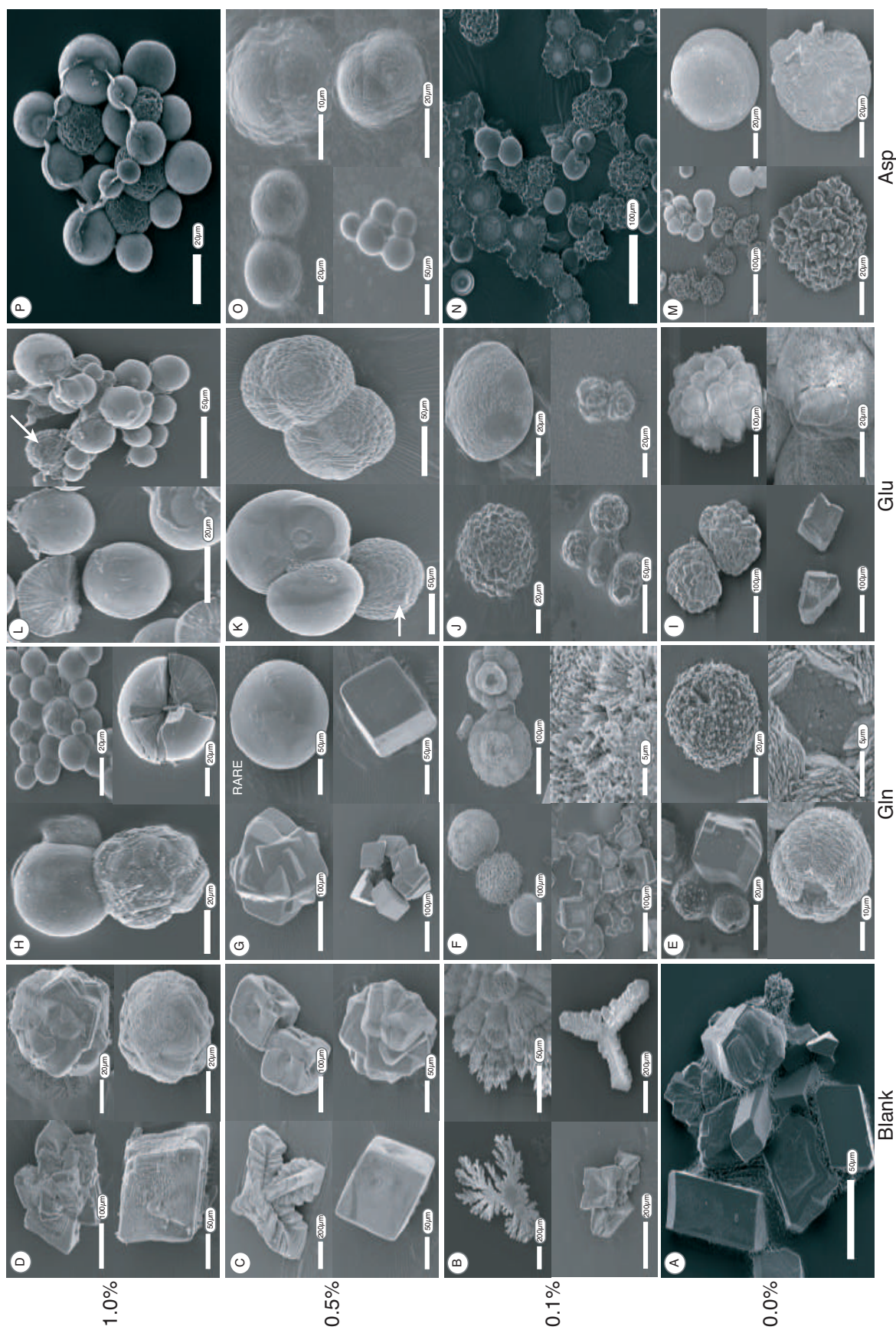


Figure 56: Figure de grande taille et légende complète dans l'annexe 3. *Full size picture with caption in annex 3.*

Mesure en cellule

Les mesures en cellule (deux répétitions, il s'agit là de résultats préliminaires, la méthode décrite ayant été longue à mettre au point) ont montré une décroissance rapide de la concentration de calcium, de potassium pendant les 200 premières minutes (Figure 57). Le pH quant à lui diminue de manière régulière pendant cette période (Figure 57). Dans la gamme de pH correspondant à ces 200 premières minutes, le xanthane a une forte affinité pour le calcium et le potassium. Une fois le pH descendu en dessous de 10,4, le calcium est relargué d'abord de manière rapide puis plus lentement (Figure 57). Le potassium lui reste fixé jusqu'à la fin de l'expérience. Au long de cette expérience, le sodium a un comportement erratique, difficilement explicable. En effet, celui-ci est libéré et absorbé de manière très rapide sans liaison apparente avec une variation de pH. L'évolution des concentrations en calcium, en potassium, ainsi que l'évolution du pH suggèrent que les échanges entre le milieu (ici la solution de $\text{Ca}(\text{OH})_2$) et le xanthane se font de manière complexe avec des phases rapides telles que l'absorption du calcium et du potassium, et des phases plus lentes telles que la diminution du pH et le relargage du calcium. Il faut noter que lors de l'arrêt des mesures, les deux solutions n'avaient pas atteint l'équilibre. En effet, la concentration de calcium et le pH n'étaient pas encore stables. Ceci met en évidence qu'une solution d'exopolysaccharides est un système à grande résilience où les interactions à long terme ont probablement une grande importance.

Discussion

L'inventaire morphologique et l'expérience abiotique ont produit de nombreux cristaux différents. Une façon d'aborder l'ensemble de ces cristaux de manière synthétique est de les organiser sous forme de séquences. Ces séquences peuvent être agencées de manière temporelle ou selon une variable expérimentale. Dans notre cas, les cristaux de l'inventaire morphologique seront organisés de manière temporelle et les cristaux issus de l'expérience abiotique seront organisés en séries minéralogiques suivant la concentration d'exopolysaccharides et d'acides aminés.

Cristaux de l'inventaire morphologique

Deux séquences principales peuvent être extraites de l'inventaire morphologique. La première est celle menant à la formation de baguettes indentées chez *Streptomyces*. Celle-ci commence avec l'induration progressive d'une hyphes de *Streptomyces*. Cette induration est suivie par l'apparition d'épitaixies, et de cristaux en brochette résultant de la croissance de ces épitaixies (Figure 58). La seconde séquence, que l'on retrouve sous diverses variantes chez toutes les bactéries testées, commence avec la formation de petits agrégats micritiques. Assez rapidement ces cristaux s'organisent soit en sphéroïdes, soit en polyèdres (le plus souvent ces polyèdres ont une forme similaire à la calcite de Framont décrite par Lacroix 1962). Sphères et autres agrégats micritiques peuvent être coalescents à l'intérieur des colonies. À l'interface air/colonie, la croissance en agrégats micritiques fait place à une croissance en disque ou en polyèdre tronqué. Il en résulte des cristaux en disques ou en polyèdres tronqués reposant sur des agrégats micritiques eux-mêmes le plus souvent sphéroïdaux (Figure 59).

Rôle des exopolysaccharides et comparaison entre culture et expérience abiotique

Comme cela a été montré précédemment les cristaux produits de manière abiotique peuvent être organisés en deux séquences: celle de la calcite et celle de la vaterite. Ces deux séquences peuvent être arrangées en fonction de l'acidité relative de l'acide aminé utilisé et de la quantité d'exopolysaccharide présent dans la solution (Figure 60). Dans ce contexte les cristaux produits par *Xanthobacter autotrophicus* et *Ralstonia eutropha* peuvent facilement être replacés dans la figure 60. En effet, *Ralstonia eutropha* qui ne produit que très peu d'exopolysaccharides a permis la précipitation des cristaux de calcite polyédriques, rhomboédriques ou en fleurs. Ceci correspond à ce qui peut être observé aux étapes 1 et 2 de la figure 60. En revanche, *Xanthobacter autotrophicus* qui produit de grandes quantités d'exopolysaccharides et dont la paroi est riche en poly-glutamine (Kandler et al.

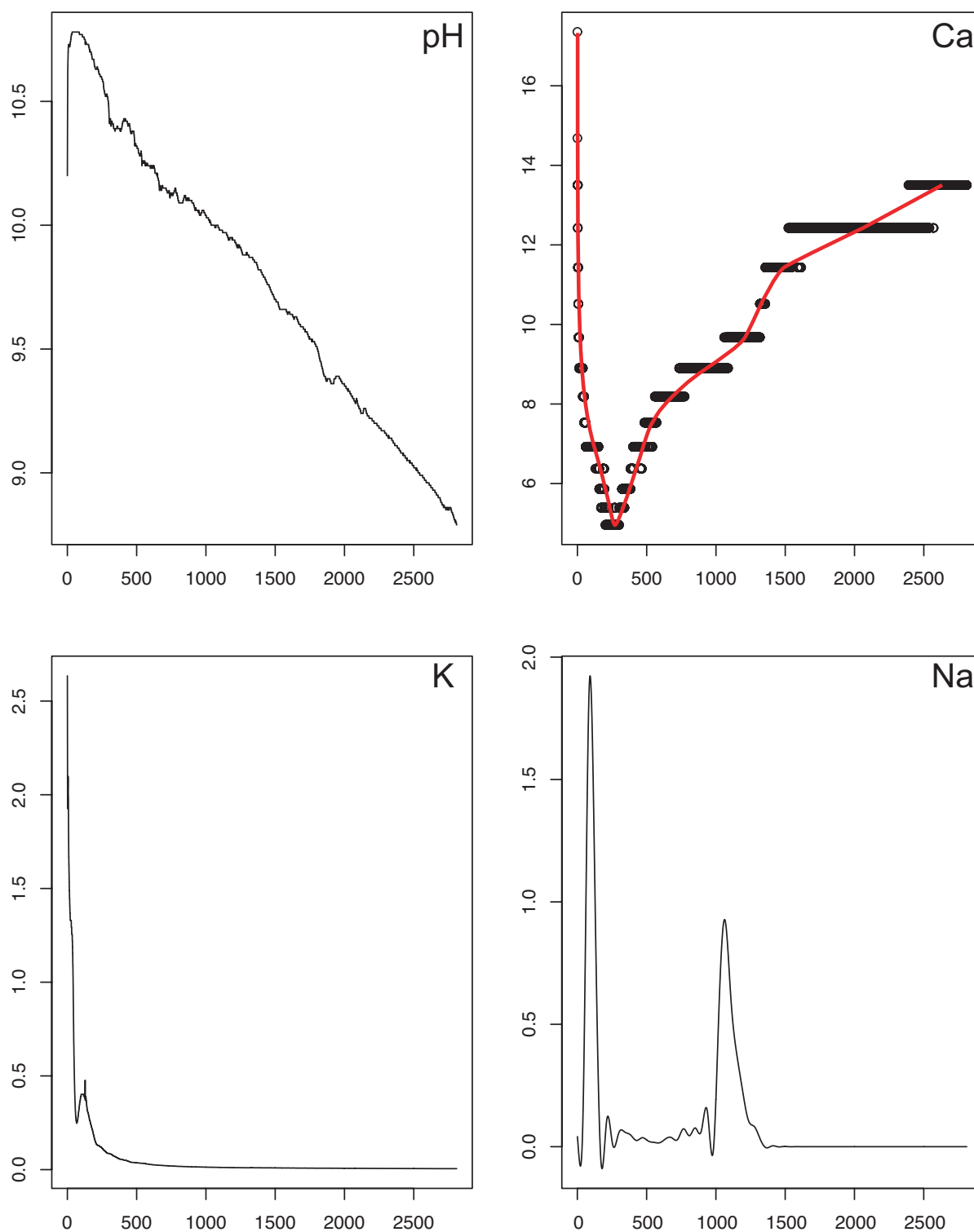


Figure 57: Evolution du pH, de la concentration en calcium, en potassium et en sodium lors d'une mesure d'affinité réalisée en cellule de mesure. En abscisse le temps en minute, en ordonnée la concentration des ions en mg / L. En rouge, une courbe d'approximation de la concentration en calcium. *Evolution of pH, calcium concentration, potassium concentration and sodium concentration during an affinity measure made inside the cell. In red an approximation curve of the calcium concentration is shown.*

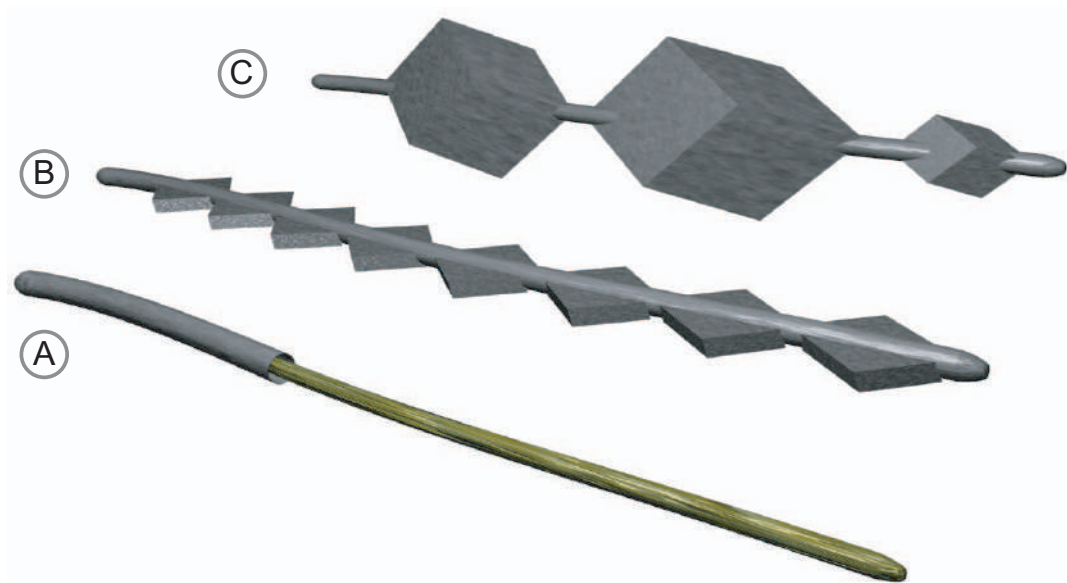


Figure 58: Séquence menant à la formation d'hyphes indurées. A: Un manchon de carbonate de calcium se forme autour de l'hyphe d'un streptomycète. B: Des épitaxies se forment sur une hyphe recouverte de carbonate de calcium. Il en résulte un filament indenté. C: Ces épitaxies croissent jusqu'à former des cristaux subautomorphes. *Sequence leading to the formation of indurated streptomycetes hyphae. A: A calcium carbonate sheath precipitates around a streptomycete hypha. B: Epitactic growth of calcium carbonate on the indurated hypha leads to the formation of a indented filament. C: Epitactic growth continues until subhedral crystals form on the hypha.*

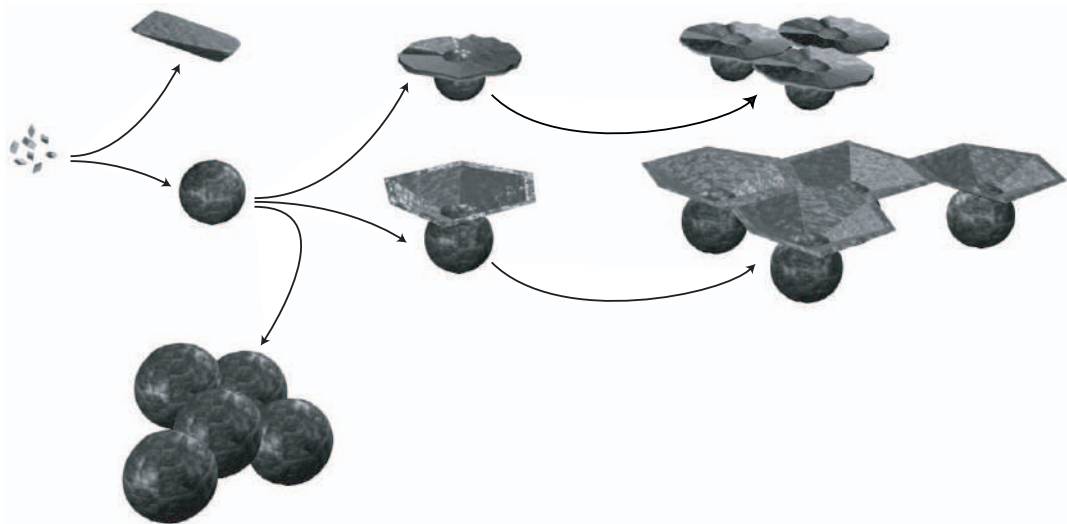


Figure 59: Séquences possibles menant à la formation des différentes morphologies de carbonate de calcium observées dans l'inventaire morphologique. Des agrégats micritiques en calcite de Framont ou sphériques se forment dans la colonie. Quand ces agrégats atteignent la surface de la colonie, la croissance se poursuit en disque ou en polyèdres aplatis. Dans la plupart des cas, les cristaux ainsi formés sont coalescents et peuvent former des structures centimétriques. *Possible sequences leading to the formation of the different morphologies observed in the morphological inventory. Micritic aggregates form in the colonies. Once these aggregates reach the surface of the colony, crystal growth change to form disks or polyedra. Most of the time, these crystals coalesce until they form centimetric structures.*

1983, Wiegel 1991) précipite des sphérulites vatéritiques correspondant aux étapes 2 à 4 de la figure 60. De même les cristaux de calcite produits en moindre quantité par cette bactérie étaient des agrégats micritiques pouvant être rapprochés eux de l'étape 2 de la figure 60.

L'habitus sphérulitique est très présent dans les deux séquences. Dans la nature, cet habitus du carbonate de calcium est souvent décrit dans des sédiments superficiels ou dans des sols. L'origine de tels cristaux dans les échantillons naturels est souvent attribuée à la présence de matière organique ou de bactéries sans explication supplémentaire. Néanmoins de nombreuses expériences en laboratoire ont montré que la morphologie sphérique pouvait facilement être obtenue lors de cultures bactériennes. Rivadeneyra et al. (1996) ont obtenu la formation de sphérulites aragonitiques lors de la culture de *Deleya halophila*. Ce groupe attribue la formation de ces sphérulites à la calcification et l'agglomération des cellules de *Deleya halophila*. De même, des sphérulites calcitiques ont été obtenues lors de cultures de cyanobactéries. Ces sphérulites se sont formées dans les fourreaux mucilagineux de celles-ci (Verrecchia et al. 1995). Les sphérulites vatéritiques produites par *Xanthobacter autotrophicus* lors de la présente expérience montrent une fois de plus que l'on peut relier ce type de morphologies à une activité bactérienne.

Affinité des cations pour le xanthane

Les cations divalents (Sr^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) semblent avoir une affinité plus élevée pour le xanthane que pour les cations monovalents (Na^+ , K^+). Parmi les cations divalents, les différences d'affinités semblent faibles ($\leq 4\%$). Néanmoins seule une gamme de pH quasi neutre (6.1-7.1) a été testée durant les expériences de dialyse. Il est possible que ces différences s'accroissent à des pH basiques. En effet à pH basique, les groupes carboxyles portés par le xanthane sont déprotonés; dans cet état, le xanthane montre probablement un comportement différent vis-à-vis de chaque cation. Les mesures effectuées en cellule à pH basique (10.8) montrent effectivement une très forte affinité pour le calcium et le potassium. L'évolution lente du pH ainsi que la libération plus lente du calcium depuis un pH de 10.4 suggèrent une forte résilience du système. Cette résilience est soulignée par le fait qu'après 40 heures le système n'avait pas encore atteint l'équilibre. Cette résilience peut s'expliquer en partie par la nature hydro-colloïdale du xanthane. Celui-ci en monopolisant les molécules d'eau et en rendant le milieu visqueux (1 % de xanthane rend le milieu 1000 x plus visqueux) limite probablement la diffusion des ions et en particulier des ions H^+ (il faut noter que le rayon ionique de l'ion H^+ est supérieur à celui des cations en solution). Cette forte résilience et sa forte affinité pour les cations divalents font que la solution de xanthane peut avoir une forte influence sur la précipitation de carbonate de calcium. En effet, une fois la solution de xanthane sursaturée par rapport au carbonate de calcium, les ions carbonate vont entrer en compétition avec le xanthane pour les cations divalents. A ce moment, la solution de xanthane pourra potentiellement modifier la composition chimique du carbonate en libérant les cations pour lesquels elle a le moins d'affinité. Les cations ainsi libérés pourront ensuite s'intégrer à la maille du carbonate en formation pour produire par exemple de la calcite magnésienne.

Conclusion

Les bactéries oxalotrophes sont capables de précipiter des cristaux de carbonate de calcium ayant beaucoup de morphologies différentes. Ces morphologies s'organisent en séquences temporelles aussi bien qu'en séquences minéralogiques ou liées à des facteurs expérimentaux. L'influence des bactéries, et des exopolysaccharides (xanthane) sur la morphologie et la minéralogie ressort bien de ces séquences. Les cristaux appartenant aux différentes séquences sont directement comparables à des échantillons naturels. L'intégralité de la séquence menant à la formation d'"hyphes minéralisées" peut être rapprochée des observations faites sur la calcite en aiguille (NFC : *needle fiber calcite*) du Cameroun, de la Côte d'Ivoire, du Mexique, des Etats-Unis d'Amérique, et d'Europe (Cailleau et al. 2005, in press, Boston et al. 2001, Newman et al. 1997, Verrecchia et Verrecchia 1994). De même des sphérules de carbonate de calcium (Grasby et al. 2003), calcitiques (Cailleau et al. 2005) et vatéritiques (Giralt et al. 2001) ont été observées dans les sols, les sédiments lacustres, et les rivières. Finalement les différentes formes d'agrégats micritiques ont aussi été observées dans

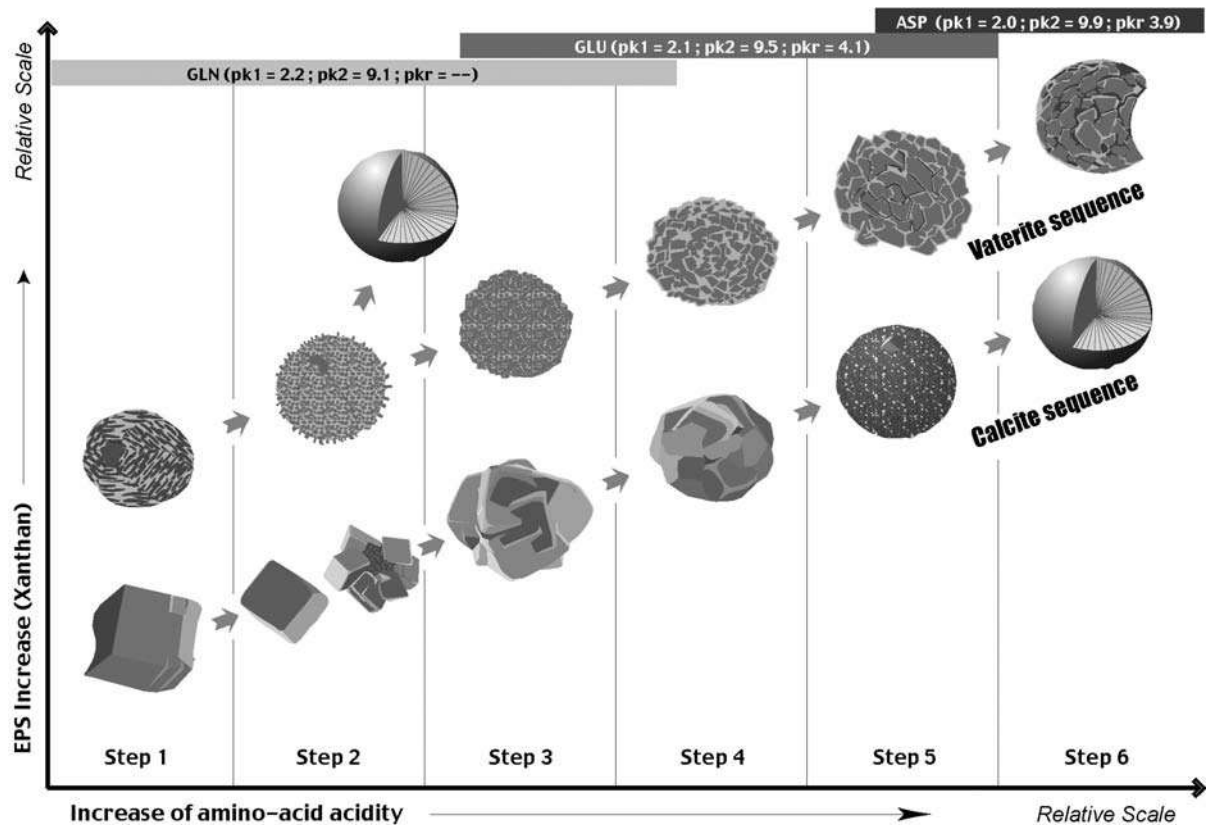


Figure 60: Séquences morphologiques des cristaux de calcite et de vaterite obtenus durant l'expérience abiotique. Les deux séquences sont organisées en fonction de la concentration croissante en EPS et de l'acidité de l'acide aminé ajouté. Les échelles sont relatives. La séquence de la calcite commence avec des rhomboèdres. Puis la taille des monocristaux formant les agrégats décroît du stade 1 au stade 6 jusqu'à la formation d'aiguilles. La forme générale des cristaux évolue du rhomboèdre à la sphère fibroradiée. La vaterite précipite toujours sous forme de sphères. La taille des monocristaux augmente du stade 1 (petites aiguilles) au stade 6 (hexagones massifs). Entre les étapes 2 et 3 la vaterite peut se trouver sous forme de sphérulite fibroradiée. *Sequences of calcite and vaterite morphologies obtained during the abiotic experiment. This sketch shows the morphologies related to increasing amino acid acidity and xanthan content. Scales are relative. The various domains of influence of amino acids are shown. Six main steps can be described for both vaterite and calcite. The calcite sequence starts with rhombohedra. Size of monocystals forming the clusters decreases from Step 1 to Step 6 until they form needles. The general shape of calcite evolves from rhombohedra to fibro-radial spherulites. Vaterite sequence: vaterite is always precipitated as spheres. The monocystals constituting the spheres increase in size from Step 1 (short needles) to Step 6 (large hexagons). Between Step 2 and Step 3, vaterite can occur as fibro-radial spherulites.*

des milieux marins (Trichet et al. 2001). L'influence des exopolysaccharides et des acides aminés sur la morphologie et la minéralogie du carbonate de calcium est directement observable. En revanche, l'influence des exopolysaccharides sur la composition chimique des carbonates précipités est un phénomène beaucoup plus difficile à aborder. En effet, il reste malaisé de mettre au point un système expérimental simple permettant d'avoir des conditions de pH constantes et de n'utiliser qu'un sel du cation à tester de manière à ne pas introduire d'ions parasites. Dans ce cas, il sera important à l'avenir de développer des méthodes spécifiques à l'étude de la précipitation du carbonate de calcium dans les exopolysaccharides en général, et dans les biofilms en particulier. Ceci est d'autant plus important que les exopolysaccharides sont des polymères très répandus dans l'environnement. On les trouve par exemple dans les tapis microbiens ainsi que dans les croûtes biologiques (Figure 61).

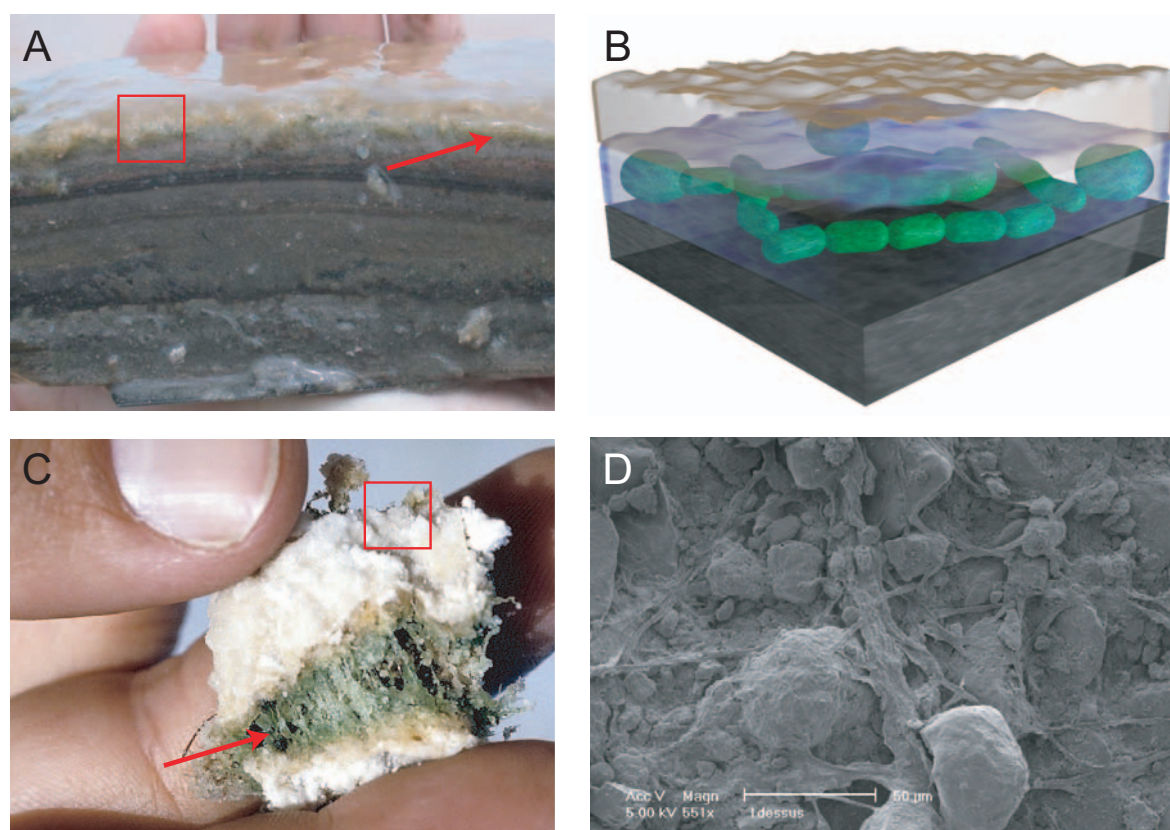


Figure 61: Exemple de systèmes continentaux riches en exopolysaccharides: A: Tapis microbien provenant d'un lac hypersalin (Bahamas). B: Modèle simplifié du tapis microbien montré en A. C: Croûte biologique. D: Détail de la surface d'une croûte biologique. *Example of continental ecosystems containing large amounts of exopolysaccharides. A: Microbial mat found in a hypersaline lake (Bahamas). B: Simplified model of the microbial mat shown in A. C: Biological soil crust. D: Close-up of the surface of a biological soil crust.*

Résumé / Summary

- Les bactéries oxalotrophes peuvent produire de nombreuses morphologies et minéralogies de cristaux de carbonate de calcium. *Oxalotrophic bacteria are able to precipitate numerous different morphologies and mineralogies of calcium carbonate.*

- Les différentes morphologies et minéralogies obtenues en cultures peuvent être expliquées en partie par les quantités d'exopolysaccharides et les types d'acides aminés présents dans les mucilage bactériens. L'expérience abiotique a permis de reproduire une grande partie des morphologies et minéralogies obtenues en cultures. *The different morphologies and mineralogies obtained during bacterial culture can be partially explained by the amount of exopolysaccharides and amino acids present in bacterial mucilaginous sheath. Many of the morphologies and mineralogies obtained in culture were reproduced during the abiotic experiment.*
- La plupart des cristaux produits lors de cultures ou d'expériences abiotiques ont des équivalents dans la nature. Ceci suggère l'importance des processus de biominéralisation dans la formation de plusieurs types de cristaux de carbonate de calcium retrouvés dans les sédiments. *Most the crystals produced during bacterial cultures or abiotic experiment have equivalents in natural samples. This suggest the importance of biomineralisation processes in the formation of several types of calcium carbonate crystals found in sediments.*

Chapitre 6: Discussion générale

Ce chapitre va reprendre les aspects principaux du cycle oxalate-carbonate développés dans les chapitres précédents et les replacer dans un contexte plus global. En effet, les méthodologies appliquées et développées dans ce travail peuvent servir à l'étude de processus liés au cycle oxalate-carbonate ou similaires à celui-ci. De même, les différents résultats obtenus peuvent concerner divers domaines, tels que les sciences du sol, l'agronomie, ou la médecine.

L'acide oxalique ; un acide organique parmi les autres

L'acide oxalique appartient au grand groupe des acides organiques de faibles poids moléculaires. Ces acides sont communs chez les plantes et chez les champignons qui les produisent en grandes quantités. Ceux-ci servent par exemple à l'acquisition de nutriment ou à la détoxification de métaux comme l'aluminium et le cuivre (Jones 1998, Gadd 1993, 1999, 2000). Chez les plantes, les plus courants sont l'acide citrique, l'acide malique, l'acide succinique, l'acide acétique, l'acide fumarique, l'acide aconitique. Chez les champignons, on retrouve essentiellement les mêmes que dans le règne végétal, mais il faut ajouter à cette liste une série d'acides organiques plus complexes tels l'acide diméthylpiruvique, l'acide glutaconique et l'éthylène oxide α - β dicarboxylate, par exemple (Cochrane 1958). La consommation d'oxalate de calcium peut mener à l'augmentation du pH et à la précipitation de carbonate de calcium. La carbonatogénèse à partir d'oxalate de calcium est un cas simple. En effet, la consommation d'oxalate de calcium fournit les ions carbonates et le calcium en quantité suffisante pour précipiter du carbonate de calcium. Les autres acides organiques ne fournissent pas le calcium comme l'oxalate, mais leur consommation peut aussi mener à l'alcalinisation du milieu dans la mesure où celle-ci va transformer un acide organique faible en acide carbonique (encore plus faible - Table 12). Dans cette situation, si une source de calcium est présente, du carbonate de calcium peut précipiter. Bien que les pools d'acides organiques dans les sols et les sédiments soient relativement bien connus (Jones 1998, van Hees et al. 2002, 2003, Tani et Higashi 1999, Certini et al. 1999, Smith et Oremland 1983), les flux d'oxalates entre les plantes, les champignons et le sol reste mal connu. Dans un système aussi dynamique que le cycle oxalate carbonate, il serait important d'avoir une estimation de la contribution relative à l'apport d'oxalates dans les sols des plantes et des champignons. Néanmoins l'étude de champignons ectomycorhiziens a montré que la contribution en oxalate de ceux-ci ne participait que peu à production totale d'oxalate (Casarin et al. 2003).

Table 12: pKs des acides organiques fréquemment rencontrés dans la nature et la rhizosphère. *pKs of organic acids commonly found in the nature and rhizosphere.*

Formule	Nom courant	pK ₁	pK ₂	pK ₃	Formule	Nom courant	pK ₁	pK ₂	pK ₃
H ₂ CO ₃	Acide carbonique	6.37	10.25	—	HCOOH ₃	Acide formique	3.75	—	—
H ₂ C ₂ O ₄	Acide oxalique	1.23	4.19	—	H ₆ C ₃ O ₅	Acide lactique	3.08	—	—
H ₄ C ₂ O ₂	Acide acétique	4.74	—	—	H ₈ C ₄ O ₂	Acide butyrique	4.83	—	—
H ₄ C ₃ O ₄	Acide malonique	2.82	5.70	—	H ₆ C ₄ O ₄	Acide succinique	4.21	5.64	—
H ₈ C ₆ O ₇	Acide citrique	3.13	4.76	6.40					

La guilde oxalotrophe

Dans la première partie de cette thèse, deux souches ont été étudiées en détail de manière à mettre en évidence les processus liés à la consommation d'oxalates. Il s'agissait de *Xanthobacter autotrophicus* et *Ralstonia eutropha*. Par la suite, plusieurs autres bactéries oxalotrophes ont été isolées et identifiées. Plusieurs de ces bactéries se sont révélées être des bactéries communes de la rhizosphère, on peut donc légitimement essayer de mettre en évidence les relations qui peuvent exister entre les producteurs d'oxalates et la guilde des bactéries oxalotrophes. Afin d'estimer les interactions plantes-champignons-bactéries on peut placer les bactéries isolées dans différents groupes fonctionnels indépendants de la phylogénie. Le premier de ces groupes est celui des bactéries consommatrices d'acides organiques. Dans ce groupe, on trouve *Ralstonia*, *Comamonas*, *Delftia* et *Azospirillum* (Holt et al. 2000, Tamer et Aragno 1980). Un deuxième groupe fonctionnel peut être constitué avec les bactéries potentiellement capables de fixer l'azote atmosphérique. Ce groupe contient *Azospirillum* et *Comamonas* qui sont aussi membres du groupe précédent, ainsi que *Stenotrophomonas* (Andrade et al. 1997, Park et al. 2005, Halsall et al. 1989). Le troisième groupe est représenté par les bactéries méthylophiles du genre *Methylobacterium*. Finalement le dernier groupe réunit les streptomycètes qui sont des bactéries capables de dégrader des substrats récalcitrants souvent complexes. Outre l'oxalotrophie, la consommation d'acides organiques, de méthanol, la fixation d'azote et la dégradation de substrats récalcitrants sont autant de caractéristiques importantes qui vont influencer les relations entre les plantes et ces 4 groupes de bactéries oxalotrophes (Figure 62). Avec les plantes, on peut estimer que ces relations vont du commensalisme au mutualisme. En effet, les bactéries consommatrices d'acides organiques et méthylophiles consomment l'oxalate et accessoirement le méthanol produit par la plante sans bénéfice en retour pour la plante. En revanche les plantes peuvent profiter de la présence de bactéries fixatrices d'azote qui vont leur fournir ce nutriment. Cette hypothèse est d'autant plus probable que l'action chimio-attractrice de l'acide oxalique sur *Azospirillum* a été démontrée auparavant (Reinhold et al. 1985, Alexandre et al. 2000). Finalement les plantes auront plutôt à souffrir de la présence de bactéries telles que les streptomycètes qui vont s'associer de manière synergique aux champignons pour dégrader les tissus ligneux des végétaux (Groot 1971). Outre cette association avec les streptomycètes, les champignons peuvent aussi profiter de la présence de bactéries fixatrices d'azote. En effet, le rapport C : N dans le bois est de 350 : 1, les champignons peuvent donc profiter de cet apport d'azote pour combler un manque de ce nutriment (Clausen 1996). Néanmoins beaucoup de champignons saprophytes sont capables de se procurer cet azote par translocation de celui depuis le sol comme il le font avec d'autres nutriments.

Au final, il est concevable qu'une partie de la guilde oxalotrophe comprenant les oxalotrophes fixateurs d'azote et méthylophiles, soit associée à la plante de manière mutualiste. Une autre fraction de la guilde oxalotrophe constituée cette fois des streptomycètes serait elle associée aux champignons saprophytes. Les streptomycètes pouvant consommer les cristaux d'oxalate de calcium libérés des tissus végétaux par les champignons saprophytes ainsi que l'acide oxalique excrété par ceux-ci. Pour terminer la dernière partie de la guilde oxalotrophe consomme l'oxalate de manière opportuniste dans la litière ou proche des racines.

Contribution de la guilde oxalotrophe à la production de carbonate

A une échelle macroscopique, toutes les souches oxalotrophes mises en cultures sur des milieux liquides ou gélifiés contenant de l'oxalate ont montré leur capacité à augmenter le pH et à provoquer la précipitation de carbonate de calcium sous différentes formes. Les carbonates trouvés en Afrique et en Espagne témoignent que l'activité observées en laboratoire existe aussi dans le milieu naturel. De la même manière qu'au laboratoire, plusieurs formes de carbonates telles que la calcite, la calcite magnésienne, la monohydrocalcite et la podolite (phosphate-carbonate) ont été observées dans les sols (Cailleau 2005, Cailleau et al. 2005). A l'échelle microscopique, la guilde oxalotrophe s'est montrés capable de produire en culture un grand nombre des cristaux observés sur le terrain. Une partie de ces morphologies peuvent être expliquées par la production d'exopolysaccharides et d'homopolypeptides pariétaux. Dans un sol, la production d'exopolysaccharides par les microor-

ganismes est liée à la formation de biofilms dans lesquels vivent probablement la majorité des cellules microbiennes (Sutherland 2001, a,b,c). C'est donc dans des biofilms que vont vraisemblablement se former la plupart des carbonates observés. Dans ce travail, c'est le xanthane qui a servi de modèle pour estimer la contribution des biofilms à la formation des différentes formes du carbonate de calcium observées. Le chapitre 5 a montré que l'influence de celui-ci sur les mouvements de cations, et du calcium en particulier, était complexe. Dans les systèmes naturels, cette complexité est probablement renforcée du fait de la participation de nombreux organismes différents à la formation du biofilm. De plus les substitutions de monosaccharides (ou d'autre groupes de l'exopolysaccharide) par des acides organiques ou inorganiques sont fréquentes. Ainsi des acides organiques tels que l'acide acétique, l'acide glycérique, l'acide pyruvique, l'acide succinique et l'acide hydroxybutanoïque sont souvent présents dans les biofilms. De même, la présence de phosphates chez les bactéries gram positives et celle de sulfates chez certaines cyanobactéries est commune (Sutherland 2001 a). À l'avenir il sera donc important d'appliquer les méthodologies développées dans ce travail à des biofilms naturels, et particulièrement dans des environnements vadoses. De même il sera important de mettre au point des méthodes spécifiques à l'extraction et l'étude de ces biofilms.

Conséquences de l'activité oxalotrophe liée au cycle oxalate-carbonate

Les différents chapitres ont montré divers aspects du cycle oxalate-carbonate. Tous les processus observés ont des conséquences dans les systèmes examinés. Une partie de ces conséquences sont traitées ci-dessous.

Stockage de carbone

Le stockage de carbone est probablement la conséquence environnementale la plus importante du cycle oxalate-carbonate. La transformation des oxalates en carbonates équivaut à la transformation d'un carbone organique en un carbone minéral. Les systèmes étudiés suggèrent que la transformation des oxalates en carbonates a lieu dans de nombreux écosystèmes. L'iroko, les opuntia ainsi que la vigne ne sont toutefois que trois modèles parmi tant d'autres. La dégradation des oxalates et leurs transformations en carbonates peut potentiellement prendre place autour de toutes les plantes citées dans l'annexe 1. De même la transformation oxalate-carbonate n'est pas limitée aux écosystèmes terrestres, puisque les tapis alguaire (cyanobactéries comprises) contiennent des quantités non négligeables d'oxalate (environ 210 mg / kg de masse sèche). On peut donc étendre ce cycle aux environnements fluviaux, lacustres et marins (Smith et Oremland 1983). Les études précédentes ont montré qu'il était possible de former environ 10 tonnes de carbonate de calcium autour d'un iroko (Cailleau et al. 2004, 2005), ce qui représente environ 1200 kilos de carbone. Bien que l'iroko soit une plante "exceptionnelle", la généralisation de ce type de résultats à plusieurs systèmes suggère que le puits de carbone lié à la transformation des oxalates en carbonates n'est pas négligeable ! En revanche ce type de puits de carbone est probablement "écologiquement fragile". En effet, il a été montré que le déficit de piégeage de carbone lié à la déforestation et à l'exploitation du bois d'iroko en Côte d'Ivoire représentait environ 1.53×10^{-4} PgC / ans (Cailleau et al. 2005). L'étude de ce type de puits de carbone se révèle donc nécessaire rapidement dans la mesure où le stockage de carbone sous forme minérale n'est pas pris en compte dans les modèles globaux (Prentice et al. 2001), et où les exemples les plus probants comme l'iroko sont menacés à court terme.

Modification des sols - mobilité des métaux

L'augmentation du pH des sols, même si elle ne mène qu'à la précipitation de faibles quantités de carbonate de calcium, influence la mobilité des métaux. De manière générale, certains métaux comme le fer sont mobiles à pH acide alors que d'autres comme le molybdène le sont à pH basique. Dans les sols tropicaux étudiés, le pH peut s'élever de 4.3 à 10.3. Dans ces conditions, des métaux tels que l'aluminium, le chrome, le mercure et le cuivre, vont être immobilisés (Förstner 1985). Ceci représente un avantage important pour les irokos et les plantes vivant à sa proximité. En effet, à

pH acide l'aluminium, et le manganèse sont toxiques pour les plantes car ceux-ci entre en compétition avec des nutriments comme le fer et le calcium. En revanche cette alcalinisation va augmenter la mobilité de semi métaux et de non-métaux comme l'arsenic et le sélénium. Néanmoins ceux-ci se trouvent généralement à l'état de traces dans les sols, on peut considérer que l'augmentation du pH dans des sols généralement acides est bénéfique pour l'écosystème en général.

Perspectives et éventuelles applications

Ce travail a essentiellement réalisé un grand débroussaillage autour de systèmes de biominéralisation jusque-là peu étudiés et donc peu connus. Néanmoins durant la réalisation de ce travail, de nombreux travaux concernant directement ou indirectement le cycle oxalate-carbonate ont été publiés. Ceux-ci ouvrent de nouvelles voies de recherches et permettent d'envisager de nouvelles approches du cycle oxalates-carbonate. La suite de cette partie donne un aperçu des nouvelles voies de recherches dans lesquelles il est possible de s'engager.

Biologie moléculaire

De nombreux micro-organismes ont vu leur génome complètement séquencé et annoté ces dernières années. Parmi ces micro-organismes des bactéries telles que *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces avermitilis* (MA-4680), *Burkholderia fungorum* LB400, et *Bradyrhizobium japonicum* (USDA 110). Chez ces bactéries, on a trouvé un opéron regroupant les gènes indispensables à l'oxalotrophie. La vérification de l'oxalotrophie de ces souches a été faite par mise en culture de ces souches sur milieu DSM 81 additionné d'oxalate de calcium. Ces opérons ayant une organisation semblable (Figure 63), il est envisageable de développer à court terme des sondes ADNs permettant d'approcher les communautés oxalotrophes et leurs diversités à l'aide d'outils moléculaires. Une telle approche permettra de se libérer des méthodes dépendant de la culture des bactéries, et probablement d'avoir une image plus pertinente de la guildes oxalotrophe.

Microcosmes

Le développement de techniques moléculaires permet d'envisager la fabrication de microcosmes. Ces microcosmes pourraient servir à étudier les interactions plantes-bactéries-champignons. Les microcosmes fournissent un environnement contrôlé dans lequel il est possible d'introduire des bactéries oxalotrophes connues. De même ces bactéries peuvent subir des différents types de marquages. On peut en effet marquer une bactérie oxalotrophe à l'aide de *gfp* et ainsi voir sa répartition dans le microcosme en particulier au niveau des racines. Il est aussi possible de marquer un des gènes indispensable à l'oxalotrophie à l'aide de *gfp* en opérant une "fusion *gfp*". Finalement le double marquage d'une bactérie associant les 2 marquages précédents en utilisant la *gfp* et la *rfp* permettrait de mettre en évidence la répartition et l'activité d'une bactérie. L'approche en microcosme a beaucoup à apporter à l'étude de la guildes oxalotrophe, de sa répartition et de son activité. Néanmoins, les microcosmes pour être parfaitement efficaces devraient être exempts de carbonate et d'oxalate au départ. Ce qui implique l'utilisation de sol synthétique tel qu'il a été décrit par Ellis (2004) sans le carbonate de calcium.

Les biofilms

Les exopolysaccharides et les biofilms en général se sont révélés être des systèmes particulièrement difficiles à aborder d'un point de vue méthodologique. Néanmoins, la combinaison d'une cellule de mesure et d'électrodes cations spécifiques couplées à un enregistreur de données s'est révélée performante dans l'approche de la dynamique de systèmes tels que les biofilms. Une méthodologie standard doit maintenant être développée pour permettre d'obtenir des points de comparaison entre les différents types de biofilms naturels. En particulier des biofilms d'environnements vadoses encore mal connus.

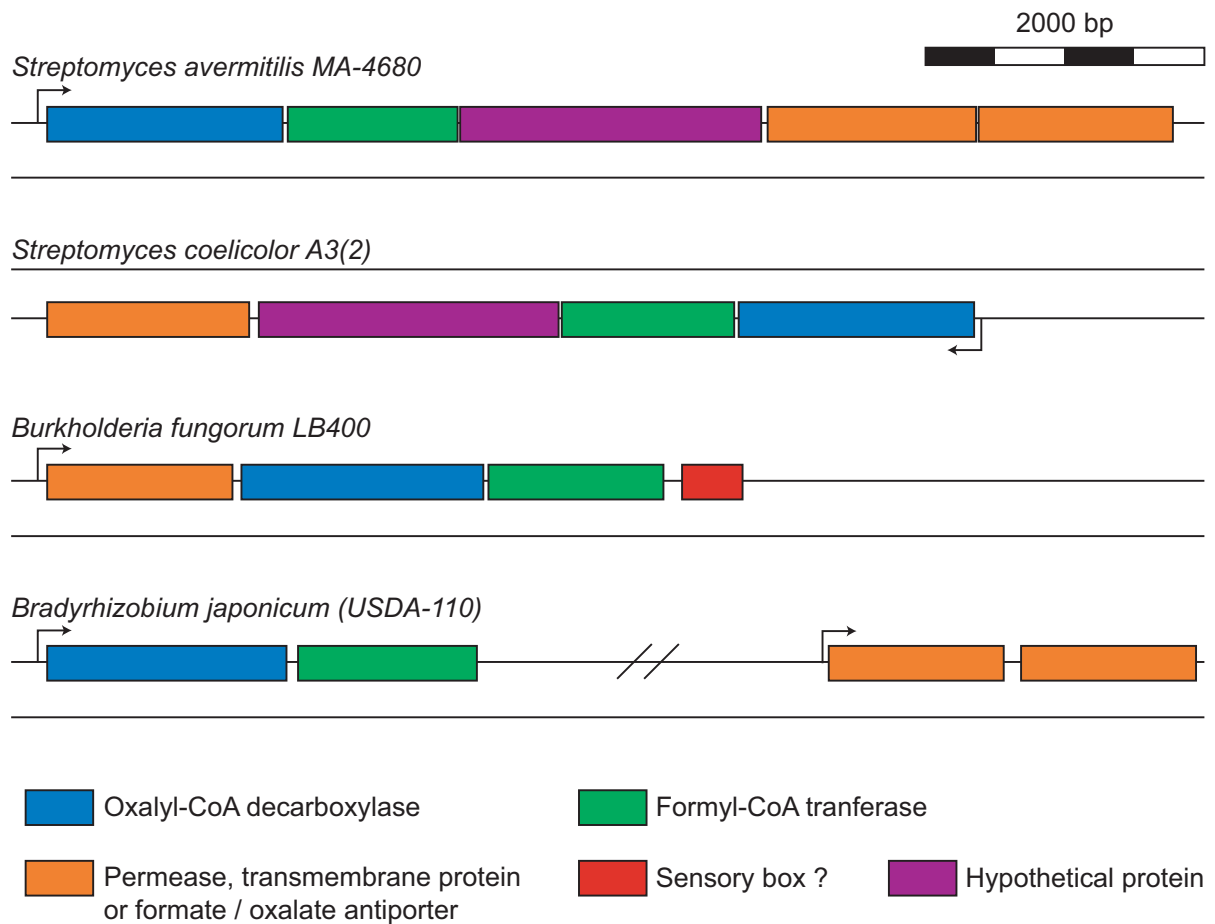


Figure 63: Shéma représentant les opérons contenant des gènes impliqués dans le métabolisme de l'oxalate. (basé sur des recherches effectuées par blast) *Sketch showing the operons containing genes associated with the oxalate metabolism (based on gene blast).*

Identification des carbonates

Les carbonates trouvés dans les sols africains et espagnols ont pu être attribués directement à une activité bactérienne grâce à leur composition isotopique en ^{13}C et au fait qu'il n'y avait pas de carbonate hérité dans les sols étudiés. Néanmoins en présence de carbonates hérités, cette distinction n'est plus envisageable. Il sera donc important à l'avenir de développer des méthodes de micromorphologie des sols permettant de prélever de petites quantités de carbonates sur lesquels des analyses plus poussées seront possibles.

Utilisation des carbonates

Après l'abattage des irokos, de grandes quantités de carbonate de calcium restent dans le sol où elles sont inutilisées. Le carbonate de calcium étant rare dans les régions d'Afrique prospectées celui-ci pourrait être mis en valeur. En effet, celui-ci sert à faire de la chaux par exemple. Mais ce carbonate pourrait aussi avoir un usage agronomique. En effet, il pourrait être utilisé pour chauler certaines cultures afin de maintenir les sols à un pH optimal. Bien que cette ressource en carbonate de calcium soit limitée, elle pourrait être très utile. De même des co-cultures avec des irokos (ou des cactus pour certains sols) sont une alternative envisageable pour maintenir des sols à un pH moins acide que celui des sols latéritiques typiques. Encore une fois, une étude agronomique serait nécessaire dans ce domaine.

Une vision plus large du cycle oxalate-carbonate

Comme le montre ce chapitre, le cycle oxalate-carbonate est un processus complexe aux conséquences environnementales multiples. Un moyen est de l'aborder du point de vue environnemental et de relier les différents processus de ce cycle en montrant leurs effets respectifs sur l'environnement (Figure 64). Un autre moyen est de l'aborder du point de vue du biologiste et de résumer les interactions qui ont lieu entre les différents organismes intervenant dans ce cycle (Figure 65). Ces deux visions complémentaires permettent d'obtenir une image globale du cycle oxalate-carbonate et de ses conséquences. Au final, il ressort de ces deux visions que le cycle oxalate-carbonate est un processus impliquant un écosystème entier (bactéries, plantes et champignons) et que ce processus ne pourrait avoir lieu sans les interactions entre tout ces acteurs.

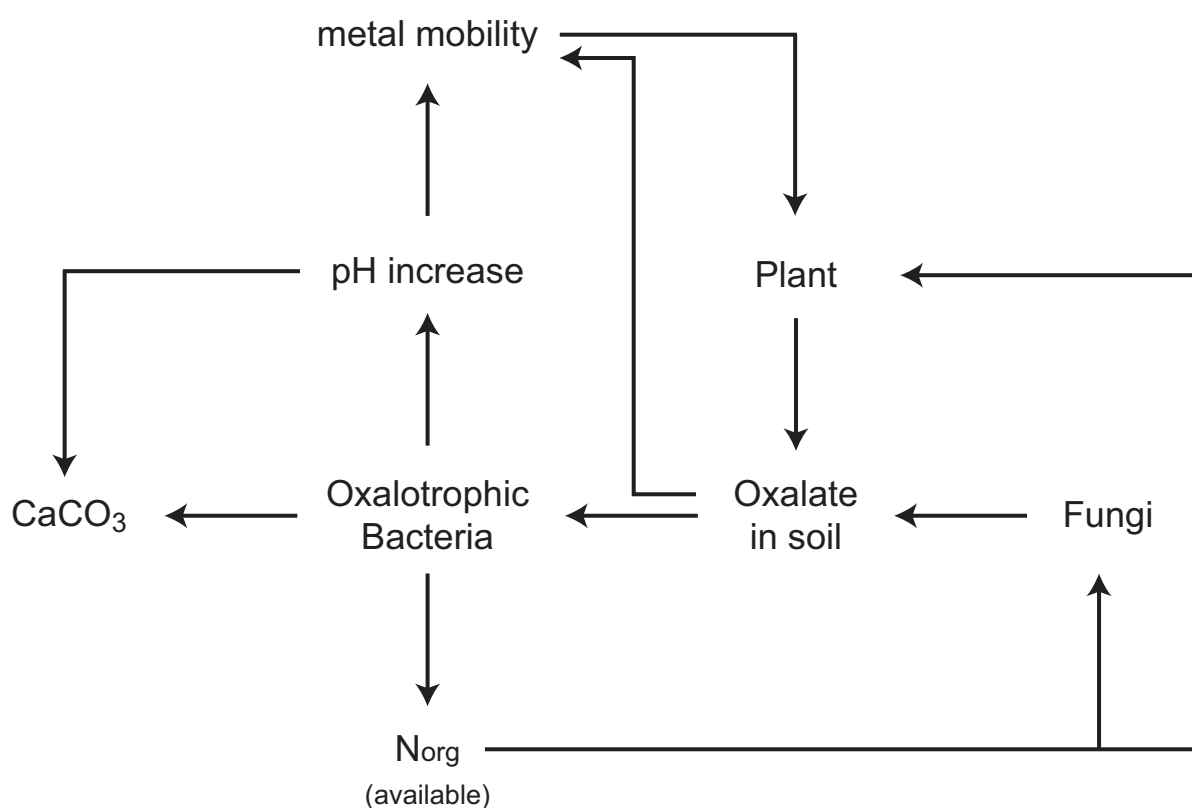


Figure 64: Schéma simplifié des interactions possibles entre les paramètres physico-chimiques et les organismes vivants participant au cycle oxalate-carbonate. Ce schéma montre les nombreuses rétroactions possibles liées au cycle oxalate-carbonate. La plupart de celles-ci comme la fixation de l'azote par des bactéries telles qu'*Azospirillum* ou l'immobilisation de métaux toxiques sont probablement bénéfiques pour les plantes. *Simplified sketch representing the possible interactions between physico-chemical parameters and living organisms involved in the oxalate-carbonate cycle. This sketch shows the numerous possible retroactions linked to the oxalate-carbonate cycle. Many of these retroactions such as nitrogen fixation by bacteria such as *Azospirillum* and toxic metals immobilization are probably positive for the plant.*

Chapitre 7: Conclusions

L'étude du cycle oxalate-carbonate a montré qu'il s'agissait d'un cycle biogéochimique très actif dans les sols menant à l'accumulation de carbonate de calcium. Les acteurs de ce cycle, les plantes, les champignons et les bactéries sont présents dans tous les écosystèmes, ce qui suggère que le cycle oxalate-carbonate n'est pas limité aux systèmes étudiés. Les mesures réalisées sur le terrain montrent que la transformation des oxalates en carbonates est un processus qui se passe dans la partie supérieure des sols; les trente premiers centimètres.

Les bactéries se sont révélées être le principal moteur de ce cycle, consommant l'oxalate, et provoquant l'augmentation du pH et la précipitation de carbonate de calcium. Dans les systèmes naturels, celles-ci sont alimentées constamment en oxalates par les plantes et les champignons. Les différents systèmes étudiés ont montré que la litière et la rhizosphères étaient les lieux préférentiels de la dégradation de l'oxalate. L'identification des bactéries oxalotrophes isolées a confirmé que beaucoup de celles-ci étaient des bactéries communes de la rhizosphère. Les streptomycètes quant à eux sont communs dans les sols, l'oxalate présent dans la litière et dans les premières couches du sol constitue probablement une source de carbone intéressante pour ceux-ci. Le fait que les streptomycètes soient connus pour s'associer avec les champignons milite aussi en faveur de leur activité dans la litière.

Les cultures de bactéries oxalotrophes ont produit de nombreux carbonates différents. Ces carbonates ont montré de grandes ressemblances morphologiques et minéralogiques avec des carbonates associés aux plantes productrices d'oxalate. L'influence des polymères pariétaux et des exopolysaccharides s'est révélée primordiale dans la morphologie et la minéralogie de ces carbonates. Les expériences conduites en utilisant un exopolysaccharide commercial ont montré que l'on peut s'attendre à une forte influence de celui-ci sur la chimie des carbonates produits.

Tous ces éléments impliquent que le cycle oxalate-carbonate se comporte comme un puits de carbone pleinement fonctionnel. Néanmoins pour en estimer l'importance en termes de stockage de carbone à l'échelle des continents, de nombreuses études restent à faire. En particulier il est important de quantifier de manière précise la contribution du cycle oxalate-carbonate au bilan de séquestration du carbone, y compris dans des systèmes carbonatés.

Pour conclure, il faut dire que ce travail ne représente que la contribution microbiologique à l'étude pluridisciplinaire du cycle oxalate-carbonate. Il laisse donc de nombreuses questions ouvertes, telles que le rôle des biofilms dans la précipitation du carbonate de calcium ou les conséquences agronomiques du cycle oxalate-carbonate. J'espère que ces questions auront l'occasion de trouver des réponses au gré des études qui suivront ce travail.

Bibliographie

- **Addadi L., Berman A., Moradial-Oldak J. & Weiner S. (1990).** Tuning of crystal nucleation and growth by protein: molecular interaction at solid-liquid interfaces in biomineralization. *Croatica Chemica Acta* **63**, 539-544.
- **Alexandre G., Greer S. E. & Zhulin I. (2000).** Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *J. Bact.* **182**, 6042-6048.
- **Allison M. J., Dawson K. A., Mayberry W. R. & Foss J. G. (1985).** *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: Oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Arch. Microbiol.* **141**, 1-7.
- **Andrade G., Esteban E., Velasco L., Lorite M. & Bedmar J. E. (1997).** Isolation and identification of N₂-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.). *Plant and soil* **197**, 19-23.
- **Arnott H. J. (1995).** Calcium oxalate in fungi. In *Calcium oxalate in biological systems*, pp. 73-111. Edited by K. S. R. Boca Raton: CRC Press.
- **Arnott H. J. & Pautard F. G. E. (1970).** Calcification in plants. In *Biological calcification*, pp. 375-476. Edited by Schraer H. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
- **Aubréville A. (1396).** *La flore forestière de la Côte d'Ivoire*. Paris: Larose editeurs.
- **Bassalik K. (1913).** Über die Verarbeitung der Oxalsäure durch *Bacillus extorquens*. *Jahrb. Wiss. Bot.* **53**, 255-302.
- **Beaumont A. & Cassier P. (1996).** *Biologie animale: des protozoaires aux métazoaires épithélio-neuriens*. Paris: Dunod.
- **Becking J. H. (1984).** The genus *Beijerinckia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 311-321. Edited by Krieg N. R., & Holt J. G. Baltimore: Lippincott-Williams & Wilkins.
- **Blackmore M. A. & Quayle J. R. (1970).** Microbial growth on oxalate by a route not involving glyoxylate carboligase. *Biochem. J.* **118**, 53-59.
- **Boquet E., Boronat A & Ramos-Cormenzana A. (1973).** Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* **246**, 527-528.
- **Borruat G., Roten C.-A., Marchant R., Fay L. b. & Karamata D. (2001).** Chromatographic method for diaminopimelic acid detection in calcareous rock. Presence of biomarker in stromatolites. *J. Chromatogr. A.* **13**, 219-224.
- **Bosak T. & Newman D. K. (2005).** Microbial kinetic controls on calcite morphology in supersaturated solutions. *J. Sediment. Res.* **75**, 000-000.
- **Boston P. J., Spidle M. N., Northup D. E. & Melim L. A. (2001).** Cave microbe-mineral suites: best model for extraterrestrial biosignature. *Lunar and Planetary Science XXXII*.

- **Braissant O., Aragno M. & Verrecchia E. P. (2002).** Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated ? *Naturwissenschaften* **89**, 366-370.
- **Braissant O., Cailleau G., Aragno M. & Verrecchia E. P. (2004).** Biologically induced mineralization in the tree *Milicia excelsa* (Moraceae): its causes and consequences to the environment. *Geobiology* **2**, 59-66.
- **Braissant O., Cailleau G., Dupraz C. & Verrecchia E. P. (2003).** Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids. *J. Sedim. Research* **73**, 485-490.
- **Braissant O. & Verrecchia E. P. (2002).** Microbial biscuits of vaterite in Lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan)-Discussion. *J. Sedim. Research* **72**, 944-946.
- **Brochier J. E. (2002).** **Les sédiments anthropiques.** In *Géologie de la préhistoire: méthodes, techniques, applications*, pp. 453-462. Edited by M. J. C. Paris: Société Géologique de France.
- **Buczynski C. & Chafetz H. S. (1991).** Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy. *J. Sedim. Petrol.* **61**, 226-233.
- **Cailleau G. (2005).** Cycle du carbone et biominéralisation carbonatée en milieu continental : la diagénèse des phases oxalate et carbonate. In *Institut de Géologie*, pp. 200. Neuchâtel: University of Neuchâtel.
- **Cailleau G., Braissant O., Aragno M. & Verrecchia E. P. (2005).** Biologically induced accumulation of CaCO₃ in orthox soils of Biga, Ivory Coast. *Catena* **59**, 1-17.
- **Cailleau G., Braissant O. & Verrecchia E. P. (2004).** Biomineralization in plants as a long-term carbon sink. *Naturwissenschaften*, **91**, 191-194.
- **Cailleau P., Jacquin C., Dragone D., Girou A., Roques H. & Humbert L. (1979).** Influence des ions étrangers et de la matière organique sur la cristallisation des carbonates de calcium. *Revue de l'Institut Français du Pétrole XXXIV*, 89-112.
- **Campbell W. G. & Fisher R. C. (1933).** The composition and origin of "stone" in Iroko wood (*Chlorophora excelsa*) Benth and Hook. *Empire Forestry Journal* **11**, 244-245.
- **Carozzi A. V. (1967).** Recent calcite-cemented sandstone generated by equatorial tree iroko (*Chlorophora excelsa*), Daloa, Ivory Coast. *J. Sedim. Petrol.* **37**, 597-600.
- **Casarin V., Plassard C., Souche G. & J.-C., A. (2003).** Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. *Agronomie* **23**, 461-469.
- **Castanier S., Le Métayer-Levrel G. & Perthuisot J.-P. (2000).** Bacterial roles in the precipitation of carbonate minerals. In *Microbial Sediments*, pp. 32-39. Edited by Riding R. E. & Awramik S. M. Heidelberg: Springer-Verlag.
- **Castanier S., Maurin A. & Perthuisot J.-P. (1989).** Production bactérienne expérimentale de corpuscules carbonatés, sphéroïdaux à structure fibro-radiale; Réflexions sur la définition des ooïdes. *Bulletin de Société Géologique de France* **5**, 589-595.
- **Certini G., Corti G. & Ugolini F. C. (2000).** Vertical trends of oxalate concentration in two soils under *Abies alba* from Tuscany (Italy). *J. plant nutr. soil. sci.* **163**, 173-177.
- **Chandra T. S. & Shethna Y. I. (1975).** Isolation and characterization of some new oxalate-decomposing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **41**, 101-111.
- **Chandra T. S. & Shethna Y. I. (1977).** Oxalate, formate, formamide and methanol metabolism in *Thiobacillus novellus*. *J. Bact.* **131**, 389-398.
- **Clausen C. A. (1996).** Bacterial associations with decaying wood: a review. *Int. biodet. biodeg.* **37**, 101-107.

- **Cochrane V. W. (1958).** *Physiology of Fungi*. London, New York: John Wiley and Sons.
- **Cojan I. & Renard M. (1999).** *Sédimentologie*. Paris: Dunod.
- **Collins M. D., Lawson P. A., Willems A., Cordoba J. J., FernandezGarayzabal J., Garcia P, Cai J., Hipe H. & Farrow J. A. E. (1994).** The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 812-826.
- **Cromack K., Sollins P., Todd R. L., Fogel R., Todd A. W., Fender W. M., Crosley M. E. & Crosley D. A. (1977).** The role of oxalic acid and bicarbonate in calcium cycling by fungi and bacteria: some possible implications for soils animals. *Ecol. Bull. (Stockholm)* **25**, 246-252.
- **Daniel S. L. & Drake H. L. (1996).** Oxalate- and glyoxylate-dependent growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 3062-3069.
- **Dardenne M. (2001).** Carbonates naturels. In *Dictionnaire des roches et minéraux*, pp. 101-112. Edited by A. Michel. Paris: Albin Michel.
- **de Groot R. C. (1971).** Interactions between wood decay fungi and *Streptomyces* species. *Bull. Torrey Bot. Club* **98**, 336-339.
- **Dedek J. (1966).** *Le carbonate de chaux*: Librairie Universitaire de Louvain.
- **Deganello S., Kampf A. R. & Moore P. B. (1981).** The crystal structure of calcium oxalate trihydrate $\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_3\text{C}_2\text{O}_4$. *Am. Min.* **81**, 859-865.
- **Dehning I. & Schink B. (1989).** Two new species of anaerobic oxalatefermenting bacteria, *Oxalobacter vibrioformis* sp. nov. and *Clostridium oxalicum* sp. nov., from sediment samples. *Arch. Microbiol.* **153**, 79-40.
- **Dijkhuizen L., Wiermsa M. & Harder W. (1977).** Energy production and growth of *Pseudomonas oxalaticus* OX1 on oxalate and formate. *Arch. Microbiol.* **115**, 229-236.
- **Dove P. M., De yoreo J. J. & Weiner S. (2003).** *Biomineralization*. Washington D.C.: Mineralogical Society of America.
- **Dutton M. V. & Evans C. S. (1996).** Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.* **42**, 881-895.
- **Dykstra M. J. & Reuss L. E. (2003).** *Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- **Echigo T., Kimata M., Kyono A., Shimizu M. & Hatta T. (2005).** Re-investigation of the crystal structure of whewellite [$\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$] and the dehydration mechanism of caoxite [$\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$]. *Miner. Mag.* **69**, 77-88.
- **Einsele G. (1992).** *Sedimentary basins. Evolution, facies and sediment budget*. Berlin: Springer-Verlag.
- **Ellis J. R. (2004).** Artificial soil microcosms: a tool for studying microbial autecology under controlled conditions. *J. Micr. Methods* **56**, 287-290.
- **Ehrlich H. L. (1996).** *Geomicrobiology*. New York: Marcel Dekker, inc.
- **Ehrlich H. L. (1998).** Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Science Reviews* **45**, 45-60.
- **Eugster H. P. & Hardie L. A. (1978).** Saline lakes. In *Lakes, chemistry, geology, physics*. Edited by Lerman. Heidelberg: Springer-Verlag.
- **Falini G. (2000).** Crystallization of calcium carbonate in biologically inspired collagenous matrices. *Int. J. Inorg. Mat.* **2**, 455-461.

- **Falini G., Fermani S. & Ripamonti A. (2002).** Crystallization of calcium carbonate salts into beta-chitin scaffold. *J. Inorg. Biochem.* **91**, 475-480.
- **Ferris F. G. (2000).** Microbe-metal interactions in sediments. In *Microbial sediments*, pp. 121-126. Edited by Riding R. E. and Awramick S. M. Berlin: Springer-Verlag.
- **Ferris F. G., Phoenix V. R., Fujita Y. & Smith R. W. (2003).** Kinetics of calcite precipitation induced by ureolytic bacteria at 10 to 20°C in artificial groundwater. *Geochimica Cosmochimica Acta* **67**, 1701-1722.
- **Fierer N., Schimel J. & Holden P. A. (2003).** Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol. Biochem.* **35**, 167-176.
- **Folk R. L. (1974).** The natural history of crystalline calcium carbonate: effect of magnesium content and salinity. *J. Sedim. Petrol.* **44**, 40-53.
- **Förstner U. (1985).** Chemical forms and reactivities of metals in sediments. In *Chemical methods for assessing bio-available metals in sludges and soil*, pp. 1-30. Edited by Leschber R., Davis R. D. & L'Hermite P. Amsterdam: Elsevier.
- **Franceschi V. (2001).** Calcium oxalate in plants. *TIPS* **6**, 331.
- **Franceschi V. & Horner H. T. (1980).** Calcium oxalate crystal in plants. *The Botanical Review* **46**, 360-427.
- **Gadd G. M. (1993).** Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist* **124**, 25-60.
- **Gadd G. M. (1999).** Fungal production of citric and oxalic acid; importance in metal physiology and biochemical processes. *Advances in microbial physiology* **41**, 47-92.
- **Gadd G. M. (2000).** Heterotrophic solubilization of metal-bearing minerals by fungi. In *Microbial interactions, anthropogenic influences, contaminated land and waste management*, pp. 57-75. Edited by Cotter-Howells J. D., Campbell L. S., Valsami-Jones E. & Batchelder M. London: The mineralogical society of Great Britain & Ireland.
- **Garvie L. A. J. (2003).** Decay-induced biomineralization of the saguaro cactus (*Carnegiea gigantea*). *Am. Min.* **88**, 1879-1888.
- **Gaskins M. H., Albrecht S. L. & Hubell D. H. (1984).** Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: a review. *Agric. Ecosyst. Environ.* **12**, 99-116.
- **Giralt S., Julià R. & Klerkx J. (2001).** Microbial Biscuits of Vaterite in Lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan). *J. Sedim. Res.* **71**, 430-435.
- **Gonzalez-Munoz M.T., Ben-Chekroun K., Ben-Aboud A., Arias J.M. & Rodriguez-Gallego M. (2000).** Bacterially induced Mg-calcite formation: role of Mg²⁺ in development of crystals morphology. *J. Sedim. Res.* **70**, 559-564.
- **Grasby S. E. (2003).** Naturally precipitating vaterite (CaCO₃) spheres: Unusual carbonates formed in an extreme environment. *Geochimica Cosmochimica Acta* **67**, 1659-1666.
- **Graustein W. C., Cromack K. & Sollins P. (1977).** Calcium oxalate: occurrence in soils and effects on the nutrient and geochemical cycles. *Science* **198**, 1252-1254.
- **Guillet B. (1993).** Recherches préliminaires sur les minéralisations de l'iroko, pp. 1-13. Orléans: CNRS - Laboratoire de Géochimie.
- **Halsall D. M. & Gibson A. H. (1989).** Nitrogenase activity of a range of diazotrophic bacteria on straw, straw breakdown product and related compounds. *Soil Biol. Biochem.* **21**, 291-298.

- **Hamelin J. (2003).** Influence d'une augmentation en pCO₂ atmosphérique sur les communautés bactériennes associées à *Molinia coerulea*. In *Laboratoire de microbiologie*, pp. 147. Neuchâtel: University of Neuchâtel.
- **Harder W., Wiermsa M. & Groen L. (1974).** Transport of substrate and energetics of growth of *Pseudomonas oxalaticus* during growth on formate or oxalate in continuous culture. *J. Gen. Micro.* **81**, ii-iii.
- **Harris C. M. (1935).** Stone in *Chlorophora excelsa* B. & H., Iroko. *Empire Forestry Journal* **12**, 238.
- **Hart H. & Conia J. M. (1995).** *Introduction à la chimie organique*. Paris: Interéditions.
- **Heywood V. H (1996).** *Les plantes à fleurs*. Paris: Nathan.
- **Hirsch P. (1984).** The genus *Hyphomicrobium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1895-1904. Edited by Bryant M.P, Pfennig N., Holt J.G. & Staley T. A. Baltimore: Lippincott-Williams & Wilkins.
- **Hofmann B. A. & Bernasconi S. M. (1998).** Review of occurrences and carbon isotope geochemistry of oxalate minerals: implications for the origin and fate of oxalate in diagenetic and hydrothermal fluids. *Chemical Geology* **149**, 127-146.
- **Hokama S., Honma Y., Toma C. & Ogawa Y. (2000).** Oxalate-degrading *Enterococcus faecalis*. *Microbiol. Immunol.* **44**, 235-240.
- **Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T. & Williams S. T. (1994).** *Bergey's manual of determinative bacteriology*. New York, London: Lippincott Williams & Wilkins.
- **Horner H. T. & Wagner B. L. (1995).** Calcium oxalate formation in higher plants. In *Calcium oxalate in biological systems*. Edited by Khan S. R. Boca Raton: CRC press.
- **Ishida M. L., Andersen P. & Breno L. (2004).** Effect of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay xylem fluid on cecropin B activity against *Xylella fastidiosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **64**, 73-81.
- **Ito H., Miura N., Masai M., Yamamoto K. & Hara T. (1996).** Reduction of oxalate content of foods by the oxalate degrading bacterium, *Eubacterium lentum* WHY-1. *Int. J. Urol.* **3**, 31-34.
- **Jayasuriya G. C. N. (1955).** The isolation and characteristics of an oxalatedecomposing organism. *J. Gen. Micro.* **12**, 419-428.
- **Jenni N., Realini M., Aragno M. & Tamer A. (1988).** Taxonomy of non H₂-lithotrophic, oxalate-oxidizing bacteria related to *Alcaligenes eutrophus*. *J. Gen. Micro.* **10**, 126-133.
- **Jenni N., Aragno M. & Wiegel K. M. (1987).** Numerical analysis and DNA-DNA hybridization studies on *Xanthobacter* and emendation of *Xanthobacter flavus*. *Syst. Appl. Microbiology* **9**, 247-253.
- **Jones D. L. (1998).** Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and soil* **205**, 25-44.
- **Kageyama A., Benno Y. & Nakase T. (1999).** Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium lentum* to the genus *Eggerthella* as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1725-1732.
- **Kanakis J. & Dalas E. (2000).** The crystallization of vaterite on fibrin. *J. Cryst. Growth* **219**, 277-282.
- **Kandler O., König H., Wiegel J. & Claus D. (1983).** Occurrence of poly- γ -glutamic acid and poly- α -glutamine in the genera *Xanthobacter*, *Flexithrix*, *Sporosarcina* and *Planococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 34-41.

- **Kellenberg E., Ryter A. & Sechard J. (1958).** Electron microscope study of DNA containing plasmids II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 671-676.
- **Kerstens K., Ludwig W., Vancanneyt M., De Vos P., Gillis M. & Schleifer K.-H. (1996).** Recent changes in the classification of Pseudomonads: an overview. *System. Appl. Microbiol.* **19**, 465-477.
- **Khambata S.R. & Bhat J.V. (1953).** Studies on a new oxalate-decomposing bacterium, *Pseudomonas oxalaticus*. *J. Bact.* **66**, 505-507.
- **Khan S. R. (1995).** *Calcium oxalate in biological systems*. Boca Raton: CRC.
- **Kitano Y. & Hood D. W. (1965).** The influence of organic material on the polymorphic crystallization of calcium carbonate. *Geochimica Cosmochimica Acta* **29**, 29-41.
- **Klein C. (2002).** *Mineral science*. New York: John Wiley and sons, inc.
- **Knutson D. M., Hutchins A. S. & Cromack K. (1980).** The association of calcium oxalate utilizing streptomyces with conifer ectomycorrhizae. *Antonie van Leeuwenhoek* **46**, 611-619.
- **Krieg N. R. & Holt J. G. (1984).** *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 986. Baltimore, London: Williams & Wilkins.
- **Krumbein W. E. (1979).** Calcification by bacteria and algae. In *Biogeochemical cycling of mineral-forming elements*, pp. 47-68. Edited by Trudinger P. A. & Swaine D. J. Amsterdam: Elsevier.
- **Labeda (1992).** The genus *Saccharothrix*. In *The Prokaryotes*, pp. 1061-1068. Edited by Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W. & Schleifer K. H. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- **Lacroix A. (1962).** *Minéralogie de France et de ses anciens territoires d'outre-mer*. Paris: Librairie scientifique et technique.
- **Lajudie P., Willems A., Nick G., Mohamed S.H., Torck U., Coopman R., Filali-Maltouf A., Kersters K., Dreyfus B., Lindström K. & Gillis M. (1999).** *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiology* **22**, 119-132.
- **Lee S. D., Kim E. S., Roe J.-H., Kim J.-H., Kang S.-O. & Hah Y. C. (2000).** *Saccharothrix violacea* sp. nov., isolated from a gold mine cave and *Saccharothrix albidocapillata* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **50**, 1315-1323.
- **Li X., Zhang D., Lynch-Holm V. J., Okita T. W. & Franceschi V. (2003).** Isolation of a crystal matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized cells. *Plant physiology* **133**, 549-559.
- **Lowenstam H. A. (1981).** Minerals formed by organisms. *Science* **211**, 1126-1131.
- **Mann S., Webb J. & Williams R. P. J. (1989).** *Biomineralization*. Weinheim: VCH.
- **Manoli F. & Dalas E. (1999).** Calcium carbonate overgrowth on elastin substrate. *J. Cryst. Growth* **204**, 369-375.
- **Manoli F. & Dalas E. (2001).** Calcium carbonate crystallization in presence of glutamic acid. *J. Cryst. Growth* **222**, 293-297.
- **McHargue J. S. & Calfee R. K. (1931).** Effect of manganese, copper and zinc on growth and metabolism of *Aspergillus flavus* and *Rhizopus nigricans*. *Botanical Gazette* **91**, 183-193.
- **McLaughlin S. B. & Wimmer R. (1999).** Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. *New phytologist* **142**, 373-417.

- **Merz M. & Zankl H. (1993).** The influence of the sheath on the precipitation of calcium carbonate by Cyanobacteria. In *Studies on fossil benthic algae* : Bull. Soc. Paleont. Ital. (special volume), pp. 325-331. Edited by Barattolo F. Roma: Soc. Paleont. Ital.
- **Meyer O., Stackebrandt E. & Auling G. (1993).** Reclassification of ubiquinone Q-10 containing carboxydrotrophic bacteria: Transfer of *Pseudomonas carboxydovorans* OM5T to *Oligotropha*, gen. nov., as *Oligotropha carboxidovorans*, comb. nov., transfer of *Alcaligenes carboxydus* DSM 1086T to *Carbophilus*, gen. nov., as *Carbophilus carboxydus*, comb. nov., transfer of *Pseudomonas compransoris* DSM 1231T to *Zavarzina*, gen. nov., as *Zavarzina compransoris*, comb. nov. and amended description of new genera. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 393-395.
- **Mitterer R. M. & Cunningham R. (1985).** The interaction of natural organic matter with grain surfaces: implications for calcium carbonate precipitation. *Spec. Publ. Soc. econ. Paleont. Mineral.* **36**, 17-31.
- **Monger H. C., Daugherty L. A., Lindemann W. C. & Lidell C.M. (1991).** Microbial precipitation of pedogenic calcite. *Geology* **19**, 997-1000.
- **Monje P. V. & Baran E. (2002).** Characterization of calcium oxalate generated as biominerals in cacti. *Plant physiology* **128**, 707-713.
- **Monje P. V. & Baran E. (2004).** Complex biomineralization pattern in cactaceae. *J. Plant Physiol.* **161**, 121-123.
- **Morris S. J. & Allen M. F. (1994).** Oxalate-metabolizing microorganisms in sagebrush steppe soil. *Biol. Fertil. Soils* **18**, 255-259.
- **Muller H. (1950).** Oxalsäure als kohlenstoffquelle für microorganismen. *Arch. Microbiol.* **15**, 137-148.
- **Naasema A., Mary S, & Selvam G. S. (1998).** Isolation and characterization of oxalate degrading bacteria from marine and terrestrial environments of Cochin. *J. Sci. Ind. Res.* **57**, 795-799.
- **Nagy M. L., Souther E., Perez A. & Garcia-Pichel F. (2004).** Prokaryotic diversity in typical, pristine biological soil crust from the Sonoran Desert. In *Microbial planet: subsurface to space (ISME-10)*. Cancun, Mexico, August 22-27, 2004.
- **Newman B. D., Campbell A. R., Norman D. I. & Ringelberg D. B. (1997).** A model for microbially induced precipitation of vadose-zone calcites in fractures at Los Alamos, New Mexico, USA. *Geochimica Cosmochimica Acta* **61**, 1783-1792.
- **O'Neil M. J., Smith A., Heckelman P. E., Obenchain J. R., Gallipeau J. A. R., D'Arecca M. A. & Budavari S. (2001).** *The Merck Index*. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co.
- **Paleroni N. J. (1984).** The genus *Burkholderia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 311-321. Edited by Krieg N. R., & Holt J. G. Baltimore: Lippincott-Williams & Wilkins.
- **Pansu M. & Gautheyrou J. (2003).** *L'analyse du sol: minéralogique organique et minérale*. Paris: Springer.
- **Park M., Kim C., Yang J., Lee H., Shin W., Kim S. & Sa T. (2005).** Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. res.* **160**, 127-133.
- **Parraga J., Rivadeneyra M. A., Delgado R., Iñiguez J., Soriano M. & Delgado G. (1998).** Study of biomineral formation by bacteria from soil solution equilibria. *Reactive and Functional Polymers* **26**, 265-271.
- **Peinado M., Alcaraz F. & Martinez-Parras J.-M. (1992).** *Vegetation of southern Spain*. Berlin: Cramer.

- **Pentecost A. & Terry C. (1988).** Inability to demonstrate calcite precipitation by bacterial isolate from travertine. *Geomicrobiology journal* **6**, 185-194.
- **Phoenix V. R., Martinez R. E., Konhauser K. O. & Ferris F. G. (2002).** Characterization and implications of the cell surface reactivity of *Calothrix* sp. strain KC97. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4827-4834.
- **Pobeguïn T. (1943).** Les oxalates de calcium chez quelques angiospermes; étude physico-chimique, formation, destin. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique* **IV**, 1-95.
- **Postgate J. R. (1963).** A strain of *Desulfovibro* able to use oxamate. *Arch. Microbiol.* **46**, 287-295.
- **Prentice I. C., Farquhar G. D., Fasham M. J. R., Goulden M. L., Heimann M., Jaramillo V. J., Kheshgi H. S., Le Quere C., Scholes R. J., & Wallace D. W. R. (2001).** The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide. In *Climate change 2001: the scientific basis Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, pp. pp 183-237. Edited by Houghton J. T., Ding Y., Griggs D. J., Noguer M., Linden P J., Dai X., Maskell K. & J. C. A. Cambridge: Cambridge University Press,.
- **Prescott L. F., Harley J. P & Klein D. A. (1995).** *Microbiologie*. Bruxelles: DeBoeck Université.
- **Prychid C. J. & Rudall P. (1999).** Calcium oxalate crystals in monocotyledons : a review of their structure and systematics. *Annals of Botany* **84**, 725-739.
- **Reid R. P., Visscher P. T., Decho A. W., Stolz J. F., Bebout B. M., Dupraz C., Macintyre I. G., Pearl H. W., Pinckney J. L., Prufert-Bebout L., Steppe T. F. & DesMarais D. J. (2000).** The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites. *Nature* **406**, 991-992.
- **Retallack G. J. (1990).** *Soils of the past: an introduction to paleopedology*. London: Unwin-Hyman.
- **Rivadeneira M. A., Delgado G., Ramos-Cormenzana A. & Delgado R. (1998).** Biomineralization of carbonates by *Halomonas eurihalina* in solid and liquid media with different salinities: crystal formation sequence. *Res. Microbiol.* **149**, 277-287.
- **Rivadeneira M. A., Delgado R., del Moral A., Ferrer M. R. & Ramos-Cormenzana A. (1994).** Precipitation of calcium carbonate by *Vibrio* spp. from an inland saltern. *FEMS Microbial Ecology* **13**, 1997-1204.
- **Rivadeneira M. A., Parraga J., Delgado R., Ramos-Cormenzana A. & Delgado G. (2004).** Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. *FEMS Microbial Ecology* **48**, 39-46.
- **Rivadeneira M. A., Ramos-Cormenzana A., Delgado G. & Delgado R. (1996).** Process of carbonate precipitation by *Deleya halophila*. *Current Microbiology* **32**, 308-313.
- **Robbel L. & Kutzner H. J. (1973).** *Streptomyces* taxonomy: Utilization of organic acids as an aid in the identification of species. *Naturwissenschaften* **60**, 351-352.
- **Robert D. & Roland J.-C. (1989).** *Biologie végétale*. Paris. Dunod
- **Roesti D. (2005).** Bacterial community associated with the rhizosphere of wheat: interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and selection of plant growth promoting rhizobacteria for increase of wheat growth and soil health in Indian marginal rainfed fields. In *Laboratoire de microbiologie*, pp. 206. Neuchâtel: University of Neuchâtel.
- **Ruiz N., Ward D. & Saltz D. (2002).** Calcium oxalate crystals in leaves of *Pancratium sickenberg-eri*: constitutive or induced defense ? *Functional Ecology* **16**, 99-105.

- **Sahin N. (2001).** Isolation characterization and phylogenetic analysis of some new oxalotrophic bacteria. Izmir, Turkey: Dokuz Eylul University.
- **Sahin N. (2003).** Oxalotrophic bacteria. *Res. Microbiol.* **154**, 399-407.
- **Sahin N. (2004).** Isolation and characterization of mesophilic, oxalate-degrading *Streptomyces* from plant rhizosphere and forest soils. *Naturwissenschaften* **91**, 498-502.
- **Sahin N., Isik K., Tamer A. & Goodfellow M. (2000).** Taxonomic position of "*Pseudomonas oxalaticus*" strain Ox1T (DSM 1105T) (Khambata and Bhat, 1953) and its description in the genus *Ralstonia* as *Ralstonia oxalatica* comb. nov. *System. Appl. Microbiol.* **23**, 206-209.
- **Sanchez-Moral S., Cañaveras J. C., Laiz L., Saiz-Jimenez C., Bedoya J. & Luque L. (2003).** Bio-mediated precipitation of calcium carbonate metastable phases in hypogean environments: a short review. *Geomicrobiology journal* **20**, 491-500.
- **Satabié B. (1985).** *Flore du Cameroun*. Yaoundé: Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique.
- **Schidlowski M. (2000).** Carbon isotopes and microbial sediments. In *Microbial sediments*, pp. 84-95. Edited by Riding R. E. & Awramick S. M. Heidelberg: Springer Verlag.
- **Schneider A. (1901).** The probable function of calcium oxalate crystals in plants. *Botanical Gazette* **32**, 142-144.
- **Smith R. L. & Oremland R. S. (1983).** Anaerobic oxalate degradation: widespread natural occurrence in aquatic sediments. *Arch. Microbiol.* **141**, 8-13.
- **Smith R. L., Strohmaier F. E. & Oremland R. S. (1985).** Isolation of anaerobic oxalate-degrading bacteria from freshwater lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 106-113.
- **Spichiger R.-E., Savolainen V. V., Figeat M. & Jeanmonod D. (2002).** *Botanique systématique des plantes à fleurs*. Lausanne: Presse Polytechnique et Universitaires Romandes.
- **Sterling C. (1964).** Crystal structure of Weddellite. *Science* **146**, 518-519.
- **Sterling C. (1964).** Crystal structure analysis of weddellite $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot (2+X)\text{H}_2\text{O}$. *Acta Cryst.* **18**, 917.
- **Stumm W. & Morgan J. J. (1996).** *Aquatic chemistry*. New York: John Wiley & sons, INC.
- **Sutherland I. A. (2001).** The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *TIM* **9**, 222-227.
- **Sutherland I. A. (2001).** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3-9.
- **Sutherland I. A. (2001).** Exopolysaccharides in biofilms, floc and related structures. *Water Science and Technology* **43**, 77-86.
- **Tamer A. & Aragno M. (1980).** Isolement, caractérisation et essai d'identification de bactéries capables d'utiliser l'oxalate comme seule source de carbone et d'énergie. *Bull. Soc. Ne. Sc. Nat.* **103**, 91-104.
- **Tamer A., Aragno M., & Sahin N. (2002).** Isolation and characterization of a new type of aerobic, oxalic acid utilizing bacteria, and proposal of *Oxalicibacterium flavum* gen. nov., sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 513-519.
- **Tan Z. Y., Wang E. T., Peng G. X., Zhu M. E., Martinez-Romero E. & Chen W. X. (1999).** Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. *Int. J. Syst. Bacteriol* **49**, 1457-1469.

- **Tani M. & Higashi T. (1999).** Vertical distribution of low molecular weight aliphatic carboxylic acids in some forest soils of Japan. *European Journal of Soil Science* **50**, 217-226.
- **Tazzoli V. & Domaneghetti C. (1980).** The crystal structure of whewellite and weddellite: re-examination and comparison. *Am. Min.* **65**, 327-334.
- **Trichet J., Défarge C., Tribble J., Tribble G. & Sansone F. (2001).** Christmas Island lagoonal lakes, models for the deposition of carbonate-evaporite-organic laminated sediments. *Sedimentary Geology* **140**, 177-189.
- **Tucker M. E. & Wright V. P. (1992).** *Carbonate sedimentology*. London: Blackwell Science.
- **van Hees P. A. W., Jones D. L. & Godbold D. L. (2002).** Biodegradation of low molecular weight organic acids in coniferous forest podzolic soils. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 1261-1272.
- **van Hees P. A. W., Vinogradoff S. I., Edwards A. C., Godbold D. L. & Jones D. (2003).** Low molecular weight organic acid adsorption in forest soils: effects on soil solution concentrations and biodegradation rates. *Soil Biol. Biochem.* **35**, 1015-1026.
- **Verrecchia E. P. (1990).** Litho-diagenetic implications of the calcium oxalate-carbonate biogeochemical cycle in semiarid calcretes, Nazareth, Israel. *Geomicrobiology journal* **8**, 87-99.
- **Verrecchia E. P. (2000).** Fungi and Sediments. In *Microbial Sediments*. Edited by Riding R. E. and Awramick S. M.: Springer-Verlag.
- **Verrecchia E. P. (2002).** Géodynamique du carbonate de calcium à la surface des continents. In *Géologie de la préhistoire: méthodes, techniques, applications*, pp. 235-259. Edited by Miskovski. J. C. Paris: Société Géologique de France.
- **Verrecchia E. P., Freydet P., Verrecchia K. E. & Dumont J.-L. (1995).** Spherulite in calcrete laminar crusts: biogenic CaCO₃ precipitation as major contributor to crust formation. *J. Sedim. Research.* **A65**, 690-700.
- **Verrecchia E. P. & Verrecchia K. E. (1994).** Needle fiber calcite: a critical review and a proposed classification. *J. Sedim. Res.* **A4**, 650-664.
- **Visscher P. T. & Stolz J. F. (2005).** Microbial mats as bioreactors: populations, processes and products. *Palaeo* **219**, 87-100.
- **Warthmann R., van Lith Y., Vasconcelos C., McKenzie J. A. & Karpoff A. M. (2000).** Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments. *Geology* **28**, 1091-1094.
- **Wayne L. G. & Kubica G.P. (1986).** The genus *Mycobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1436-1457. Edited by Krieg N. R., & Holt J. G. Baltimore: Lippincott-Williams & Wilkins.
- **Weber O.B., Baldani V. L. D., Teixeira K. R. S., Kirchhof G., Baldani J.I. & Dobereiner J. (1999).** Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil* **210**, 103-113.
- **Weiner S. & Dove P. M. (2003).** Overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. In *Biomineralization*, pp. 1-29. Edited by Dove P. M., De yoreo J. J. & Weiner S. Washington D.C.: Mineralogical Society of America.
- **Wiegel J. (1991).** The genus *Xanthobacter*. In *The Prokaryotes*, pp. 2365-2383. Edited by Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W. & Schleifer K. H. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- **Wilson M. J., Jones D. & Russell J. D. (1980).** Glushinskite, a naturally occurring magnesium oxalate. *Miner. Mag.* **43**, 837-840.

- **Wollast R. (1971).** Kinetic aspects of the nucleation and growth of calcite from aqueous solutions. In *Carbonate Cements*, pp. 264-273. Edited by Bricker. PO. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- **Zaitsev G. M., Tsitko I. V., Rainey F. A., Trotsenko Y. A., Uotila J. S., Stackebrandt E. & Salkinoja-Salonen M. S. (1998).** New aerobic ammoniumdependent obligately oxalotrophic bacteria: Description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov. sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol* **48**, 151-163.
- **Zolg W. & Ottow J. C. G. (1975).** *Pseudomonas glathei* sp. nov., a new nitrogenscavenging rod isolated from acid lateritic relicts in Germany. *Z. Allg. Mikrobiol.* **15**, 287-299.

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate

Annex 1: List of oxalate containing plants

Ordre des Ginkgoales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo</i>	<i>biloba</i>	Ca-oxalate	Horner and Wagner 1995
Pinaceae	<i>Abies</i>	sp	Ca-oxalate	Horner and Wagner 1995
	<i>Tsuga</i>	sp	Ca-oxalate	Horner and Wagner 1995
Taxaceae	<i>Taxus</i>		Ca-oxalate	Pobeguïn 1943

Ordre des Hydrocharitales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Hydrocharitaceae	<i>Elodea</i>	<i>canadensis</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Elodea</i>	<i>densa</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943

Ordre des Arecales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Arecaceae	<i>Jubaeopsis</i>	<i>caffra</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Caryota</i>	sp	Ca-oxalate	California Poison Control System

Ordre des Arales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Araceae	<i>Pistia</i>	<i>startoties</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Anthurium</i>	sp	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Arum</i>	sp	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Caladium</i>	<i>bicolor</i>	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Zanthedeschia</i>	<i>aethiopica</i>	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Aglaonema</i>	sp	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Diffenbachia</i>	sp	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Colocasia</i>	sp	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Colocasia</i>	<i>esculenta</i>	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Alocasia</i>	sp	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Xanthosoma</i>	sp	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Syngonium</i>	sp	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Philodendron</i>	spp	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Epipremnum</i>	<i>aureum</i>	Ca-oxalate	California Poison Control System
	<i>Monstera</i>	<i>deliciosa</i>	Ca-oxalate	California Poison Control System

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Arales (suite)

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Lemnaceae	<i>Lemna</i>	<i>aequinoctalis</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Lemna</i>	sp	Ca-oxalate	Horner and Wagner 1995
	<i>Spirodela</i>	<i>punctata</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994

Ordre des Commelinales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Commelinaceae	<i>Zebrina</i>	<i>pendula</i>	Ca-oxalate 3H ₂ O	Pobeguïn 1943
	<i>Rhoeo</i>	sp	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Tradescantia</i>	<i>virginica</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943

Ordre des Cyperales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Poaceae	<i>Setaria</i>	<i>anceps</i>	Ca-oxalate	Tokarnia et al. 2002

Ordre des Typhales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Thyphaceae	<i>Typha</i>	<i>spp</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Sparganiaceae	<i>Sparaganium</i>	<i>fallax</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994

Ordre des Arales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Musaceae	<i>Ravenala</i>	<i>spp</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Zingiberaceae	<i>Hedychium</i>	<i>gardnerianum</i>	Whewellite	Frey - Wyssling 1981
	<i>Elettaria</i>	<i>cardamomum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Orchidales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Orchidaceae	<i>Vanilla</i>	<i>planifolia</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Aspasia</i>		Ca-oxalate	Pobeguïn 1943

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Liliales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Liliaceae	<i>Allium</i>	<i>cepa</i>	Weddelite	Frey - Wyssling 1981
	<i>Allium</i>	<i>sativum</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Allium</i>	<i>ursinum</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Allium</i>	<i>schoenoprasum</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Allium</i>	<i>oleraceum</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Allium</i>	<i>sphaerocephalum</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Colchicum</i>	sp	Ca-oxalate	Schneider 1901
	<i>Colchicum</i>	<i>autumnale</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Ornithogalum</i>	<i>caudatum</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Aspidistra</i>	<i>elatior</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Hosta (Funkia)</i>	sp.	Whewellite	Pobeguïn 1943
	<i>Polygonatum</i>	<i>vulgare</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Hemerocallis</i>	<i>fulva</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Asparagus</i>	sp	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Hyacinthus</i>	<i>orientalis</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
Amaryllidaceae	<i>Pancratium</i>	<i>sickenbergeri</i>	Ca-oxalate	Ruiz et al 2002
	<i>Agapanthus</i>	<i>umbellatus</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
Iridaceae	<i>Iris</i>	<i>pseudacarus</i>	Ca-oxalate	Frey - Wyssling 1981
	<i>Iris</i>	<i>germanica</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Iris</i>	<i>pallida</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Montbretia</i>	sp	Whewellite	Pobeguïn 1943
Agavaceae	<i>Agave</i>	<i>amricana</i>	Ca-oxalate	Frey - Wyssling 1981
	<i>Dracaena</i>	<i>sanderian</i>	Ca-oxalate	Pennisi et al 2001
	<i>Dracaena</i>	<i>fragrans</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Yucca</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Philydraceae	<i>Philydrum</i>	<i>lanuginosum</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
Pontederiaceae	<i>Eichornia</i>	<i>crassipes</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Monochoria</i>	<i>vaginalis</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Monochoria</i>	sp	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Pontederia</i>	sp	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea</i>	<i>transversa</i>	Whewellite	Pobeguïn 1943

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Magnoliales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Magnoliaceae	<i>Magnolia</i>	<i>spp</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Illicium</i>	<i>spp</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Myristicaceae	<i>Myristica</i>	<i>fragrans</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Myristica</i>	<i>surinamensis</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Pycnanthus</i>	<i>kombo</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Virola</i>	<i>spp</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Ranunculales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Ranunculaceae	<i>Helleborus</i>	<i>foetidus</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Paeonia</i>	<i>spp</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Berberidiaceae	<i>Berberis</i>	<i>vulgaris</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Nymphaeales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Nymphaeaceae	<i>Euryale</i>	<i>ferox</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Nelumbo</i>	<i>lutea</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Nelumbo</i>	<i>nucifera</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Nuphar</i>	<i>shimadai</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Nymphaea</i>	<i>lotus</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Nymphaea</i>	<i>mexicana</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Nymphaea</i>	tetragona	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Nymphaea</i>	<i>sp</i>	Ca-oxalate	Horner and Wagner 1995
	<i>Victoria</i>	<i>cruziana</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994

Ordre des Piperales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Piperaceae	<i>Peperomia</i>	<i>sp</i>	Ca-oxalate	Franceschi 2001

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Papaverales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Papaveraceae	<i>Argemone</i>	<i>mexicana</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Glaucium</i>	<i>luteum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Papaver</i>	<i>somniferum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Hammamelidales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Hamamelidaceae	<i>Distylium</i>	<i>racemosum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Hamamelis</i>	<i>mollis</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Hamamelis</i>	<i>virginiana</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Liquidambar</i>	<i>styraciflua</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Parrotia</i>	<i>persica</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Sinowilsonia</i>	<i>henryi</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Urticales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Ulmaceae	<i>Ulmus</i>	<i>suberosa</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Ulmus</i>	<i>spp</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Moraceae	<i>Milicia</i>	<i>excelsa</i>	Whewellite	This work, Pobeguïn 1943

Ordre des Urticales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Fagaceae	<i>Quercus</i>	<i>sp</i>	Ca-oxalate	Schneider 1901
	<i>Fagus</i>	<i>sybatica</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Fagus</i>	<i>ferruginea</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Betulaceae	<i>Corylus</i>	<i>avellana</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Corylus</i>	<i>spp</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Theales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Caryocaraceae	<i>Caryocar</i>	<i>nuciferum</i>	Whewellite	Frey - Wyssling 1981

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Caryophyllales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Cactaceae	<i>Carnegia (Cereus)</i>	<i>gigantea</i>	Whewellite and Wedd	Garvie 2002
	<i>Opuntia</i>	<i>cochenillifera</i>	Whewellite	Pobeguín 1943
	<i>Opuntia</i>	<i>longispina</i>	Whewellite	Monje and Baran 2002
	<i>Opuntia</i>	<i>microdasys</i>	Whewellite	Monje and Baran 2002
	<i>Opuntia</i>	<i>penicilligera</i>	Whewellite	Monje and Baran 2002
	<i>Opuntia</i>	<i>aurantiaca</i>	Whewellite	Monje and Baran 2002
	<i>Opuntia</i>	<i>imbricata</i>	Whewellite	Rivera and Smith 1979
	<i>Opuntia</i>	<i>englemannii</i>	Whewellite	Rivera and Smith 1979
	<i>Echinomastus</i>	<i>intertextus</i>	Whewellite	Rivera and Smith 1979
	<i>Escobaria</i>	<i>tuberculosa</i>	Whewellite	Rivera and Smith 1979
	<i>Echinocactus</i>	<i>horizonthalonius</i>	Whewellite	Rivera and Smith 1979
	<i>Puna</i>	<i>clavarioides</i>	Whewellite	Monje and Baran 2002
	<i>Tephrocactus</i>	<i>articulatus</i>	Whewellite	Monje and Baran 2002
	<i>Maihueniopsis</i>	<i>glomerata</i>	Whewellite	Monje and Baran 2002
	<i>Echinocereus</i>	<i>berlandieri</i>	Whewellite	Pobeguín 1943
	<i>Phyllocactus</i>	sp.	Whewellite	Pobeguín 1943
	<i>Cactus</i>	<i>senilis</i>	Ca-oxalate	Robert and Roland 1989
	<i>Chamacereus</i>	<i>silvestrii</i>	Weddellite	Monje and Baran 2002
	<i>Cleistocactus</i>	<i>baumanii</i>	Weddellite	Monje and Baran 2002
	<i>Gymnocalycium</i>	<i>cytianum</i>	Weddellite	Monje and Baran 2002
	<i>Gymnocalycium</i>	<i>platense</i>	Weddellite	Monje and Baran 2002
	<i>Rebutia</i>	<i>margarethae</i>	Weddellite	Monje and Baran 2002
	<i>Pyrrhocactus</i>	<i>strausianus</i>	Weddellite	Monje and Baran 2002
<i>Wigginsia</i>	<i>tephracantha</i>	Weddellite	Monje and Baran 2002	
Chenopodiaceae	<i>Anabasis</i>	<i>articulata</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Anabasis</i>	<i>arvensis</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Chenopodium</i>	<i>album</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Beta</i>	<i>vulgaris</i>	Ca-oxalate	Horner and Wagner 1995
Caryophyllaceae	<i>Lychmis</i>	<i>dioica</i>	Ca-oxalate	Pobeguín 1943
	<i>Dianthus</i>	<i>caryophyllus</i>	Ca-oxalate	Pobeguín 1943
Aizoaceae	<i>Mesembryanthemum</i>	sp.	Ca-oxalate	Pobeguín 1943
Nyctaginaceae	<i>Pisonia</i>	<i>nitida</i>	Ca-oxalate	Pobeguín 1943

Ordre des Capparales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Brassicaceae	<i>Barbarea</i>	<i>vulgaris</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Polygonales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Polygonaceae	<i>Polygonum</i>	<i>hydropiper</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Rumex</i>	<i>nervosus</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Rumex</i>	sp	Ca-oxalate	Schneider 1901
	<i>Rheum</i>	sp	Ca-oxalate	Schneider 1901
	<i>Rheum</i>	<i>rhabarbatum</i>	Ca-oxalate	California Poison Control System

Ordre des Malvales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Tiliaceae	<i>Corchorus</i>	<i>pilobolus</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Tilia</i>	<i>argentea</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Tilia</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Sterculiaceae	<i>Theobroma</i>	<i>cacao</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Bombacaceae	<i>Adansonia</i>	<i>digitata</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Bombax</i>	<i>malabaricum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Ceiba</i>	<i>petandra</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Eriodendron</i>	<i>anfractuosum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Malvaceae	<i>Sida</i>	<i>rhombifolia</i>	Ca-oxalate	Molano-Flores 2001
	<i>Gossypium</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Hibiscus</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Hibiscus</i>	<i>esculentus</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Salicales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Salicaceae	<i>Salix</i>	sp	Ca-oxalate	Schneider 1901
	<i>Populus</i>	sp	Ca-oxalate	Schneider 1901

Ordre des Primulales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Primulaceae	<i>Anagallis</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Cyclamen</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Violales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Caricaceae	<i>Carica</i>	<i>papaya</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Cucurbitaceae	<i>Citrullus</i>	<i>colocynthis</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
Flacourtiaceae	<i>Hydnocarpus</i>	<i>laurifolia</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Taraktogenos</i>	<i>kurzii</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Loasaceae	<i>Blumenbachia</i>	<i>hieronymi</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Begoniaceae	<i>Begonia</i>	sp	Weddelite	Frey - Wyssling 1981
	<i>Begonia</i>	<i>viaudii</i>	Ca-oxalate	Pobeguain 1943

Ordre des Rosales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Rosaceae	<i>Quillaja</i>	sp	Ca-oxalate	Schneider 1901
	<i>Prunus</i>	<i>salicina</i>	Ca-oxalate	Sanchez-Alonso and Lachica 1988
	<i>Prunus</i>	<i>avium</i>	Ca-oxalate	Sanchez-Alonso and Lachica 1988
	<i>Prunus</i>	<i>amygdalus</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Pyrus</i>	<i>malus</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Kerria</i>	sp.	Ca-oxalate	Pobeguain 1943
Saxifragaceae	<i>Ribes</i>	<i>rubrum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Ribes</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Arisaena</i>	<i>triphylllum</i>	Ca-oxalate	California Poison Control System

Ordre des Cornales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Cornaceae	<i>Aucuba</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Celestrales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Celastraceae	<i>Celastrus</i>	<i>paniculatus</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Fabales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Mimosaceae	<i>Mimosa</i>	<i>pubica</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Fabaceae	<i>Medicago</i>	<i>truncata</i>	Ca-oxalate	Mc Conn and Nakata 2002
	<i>Phaseolus</i>	<i>vulgaris</i>	Ca-oxalate	Barnabas and Arnott 1990
	<i>Phaseolus</i>	<i>multiformis</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Canavalia</i>	<i>ensiformis</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Glycine</i>	<i>max</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Glycine</i>	<i>gracilis</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Cercidium</i>	<i>floridum</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Cercis</i>	<i>canadensis</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Cercis</i>	<i>siliquastrum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Dolichos</i>	<i>biflorus</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Lupinus</i>	<i>luteus</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Acacia</i>	<i>mellifera</i>	Ca-oxalate	Gourlay and Grimes 1994
	<i>Acacia</i>	<i>karoo</i>	Ca-oxalate	Gourlay and Grimes 1994
	<i>Acacia</i>	<i>nilotica</i>	Ca-oxalate	Gourlay and Grimes 1994
	<i>Acacia</i>	<i>albida</i>	Ca-oxalate	Gourlay and Grimes 1994
	<i>Acacia</i>	<i>tortilis</i>	Ca-oxalate	Gourlay and Grimes 1994
	<i>Canavalia</i>	sp	Ca-oxalate	Horner and Wagner 1995

Ordre des Myrtales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i>	<i>erythrocorys</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Eucalyptus</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Trapaceae	<i>Trapa</i>	<i>bispinosa</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
Onagraceae	<i>Ludwigia</i>	<i>adscendens</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Ludwigia</i>	<i>octovalvis</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Oenothera</i>	<i>biennis</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Oenothera</i>	<i>Lamarckiana</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
	<i>Clarkia</i>	<i>elegans</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
Combretaceae	<i>Terminalia</i>	<i>catappa</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Lythraceae	<i>Rotala</i>	<i>hippuris</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Rotala</i>	<i>indica</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Rotala</i>	<i>rotundifolia</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Rotala</i>	<i>wallichii</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Euphorbiales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Buxaceae	<i>Simmondsia</i>	<i>chinensis</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
Euphorbiaceae	<i>Claoxylon</i>		Ca-oxalate	Franceschi 2001
	<i>Euphorbia</i>	<i>peplis</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Ricinus</i>	<i>communis</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Tragia</i>	<i>ramosa</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Tragia</i>	<i>saxicola</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Aleurites</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Croton</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Tigllium</i>	<i>officinale</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Bracharia</i>	<i>humidicola</i>	Ca-oxalate	Tokarnia et al. 2002

Ordre des Sapindales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Hippocastanaceae	<i>Aesculus</i>	<i>hypocastanum</i>	Whewellite	Frey - Wyssling 1981
Anacardiaceae	<i>Rhus</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Aceraceae	<i>Acer</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Rutaceae	<i>Citrus</i>	<i>medica</i>	Whewellite	Frey - Wyssling 1981
	<i>Citrus</i>	<i>aurantium</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Citrus</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Zygophyllaceae*	<i>Balanites</i>	<i>aegyptia</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Meliaceae	<i>Amoora</i>	<i>rohituka</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Trichillia</i>	<i>emetica</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Sapindaceae	<i>Cardiospermum</i>	<i>halicacabum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Staphyleaceae	<i>Staphylea</i>	<i>pinnata</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Rhamnales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Vitaceae	<i>Cissus</i>	<i>antartica</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Vitis</i>	<i>vinifera</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Parthenocissus</i>	sp	Ca-oxalate	California Poison Control System

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Geraniales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Oxalidaceae	<i>Oxalis</i>	<i>corniculata</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Oxalis</i>	<i>stricta</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Oxalis</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Geraniaceae	<i>Geranium</i>	<i>robertianum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Geranium</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Apiales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Araliaceae	<i>Hedera</i>	<i>helix</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943
Apiaceae	<i>Ammi</i>	<i>majus</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Aethusa</i>	<i>cynapium</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Anethum</i>	<i>graveolens</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Anthriscus</i>	<i>cerefolium</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Apium</i>	<i>graveolens</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Carum</i>	<i>carvi</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Coriandrum</i>	<i>sativum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Daucus</i>	<i>carota</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Foeniculum</i>	<i>vulgare</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Pastinaca</i>	<i>sativa</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Petroselinum</i>	<i>sativum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Pimpinella</i>	<i>anisum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Santanales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Loranthaceae	<i>Loranthus</i>	<i>sp</i>	Ca-oxalate	Pobeguïn 1943

Ordre des Gentianales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Apocynaceae	<i>Nerium</i>	<i>oleander</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
Asclepiadaceae	<i>Calotropis</i>	<i>procera</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Pergularia</i>	<i>tomentosa</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Polygalales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Polygalaceae	<i>Polygala</i>	<i>butyracea</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Proteales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Proteaceae	<i>Macadamia</i>	<i>ternifolia</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Haloragales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Haloragidaceae	<i>Myriophyllum</i>	<i>sp</i>	Ca-oxalate	Pobeguain 1943

Ordre des Solanales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Solanaceae	<i>Datura</i>	<i>stramonium</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Hyoscyamus</i>	<i>muticus</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Solanum</i>	<i>nigrum</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Solanum</i>	<i>dulcamara</i>	Ca-oxalate	Schneider 1901
	<i>Withania</i>	<i>somnifera</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991
	<i>Capsicum</i>	<i>annuum</i>	Ca-oxalate	Horner and Wagner 1992
	<i>Atropa</i>	<i>belladonna</i>	Ca-oxalate	Schneider 1901
	<i>Physalis</i>	<i>sp</i>	Ca-oxalate	Schneider 1901
	<i>Nicotiana</i>	<i>sp</i>	Ca-oxalate	Horner and Wagner 1995
	<i>Lycopersicon</i>	<i>esculentum</i>	Ca-oxalate	Bouropoulos et al. 2001
Convolvulaceae	<i>Convolvulus</i>	<i>arvensis</i>	Ca-oxalate	Doaigey 1991

Ordre des Scrophulariales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Oleaceae	<i>Olea</i>	<i>europaea</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
Scrophulariaceae	<i>Linnophila</i>	<i>aromatica</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Linnophila</i>	<i>indica</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Linnophila</i>	<i>sessiliflora</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994
	<i>Linnophila</i>	<i>sp</i>	Ca-oxalate	Kuo-Huang et al 1994

Annexe 1: Liste des plantes contenant de l'oxalate (suite)

Annex 1: List of oxalate containing plants (continued)

Ordre des Lamiales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Pedaliaceae	<i>Sesamum</i>	<i>indicum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Sesamum</i>	<i>radiatum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Rubiales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Rubiaceae	<i>Coffea</i>	spp	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Psychotria</i>	sp	Ca-oxalate	Horner and Wagner 1995

Ordre des Dipsacales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Caprifoliaceae	<i>Sambucus</i>	<i>nigra</i>	Whewellite	Pobeguain 1943
Dipsacaceae	<i>Cephalaria</i>	<i>procera</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

Ordre des Asterales

Famille	Genre	espèce	type d'oxalate	référence
Asteraceae	<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>	Ca-oxalate	Franceschi and Horner 1980
	<i>Centaurea</i>	<i>jacea</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Scorzonera</i>	<i>hispanica</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Silybum</i>	<i>marianum</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982
	<i>Tragopogon</i>	<i>major</i>	Ca-oxalate	Webb and Arnott 1982

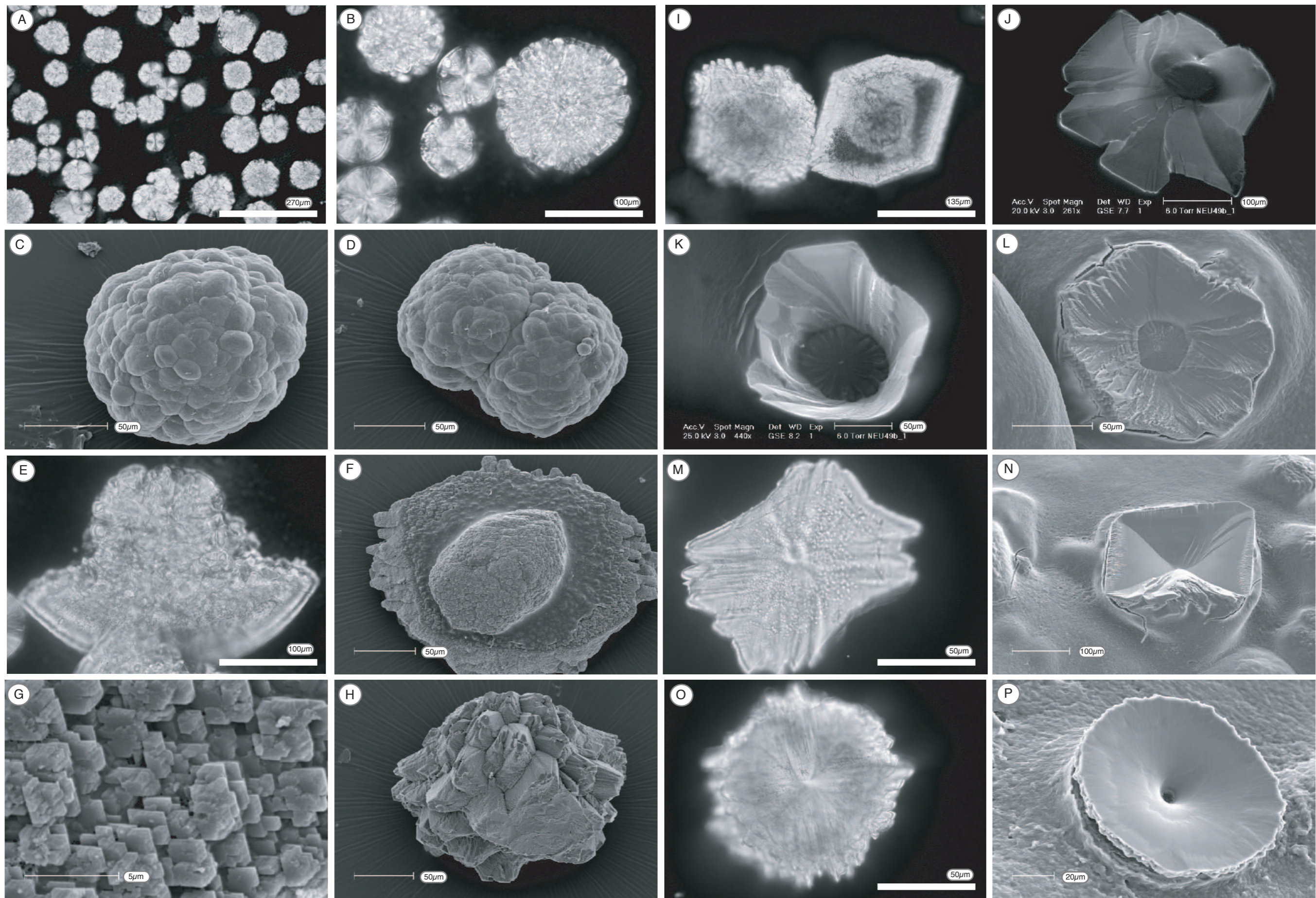


FIG. 55.—Morphologie des cristaux obtenus en culture A–H, *Xanthobacter autotrophicus*; I–P, *Ralstonia entrophia*. A) Vue générale des sphérulites de vatérite. B) Détail de A montrant l'arrangement des monocristaux. Les sphères montrant une croix noire sont constituées de cristaux en aiguilles alors que les autres sont formées d'agrégats de petits cristaux. C, D) Vue au microscope électronique à balayage (MEB) de sphérulites simples (C) et coalescentes (D). La surface de ces sphérulites montre une topographie mamelonnée. E, F) Morphologie en "oeuf au plat". Ces agrégats sont constitués de deux parties. Une partie supérieure calcitique aplatie et une partie centrale vatéritique en hémisphère. G) Détail de la partie hémisphérique montrant de petits hexagones de vatérite. H) Rhomboédres de calcite formant un agrégats imparfait I) Rhomboédre automorphe à sub-automorphe. Lumière polarisée. J) Fleur de calcite formée de cristaux sparitiques aplatis (MEB) K) Partie centrale d'une fleur de calcite montrant une structure spiralée (MEB). L) Vue au MEB d'une fleur de calcite dont les pétales sont formés par des cristaux palissadiques fins. M) Vue en lumière polarisée d'un agrégat formé de 4 cristaux en trainagle joints par les pointes et formant une "croix de Malte". N) Vue au MEB d'un cristal similaire à celui montré en M. O, P) Vue en lumière polarisée et au microscope électronique à balayage de cristaux en entonnoirs.

FIG. 55.—Morphology of crystals obtained during bacterial growth. A–H, *Xanthobacter autotrophicus*; I–P, *Ralstonia entrophia*. A) General view of vaterite spherulites in cross-polarized light (XPL). B) Close-up of part A showing two different crystal arrangements. Spheres showing a black cross are constituted by needles, whereas other spheres are formed by clusters of small monocystals. C, D) Scanning electron microscope (SEM) view of individual (C) and coalescent (D) vaterite spherulites. The surface of the sphere is not smooth and shows a mammillated rough topography. E, F) "Fried egg" morphology of accessory crystals. These clusters are constituted by two parts, a calcitic bottom part having a lens- to plate-shape and a central hemispherical upper part constituted by vaterite crystals of various sizes. G) Detail of the hemispherical part showing small hexagons of vaterite. H) Imbricated rhombohedra forming imperfect spherical calcite clusters. I) Subhedral to euhedral rhombohedra. XPL view. J) ESEM view of a calcite flower formed by flat sparitic crystals. K) SEM view of the heart of a calcite flower constituted by crystals forming a spiral-like structure. L) SEM view of a calcite flower with petals formed by thin palissadic crystals. M) XPL view of a calcite cluster constituted by four triangular-shaped crystals joined at their tip to form a thickened Maltese cross. N) SEM view of a similar crystal shown in part M. O, P) XPL and SEM view of funnel-like crystals

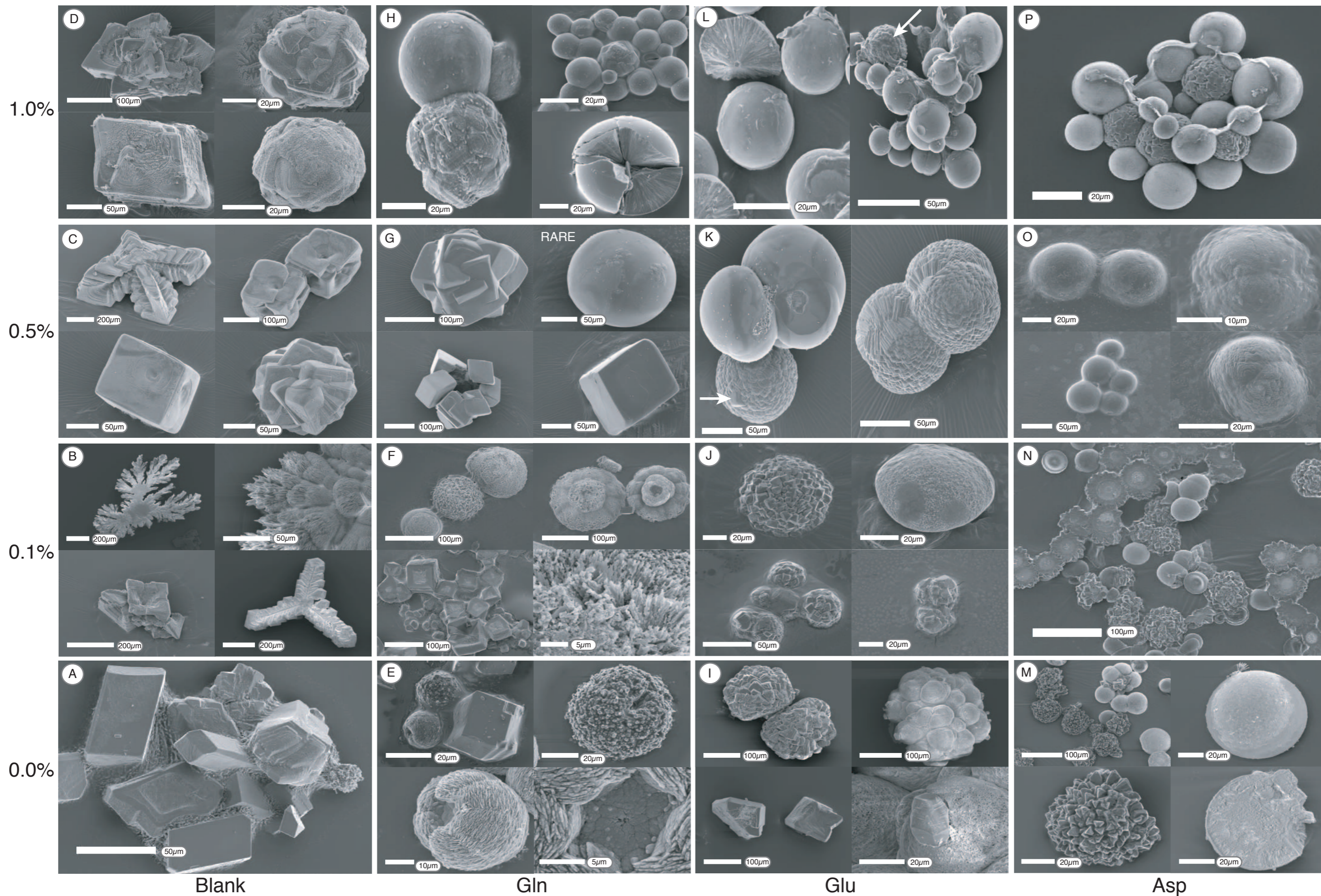


FIG. 56.—Scanning electron microscope photographs of crystal morphologies obtained during abiotically mediated synthesis of calcium carbonate in the presence of exopolysaccharides and amino acids. Abscissa: Blank (no amino acids present), Gln, L-glutamine, Glu, L-glutamic acid, Asp, L-aspartic acid. Coordinates: xanthan content (a glucose and mannose polymer), from 0.0% (absence of xanthan) to 0.1, 0.5 and 1.0% w/v. A) Euhedral calcite crystals. B) Subhedral and dendritic calcite crystals. Dendritic crystals show two different morphologies: diffusion-limited aggregation clusters and ordered dendrites. C) Crystal morphologies become chunkier, leading to imbricated twins. Some euhedral rhombohedra are preserved. D) Agglomerated twins tending to form spheres. E) Euhedral calcite rhombohedra associated with vaterite spherulites composed of either short needle monocrystals or an agglomerate of small euhedral rhombohedra. F) Imperfect calcite rhombohedra are present with vaterite spheres. General structure of vaterite spherulites is similar to part E. G) Rare spherulitic vaterite associated with calcite rhombohedra. Edges of calcite crystals are smoother than in part A, and they tend to form imbricated twin clusters. H) Vaterite and calcite spherulites. Calcite appears as imbricated twin clusters. In addition, both vaterite and calcite can be characterized by fibro-radial spheres. I) Upper part: vaterite spiky agglomerates and cauliflower-shaped calcite. Bottom part: left, calcite rhombohedra; right, epitaxial growth of a hexagonal vaterite crystal on a calcite substrate forming cauliflower clusters. J) Spiky agglomerate of vaterite starting to form a sphere, and a rough calcite spherulite. K) Calcite spheres. The arrow shows remains of a rhombohedron emphasizing the transition between imbricated twin clusters shown in parts G and H and the structure of spheres formed by styloidic crystals. Double sphere of calcite showing a structure close to fibro-radial spheres and composed by styloidic monocrystals. L) Fibro-radial calcite and vaterite spheres with a smooth surface associated with spiky vaterite spherulites (arrow). M) Fibro-radial calcite spherulites (right). Spiky vaterite agglomerate (left). N) General view of spiky vaterite spherulites associated with calcite spheres. Flat shapes are due to contact of the surface of the medium with the atmosphere. O) Calcite spheres. Some spheres are constituted by stacked flat monocrystals, which can be compared with spheres formed by styloidic crystals shown in part K. P) General view of vaterite and calcite spheres. Vaterite spherulites are characterized by the agglomeration of large monocrystals, whereas calcite spheres are smooth and fibro-radial.

Annexe 3 (suite) : Légende en français de la figure 56

Annex 3 (continued) : French caption of figure 56

FIG. 56. – Vue au microscope électronique à balayage des cristaux produits pendant la synthèse abiotique de cristaux de carbonate de calcium en présence d'exopolysaccharide et d'acides aminés. En abscisse : blanc (sans acides aminés ajoutés), Gln, L-glutamine, Glu, L-glutamate, Asp, L-aspartate. En ordonnée : concentration de xanthane (polymère de glucose, mannose et pyruvate) de 0.0% (absence de xanthane) à 1% p/v. A) Cristaux de calcite automorphes. B) Cristaux de calcite sub-automorphes et en dendrites. Les dendrites sont soit organisées selon un modèle d'agrégation par diffusion limitée soit ordonnées. Quelques rhomboèdres sont préservés. D) Agglomérats de macles tendant à former une sphère. E) Rhomboèdre de calcite automorphe associé à des sphérulites de vatérites composées soit de petites aiguilles soit de petits cristaux sub-automorphes. F) Rhomboèdres calcitiques imparfaits associés à des sphères de vatérites. La structure des sphérulites de vatérites est similaire à la description de E. G) Quelques rares sphérulites vatéritiques associées à des rhomboèdres de calcite. Les angles des cristaux de calcite sont plus arrondis qu'en A, et ceux-ci tendent à former des macles imbriqués. H) Sphérulites calcitiques et vatéritiques. La calcite se présente sous forme d'agrégats de cristaux maclés. I) Haut : agglomérat en hérisson de vatérite et calcite formant une structure en chou fleur (framboïde). Bas : Rhomboèdre de calcite (gauche) et cristal de vatérite hexagonal poussant en épitaxie sur de la calcite en chou fleur. J) vatérite en hérisson avec une morphologie s'approchant de la sphère et sphérulite calcitique rugueuse. K) Sphères de calcite. La flèche indique un reste de rhomboèdre montrant bien la transition entre les agrégats de cristaux maclés (G et H) et les sphères formées de cristaux stiloïdiques. Sphères de calcite accolées montrant une structure fibroradiaire composée de cristaux stiloïdiques. L) Calcite fibroradiée et sphérulites de vatérite à surface lisse associée à de la vatérite en hérisson (flèche). M) Sphérulite de calcite fibroradiée (droite) et agglomérat de calcite en hérisson (gauche). N) Vue générale de sphères vatérite en hérissons associées à des sphères calcitiques. Les formes plates sont dues au contact de la surface de la solution. O) Sphères de calcite. Quelques sphères sont formées de monocristaux aplatis qui sont comparables aux cristaux stiloïdiques décrits en K. P) Vue générale de sphères calcitiques et vatéritiques. Les sphères vatéritiques sont caractérisées par l'agglomération de cristaux massifs alors que la calcite apparaît lisse avec une structure finement fibroradiée.

Olivier Braissant · Eric P. Verrecchia · Michel Aragno

Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated?

Received: 20 December 2001 / Accepted: 26 May 2002 / Published online: 12 July 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract Some commonly found species of soil bacteria use low molecular weight organic acids as their sole source of carbon and energy. This study shows that acids such as citrate and oxalate (produced in large amounts by fungi and plants) can rapidly be consumed by these bacteria. Two strains, *Ralstonia eutropha* and *Xanthobacter autotrophicus*, were cultured on acetate- and citrate-rich media. The resulting CO_2 and/or HCO_3^- reacted with calcium ions to precipitate two polymorphs of calcium carbonate (CaCO_3), calcite and vaterite, depending on the quantity of slime produced by the strains. This production of primary calcium carbonate crystals by oxalate- and citrate-degrading bacteria from soil organic carbon sources highlights the existence of an important and underestimated potential carbon sink.

Introduction

In soils, low molecular weight organic acids are usually associated with microbial decay of organic matter and/or root secretions in the rhizosphere (see Jones 1998 for a review). Acetic, citric and oxalic acids produced by fungi during organic matter degradation are able to interact with metal ions and particularly with calcium (Ca) and iron (Fe). As fungi constitute an important and ubiquitous biomass in soils and sediments (Gobat et al. 1998; Verrecchia 2000), these three acids are believed to play an important role in various biogeochemical cycles (Cochrane 1958; Verrecchia 1990; Gadd 1999), e.g. the dissolution of phosphate minerals such as variscite ($\text{AlPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Illmer et al. 1995).

Low molecular weight organic acids, such as acetate, glyoxylate, succinate, malate and citrate, are used as the sole carbon and energy sources by many bacteria and are metabolized through the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles (Prescott et al. 1995; Lengeler et al. 1999). Oxalate is used as the sole carbon and energy source by a limited number of bacterial species. It is assimilated through either the serine pathway or the glycolate pathway (Tamer and Aragno 1980). Due to its high oxidation degree and low molecular weight, the growth yield is low, about 2.5 g/mol. Despite the low solubility of metal oxalates ($K_{\text{ps}}=4 \times 10^{-9}$ for Ca oxalate), they can be dissolved by oxalate-utilizing bacteria (Chandra and Shethna 1975; Dijkhuizen et al. 1977; Friedrich et al. 1979; Tamer and Aragno 1980). Generally, the metabolic role of oxalate in other bacteria remains unclear, but it is assumed to be used in pH regulation, energy production from glyoxylate and in aluminum detoxification by some bacteria (Hamel et al. 1999; Tanner and Bornemann 2000). Another reason for bacterial degradation of oxalate is its detoxification, as it can easily become toxic for many strains. Detoxification may occur, as it does in some plants using an oxalate oxidase, which produces CO_2 and H_2O_2 from oxalate (Koyama 1969).

Bacterial heterotrophic aerobic catabolism results in general in the complete oxidation of the organic electron and energy source, resulting in the production of CO_2 and/or HCO_3^- ions. This is the case with citrate and oxalate (Blackmore and Quayle 1970; Prescott et al. 1995; Lengeler et al. 1999). In natural environments, carbonate ions will rapidly react with Ca^{2+} to precipitate CaCO_3 when the required conditions are reached.

The aim of this study is to show that low molecular weight organic acids such as citrate and oxalate produced in large amounts by fungi and plants can rapidly be consumed by soil bacteria. This consumption results in CO_2 and/or HCO_3^- production and, after reacting with calcium ions, Ca carbonate is precipitated. Particular attention is paid to Ca oxalate crystals (weddelite and whewellite) commonly associated with fungi (Clémenton 1995; Dutton and Evans 1996) and with

O. Braissant · E.P. Verrecchia (✉)
Institut de Géologie, Université de Neuchâtel,
Rue Emile Argand 11, 2007 Neuchâtel, Switzerland
e-mail: eric.verrecchia@unine.ch
Fax: +41-32-7182601

M. Aragno
Laboratoire de Microbiologie, Université de Neuchâtel,
Rue Emile Argand 11, 2007 Neuchâtel, Switzerland

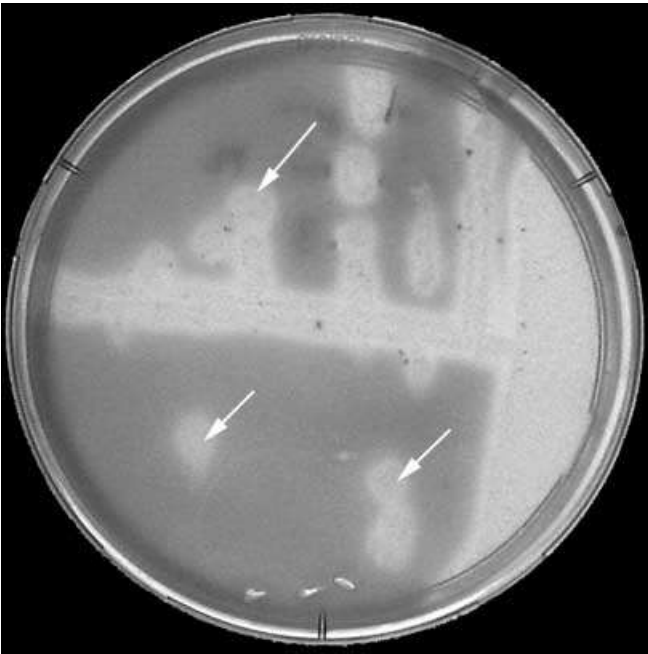


Fig. 1 Clear zones (arrows) obtained during oxalate dissolution by *Ralstonia eutropha* colonies

some plants (Horner and Wagner 1995; Franceschi 2001). These crystals may constitute a large metastable substrate for bacteria.

Materials and methods

The bacteria used in this study were *Ralstonia eutropha* H16 (syn: *Alcaligenes eutrophus*, DSM: 428, ATCC 17699) and *Xanthobacter autotrophicus* (DSM 432, ATCC 35674). These bacteria are ubiquitous and most easily found in oxalate-rich litters such as those associated with *Oxalis*, *Rumex*, *Rheum* and *Eucalyptus*. These two bacterial strains were obtained from the Neuchâtel University Microbiology Laboratory (LAMUN). Both species metabolize oxalate through the glycolate pathway.

Bacteria were grown at 26°C on citrate containing media (Merck yeast extract 4.0 g/l; Fluka tricalcium dicitrate 2.5 g/l; Merck agar-agar 15.0 g/l) and on a Schlegel mineral medium (Aragno and Schlegel 1991) containing calcium oxalate (first layer: Na₂HPO₄×12H₂O 9.0 g/l, KH₂PO₄ 1.5 g/l, NH₄Cl 1.0 g/l, MgSO₄×7H₂O 0.2 g/l, ammoniacal ferric citrate 0.005 g/l, CaCl₂ 0.01 g/l, ZnSO₄×7 H₂O 50 µg/l, MnCl₂×4H₂O 15 µg/l, H₃BO₃ 150 µg/l, CoCl₂×6 H₂O 100 µg/l, CuCl₂×2H₂O 50 µg/l, NiCl₂×6H₂O 10 µg/l, NaMoO₄×2H₂O 15 µg/l, agar 15 g/l; second layer: Schlegel mineral medium to which was added calcium oxalate monohydrate 4 g/l). On both media, consumption of citrate or oxalate was indicated by the formation of a clear zone around the colonies, due to the dissolution of Ca citrate and Ca oxalate (Fig. 1). In order to obtain more CaCO₃ crystals, bacteria were grown on a B4 medium (Merck yeast extract 4.0 g/l; Merck calcium acetate 2.5 g/l; Merck agar-agar 15 g/l). After 20 days, crystals were collected from the bacterial colony and washed in a saturated calcium hypochloride solution (to remove organic matter) until the solution remained clear. Crystals were analyzed by X-ray diffraction (XRD) using a Scintag diffractometer, and observed with a Philips XL 30 ESEM and XL 20 SEM. The XL 30 ESEM was coupled to an EDS microprobe.

In order to monitor the conditions for crystal growth on oxalate and its effect on the medium, liquid cultures were made in a

Schlegel medium (Schlegel mineral medium to which was added K oxalate 4.0 g/l) at 30°C in low agitation. Variations in the medium pH were measured with a Methrom electrode (Herisau, Switzerland). Oxalate consumption has been measured titrimetrically with KMnO₄ 0.02 M in the presence of H₂SO₄ 0.1 M. Finally, bacterial growth was measured turbidimetrically at 600 nm (using a Perkin-Elmer spectrophotometer). After total consumption of oxalate, CaCl₂ 1 M was added to the culture media in order to precipitate the carbonate formed. The resulting precipitate was analyzed by XRD.

Results

CaCO₃ crystals were precipitated on acetate- and citrate-containing media inoculated with either *R. eutropha* or *X. autotrophicus* (Fig. 2A, B). They formed either inside or close to the colony. Large amounts of other carbonate crystals identified as calcium phosphate carbonate and magnesium phosphate carbonate by microprobe analysis have been found on the Schlegel mineral medium enriched with calcium oxalate (Fig. 2C, D).

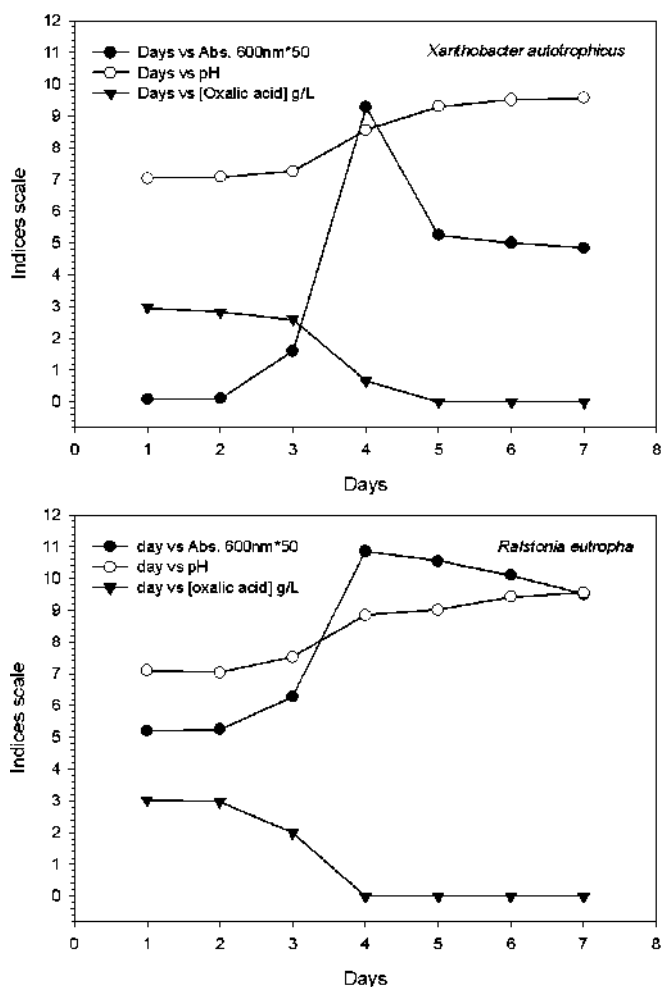
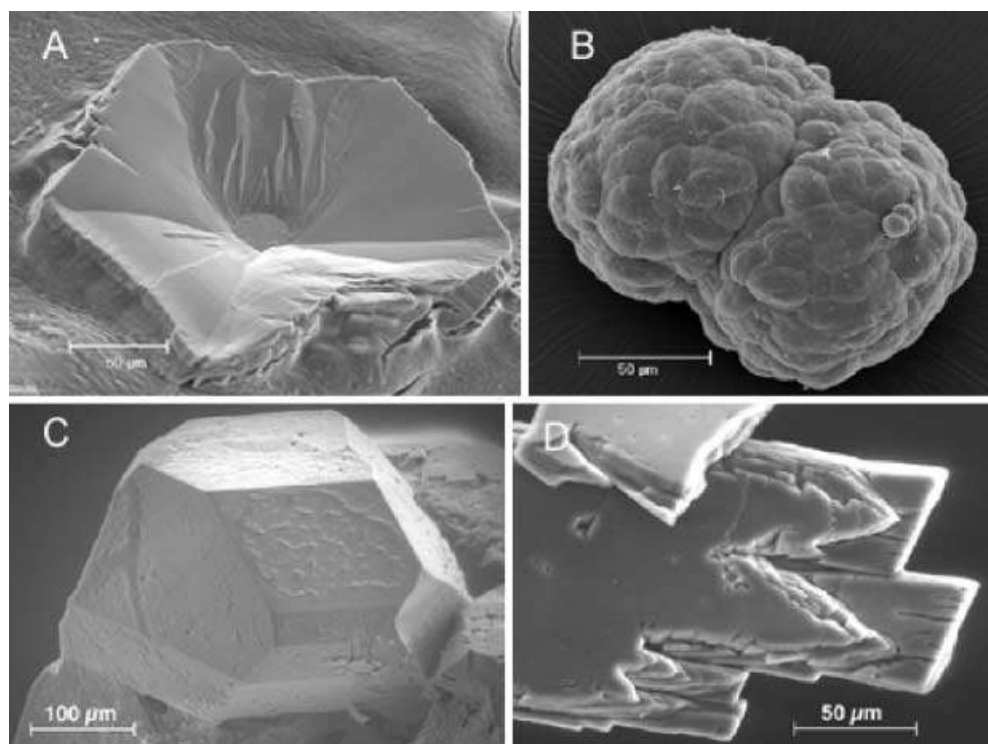
Ralstonia eutropha produced colorless twin crystals ranging from 100 µm to 600 µm in size, whereas *X. autotrophicus* produced smaller brown spherulites having a maximum size of 200 µm. XRD analysis of crystals revealed that two polymorphs of CaCO₃ were precipitated during the growth on acetate- and citrate-rich media. *Ralstonia eutropha* preferentially precipitates calcite crystals, whereas *X. autotrophicus* mainly precipitates vaterite spherulites (Fig. 2A, B).

In addition, XRD analyses showed no difference between crystals produced on acetate and citrate media for both bacterial strains. On the Schlegel medium, similar calcium and magnesium phosphate carbonate crystals were produced by the two strains (Fig. 2C, D). XRD analyses suggest that calcium phosphate carbonate crystals may have a structure similar to rapidcreekite (Ca₂(SO₄)(CO₃)×4H₂O) (Roberts et al. 1986).

The growth of *R. eutropha* and *X. autotrophicus* in the liquid Schlegel medium containing potassium oxalate showed a rapid consumption of oxalate associated with a continuous increase in pH (Fig. 3). The pH rapidly increases during the exponential growth of the colony and continues to increase at a lower rate after the stationary phase has been reached. This can be explained by the release of metabolites during lysis of dead cells, which are probably quickly reused by living cells, after the oxalate source has been totally exhausted. Final pH after 7 days of incubation was >9.5 in each case. Calculations show that the theoretical pH should reach a value of 9.55±0.05 after total oxalate consumption, emphasizing the role of bacteria in providing the required conditions for calcium carbonate precipitation.

XRD analysis of precipitates obtained by addition of calcium chloride 1 M indicated the presence of carbonate in the media. As the Schlegel medium contains large amounts of phosphates, carbonate ions were not directly precipitated as calcium carbonate but as calcium phosphate carbonate (Ca₁₀(PO₄)₆CO₃). Another byproduct of the precipitation triggered by CaCl₂ 1 M is chloroapatite

Fig. 2 Scanning electron microscope (SEM) images of calcium carbonate crystals obtained in bacterial culture (A, B) and SEM view of magnesium calcium carbonate phosphate (C, D) obtained in bacterial culture (*Ralstonia eutropha* and *Xanthobacter autotrophicus*). A calcite crystal associated with *R. eutropha*, B vaterite spherulite associated with *X. autotrophicus*, C magnesium phosphate carbonate, D calcium phosphate carbonate



($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$), which is not surprising regarding the composition of the Schlegel medium. Only chloroapatite and calcium oxalate have been detected in the control solutions, highlighting the role played by bacteria in oxalate oxidation.

Discussion

Calcium carbonate production by bacteria from low molecular weight organic acids seems to be a common and rapid process. On acetate- and citrate-containing media, results clearly show the influence of bacteria on the mineralogical nature and shape of CaCO_3 crystals produced on similar media. Precipitation of biogenic calcite crystals is quite common (Boquet et al. 1973; Simkiss and Wilbur 1989). However, biogenic production of vaterite has only been reported for a few groups (Lowenstam and Weiner 1989). It is known that organic matter and medium viscosity can influence CaCO_3 crystallization (Kitano and Hood 1965; Cailleau et al. 1979; Addadi et al. 1990; Buczynski and Chafetz 1991). This point is particularly important in this study because one of the main cultural characteristics differentiating the two strains studied is the amount of slime produced (mainly exopolysaccharides composed of glucuronic acid, glucose and mannose). Indeed, *X. autotrophicus* secretes

Fig. 3 Variations in indices [cell density measured turbidimetrically at 600 nm, pH and oxalic acid concentration (g/l)] during the culture of *X. autotrophicus* (top) and *R. eutropha* (bottom) in a liquid medium

abundant slime, noticeably increasing the viscosity of the media (Wiegel 1991).

The influence of organic matter, exopolysaccharides and polyaspartate in the precipitation of vaterite can also be found in nature (Falini et al. 1998; Gower and Tirrell 1998). Vaterite crystals similar to those obtained in this study have recently been found in Lake Issyk-Kul (Kyrgyzstan) and have been attributed to *Synechococcus* activity in mucilaginous mats containing polyaspartate (Giralt et al. 2001). However, as there is a great diversity in the composition, chemical and physical properties of bacterial slimes (see Sutherland 2001a, b, c for a review), it is premature to conclude that every bacterial strain producing slime will precipitate vaterite crystals.

Culture in liquid and solid Schlegel oxalate media demonstrate that bacteria change the medium conditions, allowing calcite precipitation. Rapid consumption of oxalate in liquid media and production of calcium and magnesium phosphate carbonate on solid media suggests that large amounts of calcium oxalate or free oxalic acid are probably rapidly transformed into secondary Ca carbonate in soils. This hypothesis is supported by biogeochemical studies (Verrecchia and Dumont 1996), soil biology (Cromack et al. 1977) and soil micromorphology (Verrecchia 1990; Monger et al. 1991).

Conclusion

CaCO₃ crystals can easily be produced by two common oxalate-degrading bacteria, *R. eutropha* and *X. autotrophicus*. Crystals, and particularly vaterite spherulites, can be identified in soils where soil bacteria have been involved in CaCO₃ precipitation. The two bacteria described in this study use oxalate and citrate as a carbon and energy source. The biogeochemical implications of oxalate consumption and carbonate production by bacteria in soils and surficial sediments emphasizes the existence of an important and underestimated potential carbon sink.

Acknowledgements The authors wish to thank Dr. T. Adatte for XRD analysis, Prof. P.A. Diehl, Dr. M. Dadras, N. Jeanneret, and M. Leboeuf for their helpful advice during the work. This work is supported by the Swiss National Science Foundation, grant no 2153-065174.01. Three anonymous reviewers greatly improved the first version of this manuscript.

References

- Addadi L, Berman A, Moradial-Oldak J, Weiner S (1990) Tuning of crystal nucleation and growth by protein: molecular interaction at solid-liquid interfaces in biomineralization. *Croat Chem Acta* 63:539-544
- Aragno M, Schlegel HG (1991) The mesophilic hydrogen-oxidizing (Knallgas) bacteria. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The prokaryotes*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 344-384
- Blackmore MA, Quayle JR (1970) Microbial growth on oxalate by a route not involving glyoxylate carboxylase. *Biochem J* 118: 53-59
- Boquet E, Boronat A, Ramos-Cormenzana A (1973) Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 246:527-528
- Buczynski C, Chafetz HS (1991) Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy. *J Sediment Petrol* 61:226-233
- Cailleau P, Jacquin C, Dragone D, Girou A, Roques H, Humbert L (1979) Influence des ions étrangers et de la matière organique sur la cristallisation des carbonates de calcium. *Rev Inst Fr Pet* 34:89-112
- Chandra TS, Shethna YI (1975) Isolation and characterization of some new oxalate-decomposing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 41:101-111
- Clémenceçon H (1995) *Anatomie der Hymenomyceten*. Flück-Wirth, Teufen, Germany
- Cochrane VW (1958) *Physiology of fungi*. Wiley, London
- Cromack K, Sollins P, Todd RL, Fogel R, Todd AW, Fender WM, Crosley ME, Crosley DA (1977) The role of oxalic acid and bicarbonate in calcium cycling by fungi and bacteria: some possible implications for soil animals. *Ecol Bull Stockholm* 25:246-252
- Dijkhuizen L, Wiermsa M, Harder W (1977) Energy production and growth of *Pseudomonas oxalaticus* OX1 on oxalate and formate. *Arch Microbiol* 115:229-236
- Dutton MV, Evans CS (1996) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can J Microbiol* 42:881-895
- Falini G, Fermani S, Gazzano M, Ripamonti A (1998) Orientated crystallization of vaterite in collagenous matrices. *Chem Eur J* 4:1048-1052
- Franceschi V (2001) Calcium oxalate in plants. *Trends Plant Sci.* 6:331
- Friedrich CG, Bowien B, Friedrich B (1979) Formate and oxalate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *J Gen Microbiol* 115:185-192
- Gadd GM (1999) Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal physiology and biochemical processes. *Adv Microb Physiol* 41:47-92
- Giralt S, Julià R, Klerx J (2001) Microbial biscuits of vaterite in Lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan). *J Sediment Res* 71:430-435
- Gobat J-M, Aragno M, Matthey W (1998) *Le sol vivant*. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, Lausanne, Switzerland
- Gower LA, Tirrell DA (1998) Calcium carbonate films and helices grown in solutions of poly(aspartate). *J Cryst Growth* 191: 153-160
- Hamel R, Levasseur R, Appanna VD (1999) Oxalic acid production and aluminium tolerance in *Pseudomonas fluorescens*. *J Inorg Biochem* 76:99-104
- Horner HT, Wagner BL (1995) Calcium oxalate formation in higher plants. In: Khan SR (ed) *Calcium oxalate in biological systems*. CRC, Boca Raton, Fla. pp 53-72
- Illmer P, Barbato A, Schinner F (1995) Solubilization of hardly soluble AlPO₄ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol Biochem* 27:265-270
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil* 205:25-44
- Kitano Y, Hood DW (1965) The influence of organic material on the polymorphic crystallization of calcium carbonate. *Geochim Cosmochim Acta* 29:29-41
- Koyama H (1969) Purification and characterization of oxalate oxydase from *Pseudomonas* sp. OX-53. *Agric Biol Chem* 52:743-748
- Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG (1999) *Biology of the prokaryotes*. Blackwell Science, New York
- Lowenstam HA, Weiner S (1989) *On biomineralization*. Oxford University Press, New York
- Monger HC, Daugherty LA, Lindemann WC, Lidell CM (1991) Microbial precipitation of pedogenic calcite. *Geology* 19:997-1000

- Prescott LF, Harley JP, Klein DA (1995) *Microbiologie*. DeBoeck Université, Brussels, Belgium
- Roberts AC, Ansel HG, Jonasson IR, Grice JD, Ramik RA (1986) Rapidcreekite. *Am Mineral* 72:225
- Simkiss K, Wilbur KM (1989) *Biomineralization – cell biology and mineral deposition*. Academic Press, New York
- Sutherland IA (2001a) The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222–227
- Sutherland IA (2001b) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3–9
- Sutherland IA (2001c) Exopolysaccharides in biofilms, floc and related structures. *Water Sci Technol* 43:77–86
- Tamer A, Aragno M (1980) Isolement, caractérisation et essai d'identification de bactéries capables d'utiliser l'oxalate comme seule source de carbone et d'énergie. *Bull Soc Neuchatel Sci Nat* 103:91–104
- Tanner A, Bornemann S (2000) *Bacillus subtilis* YvrK is an acid-induced oxalate decarboxylase. *J Bacteriol* 182:5271–5273
- Verrecchia EP (1990) Litho-diagenetic implications of the calcium oxalate–carbonate biogeochemical cycle in semiarid calcretes, Nazareth, Israel. *Geomicrobiol J* 8:87–99
- Verrecchia EP (2000) Fungi and sediments. In: Riding RE, Awramick SM (eds) *Microbial sediments*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 68–75
- Verrecchia EP, Dumont J-L (1996) A biogeochemical model for chalk alteration by fungi in semiarid environments. *Biogeochemistry* 35:447–470
- Wiegel J (1991) The genus *Xanthobacter*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The prokaryotes*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 2365–2383

MICROBIAL BISCUITS OF VATERITE IN LAKE ISSYK-KUL (REPUBLIC OF KYRGYZSTAN)—DISCUSSION

OLIVIER BRAISSANT AND ERIC P. VERRECCHIA

Institut de Géologie, Université de Neuchâtel, Rue Emile Argand 11, 2007 Neuchâtel, Switzerland

Giralt et al. (2001) reported the formation of microbial biscuits of vaterite in Lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan). Although they state that the trigger mechanisms for the natural precipitation of vaterite remain unclear, they propose an explanation of the origin for the vaterite biscuits involving bacterial activity. Our recent research seems to support their hypothesis, although the way we obtain vaterite precipitation is not strictly related to lacustrine or natural aqueous environments.

We have used laboratory cultures to demonstrate the ability of some soil bacteria to transform an oxalate carbon source into carbonate, a hypothesis supported by observations (Cromack et al. 1977; Verrecchia et al. 1993) and biogeochemical studies (Verrecchia and Dumont 1996). The bacteria used were isolated by Tamer and Aragno (1980) and identified as *Xanthobacter autotrophicus* (DSM 432, ATCC 35674, syn.: *Corynebacterium autotrophicum*), previously described by Wiegel et al. (1978). The bacteria were grown in a B4 media (Boquet et al. 1973) to which calcium acetate or calcium citrate was added. In this experiment, the only way to produce carbonate ions involves bacterial metabolism using the wide range of carbon sources contained in the yeast extract, including acetate and citrate (Fig. 1). Moreover, *X. autotrophicus* is able to produce a lot of exopolysaccharide and polyglutamine (Wiegel 1991).

In our experiments, bacterial metabolism lead to the production of calcium carbonate (CaCO_3) crystals inside the medium, associated with the bacteria colonies. X-ray diffraction of the samples shows that the carbonate mineral forming these crystals is vaterite and not calcite. The shape of the crystals (Fig. 2A) is similar to those described by Giralt et al. (2001). A blank experiment was conducted with the same medium exposed to the same conditions of humidity and temperature, but the medium was not inoculated. No crystals were formed under these conditions. This emphasizes the significant role of bacteria in the precipitation of crystals. The lack of crystals in the blank experiments means the crystals associated with the bacterial colonies cannot be artifacts due to the desiccation of the medium.

In order to verify that the *X. autotrophicus* strain is related to vaterite production, another bacterium, *Alcaligenes eutrophus* (syn.: *Ralstonia eutropha*), was chosen to produce calcium carbonate under the same experimental conditions. *Alcaligenes eutrophus* does not produce any polyglutamine and much less polysaccharide than *X. autotrophicus* as observed in the culture. Using exactly the same media inoculated with *A. eutrophus*, calcite is precipitated instead of vaterite (Fig. 2B). The change of media (acetate-rich instead of citrate-rich media) did not affect the result: *X. au-*

trophicus and *A. eutrophus* produce crystals of vaterite and calcite respectively.

Giralt et al. (2001) explain the precipitation of vaterite by "local supersaturation in the microenvironment in which nucleation and growth of calcium carbonate occur, . . . the presence of polyaspartates in the mucilaginous mat of bacteria [favoring] the epitaxial precipitation of oriented vaterite fibers" (p. 433). Our experiments suggest a crucial link between the presence or absence of exopolysaccharides produced by the bacteria and the nature of the mineral precipitated, i.e., vaterite instead of calcite. Moreover, we have cultured bacteria in a mineral liquid medium containing oxalate in order to control the pH during bacterial oxidation of low-molecular-weight organic sources. The initial pH of the medium was $\text{pH} \approx 7$. After seven days and total consumption of the carbon source, the final pH was $\text{pH} \approx 9.5$ indicating stable conditions for calcium carbonate precipitation and preservation.

Although the general chemical conditions, crystal mineralogy, and morphology obtained in our laboratory experiments are in total agreement with Giralt et al.'s (2001) observations, it is still possible that the Lake Issyk-Kul vaterites might be a post-sampling artifact. Giralt et al.'s samples from dredged sediments of Lake Issyk-Kul were "stored in plastic bags for study" (p. 430). It is possible that the micro-scale vaterite crystals Giralt et al. described could have been produced by bacteria during storage. This is indirectly suggested by the authors when they noted that the microbial biscuits "could form very recently" (Giralt et al., p. 434). In addition, microbial biscuits are present only in surficial sediments. This can be explained by the fact that appropriate bacteria able to transform carbon sources into vaterite are present only in these favorable environments (aerobic strains).

In conclusion, although it is always possible to get artifacts with microbiological material, Giralt et al. (2001) throw light on a new possible source of secondary calcium carbonate, one involving transformation of vaterite into calcite. They bring new observations and arguments for a likely microbial mediation in the precipitation process of this CaCO_3 , indirectly emphasizing two main consequences: (1) many secondary calcite continental deposits could result from a vaterite source, a possibility that is widely underestimated because of the difficulty of detecting primary vaterite, which transforms into calcite very rapidly; and (2) the possibility for microorganisms to precipitate a mineral phase such as vaterite or calcite from organic carbon. This latter process undoubtedly constitutes a new potential carbon sink.

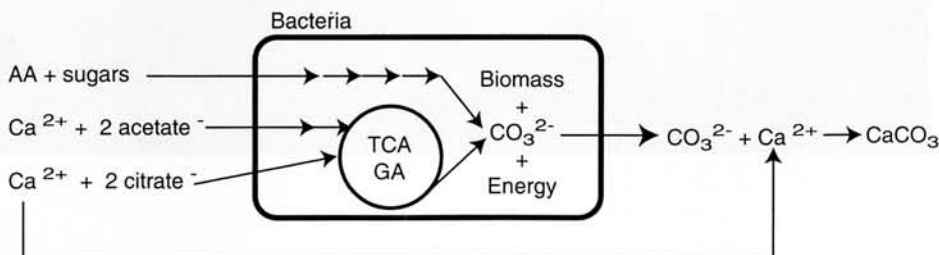


FIG. 1.—Possible metabolic pathways leading to carbonate precipitation in bacteria. AA, amino-acids; TCA, tricarboxylic acid cycle; GA, glyoxylic acid cycle.

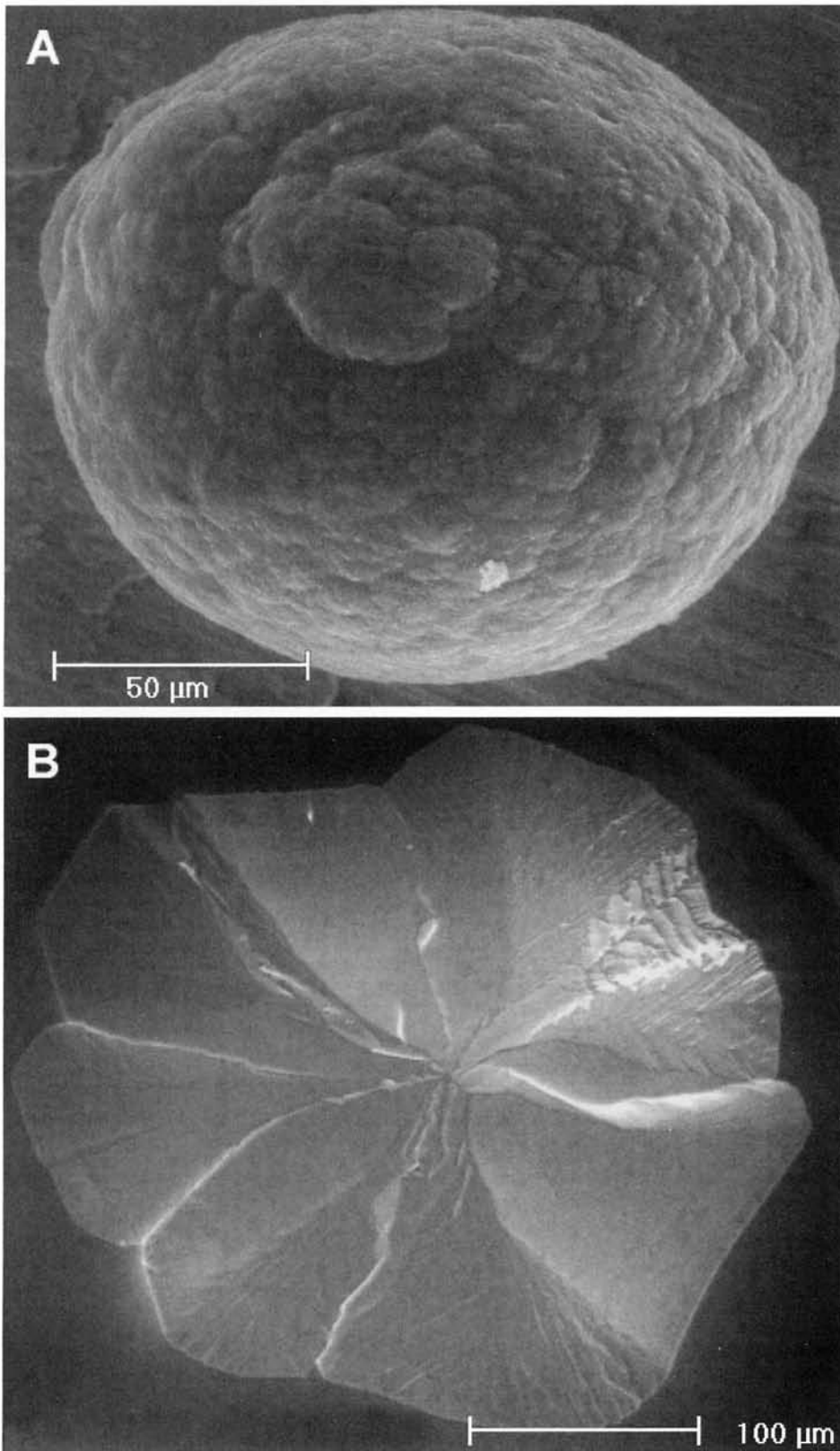


FIG. 2.—Scanning electron microscope photographs of **A**) vaterite crystal obtained from the *Xanthobacter autotrophicus* culture, and **B**) calcite crystal obtained from the *Alcaligenes eutrophus* culture.

REFERENCES

- BOQUET, E., BORONAT, A., AND RAMOS-CORMENZANA, A., 1973, Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon: *Nature*, v. 4 246, p. 527–528.
- CROMACK, K. JR., SOLLINS, P., TODD, R.L., FOGEL, R., TODD, A.W., FENDER, W.M., CROSSLEY, M.E., AND CROSSLEY, D.A. JR., 1977, The role of oxalic acid and bicarbonate in calcium cycling by fungi and bacteria: some possible implications for soil animals: *Ecological Bulletin*, v. 25, p. 246–252.
- GIRALT, S., JULIA, R., AND KLERKX, J., 2001, Microbial biscuits of vaterite in lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan): *Journal of Sedimentary Research*, v. 71, p. 430–435.
- TAMER, A., AND ARAGNO, M., 1980, Isolement, caractérisation et essai d'identification de bactéries capables d'utiliser l'oxalate comme seule source de carbone et d'énergie: *Société Neuchâteloise de Sciences Naturelles, Bulletin*, v. 103, p. 91–104.

- VERRECCHIA, E.P., DUMONT, J.-L., AND VERRECCHIA, K.E., 1993, Role of calcium oxalate biomineralization by fungi in the formation of calcretes: a case study from Nazareth, Israel: *Journal of Sedimentary Petrology*, v. 63, p. 1000–1006.
- VERRECCHIA, E.P., AND DUMONT, J.-L., 1996, A biogeochemical model for chalk alteration by fungi in semiarid environments: *Biogeochemistry*, v. 35, p. 447–470.
- WIEGEL, J., 1991, The Genus *Xanthobacter*, in Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H., eds., *The Prokaryotes*: New York, Springer-Verlag, p. 2365–2383.
- WIEGEL, J., WILHE, D., BAUMGARTEN, J., OPTZ, R., AND SCHLEGEL, H.G., 1978, Transfer of the nitrogen fixing bacterium *Corynebacterium autotrophicum* Baumgarten et al. to *Xanthobacter* gen. nov.: *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 28, p. 573–581.

Received 5 November 2001; accepted 18 April 2002.

MICROBIAL BISCUITS OF VATERITE IN LAKE ISSYK-KUL (REPUBLIC OF KYRGYZSTAN)—REPLY

SANTIAGO GIRALT¹, RAMON JULIÀ², AND JEAN KLERKX¹

¹ International Bureau for Environmental Studies (IBES), Audrey Hepburn 9/13 B-3080 Brussels, Belgium

² Institute of Earth Sciences "Jaume Almera" (CSIC), Lluís Solé i Sabarís s/n, E-08028 Barcelona, Spain

Braissant and Verrecchia's discussion of our paper on microbial biscuits of vaterite in Lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan) clearly contributes to a better understanding of the complexity of anhydrous and unstable vaterite. They support the role of bacteria in the formation of vaterite in the sediments of Lake Issyk-Kul using bacterial cultures in a media doped by calcium acetate and calcium citrate. Their results seem to prove that the high production of carbohydrates and proteins in the bacterial mucilaginous product of the *X. Autotrophius* bacteria contributes to vaterite formation whereas other experimental cultures carried out with bacteria producing less polysaccharides precipitate only calcite.

Three main factors should be pointed out in an attempt to clarify the natural occurrence of vaterite on top of the sediments of Lake Issyk-Kul, the main point challenged by Braissant and Verrecchia. First, the external shape of vaterite obtained by Braissant and Verrecchia (Fig. 2A) resemble the microbial biscuits found in Lake Issyk-Kul, but in the absence of a meridional section of these spherical forms, it is difficult to state that both spherical forms are identical. Vaterite occurrences reported by other authors show similar external morphologies but with very different origins (Kralj et al. 1994; Kralj et al. 1997; Manoli and Dalas 2001; Sondi and Matijevic 2001).

Second, Braissant and Verrecchia refer to the possibility of post-sampling artifacts as the origin of the microbial biscuits in Lake Issyk-Kul. The plastic bags that were used to collect the samples were perfectly clean, and they never contained any organic component that could induce vaterite formation. Moreover, subsequent field surveys have found similar microbial biscuits in dredged samples, visually identified on board after washing some sediment, just after the recovery of the dredge. Thus, the origin of the vaterite is not due to a post-sampling artifact. The vaterite biscuits form under natural conditions in the lake sediments.

Third, the Lake Issyk-Kul sediments also contain calcium carbonate mineral phases like monohydrocalcite that is also considered to be unstable.

Monohydrocalcite is the main mineral phase for the upper 80 cm of the sedimentary infill, and this mineral phase represents, on average, 40% of the total mineral composition. According to a preliminary chronological framework, this monohydrocalcite layer represents the last 2,000 years (Giralt et al. 2001). Thus, it seems clear that some inhibitors to calcite precipitation must play an important role in favoring precipitation and stabilization within the sediments of these unstable carbonate mineral phases (Kanakakis et al. 2001; Kitamura 2001). In this environment, oversaturated with respect to calcite and with inhibitors to its precipitation, the presence of bacterial activity in the bottom and sub-bottom sediments contributing to the organic matter decay could produce vaterite. In fact, vaterite is considered an initial phase that gradually transforms to calcite, and this transformation is just a matter of time. Therefore, the suggestion that microbial biscuits "could form very recently" must be understood in a broad geological sense of several centuries, and not just a few days or weeks.

REFERENCES

- GIRALT, S., RIERA, S., KLERKX, J., JULIÀ, R., LIGNIER, V., BECK, C., DE BATIST, M., AND KALUGIN, I., 2001, Lake Issyk-Kul (Rep. of Kyrgyzstan): an example of recent evolution in a continental environment: *Terra Nostra*, v. 2001/2, p. 30–36.
- KANAKAKIS, J., MALKAJ, P., PETROHELOS, J. AND DALAS, E., 2001, The crystallization of calcium carbonate on porcine and human cardiac valves and the antimicrobial effect of sodium alginate: *Journal of Crystal Growth*, v. 223, p. 557–564.
- KITAMURA, M., 2001, Crystallization and transformation mechanism of calcium carbonate polymorphs and the effect of magnesium ion: *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 236, p. 318–327.
- KRALJ, D., BRECEVIC, L., AND KONTREC, J., 1997, Vaterite growth and dissolution in aqueous solution II. Kinetics of transformation: *Journal of Crystal Growth*, v. 177, p. 248–257.
- KRALJ, D., BRECEVIC, L., AND NIELSEN, A.E., 1994, Vaterite growth and dissolution in aqueous solution II. Kinetics of dissolution: *Journal of Crystal Growth*, v. 143, p. 269–276.
- MANOLI, F., AND DALAS, E., 2001, Calcium carbonate crystallization in the presence of glutamic acid: *Journal of Crystal Growth*, v. 222, p. 293–297.
- SONDI, I., AND MATIJEVIC, E., 2001, Homogeneous precipitation of calcium carbonates by enzyme catalyzed reaction: *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 238, p. 208–214.

Received 30 May 2002; accepted 30 May 2002.

BACTERIALLY INDUCED MINERALIZATION OF CALCIUM CARBONATE IN TERRESTRIAL ENVIRONMENTS: THE ROLE OF EXOPOLYSACCHARIDES AND AMINO ACIDS

OLIVIER BRAISSANT, GUILLAUME CAILLEAU, CHRISTOPHE DUPRAZ, AND ERIC P. VERRECCHIA

Institut de Géologie, Université de Neuchâtel, Rue Emile-Argand 11, CH-2007 Neuchâtel, Switzerland

e-mail: eric.verrecchia@unine.ch

ABSTRACT: This study stresses the role of specific bacterial outer structures (such as glycocalyx and parietal polymers) on calcium carbonate crystallization in terrestrial environments. The aim is to compare calcium carbonate crystals obtained in bacterial cultures with those obtained during abiotically mediated synthesis to show implications of exopolysaccharides and amino acids in the mineralogy and morphology of calcium carbonate crystals produced by living bacteria. This is done using various amounts of purified exopolysaccharide (xanthan EPS) and L-amino acids with a range of acidities. Amino acids and increasing xanthan content enhance sphere formation in calcite and vaterite. Regarding calcite, the morphology of crystals evolves from rhombohedral to needle shape. This evolution is characterized by stretching along the *c* axis as the amino acid changes from glutamine to aspartic acid and as the medium is progressively enriched in EPS. Regarding vaterite, the spherulitic habit is preserved throughout the morphological sequence and starts with spheres formed by the agglomeration of short needles, which are produced in a xanthan-free medium with glutamine. Monocrystals forming spheres increase in size as xanthan is added and the acidity of amino acids (glutamic and aspartic acids) is increased. At high xanthan concentrations, amino acids, and mainly aspartic and glutamic acids, induce vaterite precipitation. The role of the carboxyl group is also probably critical because bacterial outer structures associated with peptidoglycan commonly contain carboxyl groups. This role, combined with the results presented here, clearly demonstrate the influence of bacterial outer structure composition on the morphology and mineralogy of bacterially induced calcium carbonate. This point should not be neglected in the interpretation of calcite cements and carbonate accumulations in terrestrial environments.

INTRODUCTION

Microbiologically induced mineralization is defined as processes leading to inorganic mineral deposits by adventitious precipitation. This precipitation arises from secondary interactions between various metabolic processes producing carbonate species and the surrounding environment (Mann 2001). Mineral precipitation by microbes has been known about for a long time (see historical aspects in Ehrlich 1996, 1998). Among bacterially precipitated minerals, carbonates, and in particular calcium carbonate (CaCO_3) in numerous forms, are probably the most important (Ferris et al. 1989). Bacterially precipitated calcite (in terrestrial environments), and aragonite and high Mg calcite (in marine environments) have been described many times in the literature (e.g., Boquet et al. 1973; Castanier et al. 2000; Chafetz 1986; Krumbein 1979). Although other species of calcium carbonate minerals are only rarely associated with bacterial activity, there are a couple of recently described examples: vaterite precipitation by the soil bacteria *Xanthobacter autotrophicus* (Braissant et al. 2002; Braissant and Verrecchia 2002) and monohydrocalcite ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) by the halophilic bacteria *Halomonas eurihalina* (Rivadeneira et al. 1998). The ecology of the microbes associated with vaterite and monohydrocalcite is consistent with the lacustrine environment in which the crystals formed (Giralt et al. 2001; Krumbein 1975) and not due to the activity of exotic strains under exceptional conditions. To our knowledge, microbially induced ikaite ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) has not been reported, probably because of its instability.

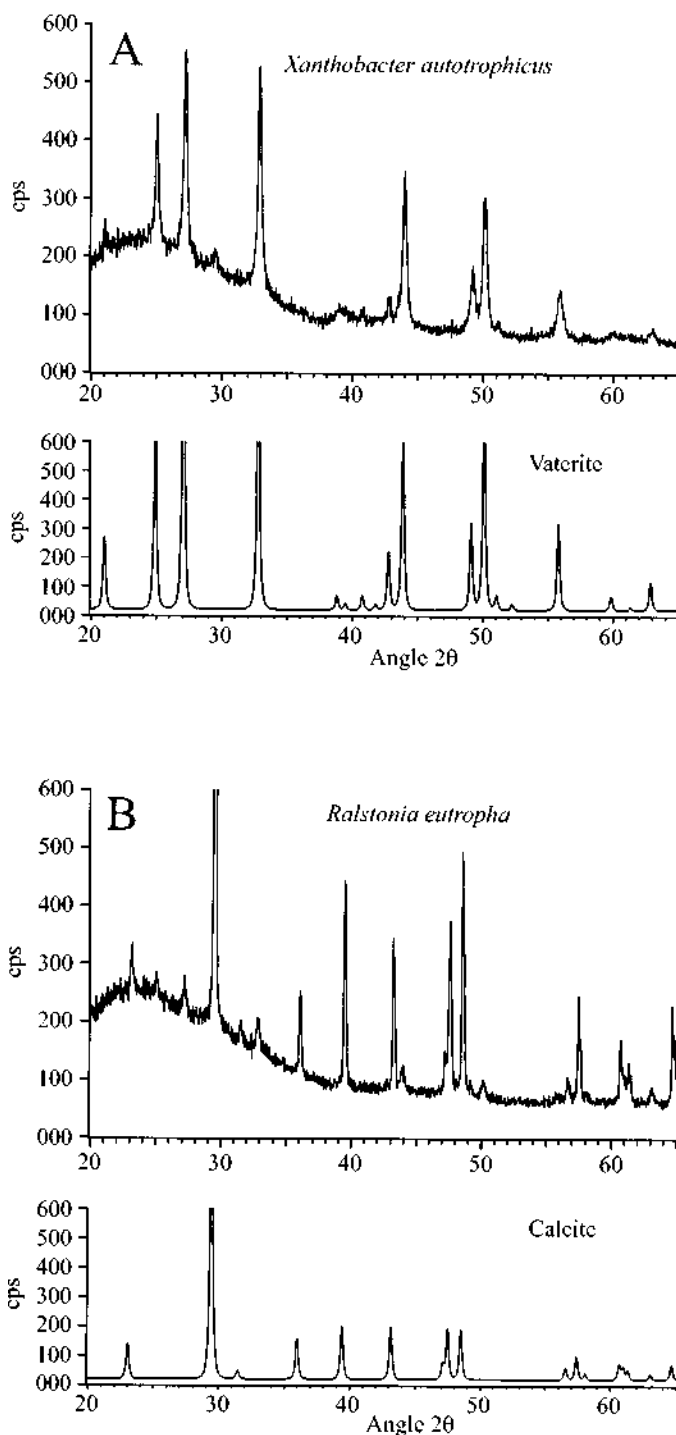


FIG. 1.—X-ray diffractograms of CaCO_3 crystals associated with A) *Xanthobacter autotrophicus* and B) *Ralstonia eutropha* cultures. These diffractograms correspond perfectly to vaterite (A) and calcite (B), respectively.

Dolomite ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) has been reported by Warthmann et al. (2000) to be precipitated by *Desulfonatovibrio* in anoxic marine environments.

Despite numerous reports of calcium carbonate precipitation by microbes and the important biomass they represent in soils, accumulation of terrestrial carbonates is still generally attributed to physicochemical processes (Lal et al. 2000). In this paper, it is demonstrated that relationships between morphologies and mineralogies of CaCO_3 encountered in soils and surficial sediments reveal a bacterial influence related to microbial biofilms. This study stresses the role of a specific exopolysaccharide (xanthan EPS) and amino acids on calcium carbonate crystallization in terrestrial environments.

In marine environments, outer structures such as the cyanobacterial S-layer have already been recognized as the main crystalline biostructure able to act as a nucleus for calcium carbonate growth (see review in Schultze-Lam et al. 1992, 1996 and Smarda et al. 2002). Most microbial cells in natural environments form communities inside microbial biofilms (Decho 1990, 2000; Sutherland 2001 a, 2001 b). Therefore, exopolysaccharides (EPS) and amino acids most likely play an essential role in calcium carbonate morphology and mineralogy. This study investigates the potential relationships between EPS, amino acids, oxidative soil bacteria, and calcium carbonate crystals using conventional bacterial cultures and abiotically mediated calcium carbonate synthesis. The aim is to compare calcium carbonate crystals obtained in bacterial cultures with those obtained during abiotically mediated synthesis. This is done using various amounts of purified EPS and L-amino acids with a range of acidities and frequently associated with mucilages.

MATERIALS AND METHODS

Bacterially mediated calcium carbonate crystals were obtained after 20 days culturing of *Xanthobacter autotrophicus* (syn: *Corynebacterium autotrophicum*, DSM 432, ATCC 35674) and *Ralstonia eutropha* H16 (syn: *Alcaligenes eutrophus*, DSM: 428, ATCC 17699) on a B4 medium kept at 26°C (Merck yeast extract 4.0 g/L; Merck calcium acetate 2.5 g/L; Merck agar-agar 15 g/L; Boquet et al. 1973). These two strains are oxidative terrestrial bacteria commonly found in soils and sediments. In the cultures, the main difference between the two strains is the amount of polysaccharide produced: *X. autotrophicus* is surrounded by a large amount of slime, whereas *R. eutropha* produces only an extremely low amount of glycocalyx (Holt et al. 1993). The pH was not monitored during culturing, but final pH was > 9 as revealed by a droplet of pH indicator. Uninoculated Petri dishes were kept as a sterility control.

Abiotically mediated crystals have been obtained by precipitation from a $\text{CaCl}_2 / (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ reaction inside a polysaccharidic medium (EPS) with various types of L-amino acids. The aim of this experiment is to simulate precipitation of calcium carbonate in an EPS-rich environment without involving living bacteria. Ten runs of this experiment have been conducted. The synthesis was performed using a CaCl_2 0.05 M solution to which was added: (1) 1.0% (w/v) amino acids (L-glutamine, L-glutamic acid and L-aspartic acid). These amino acids were chosen because they are commonly found in the parietal structures of many bacteria, e.g. polyglutamate in *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Sporosarcina halophila*,

polyglutamine in the genus *Xanthobacter* and *Flexithrix*, and finally polyaspartate in *Synechococcus* sp.); and (2) 0%, 0.1%, 0.5% and 1.0% (w/v) concentrations of xanthan from Sigma™ (a bacterial EPS mainly composed of mannose and glucose). The pH of this solution was adjusted to 8.4 (the pH of calcite stability at 1 atm and 25°C) before adding xanthan. The solution was sterilized by autoclaving at 121°C for one hour. After sterilization, the solutions were placed in Petri dishes that remained for 20 days in ethanol-washed desiccators filled with $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Petri dishes were examined with a binocular microscope to control possible presence of contaminants.

Crystals obtained in bacterial cultures, as well as in the abiotic experiment, were both isolated by either sedimentation or directly from the culture using precision tweezers. The crystals obtained were gold coated and observed with a Philips XL20 SEM. Crystals sampled from bacterial colonies were previously washed in saturated calcium hypochlorite solution in order to remove organic matter from the surfaces of the crystals. Samples of bacterial colonies bearing crystals were fixed with glutaraldehyde (5%), immediately dehydrated in ethanol, and air-dried after ethanol replacement by tetramethylsilane (TMS; Dey et al. 1989). These samples were gold sputter coated for 60 seconds to give a 23 nm gold coating, and observed with a Philips XL20 SEM. Crystals were analyzed by X-ray diffraction (XRD) using a Scintag diffractometer and by an energy-dispersive spectrometry (EDS) microprobe coupled with a Philips XL30 environmental scanning electron microscope (ESEM). Calcite and vaterite mineralogies were determined by cross checking XRD analyses, crystal habits, and relative proportions of each phase plus comparison of observed crystal shapes with shapes documented in the literature.

RESULTS

Calcium Carbonate Crystals Obtained in Bacterial Cultures

Bacterially mediated crystals were found mostly on the surfaces of colonies. They have various mineralogies and morphologies. In terms of mineralogy, *X. autotrophicus* produced mainly brown vaterite spherulites ranging from 50 μm to 200 μm in diameter, with a small fraction of calcite crystals (Fig. 1A), whereas *R. eutropha* produced colorless calcite crystals ranging from 100 μm to 600 μm in size, with traces of vaterite (Fig. 1B).

Spheres produced by *X. autotrophicus* show three different monocrystal (small individual crystal) arrangements (Fig. 2A–D). Although the overall sphere shape remains, the morphology of individual crystals forming the sphere varies from a fan shape to a needle (Fig. 3). The crystals are organized around a central point and grow radially to form the sphere. Accessory shapes are also associated with the spheres. They are made of either a polyhedral assemblage of calcite crystals or a mixture of calcite and vaterite. Two main morphologies have been observed. “Fried egg” shapes are probably formed at the surface of the colony (Fig. 2E–G). The subspherical part is constituted by vaterite and grows on a lens- to plate-shape calcite surface. The flat part is in contact with the atmosphere, the sphere being inside the colony. Therefore, the general shape is a flipped “fried egg.” Calcite also forms imperfect spherical clusters made of imbricated rhombohedra (Fig. 2H).

Fig. 2.—Morphology of crystals obtained during bacterial growth. A–H, *Xanthobacter autotrophicus*; I–P, *Ralstonia eutropha*. A) General view of vaterite spherulites in cross-polarized light (XPL). B) Close-up of part A showing two different crystal arrangements. Spheres showing a black cross are constituted by needles, whereas other spheres are formed by clusters of small monocrystals. C, D) Scanning electron microscope (SEM) view of individual (C) and coalescent (D) vaterite spherulites. The surface of the sphere is not smooth and shows a mammillated rough topography. E, F) “Fried egg” morphology of accessory crystals. These clusters are constituted by two parts, a calcitic bottom part having a lens- to plate-shape and a central hemispherical upper part constituted by vaterite crystals of various sizes. G) Detail of the hemispherical part showing small hexagons of vaterite. H) Imbricated rhombohedra forming imperfect spherical calcite clusters. I) Subhedral to euhedral rhombohedra. XPL view. J) ESEM view of a calcite flower formed by flat sparitic crystals. K) SEM view of the heart of a calcite flower constituted by crystals forming a spiral-like structure. L) SEM view of a calcite flower with petals formed by thin palissadic crystals. M) XPL view of a calcite cluster constituted by four triangular-shaped crystals joined at their tip to form a thickened Maltese cross. N) SEM view of a similar crystal shown in part M. O, P) XPL and SEM view of funnel-like crystals.

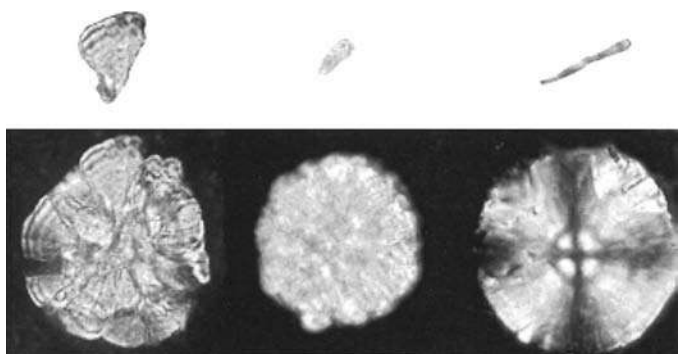


FIG. 3.—Morphology of individual crystals forming calcium carbonate spheres associated with *Xanthobacter autotrophicus*. From left to right: fan-shaped, petal-like, and needle monocystals. The two first spheres are vaterite, and the third is either calcite or vaterite.

Crystals produced by *R. eutropha* have three main shapes. The two most common morphologies encountered are euhedral to subhedral rhombohedra (Fig. 2I) and calcite flowers, composed of crystals with euhedral terminations (Fig. 2J–L). The center of the flower is formed by a circular spiral-like crystal (Fig. 2K). Two other shapes have been observed: thickened “Maltese crosses” (Fig. 2M, N) and, rarely funnels (Fig. 2O, P). In blank uninoculated Petri dishes, crystals were not observed, emphasizing the crucial role of bacteria.

Calcium Carbonate Crystals Obtained in Abiotically Mediated Experiments

The reaction between CaCl_2 and $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, with neither xanthan nor amino acids present, produces calcite rhombohedra (Fig. 4A), which is not surprising. However, synthesis of calcium carbonate crystals in mucilaginous solutions results in numerous crystal morphologies, emphasizing the potential role of EPS in their shape diversity. Synthesis using increasing concentrations of xanthan without the addition of amino acids leads mainly to individual and branching crystals. At a low concentration of xanthan (0.1%), dendritic crystals form. Dendrites can be disordered, and similar to structures obtained by diffusion-limited aggregation (Fig. 4B), or ordered along the main three directions of calcite crystal growth (Fig. 4B). Nevertheless, subhedral rhombohedra remain the most abundant shape (Fig. 4B). At a higher concentration of xanthan (0.5%), the most common shape (constituting about 90%) is a dendrite-like crystal, which is in fact lacunar and made of small stacked rhombohedra (Fig. 4C). Around 5% of the crystals are euhedral rhombohedra (Fig. 4C). The remaining 5% are im-

bricated rhombohedron twins that form irregular spheroidal clusters (Fig. 4C). When the xanthan concentration reaches 1%, more and more imbricated rhombohedron twins agglomerate until they form subspherical clusters. Whatever the concentration in xanthan, all the crystals obtained in the amino acid free media are calcitic.

When amino acids are added to the medium, various crystal morphologies are obtained (Fig. 4E–P). At first glance, it is difficult to clearly see a trend in morphologies, although the habit becomes more spherical as xanthan increases. In addition, the two calcium carbonate polymorphs—vaterite and calcite—are always precipitated during abiotic synthesis in the presence of amino acids. Nevertheless, the ratio between the two mineralogical species seems to be essentially related to the abundance of EPS and the nature of amino acids. Aspartic acid, glutamic acid, and glutamine always induced vaterite formation at a high concentration of xanthan (1.0%), although calcite is still present. Consequently, it is critical to discriminate between the two mineralogies in order to understand the difference in shapes in Figure 4. Two morphological sequences (Fig. 5) can be described in relation to increasing EPS content (which acts as a weak acid) and the acidity of the added amino acid. Glutamine is considered as a basic amino acid, whereas glutamic and aspartic acids are acidic, aspartic acid being more acidic than glutamic acid.

Regarding calcite (Fig. 5), the morphological sequence starts with rhombohedra produced in a xanthan-free medium with glutamine (Fig. 4E). The conditions in this case are the most basic (highest pH) of the total experiment involving amino acids. By adding xanthan and by increasing the acidity of amino acids (glutamic and aspartic acids), rhombohedron edges become smoother (Fig. 4G) and crystals form numerous twins, agglomerated around a center (Fig. 4G, H), and finally evolve to fibro-radial spheres (Fig. 4K–P). This sequence can be summarized by the decrease of the monocystal size forming the shape, from calcite rhombohedra to calcite styloids followed by needles (Fig. 5).

Regarding vaterite (Fig. 5), the spherulitic habit is preserved throughout the morphological sequence. It starts with spheres formed by the agglomeration of short needles, which are produced in a xanthan-free glutamine medium (Fig. 4E). Nevertheless, some spheres are composed of larger (but still small) monocystals (Fig. 4E). These monocystals increase in size as xanthan is added and the acidity of amino acids (glutamic and aspartic acids) is increased (Fig. 4I, J, L–P). Contrary to the sequence described for calcite, the vaterite sequence can be illustrated by the increase in the size of the monocystals forming the spheres. Nevertheless, in the presence of glutamine and glutamic acid and a high amount of EPS, vaterite can form fibro-radial spherulites, which show a black cross in polarized light, as shown by Dedek (1966). The only way to differentiate calcite from this vaterite is by using XRD.

←

FIG. 4.—Scanning electron microscope photographs of crystal morphologies obtained during abiotically mediated synthesis of calcium carbonate in the presence of exopolysaccharides and amino acids. Abscissa: Blank (no amino acids present), Gln, L-glutamine, Glu, L-glutamic acid, Asp, L-aspartic acid. Coordinates: xanthan content (a glucose and mannose polymer), from 0.0% (absence of xanthan) to 0.1, 0.5 and 1.0% w/v. **A**) Euhedral calcite crystals. **B**) Subhedral and dendritic calcite crystals. Dendritic crystals show two different morphologies: diffusion-limited aggregation clusters and ordered dendrites. **C**) Crystal morphologies become chunkier, leading to imbricated twins. Some euhedral rhombohedra are preserved. **D**) Agglomerated twins tending to form spheres. **E**) Euhedral calcite rhombohedra associated with vaterite spherulites composed of either short needle monocystals or an agglomerate of small euhedral crystals. **F**) Imperfect calcite rhombohedra are present with vaterite spheres. General structure of vaterite spherulites is similar to part E. **G**) Rare spherulitic vaterite associated with calcite rhombohedra. Edges of calcite crystals are smoother than in part A, and they tend to form imbricated twin clusters. **H**) Vaterite and calcite spherulites. Calcite appears as imbricated twin clusters. In addition, both vaterite and calcite can be characterized by fibro-radial spheres. **I**) Upper part: vaterite spiky agglomerates and cauliflower-shaped calcite. Bottom part: left, calcite rhombohedra; right, epitactic growth of a hexagonal vaterite crystal on a calcite substrate forming cauliflower clusters. **J**) Spiky agglomerate of vaterite starting to form a sphere, and a rough calcite spherulite. **K**) Calcite spheres. The arrow shows remains of a rhombohedron emphasizing the transition between imbricated twin clusters shown in parts G and H and the structure of spheres formed by styloidal crystals. Double sphere of calcite showing a structure close to fibro-radial spheres and composed by styloidal monocystals. **L**) Fibro-radial calcite and vaterite spheres with a smooth surface associated with spiky vaterite spherulites (arrow). **M**) Fibro-radial calcite spherulites (right). Spiky vaterite agglomerate (left). **N**) General view of spiky vaterite spherulites associated with calcite spheres. Flat shapes are due to contact of the surface of the medium with the atmosphere. **O**) Calcite spheres. Some spheres are constituted by stacked flat monocystals, which can be compared with spheres formed by styloidal crystals shown in part K. **P**) General view of vaterite and calcite spheres. Vaterite spherulites are characterized by the agglomeration of large monocystals, whereas calcite spheres are smooth and fibro-radial.

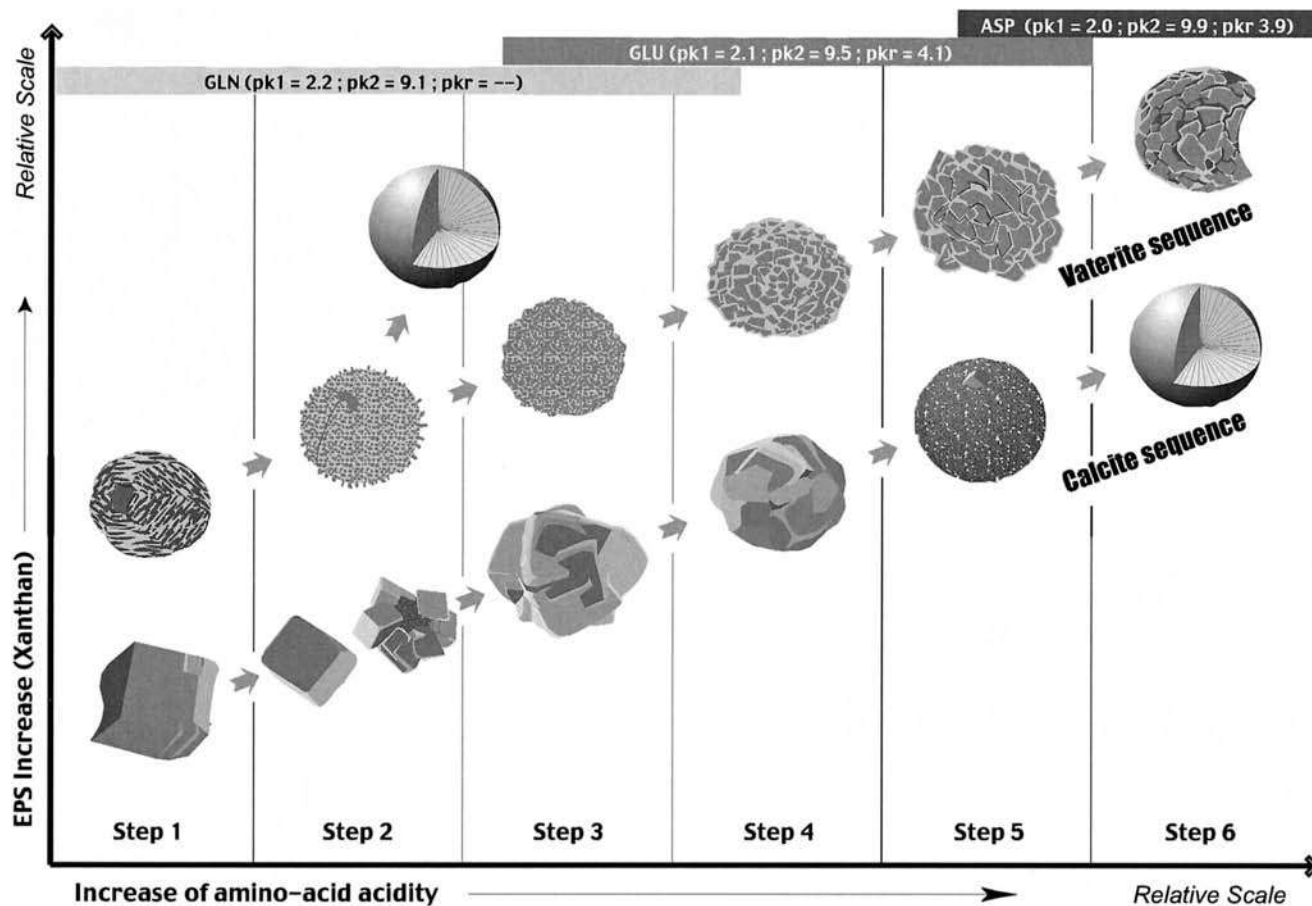


FIG. 5.—Sequences of calcite and vaterite morphologies obtained during the abiotic experiment. This sketch shows the morphologies related to increasing amino acid acidity and xanthan content. Scales are relative. The various domains of influence of amino acids are shown. Six main steps can be described for both vaterite and calcite. The calcite sequence starts with rhombohedra. Size of monocrystals forming the clusters decreases from Step 1 to Step 6 until they form needles. The general shape of calcite evolves from rhombohedra to fibro-radial spherulites. Vaterite sequence: vaterite is always precipitated as spheres. The monocrystals constituting the spheres increase in size from Step 1 (short needles) to Step 6 (large hexagons). Between Step 2 and Step 3, vaterite can occur as fibro-radial spherulites. Sketches were traced from photographs.

In summary, amino acids and increasing xanthan content enhance sphere formation in both calcite and vaterite. In addition, regarding calcite, the morphology of rhombohedra evolves from a euhedral shape to a needle. This evolution is characterized by stretching along the *c* axis as the amino acid changes from glutamine to aspartic acid and as the medium is progressively enriched in EPS.

DISCUSSION

Many spherulitic features are observed in carbonate soils and surficial sediments. The explanation of their origin is often unclear and usually attributed to possible organic influence without further elucidation. Spherulitic or oolitic habit have been observed in many other cases involving different microorganisms and different mineral species (e.g., Folk 1993). Calcium carbonate spherulites remain the most commonly described features. It has been shown that formation of aragonitic spherulites by *Deleya halophila* may be the result of cell calcification and aggregation (Rivadeneira et al. 1996). In addition, formation of magnesium calcite spherulites and dumbbells has been related to the slime-producing bacteria, *Myxococcus xanthus* (González-Muñoz et al. 2000; Holt et al. 1993). Various types of apatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{F},\text{OH})_{2+x}]$ have been shown to precipitate with a spherulitic habit when under the influence of organic matter or during (nano)bacterial activity. Kajander and Çiftçioglu (1998) have shown that nanobacteria can be responsible for the formation of small spherulites

(about 2 μm in diameter) alone or inside human cells (the spherulitic habit is not surprising considering the high density of macromolecules). Apatite spherulites including proteins (referred to as nanoforms) have also been shown to precipitate in a medium containing sterile fetal bovine serum (Vali et al. 2001). Salt ooids have been attributed to halophilic bacterial activity, which may guide the growth of biominerals (Castanier et al. 1999). In conclusion, recent research illustrates the numerous possible interactions between crystals and organic matter. Our results emphasize the importance of bacterial biofilms containing exopolysaccharides and amino acids in the precipitation of CaCO_3 , and resemble features encountered in bacterial cultures, soils, and paleosols.

The morphologies of crystals obtained in *X. autotrophicus* and *R. eutropha* cultures (Fig. 2) can now be understood given the results depicted in Figure 4. *Xanthobacter autotrophicus* is known to produce substantial amounts of exopolysaccharides (Wiegel 1991). This property leads to the precipitation of vaterite spherulites (Fig. 2A–D), with some spheres showing a black cross of extinction in cross-polarized light. These morphologies are equivalent to those observed in Step 3 of Figure 5. Vaterite spherulites showing a black cross have also been observed, although rarely in the presence of glutamine with 0.5% xanthan. Regarding calcite, the accessory shape constituted by imbricated rhombohedra (Fig. 2H) is also equivalent to Step 3 of Figure 5. These observations indicate that crystals observed in the *X. autotrophicus* culture should be produced in a medium enriched

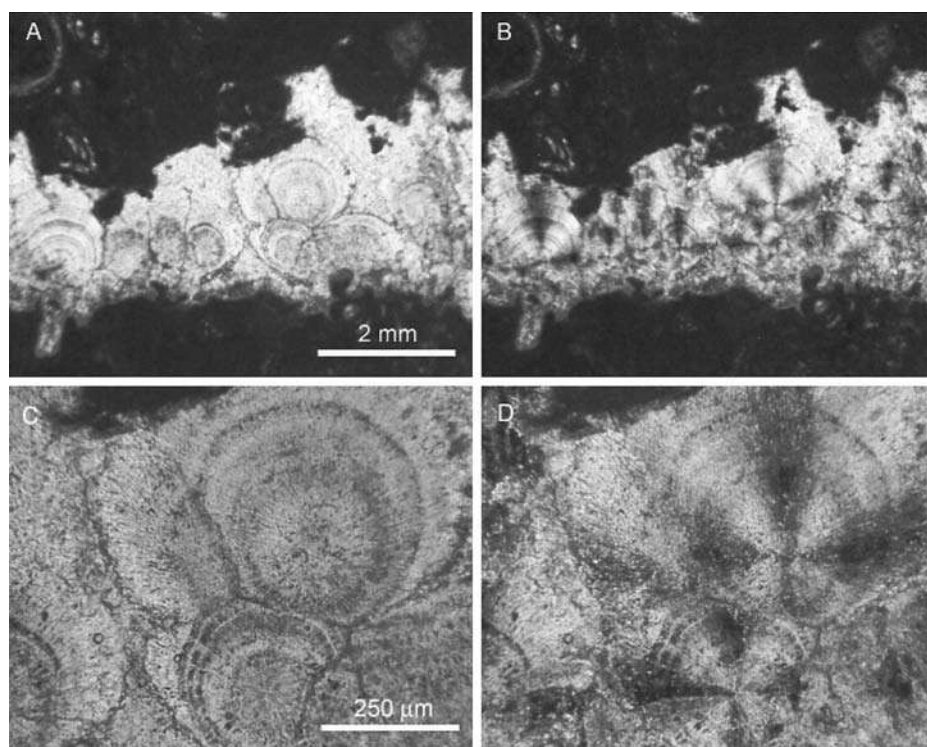


FIG. 6.—Spherulites associated with a paleosol in Bahamian eolianites (sample obtained by courtesy of C. Nawratil, University of Geneva). **A**) General view in plane-polarized light (PPL) of a planar pore infilled with a spherulitic calcite cement. **B**) Same view in cross-polarized light (XPL) showing the black cross of calcite spherulites. **C, D**) Detail in PPL and XPL of calcite spherulites showing some growth increments emphasized by impurities (organic matter) layers. These spherulites are virtually identical to those obtained in the presence of bacterial exopolysaccharides and amino acids.

in EPS as well as glutamine. Indeed, *X. autotrophicus* makes not only large amounts of exopolysaccharides but also a polyglutamine parietal polymer (Kandler et al. 1983; Wiegel 1991).

In contrast, the fact that *R. eutropha* only produces calcite rhombohedra and flower-shaped agglomerates is linked to an absence or only 0.1% EPS in the medium. The calcite crystals can be compared with Step 1 of calcite in Figure 5 or with crystals shown in Figures 4E and F. This is consistent with the fact that *R. eutropha* produces only low amounts of EPS.

The results obtained in Figure 4 can also be compared with features observed in natural environments. Spherulites showing an extinction cross in cross-polarized light are commonly found in soils and paleosols (Fig. 6). These spherulites infill pores and are associated with micritic and/or organo-micritic layers (Fig. 6A, B). Their origin has never been clearly identified. Nevertheless, their morphology (Fig. 6C, D) is identical to crystals produced in the EPS-rich medium (Fig. 4H, K, L, P). This point indicates the influence of biofilms in the precipitation of such spherulites in

soils. A similar calcium carbonate spherulite has also been observed in a polysaccharide-rich tropical soil (Fig. 7A). Calcite and vaterite spherulites have also been reported in the mucilagenous sheath of cyanobacteria, indicating the fundamental role exopolysaccharides can play in their precipitation (Verrecchia et al. 1995; Giralt et al. 2001). In a different tropical soil, a feature identical to those shown in Figures 4J, M, and N has also been observed: it is a vaterite cluster growing on a quartz grain in a biofilm rich in EPS and amino acids (Fig. 7B). In conclusion, the abiotic experiments conducted in this study shed new light on the potential contribution of bacterial EPS and amino acids on calcium carbonate precipitation in terrestrial environments.

In natural environments, the variation of CaCO₃ crystal morphologies and mineralogies associated with EPS may result from its heterogeneity due to the diversity of microorganisms living within a single biofilm. Heterogeneity in slimes leads to differences in diffusion coefficients (local supersaturation), surface tensions, and viscosity. The viscosity of the 1.0%

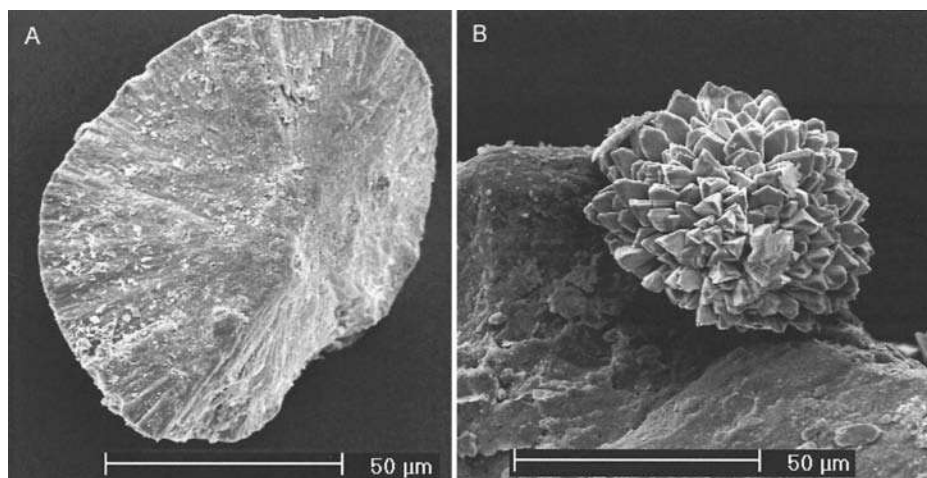


FIG. 7.—Scanning electron micrographs. **A**) Example of a fibro-radial calcite spherulite found associated with polysaccharides in a tropical soil. **B**) Vaterite cluster from a tropical soil showing a structure identical to those obtained in Figure 4J, M, and N. This vaterite cluster grew on a silica substratum in a biofilm rich in exopolysaccharides and amino acids.

xanthan solution is 1000x greater than water (water: 1 centipoise or cp at 20°C; xanthan 1.0%: 1042 cp). For 0.1% and 0.5% xanthan solutions, the viscosity is about 30 cp and 450–500 cp, respectively. This is consistent with the observations made by Buczynski and Chafetz (1991) who stated that the viscosity of the medium is the single most important control over the mineral precipitation.

All the amino acids tested in this study enhanced sphere formation. At high xanthan concentrations, amino acids induced vaterite precipitation with traces of calcite. The role of the carboxyl group is probably critical. This group shows a similar spatial configuration to the calcite lattice, and therefore shares important geometrical homologies with carbonate ions (Mitterer and Cunningham 1985; Addadi et al. 1990; Neumeier 1998). The influence of aspartic and glutamic acids on calcium carbonate crystallization has been studied extensively. These amino acids have been reported to induce mainly vaterite precipitation (Falini 2000; Manoli and Dalas 2001). Bacterial outer structures associated with peptidoglycan (homopoly-peptide—polyglutamine in the case of *X. autotrophicus* and polyglutamic acid in the case of several *Bacillus* species—or proteins) often contain carboxyl and/or amide groups. This fact, combined with the results presented in Figures 4, 5, and 6, clearly demonstrate the influence bacterial outer structure composition can have on the morphology and mineralogy of bacterially induced calcium carbonate. This point should not be neglected in the interpretation of calcite cements and carbonate accumulations in terrestrial environments.

CONCLUSIONS

From the results presented in this paper, it seems likely that spherulitic calcite and/or vaterite crystals may indicate the presence of mucilaginous bacteria or biofilms at the time of formation (and probably other mucilage-producing organisms, e.g., cyanobacteria or fungi). The relative abundance of mineral species (calcite vs. vaterite) can be informative in determining the nature of the biofilm, i.e., if they contain polyaspartic acid or other polyamino acids. In terms of sedimentary petrology, these results question the origin of some cements found in terrestrial sediments that were previously attributed to purely physicochemical processes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. T. Adatte for XRD analysis, N. Jeanneret, M. Vlimant, M. Leboeuf, and K. Verrecchia for their helpful advice during the work. Associate editor Hank Chafetz, Neva Çiftçioğlu (NASA, Houston) and Jan Toporski (Carnegie Institution of Washington) greatly improved the first version of the manuscript. Editing by John B. Southard was greatly appreciated. This work is supported by the Swiss National Science Foundation, grant no. 2153–065174.01.

REFERENCES

ADDADI, L., BERMAN, A., MORADIAL-OLDAK, J., AND WEINER, S., 1990, Tuning of crystal nucleation and growth by protein: Molecular interaction at solid–liquid interfaces in biomineralization: *Croatica Chemica Acta*, v. 63, p. 539–544.

BOQUET, E., BORONAT, A., AND RAMOS-CORMENZANA, A., 1973, Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon: *Nature*, v. 246, p. 527–528.

BRAISSANT, O., AND VERRECCHIA, E.P., 2002, Microbial biscuits of vaterite in Lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan)—Discussion: *Journal of Sedimentary Research*, v. 72, p. 944–946.

BRAISSANT, O., ARAGNO, M., AND VERRECCHIA E.P., 2002, Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated?: *Naturwissenschaften*, v. 89, p. 366–370.

BUCZYNSKI, C., AND CHAFETZ H.S., 1991, Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy: *Journal of Sedimentary Petrology*, v. 61, p. 226–233.

CASTANIER, S., LE MÉTAYER-LEVREL, G., AND PERTHUISOT, J.-P., 2000, Bacterial roles in the precipitation of carbonate minerals, in Riding, R.E., and Awramik, S.M., eds., *Microbial Sediments*: Heidelberg, Springer-Verlag, p. 32–39.

CASTANIER, S., PERTHUISOT, J.-P., MATRAT, M., AND MORVAN, J.-Y., 1999, The salt ooids of Berre salt works (Bouche-du-Rhône, France): the role of bacteria in salt crystallisation: *Sedimentary Geology*, v. 125, p. 9–21.

CHAFETZ, H.S., 1986, Marine peloids: a product of bacterially induced precipitation of calcite: *Journal of Sedimentary Petrology*, v. 56, p. 812–817.

DECHO, A.W., 1990, Microbial exopolymer secretions in ocean environments: Their role(s) in food webs and marine processes: *Annual Review of Oceanography and Marine Biology*, v. 28, p. 73–154.

DECHO, A.W., 2000, Exopolymer microdomains as a structuring agent for heterogeneity within microbial biofilms, in Riding, R.E., and Awramik, S.M., eds., *Microbial Sediments*: Heidelberg, Springer-Verlag, p. 1–9.

DEDEK, J., 1966, Le carbonate de chaux: Louvain, Librairie Universitaire de Louvain, 351 p.

DEY, S., BASU BAUL, T.S., ROY, B., AND DEY, D., 1988, A new rapid method of air-drying for scanning electron microscopy using tetramethylsilane: *Journal of Microscopy*, v. 156, p. 259–261.

EHRlich H.L., 1996, *Geomicrobiology*: New York, Marcel Dekker, Inc., 720 p.

EHRlich, H.L., 1998, Geomicrobiology: its significance for geology: *Earth-Science Reviews*, v. 45, p. 45–60.

FALINI, G., 2000, Crystallization of calcium carbonate in biologically inspired collagenous matrices: *International Journal of Inorganic Materials*, v. 2, p. 455–461.

FERRIS, F.G., SHOTYK, W., AND FYFE, W.S., 1989, Mineral formation and decomposition by microorganisms, in Beveridge, T.J., and Doyle, R.J., eds., *Metal Ions and Bacteria*: New York, Wiley, p. 413–441.

FOLK, R.L., 1993, SEM imaging of bacteria and nanobacteria in carbonate sediments and rocks: *Journal of Sedimentary Petrology*, v. 63, p. 990–999.

GIRALT, S., JULIÀ, R., AND KLERKX, J., 2001, Microbial biscuits of vaterite in Lake Issyk-Kul (Republic of Kyrgyzstan): *Journal of Sedimentary Research*, v. 71, p. 430–435.

GONZÁLEZ-MUÑOZ, M.T., BEN CHEKROUN, K., BEN ABOUD, A., ARIAS, J. M., AND RODRIGUEZ-GALLEGO, M., 2000, Bacterially induced Mg-calcite formation: role of Mg²⁺ in development of crystal morphology: *Journal of Sedimentary Research*, v. 70, p. 559–564.

HOLT, J.G., KRIG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., AND WILLIAMS, S.T., 1993, *Bergey's manual of determinative bacteriology*: Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins, 787 p.

KAJANDER, E.O., AND ÇİFTÇIOĞLU, N., 1998, Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation: *Proceedings of the National Academy of Science of U.S.A.*, v. 95, p. 8274–8279.

KANDLER, O., KÖNIG, H., WIEGEL, J., AND CLAUS, D., 1983, Occurrence of poly- γ -glutamic acid and poly- α -glutamine in the genera *Xanthobacter*, *Flexithrix*, *Sporosarcina* and *Planococcus*: *Systematic and Applied Microbiology*, v. 4, p. 34–41.

KRUMBEIN, W.E., 1975, Biogenic monohydrocalcite spherules in lake sediments of Lake Kivu (Africa) and the Solar Lake (Sinai): *Sedimentology*, v. 22, p. 631–634.

KRUMBEIN, W.E., 1979, Calcification by bacteria and algae, in TRUDINGER, P.A., AND SWAINE, D.J., eds., *Biogeochemical Cycling of Mineral-Forming Elements*: Amsterdam, Elsevier, p. 47–68.

LAL, R., KIMBLE, J.M., ESWARAN, H., AND STEWART, B.A., 2000, *Global Climate Change and Pedogenic Carbonates*: Boca Raton, Lewis Publishers, 305 p.

MANN, S., 2001, *Biomineralization—Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*: Oxford, Oxford University Press, 210 p.

MANOLI, F., AND DALAS, E., 2001, Calcium carbonate crystallization in presence of glutamic acid: *Journal of Crystal Growth*, v. 222, p. 293–297.

MITTERER, R.M., AND CUNNINGHAM, R., 1985, The interaction of natural organic matter with grain surfaces: implications for calcium carbonate precipitation, in Schneidermann, N., and Harris, P.M., eds., *Carbonate Cements*: Society of Economic Paleontologists and Mineralogists, Special Publication 36, p. 17–31.

NEUMEIER, U., 1998, Le rôle de l'activité microbienne dans la cimentation des beachrocks (sédiments intertidaux) [Thèse de doctorat es Science]: Genève, Université de Genève, 183 p.

RIVADENEYRA M.A., DELGADO G., RAMOS-CORMENZANA A., AND DELGADO R., 1998, Biomineralization of carbonates by *Halomonas ewrhalina* in solid and liquid media with different salinities: crystal formation sequence: *Research in Microbiology*, v. 149, p. 277–287.

RIVADENEYRA, M.A., RAMOS-CORMENZANA, A., DELGADO, G., AND DELGADO, R., 1996, Process of carbonate precipitation by *Deleya halophila*: *Current Microbiology*, v. 32, p. 308–313.

SCHULTZE-LAM, S., FÖRTIN, D., DAVIS, B.S., AND BEVERIDGE, T.J., 1996, Mineralization of the bacterial surface: *Chemical Geology*, v. 132, p. 171–181.

SCHULTZE-LAM, S., HARAUZ, G., AND BEVERIDGE, T.J., 1992, Participation of a cyanobacterial S layer in fine-grain mineral formation: *Journal of Bacteriology*, v. 174, p. 7971–7981.

SMARDA, J., SMAJS, D., KOMRSKA, J., AND KRZYŻANEC, V., 2002, S-layers on cell walls of cyanobacteria: *Micron*, v. 33, p. 257–277.

SUTHERLAND, I.A., 2001a, The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment: *Trends in Microbiology*, v. 9, p. 222–227.

SUTHERLAND, I.A., 2001b, Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework: *Microbiology*, v. 147, p. 3–9.

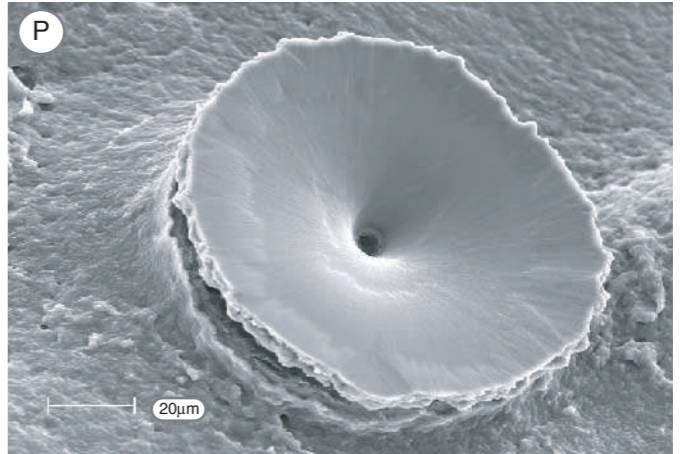
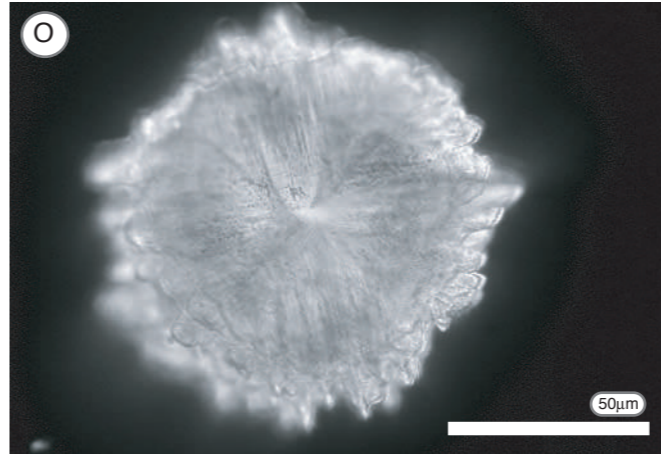
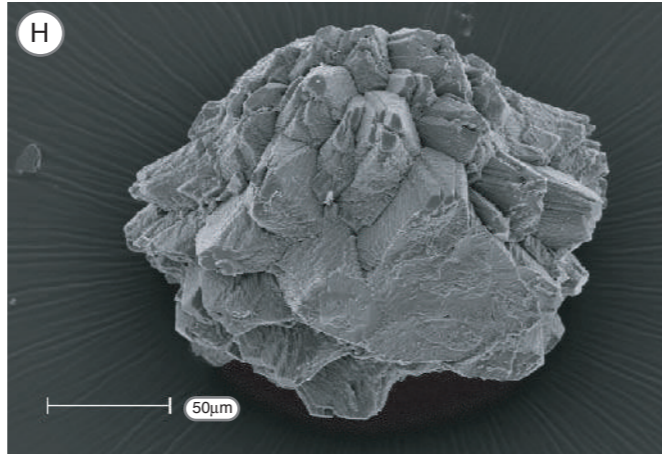
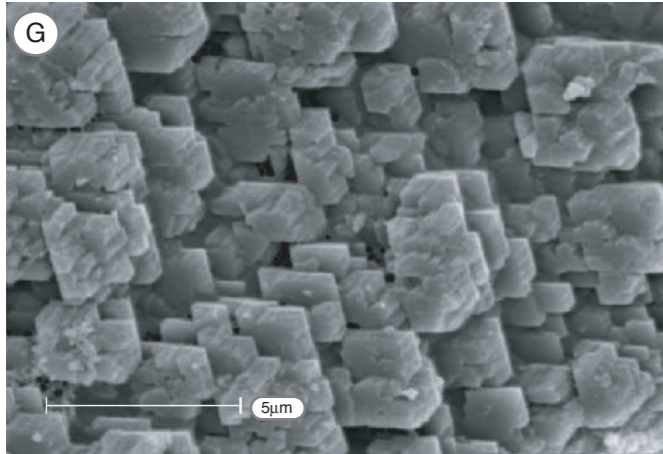
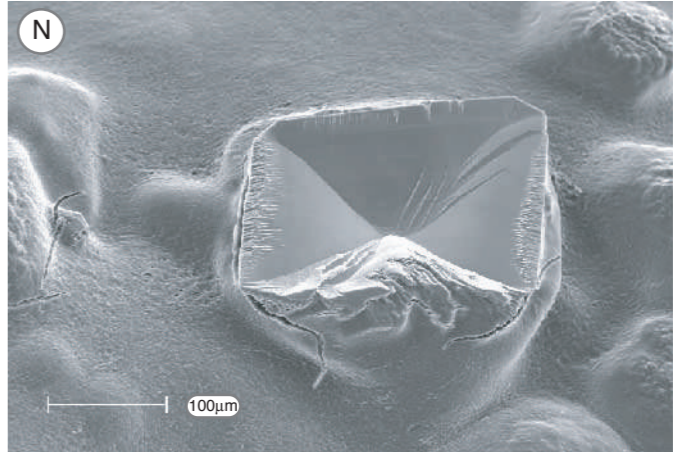
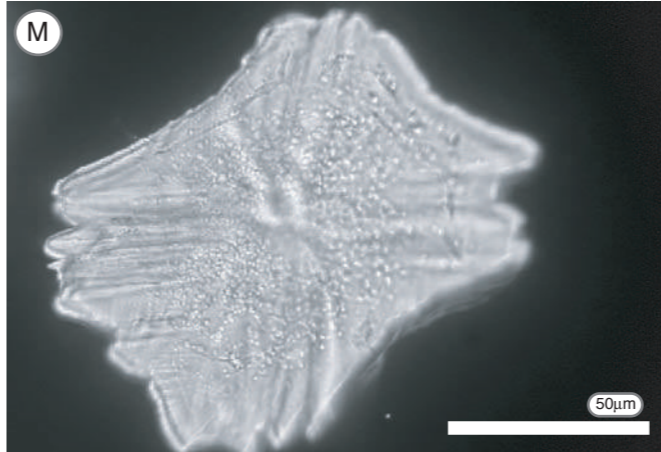
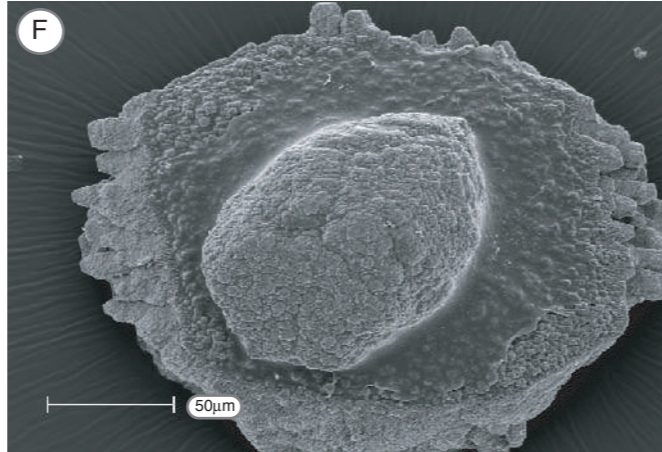
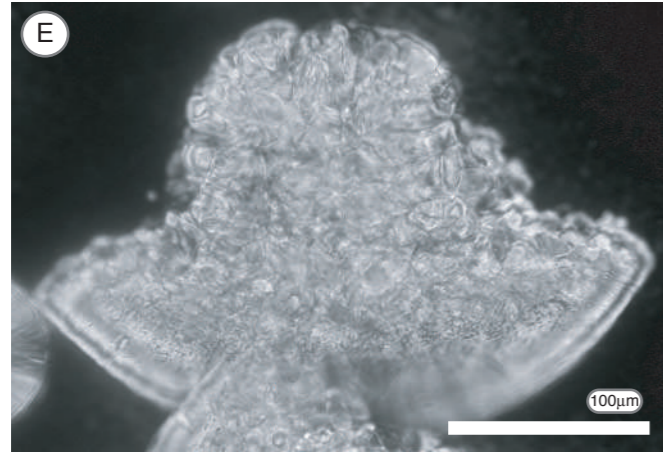
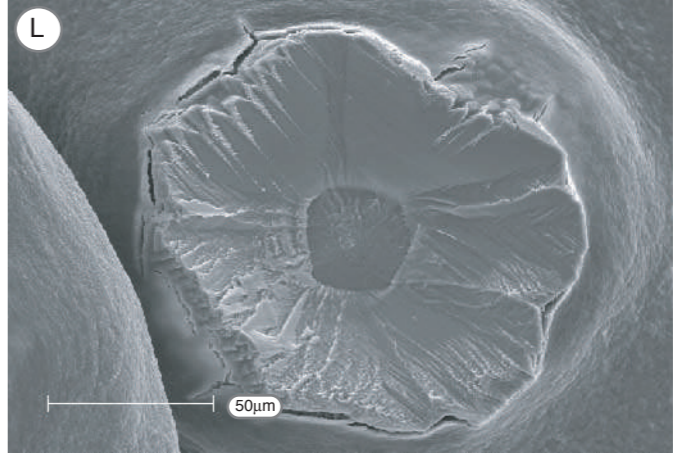
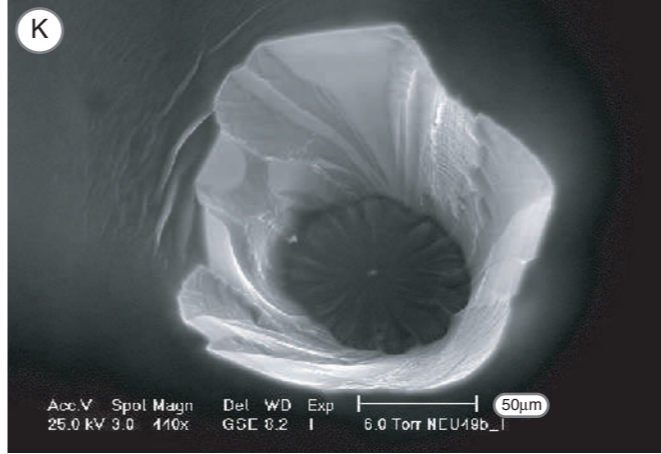
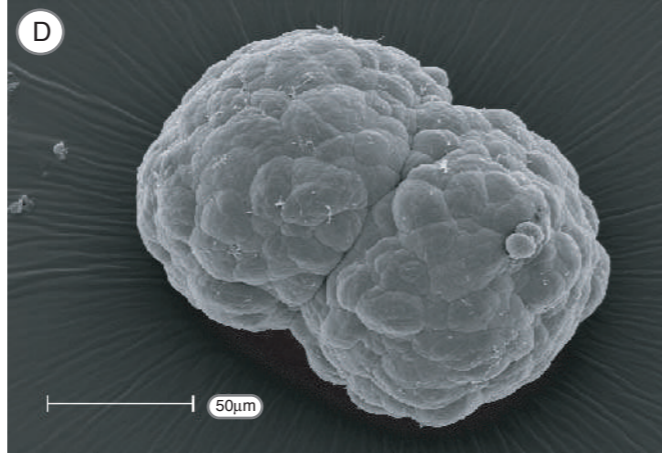
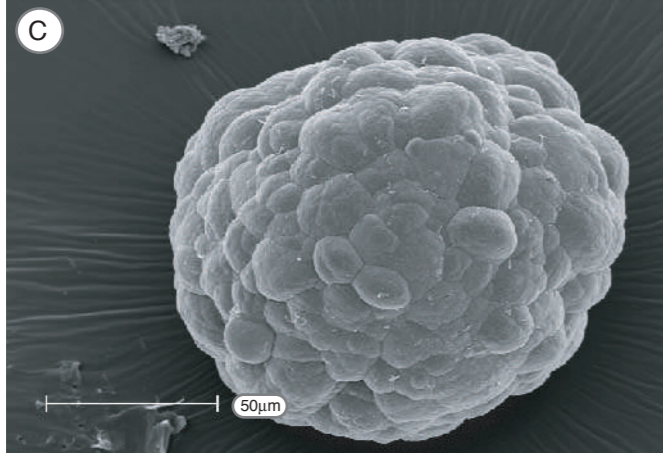
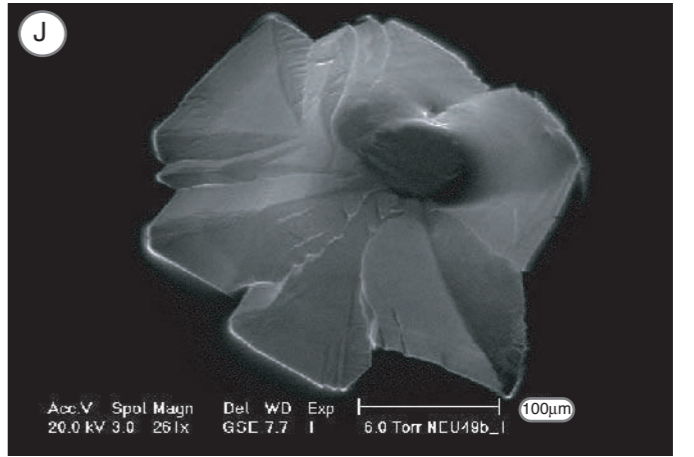
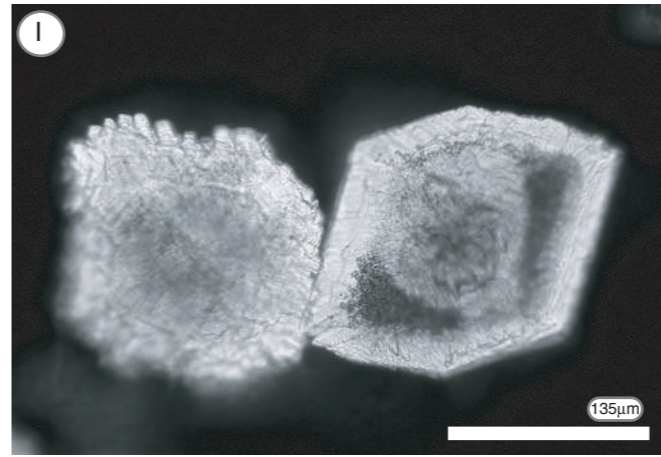
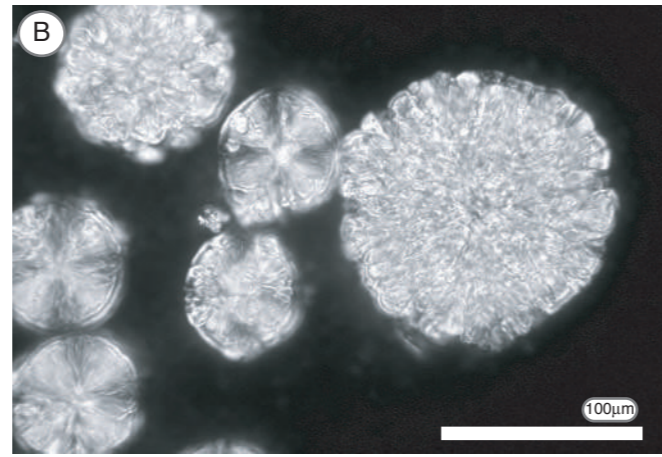
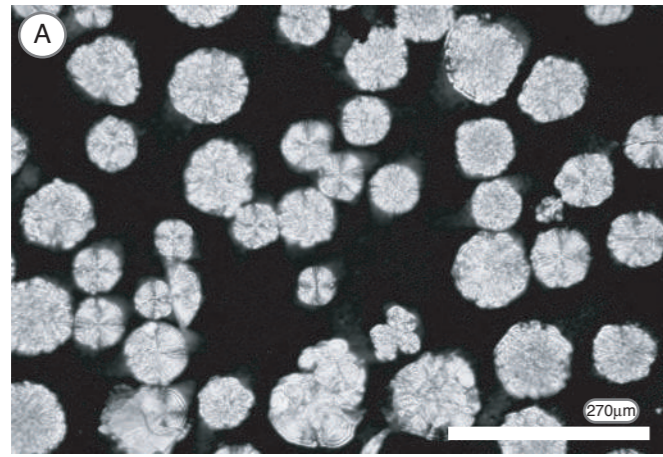
VALLI, H., MCKEE, M.D., ÇİFTÇIOĞLU, N., SEARS, S.K., PLOWS F.L., CHEVET, E., GHIABI, P., PLAVSIC, M., KAJANDER, O.E., AND ZARE, R.N., 2001, Nanoforms: a new type of protein-associated mineralization: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 65, p. 63–74.

VERRECCHIA, E.P., FREYET, P., VERRECCHIA, K.E., AND DUMONT, J.-L., 1995, Spherulites in calcrite laminar crusts: biogenic CaCO₃ precipitation as major contributor to crust formation: *Journal of Sedimentary Research*, v. A65, p. 690–700.

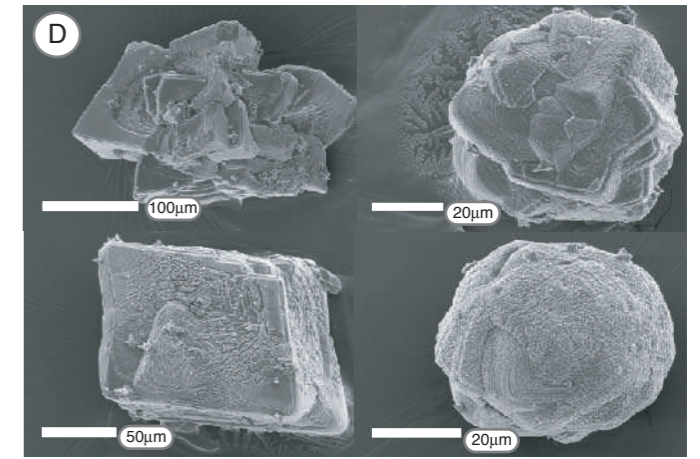
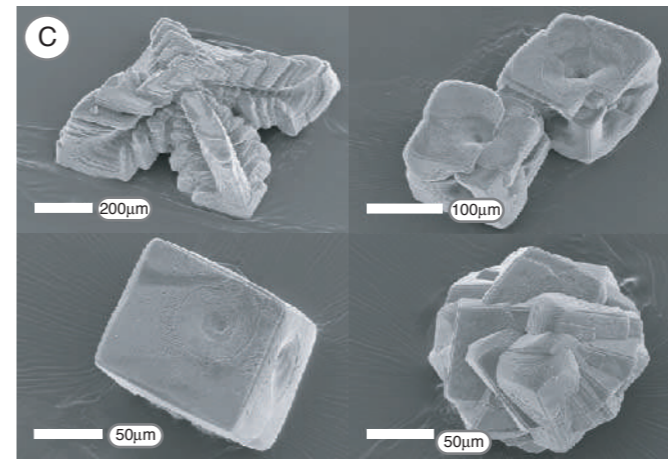
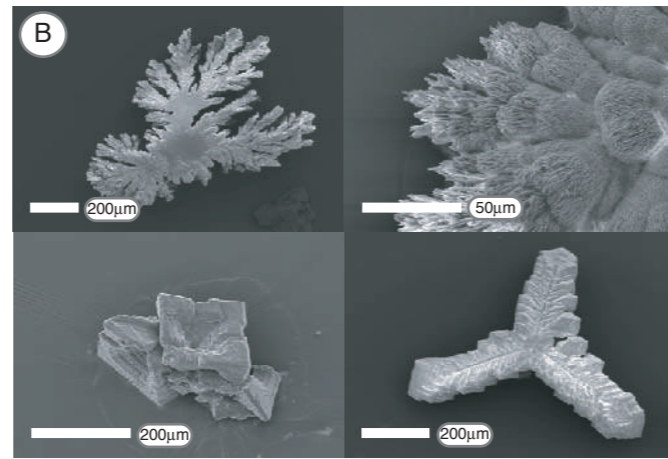
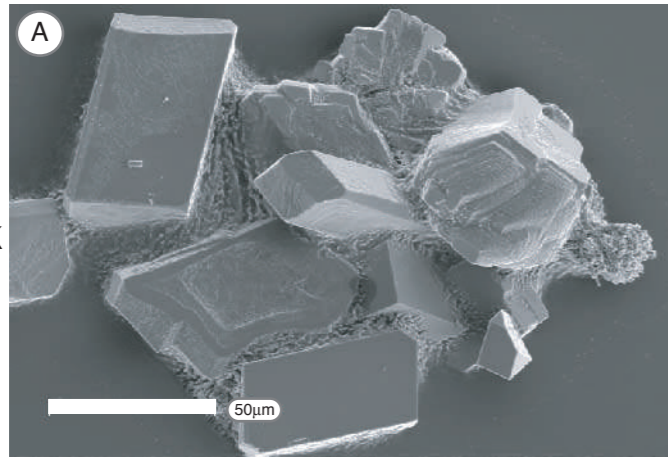
WARTHMAN, R., VAN LITH, Y., VASCONCELOS, C., MCKENZIE, J.A., AND KARPOFF A.M., 2000, Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments: *Geology*, v. 28, p. 1091–1094.

WIEGEL, J., 1991, The Genus *Xanthobacter*, in Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H., eds., *The Prokaryotes*: New York, Springer-Verlag, p. 2365–2383.

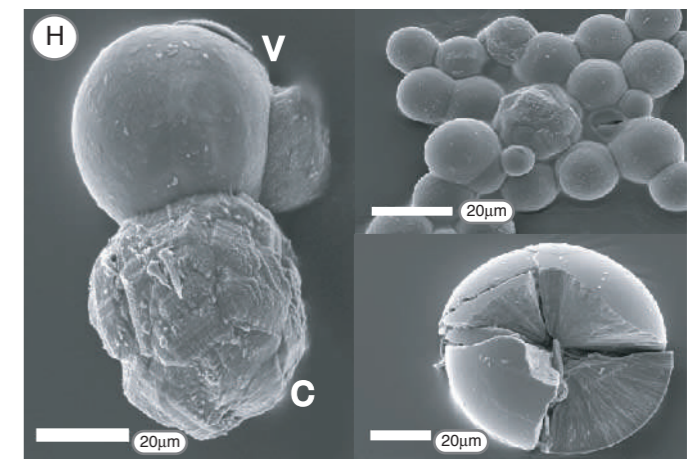
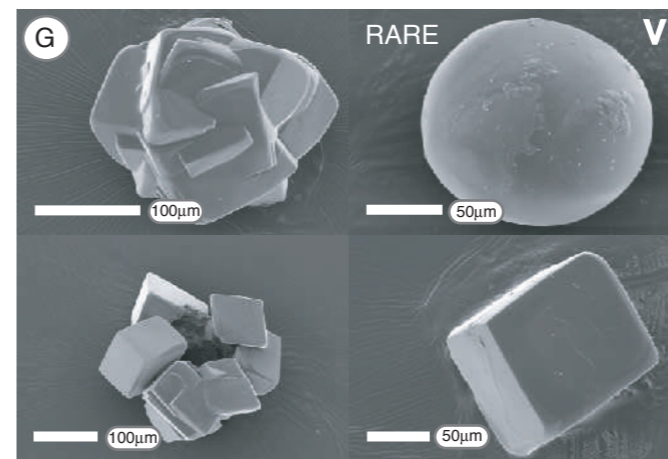
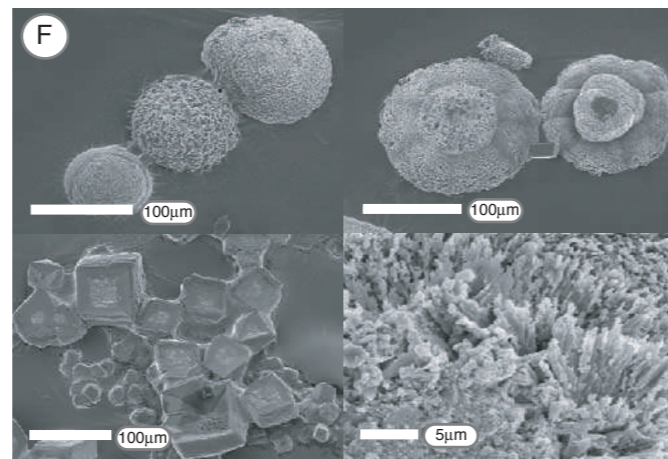
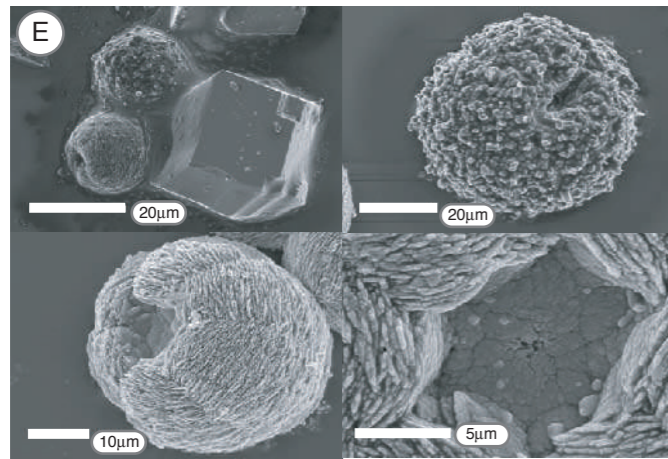
Received 22 July 2002; accepted 13 November 2002.



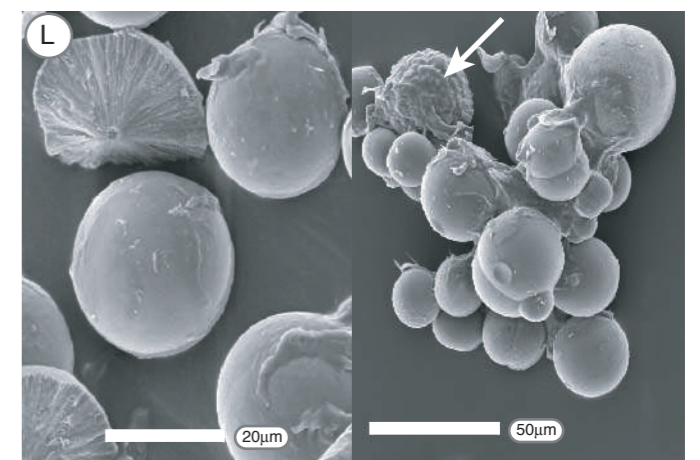
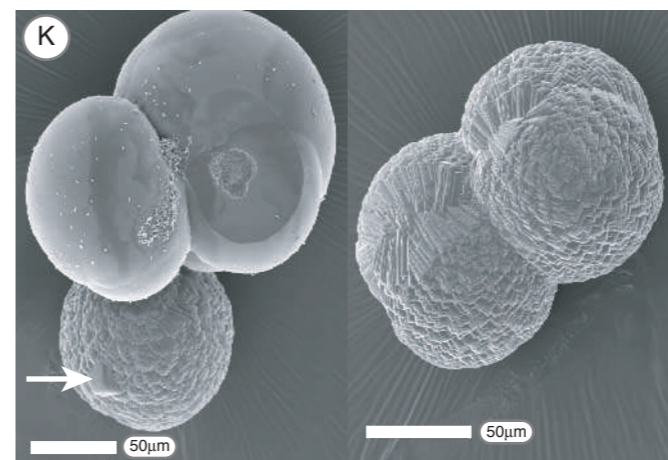
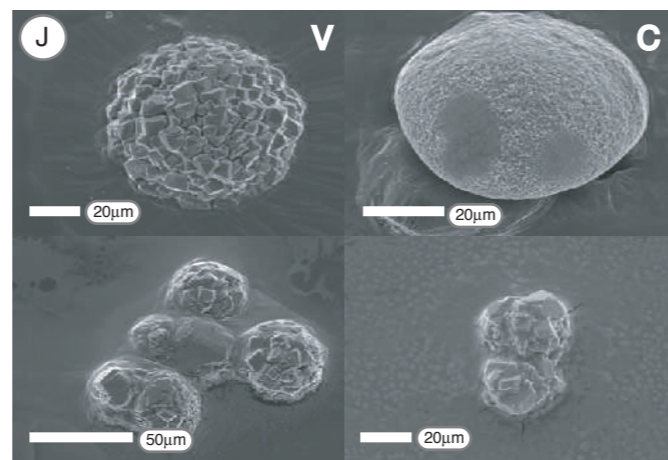
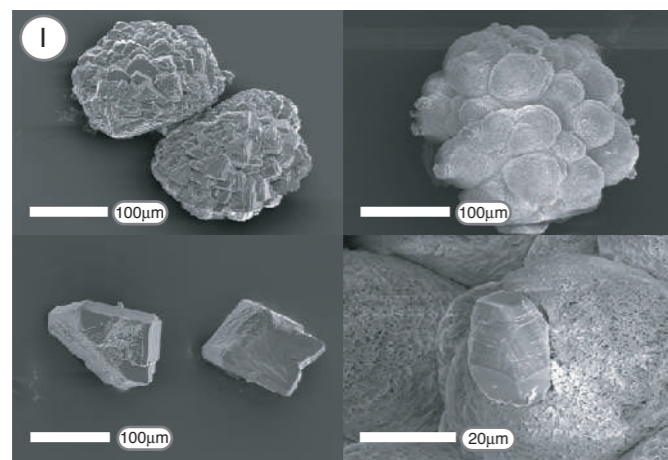
Blank



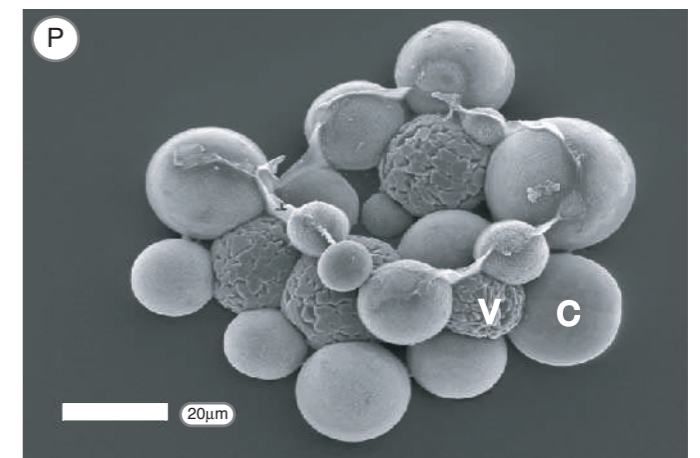
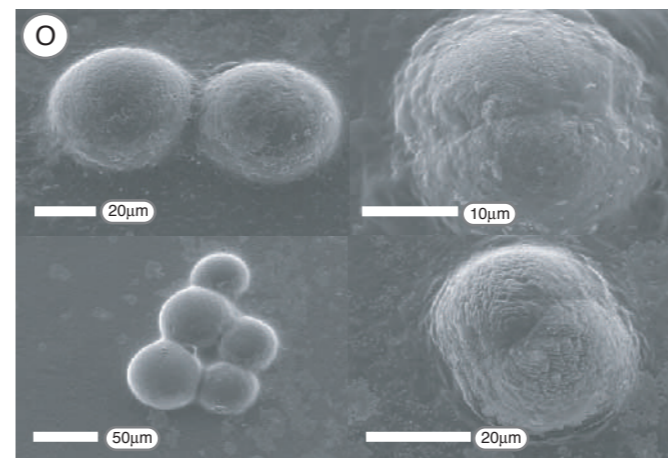
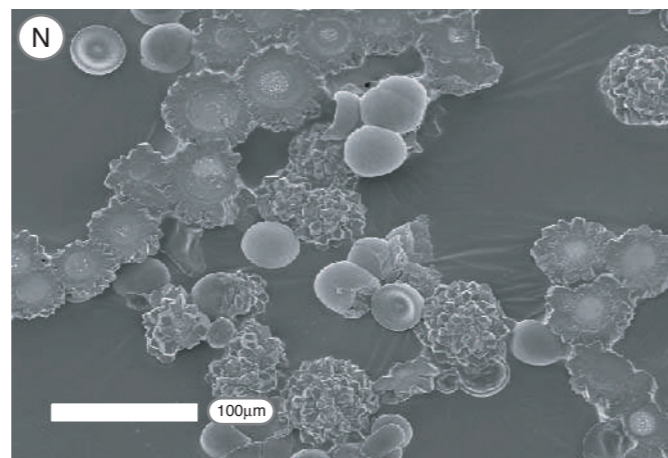
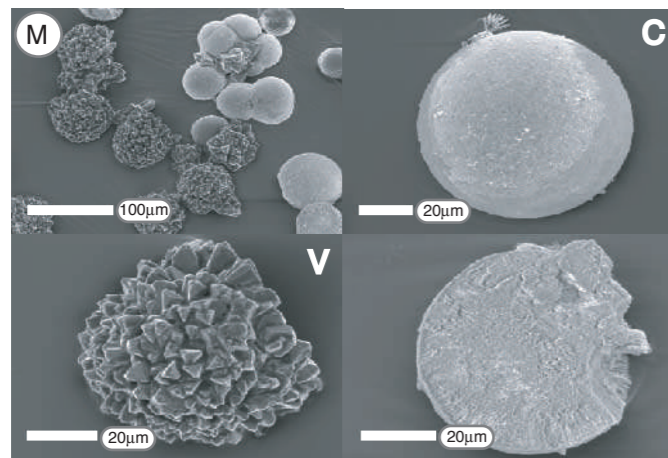
Gln



Glu



Asp



0.0%

0.1%

0.5%

1.0%

Biologically induced mineralization in the tree *Milicia excelsa* (Moraceae): its causes and consequences to the environment

OLIVIER BRAISSANT,¹ GUILLAUME CAILLEAU,¹ MICHEL ARAGNO² AND ERIC P. VERRECCHIA¹

¹*Institut de Géologie de l'Université de Neuchâtel, Laboratoire de Géodynamique de la Biosphère, Rue Emile Argand 11, 2007 Neuchâtel, Switzerland*

²*Institut de Botanique de l'Université de Neuchâtel, Laboratoire de Microbiologie, Rue Emile Argand, 9 Case Postale 2, 2007 Neuchâtel, Switzerland*

ABSTRACT

Iroko trees (*Milicia excelsa*) in Ivory Coast and Cameroon are unusual because of their highly biomineralized tissues, which can virtually transform the trunk into stone. Oxalic acid (C₂O₄H₂) and metal-oxalate play important roles in their ecosystems. In this study, the various forms of oxalate and carbonate mineralization reactions are investigated by using scanning electron microscopy and X-ray diffraction. Calcium oxalate monohydrate is associated with stem, bark and root tissues, whereas calcium oxalate dihydrate is found with wood rot fungi in soils, as well as in decaying wood. Laboratory cultures show that many soil bacteria are able to oxidize calcium oxalate rapidly, resulting in an increase in solution pH. In terms of *M. excelsa*, these transformations lead to the precipitation of calcium carbonate, not only within the wood tissue, but also within the litter and soil. We calculate that c. 500 kg of inorganic carbon is accumulated inside an 80-year-old tree, and c. 1000 kg is associated with its surrounding soil. Crucially, the fixation of atmospheric CO₂ during tree photosynthesis, and its ultimate transformation into calcite, potentially represents a long-term carbon sink, because inorganic carbon has a longer residence time than organic carbon. Considering that calcium oxalate biosynthesis is widespread in the plant and fungal kingdoms, the biomineralization displayed by *M. excelsa* may be an extremely common phenomena.

Received 11 July 2003; accepted 13 December 2003

Corresponding author: Dr Eric P. Verrecchia. Tel.: +41 (0)32 718 2579; fax: +41 (0)32 718 2601; e-mail: eric.verrecchia@unine.ch

INTRODUCTION

The African tree *Milicia excelsa* is a complex system, in which oxalic acid and metal oxalate play important roles. Calcium oxalate in plants has been reported to have many different functions. Oxalic acid is a low-molecular-weight organic acid, which is known to play a role in the regulation of free calcium ions in cytoplasm (Robert & Roland, 1989). In addition, calcium oxalate crystals in woody tissues are thought to render trees less palatable to termites and to act as a 'combustion-retarding agent' (Prior & Cutler, 1992). In leaves, calcium oxalate crystals provide physical protection against grazing animals. More recently, it was suggested that druse calcium oxalate crystals may help to distribute light evenly to the chloroplasts lining the radial walls and surrounding the vacuole in photosynthetic palisade cells of low-light-adapted plants (Franceschi, 2001). Calcium oxalate is particularly important because it is extremely common in plants and can

represent as much as 85% of a plant's dry weight (Robert & Roland, 1989).

No specific role has previously been proposed for oxalate in *M. excelsa*, because until now it has never been detected. Although its function remains unknown, metal-oxalate accumulation in *M. excelsa* must have important biogeochemical implications because oxalate minerals constitute a significant carbon source for oxalotrophic bacteria, which are numerous in both the tree and the surrounding litter. Moreover, wood-degrading fungi also influence the carbon (and some metal cation) cycles as a result of their production of large amounts of oxalic acid and other organic acids during the decay of cellulose and lignin (Cochrane, 1958; Dutton & Evans, 1996; Gadd, 1999).

The aim of this study is to investigate the role of bacteria and fungi in carbonate biomineralization within *M. excelsa*. Biomineralization (or mineralization) is defined in this study as the processes leading to inorganic mineral deposits

by living matter. In *M. excelsa*, we are particularly concerned with how the biogeochemical cycles of carbon, oxalate and calcium lead to the storage of inorganic carbon in the tree. The consequences of the transformation of oxalate into carbonate have already been studied with regard to soil fauna in temperate forests (Cromack *et al.*, 1977) and in Mediterranean to semi-arid calcrete environments (Verrecchia, 1990; Verrecchia & Dumont, 1996). Until now, however, no studies have been conducted in either a tropical environment or on the consequences of such processes in terms of carbon cycling and storage.

Discussions regarding the carbon sink in forests are predominantly focused on organic carbon storage, whereas soil mineral carbon is generally neglected. However, owing to the longer residence time of carbonate minerals in soils (10^2 – 10^6 years compared with 10 – 10^3 years for soil organic matter), storage of large quantities represents a potentially more efficient sink. *Milicia excelsa* is an excellent example of an ecosystem acting as a net carbon sink because carbonate accumulation involves only atmospheric CO_2 and Ca^{2+} from Ca-carbonate-free sources, i.e. calcium is not provided by the dissolution of primary (inherited) CaCO_3 . Considering the global distribution and the huge number of plants able to concentrate oxalate salts (Horner & Wagner, 1995), this potential source of carbon trapping should be clearly identified.

GEOLOGICAL SETTINGS

Samples were collected in Cameroon and Ivory Coast from trees having about the same diameter at a height of 1.20 m from the ground. In Cameroon, two sites were investigated: the first is situated 10 km west of Lolodorf ($10^\circ 47' \text{E}$, $3^\circ 13' \text{N}$) and the second is 15 km north of Yaounde, in the Leboudy region ($11^\circ 30' \text{E}$, $4^\circ 07' \text{N}$). At the first site, an evergreen forest grows on a yellowish brown lateritic (i.e. ferralitic) soil >3 m thick developed on a granitic bedrock (Tematio *et al.*, 2001). At the second site, the granite bedrock is overlain by a thin ferralitic soil (<1 m), covered by a semideciduous tropical forest. The climate at both Cameroon sites is equatorial with two wet seasons (April–July and September–December), a total precipitation 3000–5000 mm yr^{-1} and an annual mean temperature of around 25 °C.

In Ivory Coast, the study area is near the village of Biga ($7^\circ 32' \text{E}$, $6^\circ 36' \text{N}$), 30 km south from Daloa. This site is located on a reddish brown lateritic soil (i.e. a moderately desaturated ferralitic soil with 1–3 mEq/100 g of exchangeable bases and a mean pH of 5.5) developed on granitic parent material. This site was investigated for the first time by Carozzi (1967), who described a carbonate-cemented sandstone formed inside the lateritic soil and associated with *M. excelsa*. The vegetation at this site is a semideciduous tropical forest bordering a cleared forest (Ministère du plan, Côte d'Ivoire, 1979). The climate at the Ivory Coast site is tropical with two wet seasons (March–July and September–November), with a

total precipitation of about 2500 mm yr^{-1} . The mean annual temperature in Ivory Coast is 26.1 °C. *M. excelsa* is commonly logged in Ivorian forests.

MATERIALS AND METHODS

Milicia excelsa wood samples were tested for the presence of carbonate with 1 N hydrochloric acid. Wood, fractured bark and root samples were fixed with osmium tetroxide vapour and freeze-dried. Some of the samples were gold-coated, and then examined using Phillips XL20 and XL30 scanning electron microscopes with a 10 kV accelerating voltage to observe crystals formed in tissues and associated with wood-degrading fungi. Other parts of the samples were embedded in resin and prepared as thin sections (30 μm), and the remaining part of bark samples was crushed and analysed by X-ray diffraction (XRD) with a Scintag diffractometer.

The occurrence of oxalate-degrading bacteria in soils was monitored using soil inoculum in a 15 mL DSM 81 medium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.0 g L^{-1} , KH_2PO_4 1.5 g L^{-1} , NH_4Cl 1.0 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g L^{-1} , ferric ammoniacal citrate 0.005 g L^{-1} , CaCl_2 0.01 g L^{-1} , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, H_3BO_3 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 $\mu\text{g L}^{-1}$) also containing 4.0 g L^{-1} potassium oxalate. After the medium turned cloudy, 500 μL of the enriched culture was transferred to 15 mL of the same fresh medium. After the second enrichment, 10 μL of the culture was plated onto a solid DSM 81 medium with a sterile plastic inoculating loop (Sigma, Buchs, Switzerland). Calcium oxalate was added to this medium. The oxalate consumption by the isolated strains was controlled by observing the calcium–oxalate 4 g L^{-1} dissolution on the DSM 81 medium as described by Tamer & Aragno (1980).

In order to monitor oxalate consumption in soils associated with *M. excelsa*, two common oxalate-degrading bacteria, *Ralstonia eutropha* (DSM 428, ATCC 17699) and *Xanthobacter autotrophicus* (DSM 432, ATCC 35674; Tamer & Aragno, 1980), were inoculated into soil extract media. One to one ratio soil extracts (1 kg soil per 1 L of water) were prepared according to the method described by Parraga *et al.* (1998). Major anions and cations of this extract were analysed by liquid chromatography using a Dionex chromatograph with a conductivity detector. Columns used for anions and cations were Dionex IonPac™ AS11-HC (4 × 250 mm) and Dionex IonPac™ CS12A (4 × 250 mm), respectively. Ionic composition of the soil extract was as follows: Na^+ 13 mg L^{-1} , NH_4^+ 6 mg L^{-1} , K^+ 23 mg L^{-1} , Mg^{2+} 10 mg L^{-1} , Ca^{2+} 45 mg L^{-1} , Cl^- 18 mg L^{-1} , NO_2^- 3 mg L^{-1} , NO_3^- 150 mg L^{-1} , SO_4^{2-} 32 mg L^{-1} , and PO_4^{3-} 21 mg L^{-1} . The first medium was obtained by adding 15 g L^{-1} agar to these extracts. A second type of medium was made by adding 4 g L^{-1} calcium oxalate. Crystals produced on the different media were collected with tweezers, gold coated and observed with a Phillips XL30 SEM.

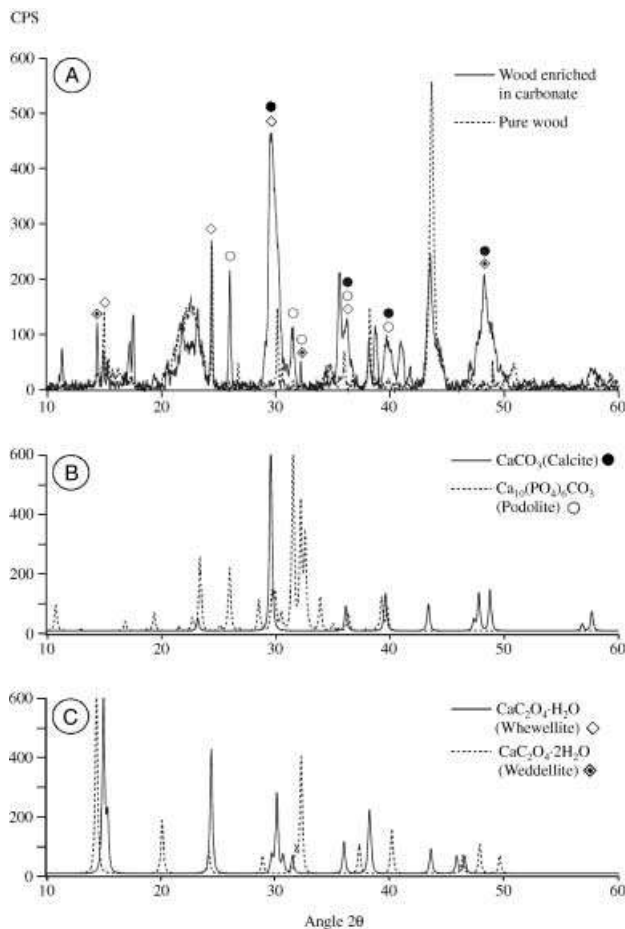


Fig. 1 X-ray diffractograms. A: wood samples enriched in carbonate and pure wood (symbols indicate characteristic peaks). B: reference calcite and calcium phosphate carbonate. C: reference calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate. Diffractogram A shows the strong differences between pure and carbonate-enriched wood.

RESULTS

X-ray diffraction analysis of *M. excelsa* wood and bark revealed the presence of calcium oxalate monohydrate [$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: whewellite], calcium oxalate dihydrate [$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: weddellite], calcium carbonate [CaCO_3], calcium phosphate carbonate [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$: podolite] and amorphous silica (Fig. 1). Scanning electron microscopy (SEM) showed the presence of euhedral whewellite crystals in the bark, as confirmed by X-ray analysis. These crystals, up to 50 μm in size, seem to be principally located near or in the conductive vessels of the wood (Fig. 2A,B). At the Ivory Coast site, large amounts of whewellite were also found forming a crust around *M. excelsa* roots (Fig. 2C,D).

On decayed or rotting wood, SEM indicated the presence of weddellite associated with the hyphae of some of the wood rot fungi (Fig. 2E,F). Monohydrate oxalate crystals were observed in stem tissues in both the Cameroon and Ivory Coast samples, whereas large amounts of monohydrate

oxalate associated with roots were only found in Ivory Coast *M. excelsa*. These roots do not form rhizoconcretions, but instead they are former living mineralized tissues that are found under the outer part of the root cuticle (Fig. 2C). In the latter case, it seems likely that whewellite is mainly associated with the living plant tissues, whereas weddellite is mainly related to decaying wood resulting from fungal activity. This is consistent with observations by Arnott (1995), who noted weddellite associated with wood rot fungi.

In both living and decaying wood, a large part of carbonate mineralized tissues is easily visible when thin sections of *M. excelsa* wood are observed by optical microscopy under polarized light (Fig. 3A,B). Moreover, anhedral to subhedral calcite crystals were observed filling conductive tissues using SEM (Fig. 3C,D). In addition, calcite rhombohedra and micritic aggregates were found in sap. Some of these micritic aggregates form spheres (Fig. 3E). Other carbonate features are found in sap and in decaying wood in the form of calcified tissues, including calcified cellulose fibres (Fig. 3F) and calcified cells (Fig. 3G), in which a calcified spheroid can be seen in the vacuole ghost (Fig. 3H). There is a striking difference between the Cameroon and Ivory Coast samples. In the former only traces of carbonate are found, whereas in the latter large parts of wood are replaced by carbonate.

More than 20 different morphotypes of oxalate-degrading bacteria were found in the soils surrounding *M. excelsa* (Fig. 2B). Some of these were identified as *Streptomyces* and other Actinomycetes, Pseudomonads and putative *Variovorax* (Sahin, 2003). All isolated strains quickly dissolved calcium-oxalate on the DSM 81 medium, and the resulting precipitation of calcium-phosphate-carbonate was identified by XRD, optical and electron microscopy, coupled with energy-dispersive X-ray (EDAX) analysis (Fig. 4A,B; Braissant *et al.*, 2002). For example, a rapid consumption of oxalate has been observed during the growth of a *R. eutropha* culture in a DSM 81 medium. After 48 h, oxalate is no longer present in the medium (Fig. 5). In addition, rapid dissolution of calcium oxalate was observed on a soil-extract medium to which calcium oxalate was added. On a 1 : 1 soil extract (with or without the addition of calcium oxalate) *R. eutropha* and *X. autotrophicus* show normal growth, demonstrating that an oxalate molecule is preferred to other carbon sources present in the soil extract. As the consumption of calcium oxalate by oxalotrophic bacteria progresses, the pH of the medium increases to a point at which calcium carbonate deposition is favourable. Spheroid micritic aggregates of calcite were also found in soil extract media associated with gypsum, showing that calcium oxalate associated with *M. excelsa* is rapidly consumed and transformed into carbonate (Fig. 4C,D). The precipitation of one or the other of the two minerals, calcite or podolite (a calcium-phosphate-carbonate), is mainly related to the concentration of phosphate in the different media (Stumm & Morgan, 1981). In DSM 81, phosphate is abundant because it is used as a buffer. Finally, one fungal strain was

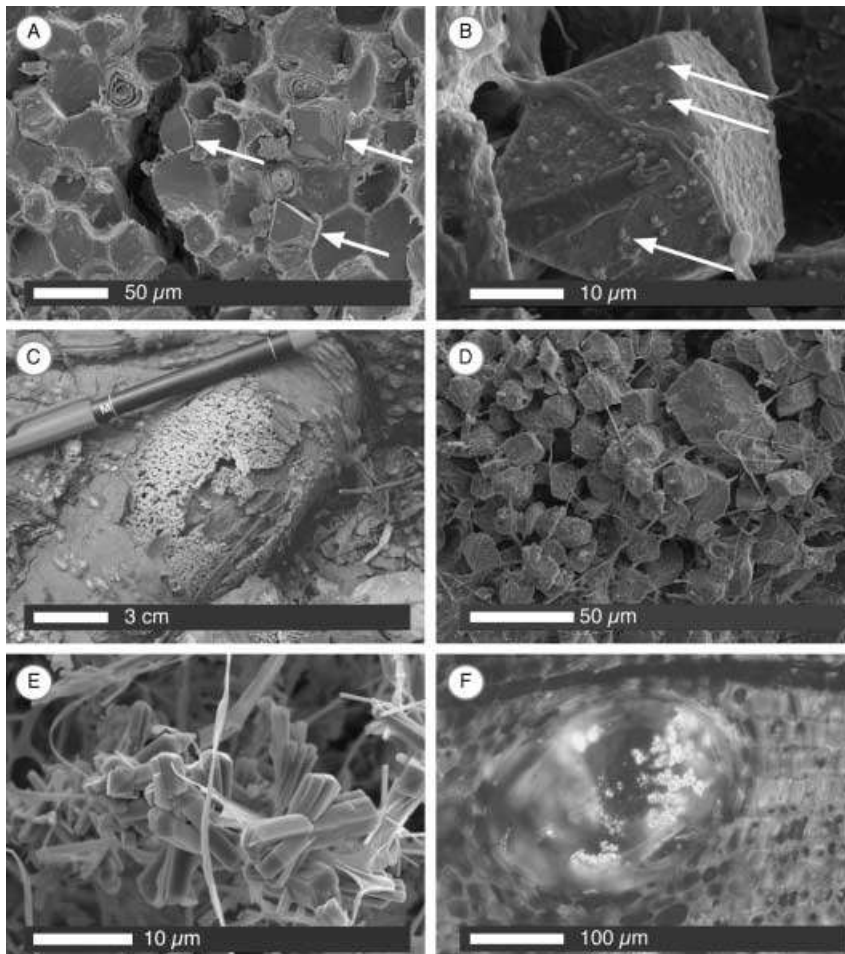


Fig. 2 SEM images of calcium oxalate crystals associated with *M. excelsa*. A: view of fractured bark showing calcium oxalate monohydrate encased in the wood tissues (arrows). B: bacteria (arrows) on a calcium oxalate monohydrate crystal. C: *M. excelsa* root encrusted with calcium oxalate monohydrate. D: details of C showing the whewellite crystals encrusting *M. excelsa* roots. E: weddellite associated with fungal hyphae on decayed wood. F: weddellite associated with fungi in *M. excelsa* conductive tissues.

co-isolated with bacteria on the DSM 81 medium. This strain is able to grow on oxalate as the sole carbon source, resulting in the dissolution of calcium oxalate and production of a mixed calcium-phosphate-carbonate phase.

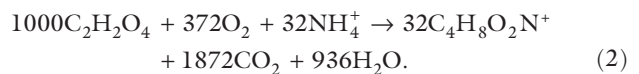
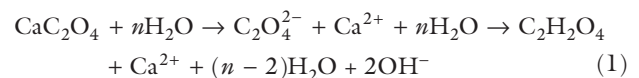
DISCUSSION

The presence of whewellite in the *M. excelsa* tissues, as well as weddellite associated with fungi, correlates well with previous studies that have documented oxalate biosynthesis and occurrence in plants and fungi (Pobeguín, 1943; Franceschi & Horner, 1980; Robert & Roland, 1989; Khan, 1995; Dutton & Evans, 1996; Gadd, 1999). In *M. excelsa*, whewellite is often found in conductive tissues and is able to encrust roots. It is likely that this form of calcium oxalate is a result of the mineral nutrition of *M. excelsa* (see Jones, 1998, for a review) or in aluminium detoxification, as suggested for bacteria by Hamel *et al.* (1999). The presence of whewellite and amorphous silica in *M. excelsa* bark could also be related to termite protection, as suggested for acacia trees (Prior & Cutler, 1992).

Weddellite is commonly associated with fungi in decaying wood. The role of oxalic acid in fungal pathogenicity is well

documented (see Dutton & Evans, 1996, for a review). However, wood rot fungi, which are not typically associated with calcium oxalate minerals, do appear to play a role in the oxalate cycle. During their consumption of cellulose, they probably help to release euhedral whewellite crystals encased in the wood tissues.

Both whewellite and weddellite are abundantly consumed by bacteria (see Eqs 1 and 2, modified from Harder *et al.*, 1974) and other micro-organisms because no macroscopic accumulation of calcium oxalate was observed in the soil and litter surrounding *M. excelsa*:



This is consistent with the rapid organic acid consumption observed for malate by Jones *et al.* (1996). Regarding *M. excelsa*, the results of bacterial growth on soil extract media indicate that such consumption is also true for oxalate. There are two

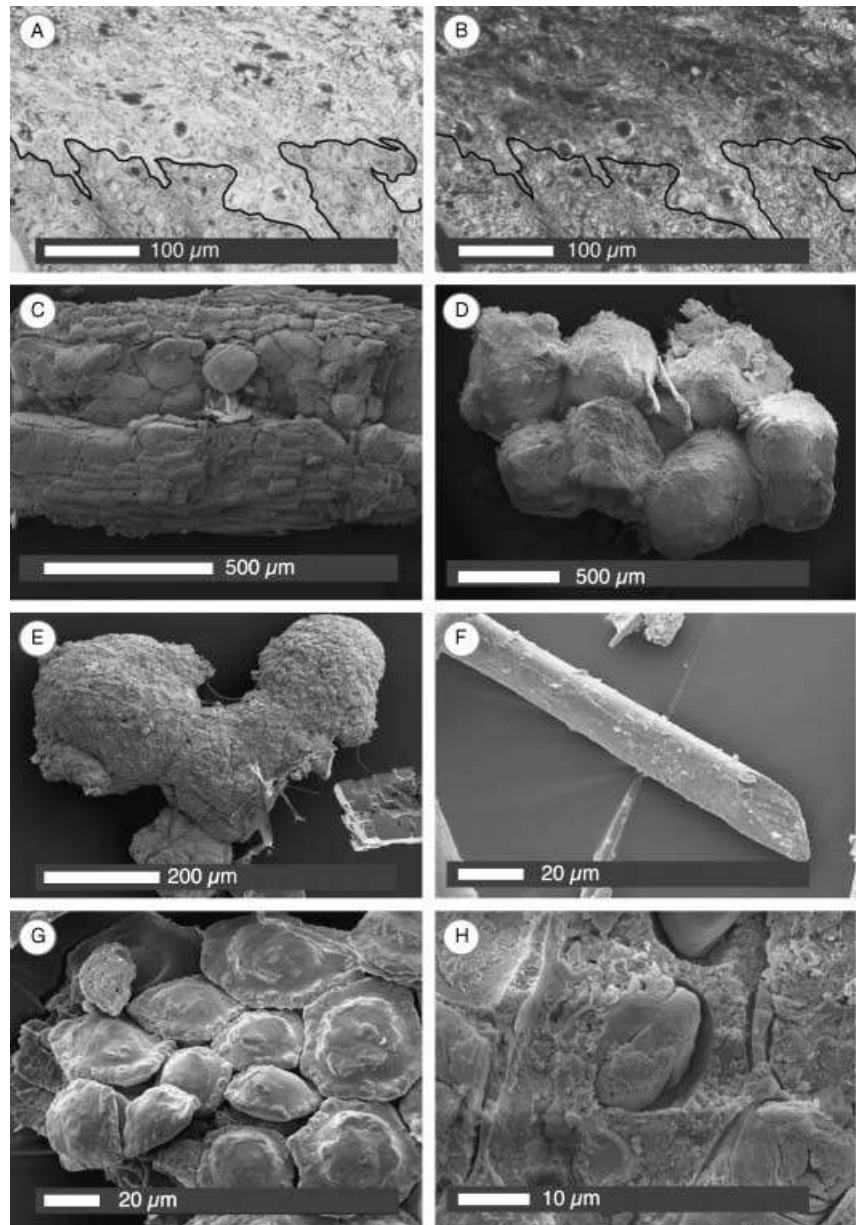
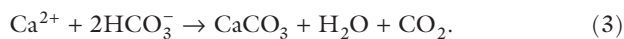


Fig. 3 Calcium carbonate crystals and carbonate-enriched tissues found in mineralized *M. excelsa*. A,B: thin section of *M. excelsa* woody tissues observed in plane (A) and cross-polarized light (B) showing large sections of carbonate mineral precipitation. Above black line, calcified woody tissues; below black line, non-mineralized woody tissues. C: SEM view of a conductive vessel infilled with anhedral to subhedral calcium carbonate crystals. D: SEM view of calcium carbonate crystals found in decaying wood. E: SEM view of calcium carbonate as micritic aggregates forming spheres and rhombohedron found in *M. excelsa* sap. F: SEM view of a cellulose fibre entirely replaced by calcium carbonate. G: SEM view of cells totally replaced carbonate. H: SEM view of carbonate-enriched tissues showing ghosts of the cell vacuole infilled by calcium carbonate and carbonate-mineralized cell walls.

principal consequences of oxalate consumption. First, metal ions are released in soils and are probably more available for other organisms, and particularly for plant and soil animals as proposed by Cromack *et al.* (1977). Second, there is a pH increase owing to the transformation of oxalate into bicarbonate, because oxalic acid ($\text{p}K_1 = 1.25, \text{p}K_2 = 4.27$) is 'stronger' than carbonic acid ($\text{p}K_1 = 6.35, \text{p}K_2 = 10.33$). This pH increase provides the required conditions for carbonate precipitation in *M. excelsa* environments (Eq. 3, with degassing of carbon dioxide):



During bacterial growth on DSM 81 and soil extract media, biologically induced changes in chemical conditions also

resulted in the precipitation of calcium-phosphate-carbonate (Braissant *et al.*, 2002), along with calcite. Therefore these experimental results seem to explain the relationship between the oxalotrophic bacteria and these minerals found in the natural environment (Fig. 1A). They might also help to explain some of the contributory factors leading to the precipitation of calcite-cemented sandstones that are observed in the tropical forested ecosystems of Ivory Coast (Carozzi, 1967; Cailleau *et al.*). Only gypsum has neither been detected in the tree nor in the soil, although it has been precipitated in laboratory experiments; the tropical conditions probably result in its dissolution.

Based on our results, a model for the calcification of *M. excelsa* is as follows (Fig. 6):

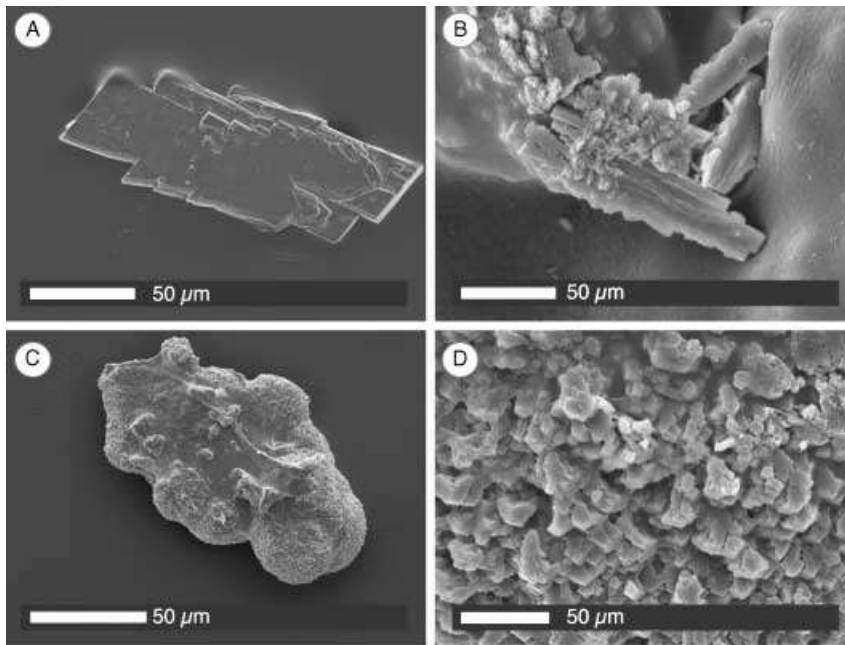


Fig. 4 SEM view of crystals resulting from calcium oxalate consumption by bacteria on Petri dishes. A: calcium-phosphate-carbonate crystal produced on DSM 81 medium. B: calcium-phosphate-carbonate crystal produced on soil extract media containing calcium oxalate. C: calcite micritic aggregates forming spherulites produced on soil extract media containing calcium oxalate. D: detail of a micritic aggregate showing the calcitic habit of individual crystals.

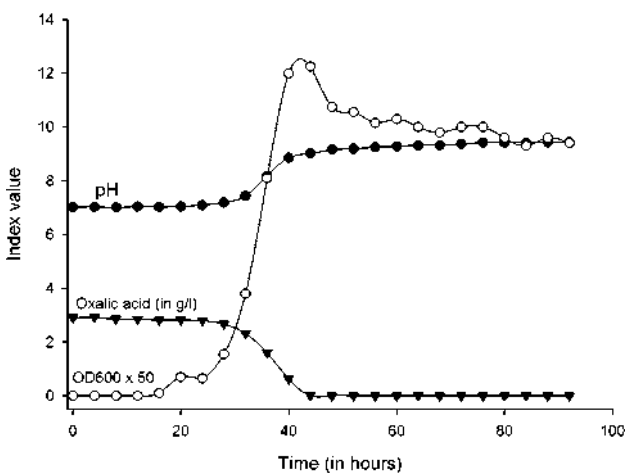


Fig. 5 Evolution of index values (cell density measured turbidimetrically at 600 nm, pH and oxalate concentration in g L^{-1}) during the culture of *R. eutropha* in a DSM 81 liquid medium.

1 Whewellite forms in the tree wood and bark because *M. excelsa* produces large amounts of oxalic acid as a metabolic product, which reacts with calcium ions (see 1 in Fig. 6).

2 Weddellite forms in rotting wood because, during cellulose and lignin degradation, oxalic acid is produced in large amounts by fungi. Weddellite formation results from calcium-ion chelation from the plant cell wall (Dutton & Evans, 1996; see 2 in Fig. 6).

3 Oxalotrophic bacteria present in the soil and the tree tissues (introduced through wounds) transform oxalates (Ca-oxalate and oxalic acid) into carbonate (see 3 in Fig. 6).

4 Other minerals, such as gypsum and podolite, also form as a result of local pH changes and carbonate ion production (see 4 in Fig. 6).

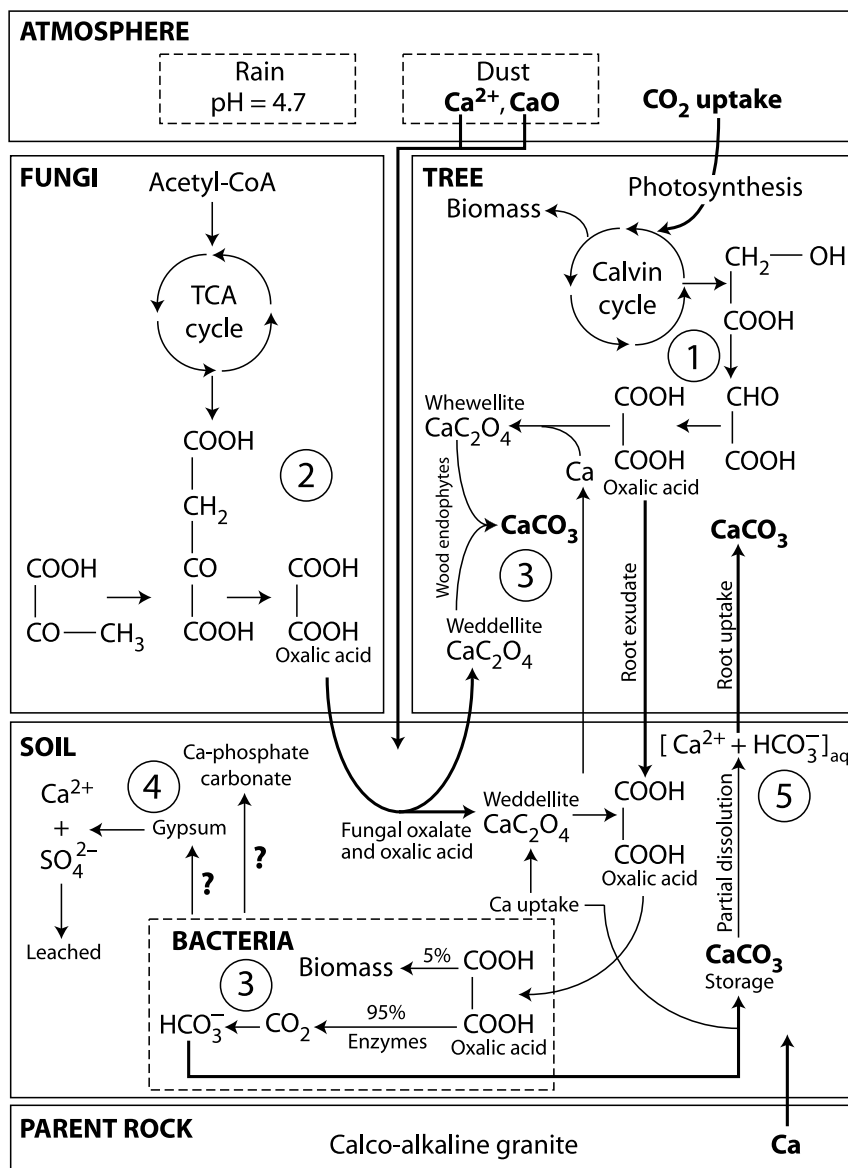
5 Calcite produced in the soil by bacteria (see 3 in Fig. 6) can be partially dissolved by rain (pH = 4.7). Bicarbonate ions can be pumped by the tree leading to CaCO_3 deposition, even in undersaturated conditions as described by Wollast (1971; see 5 in Fig. 6).

The differences in carbonatation between Cameroon and Ivory Coast samples are probably due to differences in hydrological conditions. It is possible that carbonate ions produced in Cameroon are leached and diluted as a result of the higher rainfall. Therefore, the accumulation of calcium carbonate inside the soil, as well as in the tree, is less likely to occur. However, all the processes described in Fig. 6 result in the accumulation of calcium carbonate in alkalized soils associated with *M. excelsa*. In summary, calcium carbonate is derived from the oxidation of carbon originally fixed during tree photosynthesis from atmospheric CO_2 through an oxalate step. This may constitute an important potential carbon sink.

During the last century, deforestation in Ivory Coast has led to the disappearance of 12.5 million hectares of the original rainforest. *Milicia excelsa* has been extensively logged and now it only remains in protected areas (Braissant *et al.*, 2003). Nevertheless, calculations using soil and tree carbonate titrations suggest that at least 1500 kg of $\text{C}_{\text{mineral}}$ is trapped during the life of a single *M. excelsa* tree (*c.* 500 kg inside the tree and *c.* 1000 kg in surrounding soils). This value is equivalent to a sequestration of $18.25 \text{ kgC yr}^{-1}$.

Typically, the forestry carbon sequestration component of the global carbon cycle is linked to soil organic matter, not to soil mineral carbon (Prentice *et al.*, 2001). However, as we

Fig. 6 Sketch showing possible mechanisms leading to the precipitation of carbonate in *M. excelsa* tissues; calcium ions are mainly provided by rain and dust and (to a much lesser extent) by granite. (1) Whewellite is produced inside the tree through atmospheric CO₂ uptake and the Calvin cycle. (2) Fungi also produce large amounts of weddellite through different pathways [including the tricarboxylic acid (TCA) cycle]. (3) Oxalic acid and both forms of calcium oxalate found in the tree and its litter can be transformed into calcite by the action of oxalate-degrading bacteria. Wood pathogens (fungi and bacteria) are able to release whewellite crystals, generating a pool of free oxalate crystals. Oxalate-degrading bacteria enter the tree through wounds, and also transform oxalate into carbonate inside the tree itself. In the *M. excelsa* rhizosphere and litter, oxalate-degrading bacteria can use fungal Ca-oxalate and oxalic acid excreted by the tree roots. This biological process leads to the formation of calcite concretions inside the wood and calcite accumulation in the *M. excelsa* rhizosphere. (4) Gypsum and calcium-phosphate-carbonate are produced as a result of a local pH increase and bicarbonate ion concentration. Gypsum is not stable in the *M. excelsa* environment and is easily leached. However, calcium-phosphate-carbonate is found in the soil but at lower concentration than calcite. (5) The acidity of the rain (pH = 4.7) allows some of the calcium carbonate formed in the soil to be dissolved. Bicarbonate ions may be reabsorbed by the tree during water absorption. These anions reprecipitate in the tree even from an undersaturated solution because of strong capillary action. This process probably leads to secondary calcium carbonate deposition inside the tree through vessels.



have shown, the abundance of carbonate minerals within *M. excelsa* testifies to the fact that the inorganic sink is of great significance to the terrestrial carbon cycle. As mentioned above, the sustainability of a carbon pool is also an important point: time residence for organic matter and mineral carbon in soil are at least 10¹–10³ years and 10²–10⁶ years, respectively (Retallack, 1990; Prentice *et al.*, 2001). Biologically induced mineral carbon sinks are undoubtedly more efficient for carbon sequestration than soil organic matter.

CONCLUSIONS

Milicia excelsa trees in Ivory Coast and Cameroon are unusual because of their highly biomineralized roots and trunk. Moreover, around these trees, calcium carbonate accumulations occur in acidic ferralitic soils, making these soils locally alkaline.

This change in pedochemical conditions is made possible by the presence of oxalate in the soil and tree, which creates favourable conditions for CaCO₃ precipitation. At least three sources of oxalate contribute to the budget: the *M. excelsa* tree, fungi and bacteria. The soil microflora includes bacteria that oxidize oxalate into carbonate, increasing the pH, and enhancing calcium carbonate accumulation. It seems that a period of low rainfall is necessary to allow CaCO₃ accumulation in the upper soil. To summarize, three conditions are necessary for calcium carbonate accumulations in ferralitic soils: (i) a large amount of oxalate, (ii) appropriate bacteria for oxalate oxidation into carbonate and (iii) a dry season. These conditions exist in many areas of tropical Africa. Consequently, carbon storage as inert calcium carbonate in soils from atmospheric CO₂ through a Ca-oxalate step constitutes a newly identified and neglected carbon sink.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr T. Adatte for XRD analysis, and Dr M. Dadras, M. Leboeuf, N. Jeanneret and K. Verrecchia for their helpful advice during the work. Logistical help was provided by the Centre Suisse de la Recherche Scientifique in Abidjan, Ivory Coast, and by Dr Neree Onguene Awana, Institut pour la Recherche et le Développement, Yaoundé, Cameroon. Three anonymous reviewers and especially Dr Kurt Konhauser greatly improved the first draft of this manuscript. This work is supported by the Swiss National Science Foundation, grant no. 2153-065174.01.

REFERENCES

- Arnett HJ (1995) Calcium oxalate in fungi. In *Calcium Oxalate in Biology Systems* (ed. Khan SR). CRC Press, London, pp. 73–111.
- Braissant O, Cailleau G, Dupraz C, Aragno M, Verrecchia EP (2003) *Biomediated Carbonate Storage: a Longer Term Carbon Sink Than Organic Matter*. 4th Swiss Global Change Day 2003, 4 April 2003. Bern, Switzerland.
- Braissant O, Verrecchia EP, Aragno M (2002) Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated? *Naturwissenschaften* **89**, 366–370.
- Carozzi AV (1967) Recent calcite-cemented sandstone generated by the equatorial tree iroko (*Chlorophora excelsa*), Daloa, Ivory Coast. *Journal of Sedimentary Petrology* **37**, 597–600.
- Cochrane VW (1958) *Physiology of Fungi*. John Wiley and Sons Inc, London.
- Cromack K, Sollins P, Todd RL, Fogel R, Todd AW, Fender WM, Crossley ME, Crossley DA (1977) The role of oxalic acid and bicarbonate in calcium cycling by fungi and bacteria: some possible implications for soils animals. *Ecological Bulletin (Stockholm)* **25**, 246–252.
- Dutton MV, Evans CS (1996) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 881–895.
- Franceschi V (2001) Calcium oxalate in plants. *Trends in Plant Science* **6**, 331.
- Franceschi V, Horner HT (1980) Calcium oxalate crystals in plants. *Botanical Review* **46**, 361–427.
- Gadd GM (1999) Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Advances in Microbial Physiology* **41**, 47–92.
- Hamel R, Lévassour R, Appanna VD (1999) Oxalic acid production and aluminium tolerance in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Inorganic Biochemistry* **76**, 99–104.
- Harder W, Wiersma M, Groen L (1974) Transport of substrates and energetics of growth of *Pseudomonas oxalaticus* during growth on formate or oxalate in continuous culture. *Journal of General Microbiology* **81**, ii–iii.
- Horner HT, Wagner BL (1995) Calcium oxalate formation in higher plants). In *Calcium Oxalate in Biology Systems* (ed. Khan SR). CRC Press, London, pp. 53–72.
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* **205**, 25–44.
- Jones DL, Prabowo AM, Kochian LV (1996) Kinetics of malate transport and decomposition in acid soils and isolated bacterial population – the effect of microorganisms on root exudation of malate under Al stress. *Plant and Soil* **182**, 239–247.
- Khan SR (1995) *Calcium Oxalate in Biological Systems*. CRC Press, London.
- Ministère du plan, Côte d'Ivoire (1979) *Atlas de Côte d'Ivoire*. Association de l'Atlas de Côte d'Ivoire, Abidjan.
- Parraga J, Rivadenneyra MA, Delgado R, Iniguez J, Soriano M, Delgado G (1998) Study of biomineral formation by bacteria from soil solution equilibria. *Reactive and Functional Polymers* **36**, 265–271.
- Pobeguinn T (1943) Les oxalates de calcium chez quelques angiospermes: étude physico-chimique, formation, destin. *Annales Des Sciences Naturelles, Botanique* **IV**, 1–95.
- Prentice IC, Farquhar GD, Fasham MJR, Goulden ML, Heimann M, Jaramillo VJ, Khashgi HS, Le Quéré C, Scholes RJ, Wallace DWR (2001) The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide. In *Climate Change 2001: the Scientific Basis*. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 185–237.
- Prior J, Cutler D (1992) Trees to fuel Africa's fires. *New Scientist* **135**, 35–39.
- Retallack GJ (1990) *Soil of the Past: An Introduction to Paleopedology*. Unwin-Hyman Ltd, London.
- Robert D, Roland J-C (1989) *Biologie Végétale*. Doin, Paris.
- Sahin N (2003) Oxalotrophic bacteria. *Research in Microbiology* **154**, 399–407.
- Stumm W, Morgan J (1981) *Aquatic Chemistry*, 2nd edn. John Wiley and Sons, New York.
- Tamer A, Aragno M (1980) Isolement, caractérisation et essai d'identification de bactéries capables d'utiliser l'oxalate comme seule source de carbone et d'énergie. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles* **103**, 91–104.
- Tematio P, Nyama AB, Kengni L, Bitom D (2001) Influence de la mise en culture sur la fertilité des sols en région forestière tropicale humide du Sud Cameroun. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* **87**, 321–335.
- Verrecchia EP (1990) Litho-diagenetic implications of the calcium oxalate-carbonate biogeochemical cycle in semiarid calcrete, Nazareth, Israel. *Geomicrobiology Journal* **8**, 87–99.
- Verrecchia EP, Dumont J-L (1996) A biogeochemical model for chalk alteration by fungi in semiarid environments. *Biogeochemistry* **35**, 447–470.
- Wollast R (1971) Kinetic aspects of the nucleation and growth of calcite from aqueous solutions. In *Carbonate Cements* (ed. Bricker PO). Johns Hopkins University Studies in Geology 19. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, pp. 264–273.

The oxalate-carbonate pathway in soil carbon storage: the role of fungi and oxalotrophic bacteria

ERIC P. VERRECCHIA, OLIVIER BRAISSANT, GUILLAUME CAILLEAU

Introduction

Although fungi are generally disregarded in the biogeochemical literature, they undoubtedly constitute crucial biogeochemical factors in many elemental cycles. This fact, combined with their abundance in the soil warrants greater detailed study into their geoeological impact. The network formed by fungal filaments can represent 10'000 km of thread-like mycelia in 1 m² of fertile soil. Their mass is evaluated at 3500 kg.ha⁻¹ at a depth of 20 cm in an average continental soil, i.e. taking into account all the different terrestrial environments on the Earth (Gobat, Aragno & Matthey, 2004). In comparison, bacteria and algae would represent 1500 and 10-1000 kg.ha⁻¹ respectively, in the same virtual average soil. Fungi are not only biologically important actors as saprophytes in the recycling of organic matter. They also play a geological role by excreting notable amounts of organic acids, among which oxalic acid is particularly important (Gadd, 1999), contributing to continental weathering as well as to mineral neogenesis (Verrecchia & Dumont, 1996; Verrecchia, 2000; Burford, Fomina & Gadd, 2003; Burford, Kierans & Gadd, 2003).

The first fossil fungi have been identified in rocks dated from the Ordovician, i.e. 460 to 455 Ma ago (Redecker, Kodner & Graham, 2000). But molecular clock estimates for the evolution of fungi have suggested a Late Precambrian (600 Ma) colonization on land (Berbee & Taylor 2000). Recent molecular studies, based on protein sequence analysis, indicate that fungi were present on continents 1 billion years ago and possibly

affected (together with plants), the evolution of Earth's atmosphere and climate since 700 Ma (Heckman *et al.*, 2001). Therefore, if fungi have been present on the Earth's surface for such a long time, producing large amounts of oxalic acid able to precipitate as metal oxalates, why is there no evidence of oxalate accumulation in paleosols? The question is also valid for present-day soils. The aim of this chapter is to demonstrate (1) that plants and fungi can produce high amounts of calcium oxalate polymorphs (weddelite $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$ and whewellite $CaC_2O_4 \cdot H_2O$) by various processes, and (2) that oxalotrophic bacteria must have used these abundant oxalate crystals as carbon, electron, and energy sources by oxidizing them into calcium carbonate ($CaCO_3$), a common polymorphic mineral (in the form of calcite, vaterite, or aragonite) found in soils and surficial sediments. Thermodynamical approaches will show that spontaneous oxidation of oxalate is impossible and therefore necessitates a biomediated process, leading to secondary formation of calcium carbonate and *pH* increase in the soil solution. In addition, it can be demonstrated that the oxalate-carbonate pathway constitutes a carbon sink, as the carbon source is organic and not an inherited lithogenic mineral carbon (e.g. fossil limestones).

The oxalate pool

Plants, fungi, and oxalate

There are several ways by which plants modify the surrounding soil to their advantage. They may be biotic, like the accumulation of plant-protecting rhizobacteria increasing the soil's ability to fight against root disease, or the acclimation of mycorrhizal fungi. There may also be abiotic factors, like the precipitation of toxic cations and minerals. Accumulation of calcite in carbonate-poor soils may improve the soil structure and function. There is increasing evidence that the calcium oxalate cycle is a major pathway in calcite biomineralization. This was shown with different oxalate accumulating plants, such as iroko trees (Braissant *et al.*, 2004) and Cactaceae (Garvie, 2003). Nevertheless,

a question is still pending: how and why do plants form oxalate crystals ? In the plant metabolism, oxalic acid is produced in varying amounts, depending on plant taxon and external conditions. This oxalic acid may be either accumulated in the vacuome, or precipitated in the form of insoluble Ca-oxalate crystals in the cell, called crystal idioblasts (Fig. 1). Ca-oxalate crystal formation in plants appears to play a central role in a variety of important functions, including tissue calcium regulation, protection from herbivores, and metal detoxification (Nakata, 2003). It seems that ascorbic acid is the primary precursor to oxalate biosynthesis. The ascorbic acid for oxalate biosynthesis can be synthesized directly within the calcium oxalate crystal-accumulating cell (Nakata, 2003). Obviously, Ca-oxalate accumulated in the aerial parts of the plant can eventually be transferred to the litter after plant death, during organic matter oxidation.

As an example, iroko trees (*Milicia excelsa*, Moraceae), which are trees from the tropical African forest, can accumulate large amounts of oxalate crystals in their trunk as well as their roots (Cailleau *et al.*, 2005). In the wood, calcium oxalate occupies some idioblasts, forming euhedral crystals (Fig. 2A), often occurring as chains inside neighboring cells. In roots, calcium oxalate forms a mineral network of crystals between the inner root and the thin cuticle constituting the outer part of the root (Braissant *et al.*, 2004). When fungi decay parts of dead roots or rotting wood (Fig. 2B, C), they free oxalate crystals inside the soil or litter (Fig. 2D), increasing their proportion outside the living tissues. This plant oxalate pool is a widespread and abundant carbon source for oxalate consumers.

Contrary to plants, whose excretion of oxalate ions is generally considered as negligible, fungi (mycorrhizal as well as saprophytic) are essentially oxalate excreters. Metal oxalates, essentially calcium oxalates (Lapeyrie *et al.*, 1990; Tait *et al.*, 1999; Gadd, 1999), then crystallize at the mycelium surface or in the nearby soil, mainly as monohydrate (COM - calcium oxalate monohydrate, or whewellite) and dihydrate (COD -

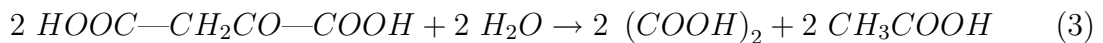
calcium oxalate dihydrate, or weddellite; Fig. 3A, B). Each of them belongs to a different crystallographic system, monoclinic and tetragonal, respectively (see synthesis in Verrecchia, Dumont & Verrecchia, 1993). An extensive review of oxalate biosynthesis in fungi has been proposed by Gadd (1999). Oxalic acid production by fungi appears to depend on whether glucose or citrate is used as the carbon source (Fig. 3C). When glucose is used, oxalate is produced through oxidation of glucose to pyruvate (Verrecchia, 1990; Wolschek & Kubicek, 1999):



Then, carboxylation of pyruvate yields oxaloacetate:



The hydrolysis of oxaloacetate allows the formation of oxalate and acetate:



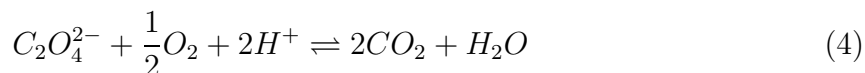
Oxalic acid reacts with calcium, forming calcium oxalate crystals, either COM or COD. Although Ca-oxalate crystals are easily observed associated with fungi, Ca-acetate or Ca-citrate crystals have never been identified. On the one hand, it is true that they constitute extremely soluble salts. But, on the other hand, organic substrates such as acetate or citrate can easily be used as carbon sources by bacteria. The culture of oxalotrophic bacteria (e.g. *Ralstonia eutropha* and *Xanthobacter autotrophicus*) for a few days on acetate-rich and citrate-rich media results in the production of calcite (calcium carbonate) crystals at the expense of the low molecular weight organic acids (Fig. 4; Braissant, Verrecchia & Aragno, 2002). Therefore, these by-products can also

be a source of secondary calcium carbonate in soils, even if they are highly soluble, and probably rapidly leached. In contrast, calcium oxalate crystals precipitate and may constitute almost 25% of soil hyphae and rhizomorphs dry weight in some ecosystems (Cromack *et al.*, 1977). When citrate is the source, oxalate is produced through the isocitrate and glyoxylate cycle involving glyoxylate hydrogenase (Dutton *et al.*, 1993).

The accumulation of oxalate crystals by fungi has also unexpected consequences: calcium oxalate can be disseminated inside the soil and the litter through oribatid mites. Such mites feed on Ca-oxalate crystals producing fungi and then reprecipitate the mineral in their cuticular hardened parts (Norton & Behan-Pelletier, 1991). They are thought to process a significant portion of the calcium pool in some ecosystems (Gist & Crossley, 1975). In conclusion, calcium oxalate is a common product of the biosphere-lithosphere interface, it can be found in numerous environments, and it results from biomineralization under the control of organisms. So why does it not accumulate in surficial environments and soils ?

Calcium oxalate stability

In order to solve the problem of missing calcium oxalate accumulation, the first question to ask is whether or not the mineral stable, i.e. is calcium oxalate able to spontaneously oxidize when in contact with the atmosphere ? If this is the case, the explanation is simple: all the oxalate produced is rapidly oxidized as CO_2 , and therefore can be neither accumulated in the surficial environment nor in the fossil record. This assumes that the transformation of oxalate into carbon dioxide must be complete and rapid in normal conditions, i.e. at 25°C (298.15 K) and a pressure of 1 atm. This complete oxalate oxidation *in solution* is given by the following reaction:



This equation can be divided into two redox equations:



For each of the redox couples, the potential can be calculated using the Nernst equation. This equation correlates Gibb's free energy, known as ΔG , and the electromotive force provided by an oxido-reduction reaction (such a reaction acts as a galvanic cell). Given the following equation due to a chemical reaction:



the reaction coefficient Q is calculated using the following ratio:

$$Q = \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} \quad (8)$$

At equilibrium in the solution, $Q = K_{eq}$, K_{eq} being the equilibrium constant associated with the reaction. The Gibb's law is expressed as:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln Q \text{ and } \Delta G = -n\mathcal{F}\Delta E \quad (9)$$

This last equation gives the relationship between Gibb's free energy and the electromotive force, ΔE . Consequently, by replacing ΔG and ΔG^0 (standard free energy) with their expression in function of ΔE and ΔE^0 (standard electrode potential), the following

equation is obtained:

$$\begin{aligned}
 -n\mathcal{F}\Delta E &= -n\mathcal{F}\Delta E^0 + RT \ln Q \Leftrightarrow \\
 \Delta E &= \Delta E^0 - \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b}
 \end{aligned} \tag{10}$$

Equation (10) is known as the Nernst equation, where R is the gas constant (8.314 J.mol⁻¹.K⁻¹), T , the temperature in Kelvin, Q the reaction quotient as defined in equation (8), \mathcal{F} , the Faraday constant (96,500 C), and n being the number of electrons involved during the oxido-reduction reaction. By using a decimal logarithm instead of a Napierian logarithm, by replacing the variables with their numerical values, and fixing the temperature at 25°C (298 K), the Nernst equation becomes:

$$\Delta E = \Delta E^0 - \frac{0.059}{n} \log \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} \tag{11}$$

Therefore, by using equation (11), the potential E_1 for equation (5) is given by:

$$E_1 = -0.49 + \frac{0.059}{2} \log \frac{(P_{CO_2})}{|C_2O_4^{2-}|} \tag{12}$$

$E_0 = -0.49$ being a measured value and not a calculated one. For equation (6), the Nernst equation is written as:

$$\begin{aligned}
 E_2 &= E_{water}^0 + \frac{0.059}{2} \log \left((P_{O_2})^{\frac{1}{2}} \cdot |H^+|^2 \right) \Leftrightarrow \\
 E_2 &= 1.23 - \frac{0.059}{2} \times 2 \times \underbrace{(-\log |H^+|)}_{pH} + \frac{0.059}{2} \log \sqrt{(P_{O_2})} \Leftrightarrow \\
 E_2 &= 1.23 - 0.059 \times pH + \frac{0.059}{2} \log \sqrt{(P_{O_2})}
 \end{aligned} \tag{13}$$

At equilibrium in the solution, $E_2 = E_1$. By combining equations (12) and (13) and by replacing variables with numerical values such as $P_{O_2} = 0.2095$ atm., $P_{CO_2} = 3.3 \times 10^{-4}$

atm., the equilibrium condition yields:

$$\begin{aligned}
-0.49 + \frac{0.059}{2} \log \frac{(P_{CO_2})^2}{|C_2O_4^{2-}|} &= 1.23 - 0.059 \cdot pH + \frac{0.059}{2} \log \sqrt{(P_{O_2})} \iff \\
\underbrace{\frac{-1.72 \times 2}{0.059}}_{-58.305} + 2 \cdot pH + \log \frac{(P_{CO_2})^2}{\sqrt{(P_{O_2})}} &= \log |C_2O_4^{2-}| \iff \\
\underbrace{\hspace{10em}}_{-6.623} & \\
-64.928 + 2 \cdot pH &= \log |C_2O_4^{2-}| \quad (14)
\end{aligned}$$

By varying the pH between 7 and 14 in equation (14), the concentration of oxalate ions is:

$$7 < pH < 14 \Rightarrow 1.18 \times 10^{-51} < |C_2O_4^{2-}| < 1.18 \times 10^{-37}$$

From these calculations, it appears that there is no more $C_2O_4^{2-}$ in solution. But in fact, this reaction occurs in the solution at an infinitely low rate under normal conditions of pressure and temperature. Indeed, many oxalate salts have a low solubility index. But this point cannot explain why a solution of potassium oxalate, which is soluble, will not oxidize spontaneously into carbon dioxide. The problem is linked to a lack of *activation energy*. Such an oxydation needs a certain initial amount of energy to occur. If a solution of calcium oxalate is left in contact with the atmosphere, it will never be oxidized into CO_{2aq} , HCO_3^- , CO_3^{2-} , and Ca^{2+} . Nevertheless, if oxalotrophic bacteria are in contact with the solution, they will provide energy to start the oxidation and feed on the oxalate carbon source.

In conclusion, any metal oxalate can be considered as a compound in a metastable equilibrium. The only sub-spontaneous diagenetic evolution of calcium oxalate is a possible transformation of weddellite into whewellite by dehydration (Frey-Wyssling, 1981; Verrecchia, Dumont & Verrecchia, 1993). Consequently, activation energy has to be provided for a complete oxidation of COM or COD, and life is the best and the most

obvious candidate. Therefore, biogenic activity could be the key explanation for the absence of oxalate in paleosols as well as in the geological sedimentary record.

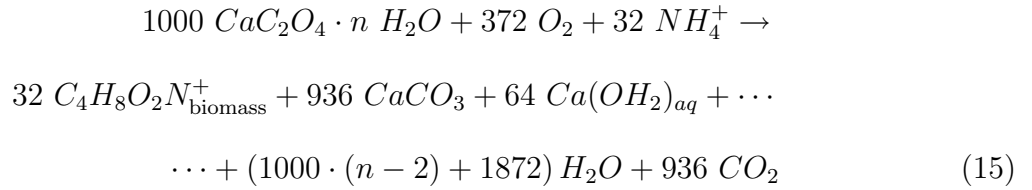
Oxalate oxidation

Oxalotrophic bacteria

The fate of oxalate in natural systems remains unclear, although oxalate catabolism by bacteria is a well recorded phenomenon (Tamer & Aragno, 1980; Allison, Daniel & Cornick, 1995). Oxalate is used as energy, electron, and carbon sources by bacteria belonging to diverse taxonomical groups (Tamer and Aragno, 1980; Jenni, Aragno & Wiegel, 1987; Jenni *et al.*, 1988; Sahin, 2003). These bacteria may occupy different oxalate-containing niches, like the rhizosphere (Knutson, Hutchins & Cromack, 1980), the litter, or the gut of soil animals (Cromack *et al.*, 1977). It seems that, after oxalate is transported into the bacterial cell, its fate is determined by following either the glyoxylate or formate pathway (Fig. 5). If reduced into glyoxylate by the enzyme oxalyl-CoA reductase, biosynthesis can take one of two routes: the glycolate pathway (Allison, Daniel & Cornick, 1995) and a variant of the serine pathway (Sahin, 2003). The glycolate pathway is common in soil oxalotrophic bacteria such as *Ralstonia oxalatica* or *Ralstonia eutropha*. The serine pathway is mainly used by oxalate-using pink pigmented facultatively methylotrophic bacteria, which contain L-serine glyoxylate aminotransferase and hydroxypyruvate reductase, key enzymes of the serine pathway (Sahin, 2003). If, however, oxalate is transformed into formate through oxalate decarboxylation, the formate is then used for cell energy and finally results in the production of carbon dioxide (Dijkhuizen, Wiermsa & Harder, 1977). Carbon dioxide is usually transported and excreted as hydrogeno-carbonate ions (HCO_3^-) through the bacterial membrane using permeases. Its combination with calcium ions leads to precipitation of calcium carbonate and concomitantly generates a proton motive force (Fig. 5). Therefore, oxalotrophic bacteria perform a complete oxidation of oxalate to CO_2 , leading to hydrogeno-carbonate ion ex-

cretion, and finally carbonate deposition. But are soil conditions favorable for calcium carbonate storage ?

The fact that protons are used as a motive force can participate to increase the pH of the soil solution, due to the H^+ bacterial uptake. Moreover, pH can also be increased due to the fact that reactions involve the transformation of oxalic acid into carbonic acid, i.e. of a strong ($pK_1 = 1.25$, $pK_2 = 4.27$) to a weak ($pK_1 = 6.35$, $pK_2 = 10.33$) acid (Braissant, Verrecchia & Aragno, 2002). This alkalization facilitates precipitation of calcium carbonate ($CaCO_3$). By modifying Harder, Wiermsa & Groen's (1974) general equation for oxalate metabolism by oxalotrophic bacteria, the following balanced equation can be proposed:



It is easy to see in this balanced equation that 93.6% of the organic carbon is transformed into mineral carbon (as precipitated $CaCO_3$ in addition to CO_2 , the latter being dispersed in the environment and eventually degassed towards the atmosphere), whereas the other part of the carbon (i.e. only 6.4%) is used to increase the biomass. These figures demonstrate the far-reaching impact of such processes on organic carbon utilization and sequestration.

Finally, it has to be noted that oxalate oxidation by oxalate oxidase is a different way of degrading oxalate. By this means, oxalate is completely oxidized into CO_2 with concomitant production of H_2O_2 . It has no trophic significance, and its importance in oxalate cycling is not known.

All these results are related to observations and measurements in the field as well

as in oxalotrophic bacteria cultures in the laboratory (Braissant *et al.*, 2004). There is no theoretical model available to explain the oxalate-carbonate transformation and its consequences on the soil solution properties, i.e. alkalization facilitating precipitation of calcium carbonate ($CaCO_3$) and CO_2 release into the atmosphere. This kind of model should be able to explain the process of oxido-reduction reactions, pH regulation, and the evolution of the various phase concentrations involved in the system, i.e. oxalate, carbonate, water, and carbon dioxide. This is the aim of the next paragraph.

A theoretical approach of oxalate-carbonate transformation

The objective of this theoretical approach is to try to compare the equilibrium diagrams of the $CaCO_3$ - CaC_2O_4 - CO_2 - H_2O system with the biogeochemical data available on the oxalate-carbonate transformation. The initial hypothesis is that the oxido-reduction reaction of oxalate-carbonate occurs biochemically, i.e. due to bacterial activity. In other words, the activation energy is present and high enough to start reactions. The theoretical system studied is defined by three different phases present:

1. The aqueous solution, which may or may not be associated with the two mineral species, calcium oxalate (CaC_2O_4) and calcium carbonate ($CaCO_3$). These two species are defined by their solubility products. Concentrations of the various chemical species in solution (including carbonates - HCO_3^- , CO_3^{2-} , oxalates - $C_2O_4^{2-}$, $C_2O_4H^-$, Ca^{2+} , and CO_2) can vary regarding the outside environment. Therefore, the system is considered as open.
2. Inside the system, the acido-basic equilibria are always reached. Nevertheless, solutions can be supersaturated regarding the two mineral species, calcite ($CaCO_3$) and Ca-oxalate (CaC_2O_4).
3. Gas exchange is assumed to be fast enough to reach equilibrium between $CO_{2(dissolved)}$ and $CO_{2(gas)}$.

The fact that the system is open is justified because atmospheric oxygen is needed for the transformation (oxidation) of oxalate into carbonate by bacteria. Also, the gas exchange with the atmosphere must be fast enough to meet the condition given in point 3. The system is described in figure 6. This system is supposed to evolve reversibly, i.e. the system is in permanent equilibrium. Therefore, at each moment, there is chemical equilibrium in the solution between the carbonate species (carbonates, hydrogeno-carbonates, dissolved carbon dioxide) and the two oxalate species (oxalate salt and oxalic acid). Nevertheless, equilibrium between solution and solids (i.e. minerals) could not be reached when the solution is supersaturated regarding one or the other of the minerals. Concerning the exchange kinetics between dissolved species inside the system and the exterior environment (Fig. 6), it is considered as extremely slow because equilibria between dissolved species inside the system are assumed to be continuously reached. Consequently, transformation of oxalate into carbonate is described as an exchange between dissolved species, the amount of oxalate and carbonate being variable. In other words, the transformation of oxalate into carbonate is an input of the model and considered to occur outside this theoretical system, i.e. through oxalotrophic bacterial activity (Fig. 6). Species activities inside the system will be considered as equal to concentrations to simplify calculations. Except for H^+ , the only cation present in the system is Ca^{2+} . This point is also only a means to simplify the calculations, but it is true in laboratory bacterial cultures. The anions are the carbonate and the oxalate species, as well as OH^- . Therefore, the alkalinity can be defined as:

$$|Alc| = 2 |Ca^{2+}| \quad (16)$$

The various limits of the variables in the system are given as follows. The values taken for the total quantity of oxalate $A = |C_2O_4^{2-}| + |C_2O_4H^-|$ are $0 < A < 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$. The concentration of calcium ions in the model is $10^{-6} < |Ca^{2+}| < 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$. The

partial pressure of carbon dioxide will vary between 0 and 1 atm. Finally, the pH ranges between 4 and 11. The equilibrium constants at 1 atm and 25 °C (298 K) are the following:

$$k = \frac{(C_2O_4^{2-})(H^+)}{(C_2O_4H^-)} = 10^{-4.3} \quad (17)$$

$$K_1 = \frac{(CO_3H^-)(H^+)}{(CO_2)} = 10^{-6.4} \quad (18)$$

$$K_2 = \frac{(CO_3^{2-})(H^+)}{(CO_3H^-)} = 10^{-10.2} \quad (19)$$

$$K_w = (H^+)(OH^-) = 10^{-14} \quad (20)$$

The mineral solid phases (calcium carbonate and calcium oxalate) are characterized by their solubility products:

$$\Pi_1 = (Ca^{2+})(CO_3^{2-}) = 10^{-8.3} \quad (21)$$

$$\Pi_2 = (Ca^{2+})(C_2O_4^{2-}) = 10^{-8.7} \quad (22)$$

The model is built using equations that follow two laws. The mass action law is applied to acido-basic reactions of carbonate and oxalate species with water. The equilibrium between the CO_2 concentrations in the gas and the solution is described by Henry's law:

$$|CO_3H_2| \text{ or } |CO_2| = k_H \cdot P_{CO_2} \quad (23)$$

Finally, the electro-neutrality of the solution is given by:

$$|C_2O_4H^-| + 2|C_2O_4^{2-}| + |CO_3H^-| + 2|CO_3^{2-}| + |OH^-| = 2|Ca^{2+}| + |H^+| \quad (24)$$

By applying these laws to the data given in equations (18) to (24), a general equation describing the relationship between the different variables of the system can be found.

The key equation describing the model is expressed as:

$$2|Ca^{2+}| = -|H^+| + \frac{K_w}{|H^+|} + \dots$$

$$\dots + (|C_2O_4^{2-}| + |C_2O_4H^-|) \left\{ 1 + \frac{1}{1 + \frac{|H^+|}{k}} \right\} + K_1 k_H \frac{P_{CO_2}}{|H^+|} \left\{ 1 + 2 \frac{K_2}{|H^+|} \right\} \quad (25)$$

In a two dimensional plot, only three variables can be put in relationship to one another. Therefore, in equation (25), three variables have to be chosen among $|H^+| = 10^{-pH}$, $|C_2O_4H^-| + |C_2O_4^{2-}|$, $|Ca^{2+}|$, and P_{CO_2} . For example, curves can be drawn for a variety of pH and concentration in $|Ca^{2+}|$. Let's take this example. Curves represent the function $pH = f(\log(|Ca^{2+}|), P_{CO_2})$ (Fig. 7). The next step consists of calculating the saturation curves related to the two mineral species: Ca-oxalate and Ca-carbonate. Let's consider that the oxalate concentration is known: the saturation curve (i.e. solution in the presence of solid Ca-oxalate) is represented by the following equation obtained by using equations (25), (22) (the solubility product), (18) (the value of k), and the concentration in oxalate species ($|C_2O_4H^-| + |C_2O_4^{2-}|$):

$$2|Ca^{2+}| = -|H^+| + \frac{\Pi_2}{|Ca^{2+}|} \left(2 + \frac{|H^+|}{k} \right) + K_1 k_H \frac{P_{CO_2}}{|H^+|} \left(1 + \frac{2K_2}{|H^+|} \right) + \frac{k_W}{|H^+|} \quad (26)$$

The P_{CO_2} values are given by the intersection of the saturation curve with the isobar. The result is given in figure 7 when the only source of calcium is considered to be the oxalates, i.e. $|Ca^{2+}| = |C_2O_4H^-| + |C_2O_4^{2-}|$. The same approach can be used to calculate the saturation curve regarding calcite. By combining equations (19), (23), and (21), the following relationship is obtained:

$$|Ca^{2+}| = \frac{\Pi_1}{k_H K_1 K_2} \cdot \frac{|H^+|^2}{P_{CO_2}}$$

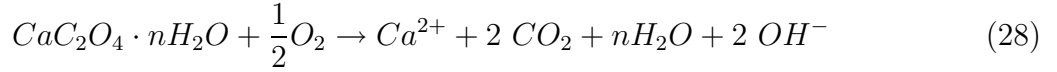
$$\Rightarrow pH = -\frac{1}{2} \log(|Ca^{2+}|) - \frac{1}{2} \log(P_{CO_2}) + 4.86 \quad (27)$$

Once again, the result given in figure 7 assumes that oxalates are the only source of calcium. To check this hypothesis, the model can be compared with an *in vitro* culture of oxalotrophic bacteria in the presence of calcium oxalate as the sole source of carbon, energy, and calcium. Such an experiment has been conducted by Braissant *et al.* (2004). They show that, in a liquid medium, calcium oxalate consumption is followed by an increase in pH in the solution, accompanied by precipitation of calcium carbonate. During the experiment, the initial pH of the solution was 6.9. At the end of the experiment, i.e. after total consumption of oxalate, the final pH was 9.6. The concentration of $|Ca^{2+}|$ does not change during the experiment: it can be used as a probe during the transformation of calcium oxalate into calcium carbonate. The initial concentration of calcium is around 10^{-2} mole.L⁻¹, i.e. $\log(|Ca^{2+}|) = -2$. Figure 7 (initial state) shows that, for such a concentration of calcium in the presence of calcium oxalate crystals and at a $P_{CO_2} = 3 \cdot 10^{-4}$ atm, the theoretical pH should be between 6.8 and 6.9, a range corroborated by the measurements. At the end of the experiment (Fig. 7, final state), there is no more oxalate. Calcium carbonate can precipitate because the intersection of the $P_{CO_2} = 3 \cdot 10^{-4}$ atm curve and a concentration of calcium around 10^{-2} mole.L⁻¹ is situated inside the area of supersaturation regarding $CaCO_3$. In addition, the pH should be between 9.5 and 9.6, which is also consistent with the experiment.

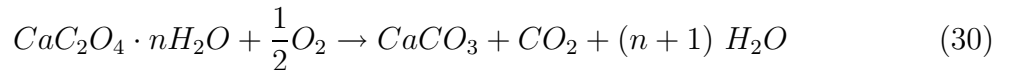
In conclusion, such a model is convenient to get an idea of the calcium oxalate concentration, carbon dioxide pressure, and conditions for potential precipitation of secondary calcium carbonate through oxalotrophic bacteria activity. It demonstrates that as long as calcium is available and oxalotrophic bacteria are present, transformation of oxalate into carbonate can occur under normal conditions found in soils and surficial sediments. Therefore, an oxalate-carbonate cycle, or at least pathway, must exist at the surface of continents (Verrecchia & Dumont, 1996), explaining the absence of calcium oxalate accumulation in soils and the fossil record.

The oxalate-carbonate pathway

A synthetic coupled cycle of calcium and carbon through the oxalate-carbonate pathway is shown in figure 8. Atmospheric CO_2 is fixed by the plants through photosynthesis to produce biomass. Inside the plant, oxalate crystals form. In addition, fungal filaments may also accumulate oxalate. Mainly in the form of Ca-oxalate (COM or COD), this carbon pool is used by oxalotrophic bacteria as carbon, energy, and electron sources. The transformation of oxalate can occur in the soil solution inside the pores, or in soil animal guts. The oxalate oxidation results in carbon dioxide production and calcium carbonate precipitation. Released carbon dioxide can be used for photosynthesis, forming a loop in the cycle. Calcium carbonate precipitation is enhanced by increasing pH during oxalotrophy, as observed by Jayasuriya (1955) and Braissant, Verrecchia & Aragno (2002), and demonstrated in this chapter. Now, let's suppose that all the oxalate available in the soil is oxidized in order to measure the potential occurrence of a carbon sink. The overall reactions can be summarized by the following two equations:



the first one describing the oxidation, the second taking advantage of alkalization to enhance calcium carbonate precipitation as stipulated above. Therefore, the final balance is the following:



The initial two moles of organic carbon are both transformed into inorganic carbon. One mole is precipitated as a mineral, with carbon being trapped inside the calcium carbonate crystals, i.e. stored on a long-term time scale. The other mole can be released

into the atmosphere and re-used for phototrophy. Therefore, the oxalate-carbonate pathway constitutes a true carbon sink because one out of two moles of organic carbon is stored in a mineral state with a long residence time, whereas the other one returns to the atmospheric reservoir.

Conclusions

Consequences of the oxalate-carbonate cycle have been investigated in different environments. In surficial formations, this cycle is believed to participate in the genesis of calcrete (indurated carbonate soils) in semiarid environments (Verrecchia 1990; Verrecchia and Dumont 1996). In temperate forests, it is related to mineral nutrient cycles including *Ca*, and more generally, other elements such as *Fe*, *Al* and *P* (Cromack et al. 1977). The possible oxidation of calcium oxalate pools by oxalotrophic bacteria probably means that a large amount of the secondary calcium carbonate found in soils and surficial sediments should originate in the transformation of low molecular weight organic acids (including citrate and acetate) into carbonates. Calcium carbonate (as various $CaCO_3$ polymorphs) may then accumulate, modifying the soil conditions. Theoretical studies have demonstrated that the soil solutions can be alkalized enough to enhance calcium carbonate accumulation and storage. Therefore, when associated with plant biomineralization, fungi and bacteria contribute to long-term carbon storage by potentially transforming half of the organic carbon from oxalate (or low molecular weight organic acids) into mineral carbon (carbonate), which has a much longer residence time in soils than organic substrates (Cailleau, Braissant & Verrecchia, 2004). The other half is released as carbon dioxide into the atmosphere. In conclusion, because oxalate salts are organic in origin, the oxalate-carbonate pathway represents a potentially major carbon sink (Cailleau *et al.*, 2005) and probably acts as a regulator of the atmospheric pCO_2 .

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. G. M. Gadd for his invitation to contribute and his never-ending patience, Prof. M. Aragno for his indispensable scientific input, and Dr. M. Dadras for his help operating the SEM. This work is supported by the Swiss National Science Foundation, grant no FNS-205320-101564.

References

- Allison, M., Daniel, S. L., Cornick, N. A. (1995) Oxalate-degrading bacteria. In *Calcium oxalate in biological systems*, ed. S. R. Khan, pp. 131-168. Boca Raton: CRC Press.
- Berbee, M. L., Taylor, J. W. (2000) Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. In *The Mycota, vol. 7B, Systematics and evolution*, ed. D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin, P.A. Lemke, pp 229-246. Berlin: Springer.
- Braissant, O., Verrecchia, E. P., Aragno, M. (2002) Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated ? *Naturwissenschaften*, **89**, 366-370.
- Braissant, O., Cailleau, G., Aragno, M., Verrecchia, E. P. (2004) Biologically induced mineralization in the tree *Milicia excelsa* (Moraceae): its causes and consequences to the environment. *Geobiology*, **2**, 59-66.
- Burford, E., Fomina, M., Gadd, G. M. (2003) Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rock and minerals. *Mineralogical Magazine*, **67**, 1127-1155.
- Burford, E., Kierans, M., Gadd, G. M. (2003) Geomycology: fungi in mineral substrata. *Mycologist*, **17**, 98-107.
- Cailleau G., Braissant O., Verrecchia E. P. (2004) Biomineralization in plants as long-term carbon sink. *Naturwissenschaften*, **91**, 191-194.
- Cailleau, G., Braissant, O., Dupraz, C., Aragno, M. & Verrecchia, E. P. (2005) Biologically induced accumulations of $CaCO_3$ in orthox soils of Biga, Ivory Coast. *Catena*, **59**, 1-17.
- Cromack K., Sollins P., Todd R. L., Fogel R., Todd A. W., Fender W. M., Crossley M. E., Crossley D. A. (1977) The role of oxalic acid and bicarbonate in calcium cycling by fungi and bacteria: some possible implications for soil animals. *Ecological Bulletin*, Stockholm, **25**, 246-252.
- Dijkhuizen, L., Wiermsa. M., Harder. W. (1977) Energy production and growth of *Pseudomonas oxalaticus* OX1 on oxalate and formate. *Archives in Microbiology*, **115**, 229-236.
- Dutton, M. V., Kathiara, N., Gallacher, I. M., Evans, C. S. (1993) Oxalate production by basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*.

- Applied Microbiology and Biotechnology*, **39**, 5-10.
- Frey-Wyssling, A. (1981) Crystallography of the two hydrates of crystalline calcium oxalate in plants. *American Journal of Botany*, **68**, 130-141.
- Gadd, G. M. (1999) Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Advances in microbial physiology*, **41**, 47-92.
- Garvie, L. A. J. (2003) Decay-induced biomineralization of the saguaro cactus (*Carnegiea gigantea*). *American Mineralogist*, **88**, 1879-1888.
- Gist, C. S., Crossley, D. A. Jr (1975) A model of mineral cycling for an arthropod foodweb in a southeastern hardwood forest litter community. In *Mineral cycling in southeastern ecosystems*, ed. F. G. Howell & M. H. Smith, pp. 84-106, ERDA Symposium Series, Conference 740513.
- Gobat, J.-M., Aragno, M., Matthey, W. (2004) *The living soil - Fundamentals of soil science and soil biology*. Enfield: Science Publishers.
- Harder W., Wiermsa M., Groen L. (1974) Transport of substrate and energetics of growth of *Pseudomonas oxalaticus* during growth on formate or oxalate in continuous culture. *Journal of General Microbiology*, **81**, ii-iii.
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L., Hedges, S. B. (2001) Molecular evidence for early colonization of land by fungi and plants. *Nature*, **293**, 1129-1133.
- Jayasuriya, G. C. N. (1955) The isolation and characteristics of an oxalate-decomposing organism. *Journal of General Microbiology*, **12**, 419-428.
- Jenni, B., Aragno, M., Wiegel, J. K. W. (1987) Numerical analysis and DNA-DNA hybridization studies on *Xanthobacter* and emendation of *Xanthobacter flavus*. *Systematic Applied Microbiology*, **9**, 247-253.
- Jenni, B., Realini, L., Aragno, M., Tamer, A. U. (1988) Taxonomy of non H₂-lithotrophic, oxalate-oxidizing bacteria related to *Alcaligenes eutrophus*. *Systematic and Applied Microbiology*, **10**, 126-130.
- Knutson, D. M., Hutchins, A. S., Cromack, K. J. (1980) The association of calcium oxalate-utilizing *Streptomyces* with conifer ectomycorrhizae. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology*, **46**, 611-619.
- Lapeyrie, F., Picatto, C., Gerard, J., Dexheimer, J. (1990) TEM study of intracellular and extracellular calcium oxalate accumulation of ectomycorrhizal fungi in pure culture or in association with *Eucalyptus* seedlings. *Symbiosis*, **9**, 163-166.

- Nakata, P. A. (2003) Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science*, **164**, 901-909.
- Norton, R. A., Behan-Pelletier, V. M. (1991) Calcium carbonate and calcium oxalate as cuticular hardening agents in oribatid mites (Acari: Oribatida). *Canadian Journal of Zoology*, **69**, 1504-1511.
- Redecker, D., Kodner, R., Graham L.E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, **289**, 1920-1921.
- Sahin, N. (2003) Oxalotrophic bacteria. *Research in Microbiology*, **154**, 399-407.
- Tait, K., Sayer, J.A., Gharieb, M.M., Gadd, G.M. (1999) Fungal production of calcium oxalate in leaf litter microcosms. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 1189-1192.
- Tamer, A.U. et Aragno, M. (1980) Isolement, caractérisation et essai d'identification de bactéries capables d'utiliser l'oxalate comme seule source de carbone et d'énergie. *Bulletin de la Société Neuchâteloise de Sciences Naturelles*, **103**, 91-104.
- Verrecchia, E. P. (1990) Litho-diagenetic implications of the calcium oxalate-carbonate biogeochemical cycle in semiarid calcretes, Nazareth, Israel. *Geomicrobiology Journal*, **8**, 87-99.
- Verrecchia, E. P. (2000) Fungi and Sediments. In *Microbial Sediments*, ed. R. Riding and S. M. Awramik, pp. 68-75. New York: Springer.
- Verrecchia, E. P., Dumont J.-L. (1996) A biogeochemical model for chalk alteration by fungi in semiarid environments. *Biogeochemistry*, **35**, 447-470.
- Verrecchia, E. P., Dumont J.-L., Verrecchia, K. E. (1993) Role of calcium oxalate biomineralization by fungi in the formation of calcretes: a case study from Nazareth, Israel. *Journal of Sedimentary Petrology*, **63**, 1000-1006.
- Wolscheck, M. F., Kubicek, C. P. (1999) Biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. In *Citric acid biotechnology*, ed. B. Kristiansen, M. Mattey and J. Linden, pp. 11-31. London: Taylor and Francis.

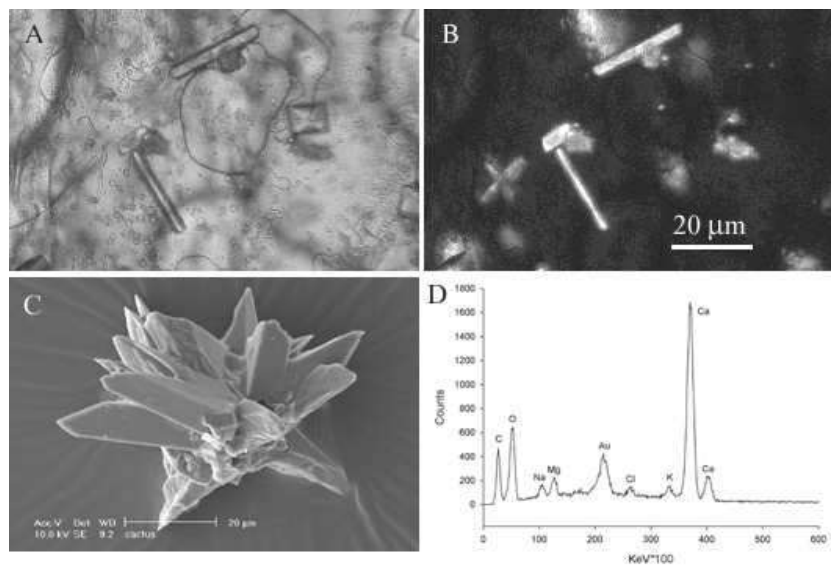


Figure 1: A) Plane polarized light microphotograph of a cross-section inside *Cereus sp.* succulent stem: prism and styloids of calcium oxalate are visible as crystal idioblasts. Scale on image B. B) Same view in cross-polarized light showing the mono-crystalline nature of the biominerals. C) Scanning electron micrograph showing the structure of a drusic agglomerate of calcium oxalate inside *Opuntia sp.* Scale on image. D) Electron dispersive energy spectrum on druse: elements found are mainly *C*, *O*, and *Ca* (for the *Ca*-oxalate), *Mg*, *K*, *Na*, and *Cl* as accessory salts, and traces of phosphorus. The gold peak is due to sample coating. The identification of the mineral (calcium oxalate monohydrate or COM) is confirmed by X-ray diffraction analysis.

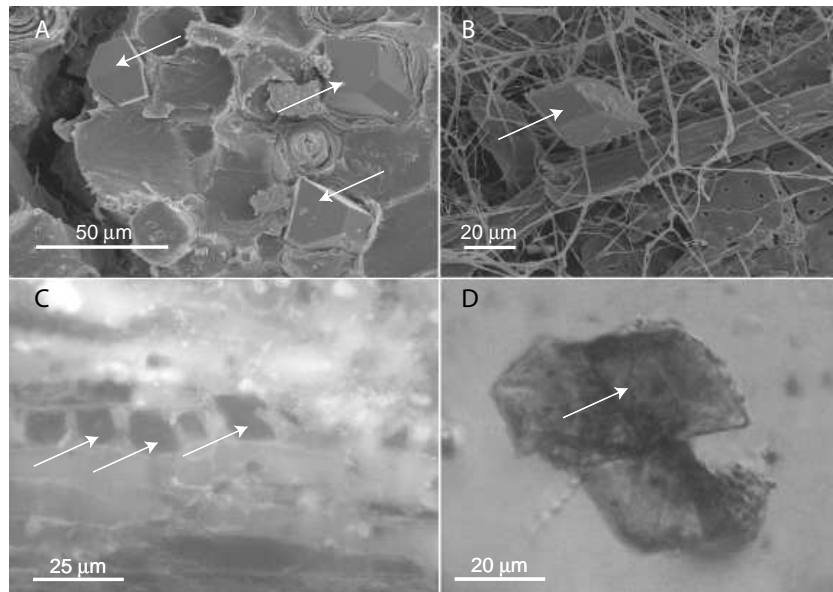


Figure 2: A) Scanning electron micrograph showing euohedral crystals (arrows) of COD (calcium oxalate dihydrate or weddellite): the other part of the photograph is mainly constituted by cellulose. Scale on image. B) COD crystal observed with scanning electron microscope. The crystal (arrow) is surrounded by fungi decaying iroko wood whose cellulose fibrous structure is still observable. Scale on image. C) UV fluorescent light microphotograph of a cross-section inside decaying wood. Between wood fibers (cellulose), a chain of dark euohedral crystals of COD almost freed in the medium. Scale on image. D) View with optical binoculars of free crystals of COD inside a soil aggregate. The shape (habitus) of the crystal shown with the arrow is exactly the same as the one of the crystal shown in B. Scale on image.

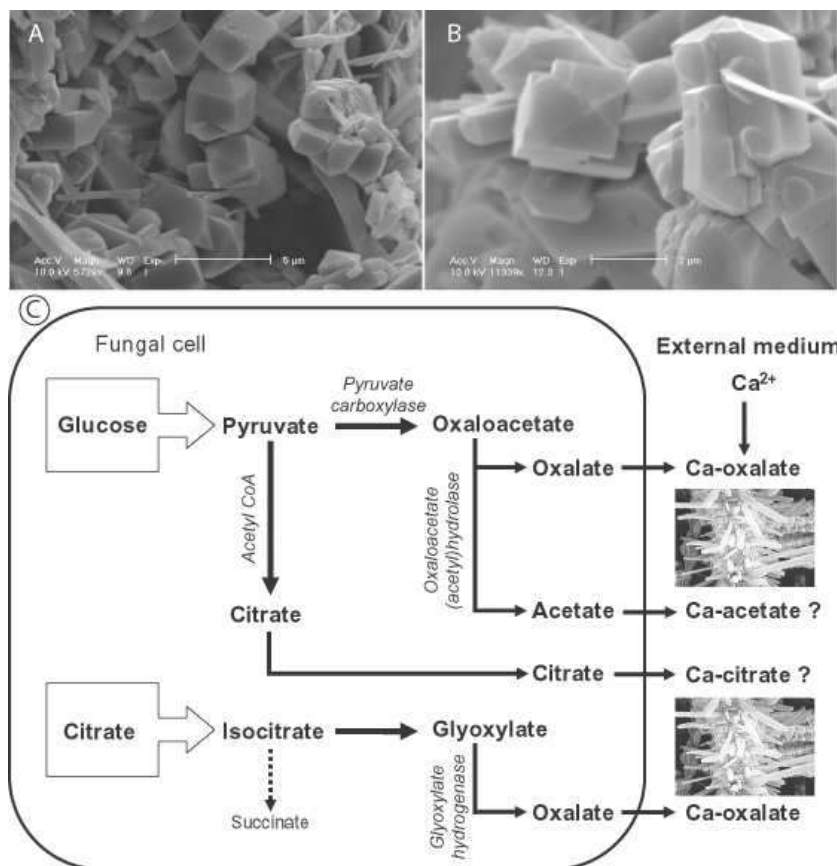


Figure 3: A) Scanning electron micrograph showing euhedral crystals of COD (calcium oxalate dihydrate or weddellite) associated with fungal filaments in decaying iroko wood (Ivory Coast). Scale on image. B) Detail of COD crystal shown in A. The COD crystals belong to the tetragonal system. Scanning electron microscope. Scale on image. C) Sketch of various pathways for Ca-oxalate production by fungi. Biosynthesis of Ca-oxalate is often accompanied by other low molecular weight organic acids, such as citrate or acetate.

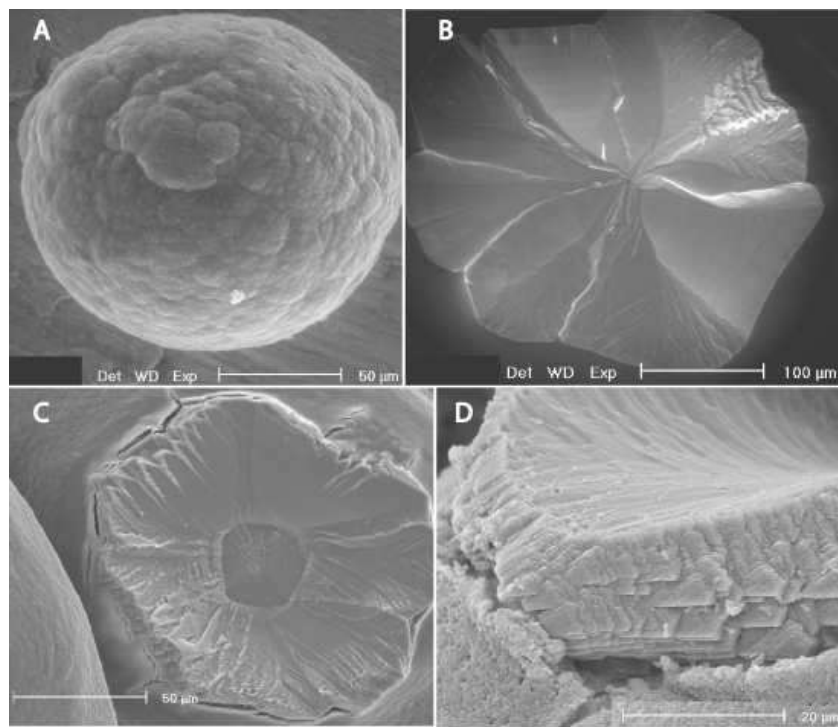


Figure 4: Scanning electron micrograph showing calcium carbonate crystals found A) associated to a *Xanthobacter autotrophicus* culture on an acetate-rich medium, B) on the same medium with *Ralstonia eutropha*, C) with the same bacteria on a citrate-rich medium, and D) on the same medium with *Xanthobacter autotrophicus*. Scale on image.

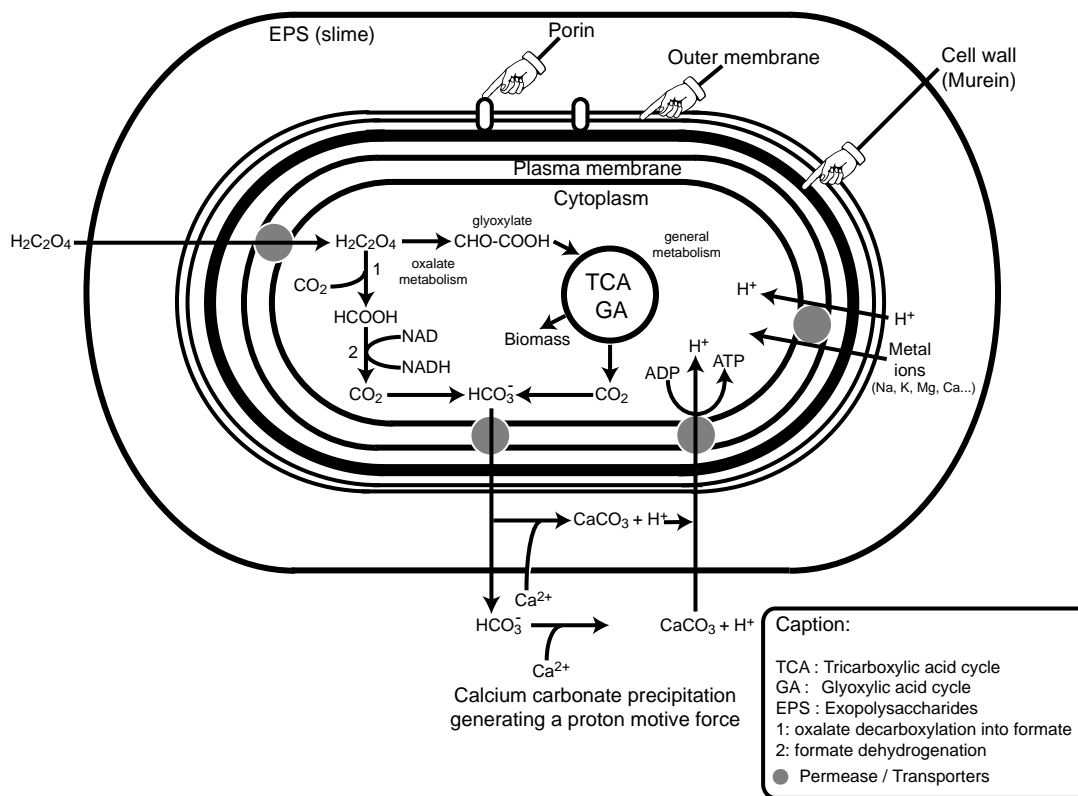


Figure 5: The two main processes identified that lead to the precipitation of calcium carbonate from an oxalate source in oxalotrophic bacteria, the formate and the glyoxylate pathways.

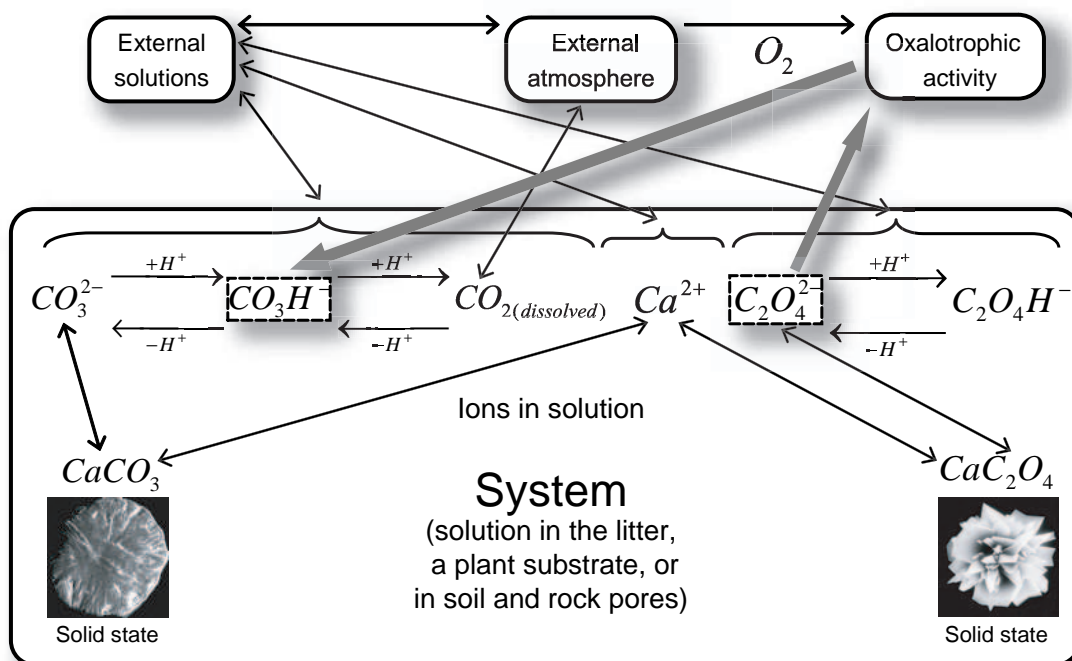


Figure 6: Sketch of the system upon which is based a theoretical model of oxalate transformation into carbonate through bacterial oxalotrophic activity. The system is defined as open and therefore, exchanges are possible with the external environment.

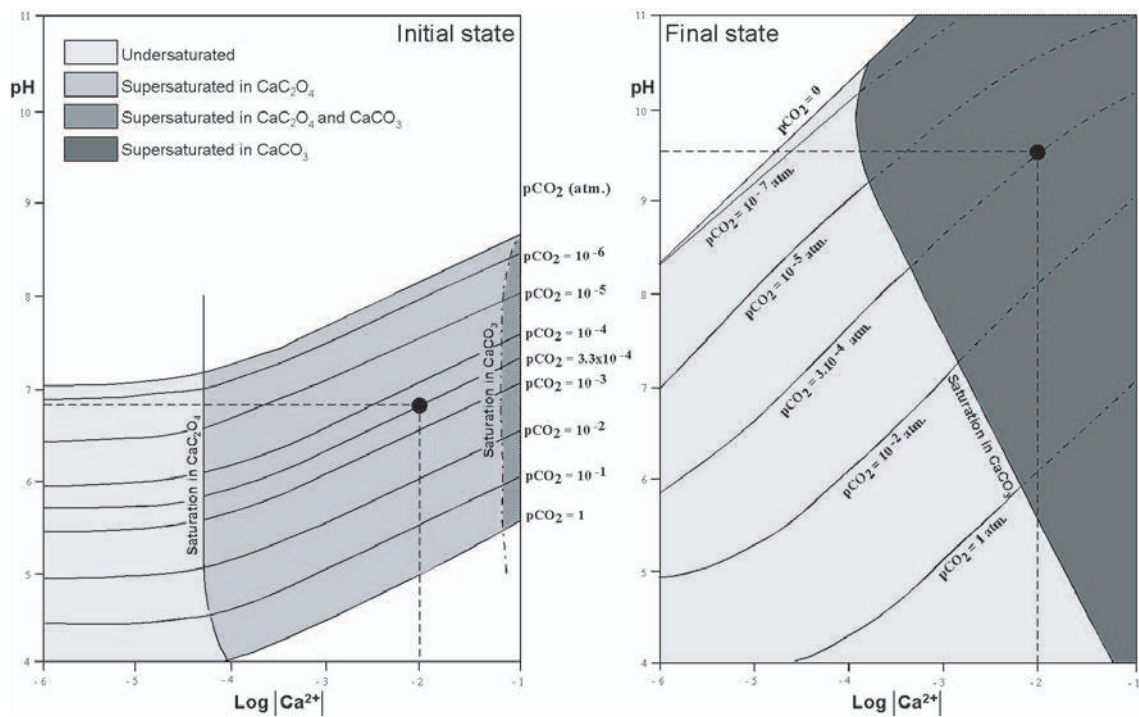


Figure 7: Curves of the function $pH = f(|Ca^{2+}|, pCO_2)$ obtained using the model given in figure 6. Two states are described: the initial state, in which oxalate is present and begins to be oxidized by oxalotrophic bacteria, and the final state, showing the evolution of pH and calcium concentration after total disappearance of oxalate. The dotted lines refer to observed conditions. Measurements are in agreement with the model. All the oxalate (intersection inside the area related to oxalate supersaturation in the initial state) has been transformed into carbonate (intersection inside the area corresponding to calcite supersaturation in the final state) accompanied by an increase in pH compared with the initial state.

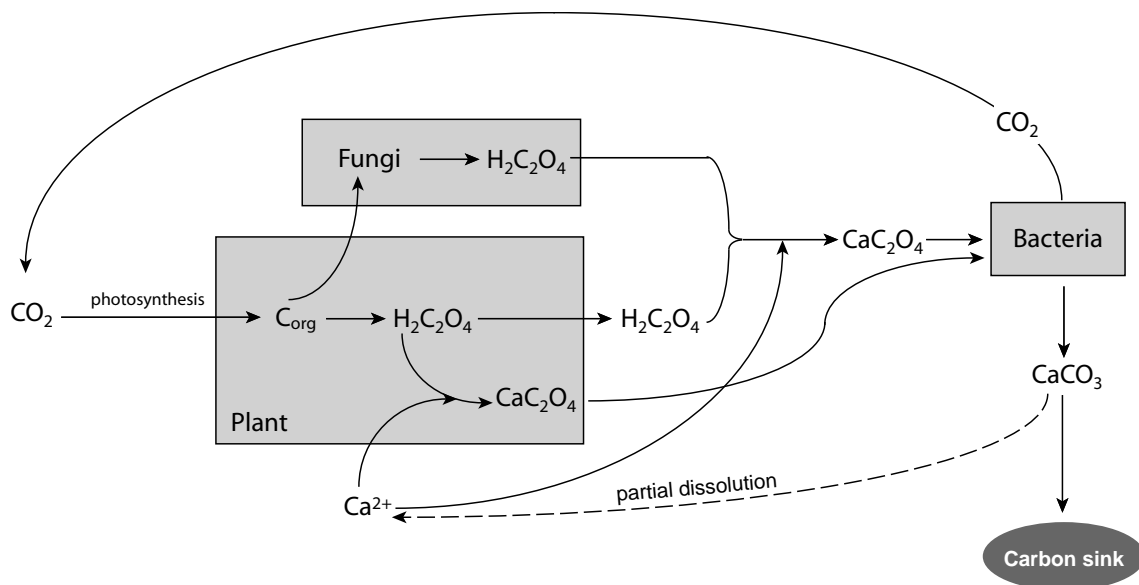


Figure 8: Simplified sketch showing main relationships inside the coupled calcium and carbon cycles of the oxalate-carbonate pathway in an hypothetical ecosystem. Plant and fungi are oxalate producers. Oxalotrophic bacteria (in the soil or animal guts) use oxalate as carbon, energy, and electron sources, leading to carbon dioxide and calcium carbonate production. Calcium carbonate can accumulate inside the soils. Because the carbon of the carbonate originates from organic carbon, its fossilization in the soil constitutes a carbon sink.