



T H È S E
En Cotutelle

Doctorat de Microbiologie Moléculaire et Biotechnologies
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (EDSVS)

Présentée par
Olfa HAOUARI ép. BEN SASSI

En vue de l'obtention du Grade de Docteur de l'Université

**Etude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices originaires
d'écosystèmes marins et hydrothermaux terrestres Tunisiens :
Potentialités oxydo-réductrices de l'arsenic**

Soutenance prévue le 10 décembre 2007, devant le jury composé de:

M. SIGOILLOT Jean-Claude	Professeur-Université de Provence <i>Marseille</i>	Président
M. BOUDABOUS Abdellatif	Professeur-FST <i>Tunis</i>	Rapporteur
M. FONTY Gérard	Directeur de recherche-CNRS <i>Clermont Ferrand</i>	Rapporteur
M. HAMDY Moktar	Professeur-INSAT <i>Tunis</i>	Directeur de thèse 5
M. OLLIVIER Bernard	Directeur de recherche-IRD <i>Marseille</i>	Directeur de thèse 6
Mme. ELBAZ-POULICHET Françoise	Directeur de recherche-MSE <i>Montpellier</i>	Examineur 3
M. SAYADI Sami	Professeur-CBS <i>Sfax</i>	Examineur
Mme. FARDEAU Marie-Laure	Ingénieur de recherche-IRD <i>Marseille</i>	Invitée 4



T H È S E
En C o t u t e l l e

Doctorat de Microbiologie Moléculaire et Biotechnologies
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (EDSVS)

Présentée par
Oifa HAOUARI ép. BEN SASSI

En vue de l'obtention du Grade de Docteur de l'Université

**Etude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices originaires
d'écosystèmes marins et hydrothermaux terrestres Tunisiens :
Potentialités oxydo-réductrices de l'arsenic**

Soutenance prévue le 10 décembre 2007, devant le jury composé de:

M. SIGOILLOT Jean Claude	Professeur-Université de Provence <i>Marseille</i>	Président
M. BOUDABOUS Abdellatif	Professeur-FST <i>Tunis</i>	Rapporteur
M. FONTY Gérard	Directeur de recherche-CNRS <i>Clermont Ferrand</i>	Rapporteur
M. HAMDY Moktar	Professeur-INSAT <i>Tunis</i>	Directeur de thèse
M. OLLIVIER Bernard	Directeur de recherche-IRD <i>Marseille</i>	Directeur de thèse
Mme. ELBAZ-POULICHET Françoise	Directeur de recherche-MSE <i>Montpellier</i>	Examineur
M. SAYADI Sami	Professeur-CBS <i>Sfax</i>	Examineur
Mme. FARDEAU Marie -Laure	Ingénieur de recherche-IRD <i>Marseille</i>	Invitée

Avant Propos

Après avoir passé trois ans à étudier la biodiversité des bactéries sulfato-réductrices originaires des milieux marins et hydrothermaux et découvrir leurs interactions vis à vis de l'arsenic, je ne peux oublier toutes les personnes avec qui moi-même j'ai été en « interaction » au cours de cette thèse. Je tiens à adresser toute ma gratitude et mes remerciements aux personnes sans lesquelles ce travail n'aurait pu aboutir. Plus particulièrement, je tiens à remercier :

Messieurs Abdellatif Boudabous, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, et Gérard Fonty, Directeur de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) à Clermont-Ferrand, rapporteurs de ce mémoire pour avoir accepté de l'expertiser.

Messieurs Jean-Claude Sigoillot, Professeur à l'Université de Provence et Chercheur à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) à Marseille et Sami Sayadi, Professeur et Chercheur au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) de me faire l'honneur de participer à mon jury.

Mme. Françoise Elbaz-Poulichet, Directrice de Recherches à la Maison des Sciences de l'Eau (MSE) à Montpellier, qui m'a ouvert les portes de la géochimie et m'a acceptée dans son laboratoire. Merci d'avoir partagé votre bureau avec moi..

M. Moktar Hamdi, Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT) pour ses conseils de qualité, pour la confiance qu'il a su me témoigner et toutes les occasions qu'il m'a données pour m'appliquer dans les bioprocédés microbiologiques..

M. Bernard Ollivier, Directeur de Recherches à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) à Marseille, pour ses encouragements et ses conseils avisés, pour la

confiance qu'il m'a accordée, pour sa bonne humeur quotidienne et pour m'avoir offert l'opportunité de devenir l'arrière petite fille de Hungate !! Merci mon Papy_Rus.

Mme. Marie-Laure Fardeau Chercheur à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Marseille, toujours disponible et à l'écoute de chacun pour apporter son aide. Merci pour m'avoir patiemment guidée et soutenue tout au long de ma thèse, tes précieux encouragements, tes massages !, tes innombrables coups de fil et surtout pour ton optimisme exceptionnel et ton grand cœur de maman scientifique. Merci M.L.F pour ta touche botanique.

Je tiens à remercier Pierre Thomas, qui m'a fait partager ses connaissances en microscopie électronique, Corinne Casiot et Chrystelle Bancon, Chercheurs à la MSE Montpellier qui m'ont enseigné leur savoir-faire dans l'analyse des métaux lourds.

Qu'il me soit permis de remercier : Laurie Casalot et Jean-Luc Cayol pour la réalisation des arbres phylogénétiques, Hassib Bouallagui pour ses appuis en bio-procédés et Guy Fauque pour sa disponibilité et pour m'avoir transmis une part de son savoir.

J'associe à mes remerciements tous les membres des laboratoires de microbiologie, de l'INSAT-Tunis et de l'IRD-Marseille, qui de par leur humour et leur soutien m'ont donné encore plus de plaisir lors de la réalisation des travaux de recherche de cette thèse.

Mille pensées très affectueuses pour mes proches... J'espère avoir été digne de vos espérances... Je vous dois tout...

Merci à tous ceux qui donnent des rêves et qui contribuent à rendre la recherche plus passionnante.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

µg	Microgramme	JCM	Japan Collection of Micro-organisms
µl	Microlitre	l	litre
°C	Degré Celsius	M	Molaire ou molarité = moles par litre
ADN	Acide Désoxyribonucléique	ml	millilitre
AFS	Fluorimètre de spectrométrie atomique	mM	millimolaire
AMP	Adénosine MonoPhosphate	MMA	Acide monométhylarsonique
APS	Adénylylsulfate réductase	Mn	Manganèse
APS	Adénosine-5'-phosphosulfate	Mo	Molybdate
ARN	Acide Ribonucléique	mV	millivolts
ARNr 16S	ARN ribosomal codant pour la sous unité 16S	Na₂S	Sulfate de sodium
As	Arsenic	NaCl	Chlorure de sodium
ATP	Adénosine triphosphate	NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	ND	Non déterminé
BSR	Bactéries Sulfato-Réductrices	ng	nanogramme
C	Oxydation Complète	nm	nanomètre
COAs	Chimiolithoautotrophes oxydant l'arsénite	O₂	Oxygène
Cr	Chrome	pb	paires de bases
D.	<i>Desulfovibrio</i>	PCR	Polymerase Chain Reaction
DMA	Acide diméthylarsinique	Pd	palladium
DO	Densité optique	pmol	picomole
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen	ppb	Partie par billions
Fe	Fer	ppm	Partie par millions
g/l	Gramme par litre	PRA s	Procaryotes réduisant l'arsénite
G+C%	Teneur en G+C mol %	PVC	Polychlorure de vinyle
h	heure	qsp	quantité suffisante pour
H₂	di-hydrogène	Se	Sélénium
H₂S	Sulfure d'hydrogène	Sp.	Espèce
HG	Générateur d'hydrures	SRD	Sulfite réductase dissimilatrice
HOAs	Hétérotrophes oxydant l'arsénite	T.	<i>Thermodesulfovibrio</i>
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance	Tm.Opt.	Température optimale de croissance
I	Oxydation Incomplète	UV	Ultraviolets

Résumé

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont largement répandues dans la nature où elles contribuent de manière importante, par l'intermédiaire du cycle du soufre, à la minéralisation de la matière organique. Cette contribution est particulièrement remarquable dans les sédiments marins où les BSR peuvent participer jusqu'à 50% de l'oxydation de cette matière organique, mais leur importance écologique est également notoire dans les environnements extrêmes. A côté de leur capacité à réduire les composés soufrés (sulfate, thiosulfate, soufre élémentaire), les BSR présentent notamment une aptitude à réduire les métaux et métalloïdes.

Des études portant sur la biodiversité des BSR ont été conduites sur des échantillons de milieux marins et de sources hydrothermales, situés au nord de la Tunisie. Des méthodes de microbiologie classique associées à celles de taxonomie moléculaire basées sur l'analyse de séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, nous ont permis :

(i) de mettre en évidence la présence d'une grande diversité de BSR appartenant essentiellement aux genres *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* et *Thermodesulfovibrio* puis,

(ii) d'isoler et caractériser trois nouvelles espèces appartenant aux respectivement genres précités.

Les potentialités oxydo-réductives de l'arsenic ont été recherchées chez les souches isolées. Nous avons pu relever chez sept de ces BSR la capacité à réduire (réduction directe) l'arséniate [As(V)] en arsénite [As(III)], sans que cette réduction ne soit couplée à leur croissance.

La réduction indirecte de l'As(V) liée à la production de sulfures par les BSR a également été démontrée. Grâce à la présence d'H₂S, la toxicité du métal est largement amoindrie.

En condition de microaérobiose (0%, 0.5% et 1% d'O₂), nous avons pu montrer, pour la première fois, que parmi les souches isolées, deux d'entre elles (HEB223 et Lam5) étaient capables d'oxyder de l'arsénite en arséniate.

Mots clés : milieu marin, source hydrothermale, bactérie sulfato-réductrice, mésophile, thermophile, biodiversité, arsenic, anaérobiose, microaérophilie.

Abstract

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are widespread in nature where they contribute significantly to organic matter mineralization through the sulfur cycle. This contribution is particularly remarkable in marine sediments where they can take part up to 50% of organic matter oxidation, although their ecological role is important as well in the extreme environments. Beside their capacity to reduce sulfur compounds (sulfate, thiosulfate, elementary sulfur), SRB have also the ability to reduce heavy metals and metalloids.

Studies related to the biodiversity of SRB were conducted on samples of marine sediments and hydrothermal terrestrial springs, located in the North part of Tunisia. Microbiological approaches coupled with molecular taxonomy based on the analysis of sequences of genes encoding for the ARNr 16S, allowed us to:

(i) provide evidence of the existence of a great diversity of SRB belonging to genera *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* and *Thermodesulfovibrio* then,

(ii) to isolate and characterize three new species belonging to the above mentioned genera.

We examined the oxydo-reductive capacities of our isolates towards arsenic compounds. Seven of these SRB showed the ability to directly reduce arsenate [As(V)] to arsenite [As(III)] without energy conservation.

Indirect reduction of As(V) linked to biological sulfide production was also shown. The presence of H₂S largely decreased metal toxicity.

Under microaerobic conditions (0.5% and 1% of O₂ in the gas phase), we demonstrated for the first time, that two of our isolates, HEB223 and Lam5, were able to oxidize arsenite to arsenate.

Keywords: marine environment, hot spring, sulfate-reducing bacteria, mesophilic, thermophilic, biodiversity, arsenic, anaerobic, microaerobic.

SOMMAIRE

Oifa HAOUARI ép. BEN SASSI

Etude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices originaires d'écosystèmes marins et hydrothermaux terrestres Tunisiens : Potentialités oxydo-réductrices de l'arsenic

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
A. Synthèse bibliographique	
<hr/>	
I. LA RÉDUCTION DU SULFATE	3
I.1. DEGRÉS D'OXYDATION DES COMPOSÉS SOUFRÉS ET CYCLE DU SOUFRE	3
I.2. LES VOIES DE RÉDUCTION DU SULFATE	4
II. LES BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES	5
II.1. PHYLOGÉNIE	6
II. 2. ASPECTS PHYSIOLOGIQUES	9
II. 3. POTENTIALITÉS MÉTABOLIQUES	10
II.3.1. Les accepteurs d'électrons	10
II.3.2. Les substrats	13
II.4. HABITATS	14
II.5. IMPACT ENVIRONNEMENTAL	15
III. LES BSR DU MILIEU MARIN	16
IV. LES BSR DES SOURCES HYDROTHERMALES TERRESTRES	20
V. LES PROCESSUS D'OXYDO-RÉDUCTION DE L'ARSENIC	24
V.1. LES FORMES SPÉCIFIQUES DE L'ARSENIC	24
V.2. LES SOURCES DE L'ARSENIC	25
V.3. LA TOXICITÉ DE L'ARSENIC ET LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCES MICROBIENNES	25
V.4. LA RÉDUCTION DE L'ARSÉNIATE CHEZ LES PROCARYOTES	26
V.4.1. Cas des BSR réduisant l'arséniate	28
V.5. LES PROCARYOTES QUI OXYDENT L'ARSÉNITE	30

V.5.1. Oxydation de l'arsénite chez les BSR	30
--	----

B. Méthodologie expérimentale

I. ORIGINE DES ÉCHANTILLONS	32
II. PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE	33
II.1. COMPOSITION DES MILIEUX DE BASE	34
II.2. PRÉPARATION DES SOLUTIONS EN ANAÉROBIOSE	34
II.3. MANIPULATION DES SOLUTIONS ET DES MILIEUX ANAÉROBES	34
III. ENRICHISSEMENTS	35
IV. ISOLEMENT DES BACTÉRIES	36
V. CARACTÉRISATION PHYLOGÉNÉTIQUE	37
V.1. EXTRACTION DE L'ADN	37
V.2. AMPLIFICATION PAR PCR ET ÉLECTROPHORÈSE	38
V.3. SÉQUENÇAGE ET ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE	38
VI. CARACTÉRISATION DES SOUCHES	38
VI.1. ÉTUDE DE LA MORPHOLOGIE	38
VI.1.1. Coloration de Gram	38
VI.1.2. Microscopie optique	38
VI.1.3. Microscopie électronique	39
VI.2. CONDITIONS DE CROISSANCE ET PROPRIÉTÉS MÉTABOLIQUES	39
VI.2.1. Température optimale de croissance	39
VI.2.2. Influence de la concentration en NaCl	40
VI.2.3. Effet du pH	40
VI.2.4. Les accepteurs d'électrons potentiellement utilisables	40
VI.2.5. Dégradation des substrats	40

VI.2.6. Test d'anaérobiose	41
VI.2.7. Recherche de formes de résistance à la chaleur	41
VI.2.8. Résistance aux antibiotiques	41
VI.3. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉTIQUES	41
VI.3.1. Détermination du G+C% de l'ADN génomique	41
VI.3.2. Hybridation ADN/ADN	41
VI.4. RECHERCHE DE LA DÉSULFOVIRIDINE	42
VII. ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'ARSENIC	42

C. Résultats et discussion

I. BIODIVERSITÉ ET ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE DE BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES DES MILIEUX MARINS ET DES SOURCES HYDROTHERMALES TERRESTRES TUNISIENS 44

I.1. CARACTÉRISATIONS PHYLOGÉNÉTIQUE, PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE DES NOUVEAUX ISOLATS 46

Article n°1 49

(publié dans International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology)

Haouari O., Fardeau ML., Casalot L., Tholozan J-L., Hamdi M. and Ollivier B. (2006). Isolation of sulfate-reducing bacteria from Tunisian marine sediments and description of *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2909-2913.

Article n°2 64

(en révision pour International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology)

Haouari O., Fardeau ML., Cayol JL., Casiot C., Elbaz-Poulichet F., Hamdi M. and Ollivier B. *Desulfotomaculum hydrothermale* sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial Tunisian hot spring.

(en révision pour Systematic Applied and Microbiology)

Haouari O., Fardeau ML., Joseph M., Cayol JL., Fauque G., Casiot C., Elbaz-Poulichet F., Hamdi M. and Ollivier B. *Thermodesulfobrio hydrogenophilus* sp. nov., a new thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a Tunisian hot spring.

II. POTENTIALITÉS OXYDO-RÉDUCTRICES DE L'ARSENIC CHEZ CERTAINES BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES ISOLÉES D'ENVIRONNEMENTS TUNISIENS	104
II.1. ÉTAPE PRÉLIMINAIRE	105
II.2. RÉDUCTION DE L'As(V) PAR LES BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES	106
II.2.1. Détermination du seuil de toxicité en As(V)	107
II.2.2. Cinétique de croissance	110
(i) Réduction directe	110
(ii) Réduction indirecte	111
II.3. LEVÉE DE LA TOXICITÉ DE L'As(III) EN CONDITIONS SULFATO-RÉDUCTRICES	115
II.3.1. Recherche du seuil de toxicité en As(III)	116
II.4. OXYDATION DE L'As(III) PAR LES BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES	118
D. Conclusion et perspectives	123
E. Bibliographie	128
F. Annexe	142

INTRODUCTION

Oifa HAOUARI ép. BEN SASSI

Etude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices originaires d'écosystèmes marins et hydrothermaux terrestres Tunisiens : Potentialités oxydo-réductrices de l'arsenic

La réduction microbienne des sulfates est un processus ancien datant de 3.4 milliards d'années. La découverte en 1895 de la première souche sulfato-réductrice, isolée d'un canal Hollandais et décrite par W.M. Beijerinck, a ouvert un axe de recherche scientifique qui n'a cessé de s'élargir par la suite. Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont probablement, de ce fait, les représentants actuels d'organismes primitifs ayant développé de grandes capacités à réduire de multiples composés minéraux et organiques.

Les BSR sont des micro-organismes anaérobies stricts présents dans la plupart des écosystèmes de la planète où elles jouent un rôle prépondérant notamment dans le cycle biogéochimique du soufre. Elles appartiennent principalement au domaine des *Bacteria* mais quelques représentants du domaine des *Archaea* ont été aussi décrits.

Malgré leurs différences morphologiques et physiologiques, les BSR ont la caractéristique commune d'utiliser les composés soufrés, dont le sulfate, comme accepteurs terminaux d'électrons, en produisant d'importantes quantités d'hydrogène sulfuré (H₂S) (Fauque, 1995 ; Widdel, 1988 ; Fauque et Ollivier, 2004). L'odeur de ce gaz et le noircissement de l'eau et/ ou des sédiments attestent de la présence de ces microorganismes dans tous les écosystèmes de la planète.

C'est dans les environnements marins que le sulfate, présent à haute concentration dans l'eau de mer [28 mmole l⁻¹ (Goldhaber et Kaplan, 1974)], permet aux BSR d'assurer une part importante (environ 50%) de la minéralisation de la matière organique (Widdel et Bak, 1992).

Les bactéries sulfato-réductrices se trouvent également dans de nombreux autres biotopes présentant des caractéristiques physico-chimiques diverses tant en termes de salinité, de pH ou de température, notamment les sources chaudes terrestres (Hugenholtz *et al.*, 1998 ; Koji *et al.*, 2003).

Les BSR peuvent non seulement réduire les composés soufrés par dissimilation, mais certains peuvent également réduire l'oxygène, le nitrate, des composés organiques et finalement les métaux ou métalloïdes (Lovley, 1993).

La réduction de ces derniers, et plus particulièrement celle de l'arsenic, a été peu étudiée à ce jour chez ces micro-organismes.

Au cours de ce travail, l'arsenic a été choisi comme métalloïde de référence pour estimer les potentialités oxydo-réductives de ce composé chez les BSR. Le choix de ce dernier est lié au fait que c'est un élément toxique, très répandu dans la nature et qui contamine beaucoup de sols et d'effluents industriels en particulier.

Bien qu'étant définies comme des bactéries anaérobies, les BSR se retrouvent parfois à des interfaces aérobie-anaérobie où elles ont pu développer des mécanismes de détoxification de l'oxygène. Alors que l'analyse de ces mécanismes fait l'objet de nombreuses études chez les aérobies et les anaérobies facultatifs, très peu de données sont retrouvées chez les organismes anaérobies stricts en général (Cypionka *et al.*, 1985 ; LeGall et Xavier, 1996 ; Fournier *et al.*, 2003). Dans ce registre, les BSR sont de bons modèles pour élucider des mécanismes originaux développés par les anaérobies à des faibles pressions partielles en O₂ (microaérobiose).

L'un des intérêts est notamment d'étudier les potentialités dont disposent les BSR pour oxyder les métaux et les métalloïdes en particulier l'arsenic, en condition de microaérophilie. Ce volet n'a jamais été étudié auparavant.

Nous nous sommes donc attachés au cours de ce travail à recenser dans un premier temps, les populations sulfato-réductrices occupant les milieux marins et hydrothermaux Tunisiens. Après avoir isolé ces micro-organismes, nous avons entrepris, pour les souches les plus originales d'un point de vue taxonomique, une étude phylogénétique, phénotypique et génomique.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux capacités oxydo-réductives vis à vis de l'arsenic de certaines de ces souches isolées.

Le premier chapitre de ce travail présente une synthèse bibliographique des données actuelles sur la sulfato-réduction tant au niveau écologique que taxonomique en insistant sur les environnements marins et les sources chaudes terrestres. Une documentation des processus d'oxydo-réduction de l'arsenic chez les anaérobies, et notamment chez les BSR, a été également présentée.

Après une description des différentes méthodes de culture et d'analyse utilisées au cours de ce travail (Chapitre matériel et méthodes), nos résultats ont été divisés en deux parties.

La première porte sur l'étude et l'analyse de la biodiversité des BSR isolées de milieux marins et hydrothermaux Tunisiens, suivie d'une étude taxonomique des souches les plus originales.

Dans la deuxième partie, sont présentés les résultats concernant les potentialités de certaines de ces BSR à réduire mais également oxyder l'arsenic.

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

Oifa HAOUARI ép. BEN SASSI

Etude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices originaires d'écosystèmes marins et hydrothermaux terrestres Tunisiens : Potentialités oxydo-réductrices de l'arsenic

I. LA RÉDUCTION DU SULFATE

I.1. DEGRÉS D'OXYDATION DES COMPOSÉS SOUFRÉS ET CYCLE DU SOUFRE

Le soufre est un des éléments les plus abondants de la croûte terrestre. Il n'est cependant présent qu'en faible quantité chez les êtres vivants (1 à 2 % du poids sec cellulaire), principalement dans la méthionine et la cystéine.

De nombreux échanges se produisent entre les différents réservoirs de soufre. Il s'agit d'émissions vers l'atmosphère de sulfure et de dioxyde de soufre (SO₂) et de retour vers l'océan et les sols sous forme de pluies acides (Brock *et al.*, 2003).

Le soufre existe sous différents états d'oxydation dans la nature, depuis sa forme la plus réduite, le sulfure (H₂S, état -II) jusqu'à sa forme la plus oxydée, le sulfate (SO₄²⁻, état +VI) (tableau 1). L'état 0 correspond au soufre élémentaire, S⁰. Ces trois états sont les plus stables et les plus représentés, surtout le plus oxydé, à savoir le sulfate qui se trouve dans les plus grands réservoirs de soufre de la biosphère tels que les océans et les roches.

Tableau 1. Degrés d'oxydation des composés soufrés (Tortora *et al.*, 2003)

Composés	Formule	Etat d'oxydation
Sulfate	SO ₄ ²⁻	+VI
Sulfite	SO ₃ ²⁻	+IV
Dithionite	S ₂ O ₄ ²⁻	+III
Thiosulfate	S ₂ O ₃ ²⁻	+II
Soufre élémentaire	S ⁰	0
Disulfure	S ₂ ²⁻	-I
Pyrite	FeS ₂	-I
Monosulfure de fer	FeS	-II
Sulfure d'hydrogène	H ₂ S	-II

Les interconversions chimiques ou biologiques entre les composés soufrés constituent le cycle du soufre, un des cycles-clés de l'écosystème (figure 1). Les étapes d'assimilation-dissimilation et les processus d'oxydation-réduction de ces différentes formes alternent dans ce cycle.

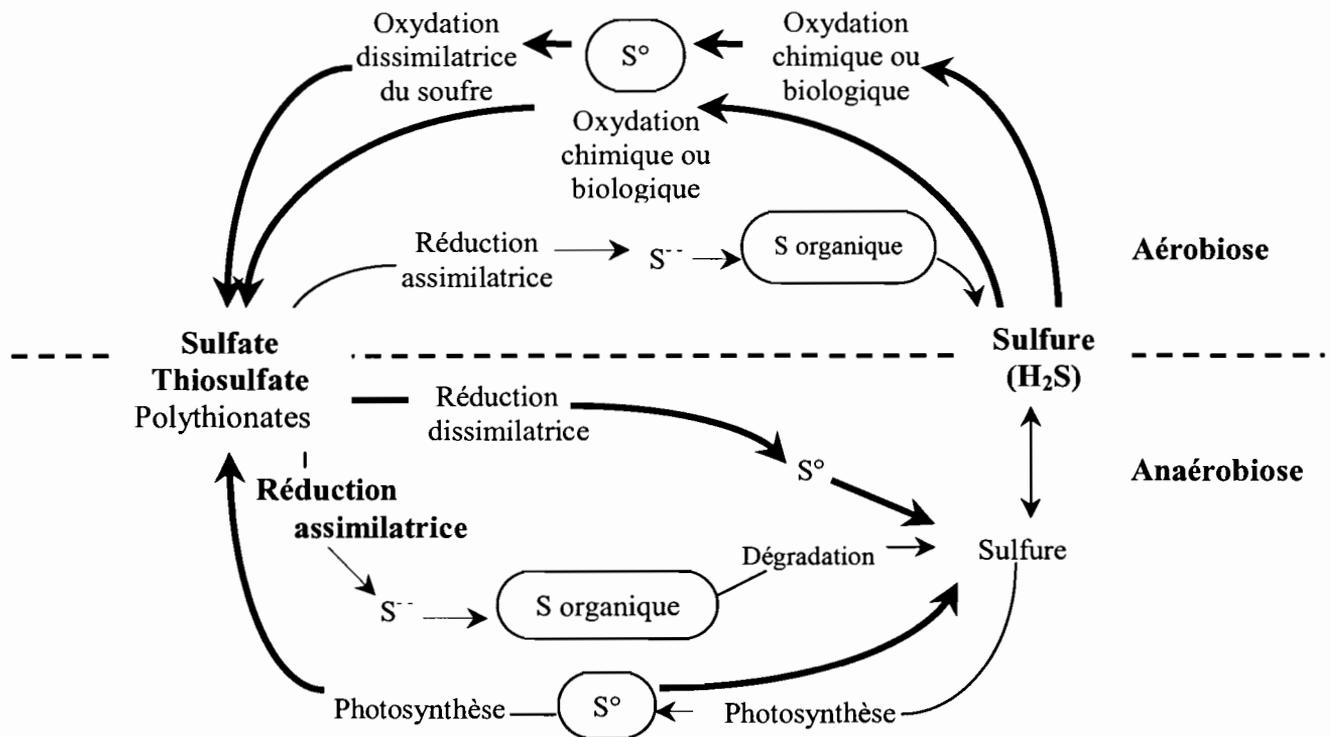


Figure 1. Cycle du soufre (adapté d'après Le Faou et al., 1990)

Les traits en gras symbolisent la partie dissimilatrice, les traits fins la partie assimilatrice

1.2. LES VOIES DE RÉDUCTION DU SULFATE

La réduction du sulfate en sulfure est la principale voie primaire de biominéralisation dans les milieux anaérobies, riches en sulfate. Jørgensen (1982) affirme que ce procédé permet de dégrader près de 50% de la matière organique existante dans les sédiments marins et côtiers.

D'une manière générale, le sulfate peut être réduit en sulfure d'hydrogène par trois processus : (i) la réduction assimilatrice, (ii) la réduction dissimilatrice et (iii) la réduction thermochimique.

La réduction assimilatrice du sulfate est un processus permettant aux plantes, aux algues, aux champignons et certains groupes de procaryotes (Peck, 1993) d'incorporer le soufre dans les acides aminés, les vitamines et d'autres molécules soufrées. Cette réduction n'aboutit pas directement à la production d'hydrogène sulfuré mais ce dernier est libéré lors de la fermentation de la matière organique.

La réduction dissimilatrice, distincte d'un point de vue enzymologique de la réduction assimilatrice du sulfate, est strictement anaérobie et conduit à la production de l'hydrogène sulfuré (H_2S) par les bactéries sulfato-réductrices (BSR).

La réduction thermochimique du sulfate est un processus s'opérant à température élevée (supérieure à 200°C) (Trudinger et Chambers, 1985) conduisant à la formation de sulfures. Les électrons nécessaires pour ce processus abiotique proviennent de la matière organique ou de composés métalliques réduits (comme le fer ferreux).

L'oxydation du sulfure d'hydrogène en sulfates est plus rapide. Elle se fait de plusieurs façons, dont l'oxydation chimique en présence d'oxygène, l'oxydation biologique aérobie, et l'oxydation bactérienne anaérobie (cas des phototrophes anoxygéniques qui utilisent le sulfure comme donneur d'électrons pour leur photosynthèse). Ces réactions sont exergoniques et peuvent constituer une source d'énergie chez de nombreux micro-organismes.

Enfin, le soufre élémentaire peut subir une réduction biologique (organismes sulfo-réducteurs) et une dismutation endergonique en $\text{H}_2\text{S} + \text{SO}_4^{2-}$ (Trandrup *et al.*, 1993).

Plusieurs types de micro-organismes interviennent dans le cycle du soufre. Ce sont les organismes sulfato-réducteurs (tels que *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*), les organismes aérobies tels que *Thiobacillus* et divers hétérotrophes (c'est le cas de quelques souches des genres *Beggiatoa* et *Thiothrix* (Larkin et Strohl, 1983), les bactéries photosynthétiques, diverses *Archaea*, dont les méthanogènes, et certaines formes dépendantes du soufre pour leur croissance comme chez les *Thermococcales* etc...

II. LES BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES

Dans les années 1920, de nombreuses BSR ont pu être mises en évidence, notamment dans les eaux de gisements pétroliers (Bastin *et al.*, 1926). Très répandues dans la nature, ce sont des organismes clefs dans le cycle du soufre qui jouent un rôle essentiel dans la dégradation de la matière organique dans les environnements anoxiques terrestres et subterrestres (Jørgensen et Bak, 1991).

Ce groupe de micro-organismes présente la capacité d'utiliser le sulfate et/ou d'autres formes oxydées du soufre (thiosulfate, sulfite en particulier) pour croître, avec production de quantités importantes de sulfure d'hydrogène (Widdel, 1988 ; Smith, 1993 ; Fauque, 1995).

Malgré cette caractéristique unique, les BSR présentent une grande diversité physiologique, écologique, métabolique, morphologique et nutritionnelle.

II.1. PHYLOGÉNIE

Les BSR constituent un groupe polyphylétique de bactéries anaérobies physiologiquement et morphologiquement différentes (Finstler *et al.*, 1997; Brandt *et al.*, 1999). La figure 2 montre quelques exemples de leur diversité morphologique (d'après Widdel *et al.*, 1988).

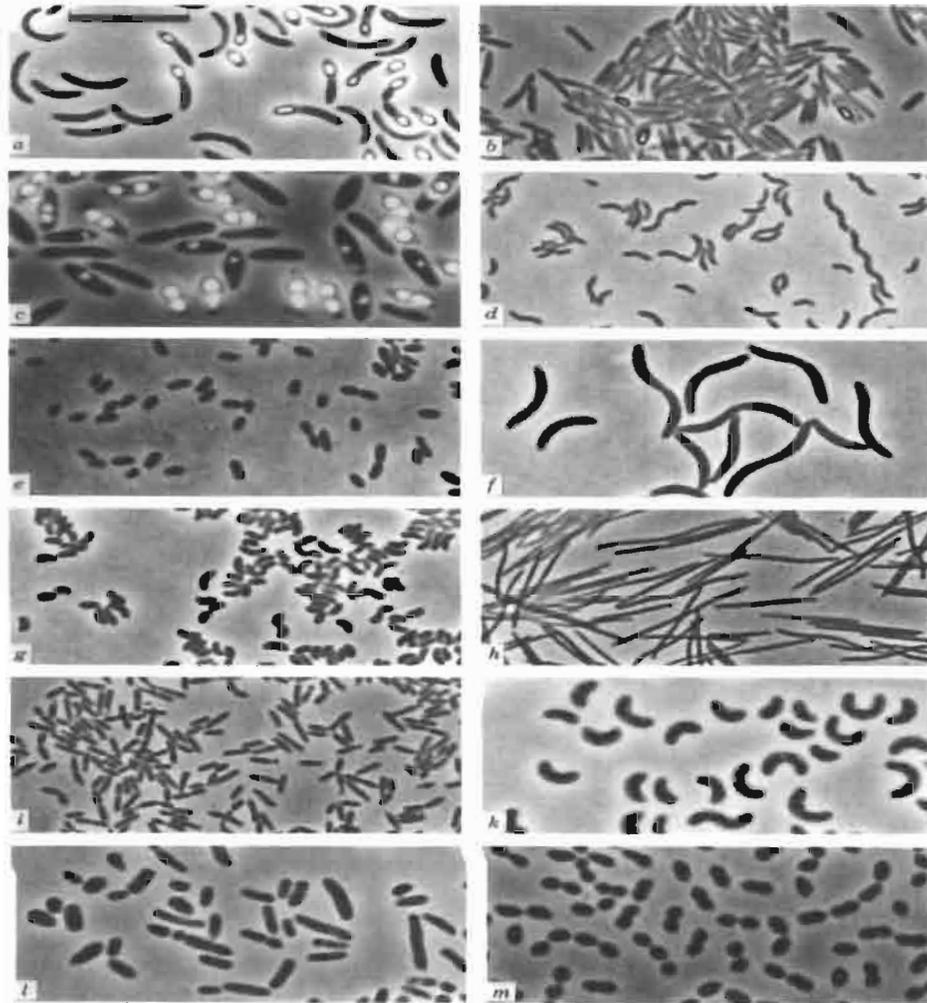


Figure 2. Photomicrographies en contraste de phase de différentes morphologies de cellules de BSR. Trait=10 μ m. (a) *Desulfotomaculum orientis*, (b) *Desulfotomaculum ruminis*, (c) *Desulfotomaculum acetoxidans*, (d) *Desulfovibrio desulfuricans* souche Essex, (e) *Desulfomicrobium baculatum* souche Norway, (f) *Desulfovibrio gigas*, (g) *Desulfovibrio salexigens*, (h) *Desulfovibrio* spp., (i) *Desulfovibrio thermophilus*, (k) *Desulfovibrio sapovorans*, (l) *Desulfomonas pigra*, (m) *Desulfobacter propionicus*

La taxonomie des BSR a subi d'énormes changements durant les 20 dernières années, 50 genres et 205 espèces de sulfato-réducteurs ont été caractérisés à ce jour, notamment grâce à des techniques moléculaires, faisant intervenir l'analyse du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, mais également les gènes de fonction codant pour la sulfite

réductase dissimilatrice (SRD) et pour l'adénylsulfate (APS) réductase.

Actuellement, les BSR sont divisées en quatre groupes phylogénétiques distincts, selon la séquence d'ARNr 16S (Castro *et al.*, 2000). Dans le domaine des *Bacteria*, nous trouvons des BSR Gram positif sporulées, des BSR Gram négatif et des BSR thermophiles appartenant aux branches basses de l'arbre phylogénétique. Le domaine des *Archaea* est lui représenté essentiellement par des thermophiles sulfato-réductrices. Le tableau 2 présente ces quatre groupes de micro-organismes et les genres les plus représentatifs avec leurs principales propriétés.

Tableau 2. Principaux caractères de classification des BSR les plus représentatives (modifié d'après Castro *et al.*, 2000)

	Mobilité	Composition de l'ADN en GC (%)	Oxydation de l'acétate	Température de croissance (°C)
BSR Gram - mésophiles				
<i>Desulfobulbus</i>	-/+	59-60	I ^a	25-40
<i>Desulfomicrobium</i>	-/+	52-67	I	25-40
<i>Desulfomonas</i>	-	66	I	30-40
<i>Desulfovibrio</i>	+	49-66	I	25-40
<i>Desulfobacter</i>	-/+	44-46	C ^b	20-33
<i>Desulfobacterium</i>	-/+	41-52	C	20-35
BSR Gram + sporulées				
<i>Desulfotomaculum</i>	+	48-52	I/C	la plupart 25-40
<i>Desulfosporosinus</i>	+	45-47	I	30-37
<i>Desulfonispota</i>	+	52	I	30
BSR thermophiles				
<i>Thermodesulfobacterium</i>	-/+	30-38	I	65-70
<i>Thermodesulfovibrio</i>	+	29-38	I	40-70
<i>Thermodesulfatator</i>	+	46	I	55-80
<i>Thermodesulfobium</i>	-	35.1	I	50-55
BSR Archaea thermophiles				
<i>Archaeoglobus</i>	-/+	41-46	I	64-92
<i>Caldivirga</i>	-	43	I	60-92
<i>Thermocladium</i>	-	52	I	45-82

^aI : incomplète ; ^bC : complète

La majorité des BSR décrites à ce jour appartient au domaine des *Bacteria*, dont la plupart sont membres du phylum des δ -*proteobacteria* (Castro *et al.*, 2000).

Cependant les BSR sont aussi trouvées dans les phylums des *Thermodesulfobacteria*, *Nitrospirae* et les Firmicutes (notamment le groupe *Bacillus/Clostridium*). Les genres les plus représentés sont les genres *Desulfovibrio* et *Desulfotomaculum*.

Les BSR appartenant aux *delta-Proteobacteria* sont généralement mésophiles, à l'exception les membres des genres *Desulfacinum* (Rees *et al.*, 1995 ; Sievert et Kuever, 2000), *Thermodesulforhabdus* (Beeder *et al.*, 1995), *Desulfonauticus* (Audiffren *et al.*, 2003) et l'espèce *Desulfomicrobium thermophilum*, récemment isolée par Thevenieau *et al.*(2007).

Les trois genres *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* et *Thermoacetogenium*, appartenant au groupe *Bacillus/Clostridium*, sont des BSR mésophiles ou thermophiles modérées avec la particularité de former des endospores (Stackebrandt *et al.*, 1997 ; Hattori *et al.*, 2000). Les quatre genres *Thermodesulfobium*, *Thermodesulfatator*, *Thermodesulfobacterium* et *Thermodesulfovibrio*, appartiennent aux branches les plus basses de l'arbre phylogénétique du domaine *Bacteria* (figure 3).

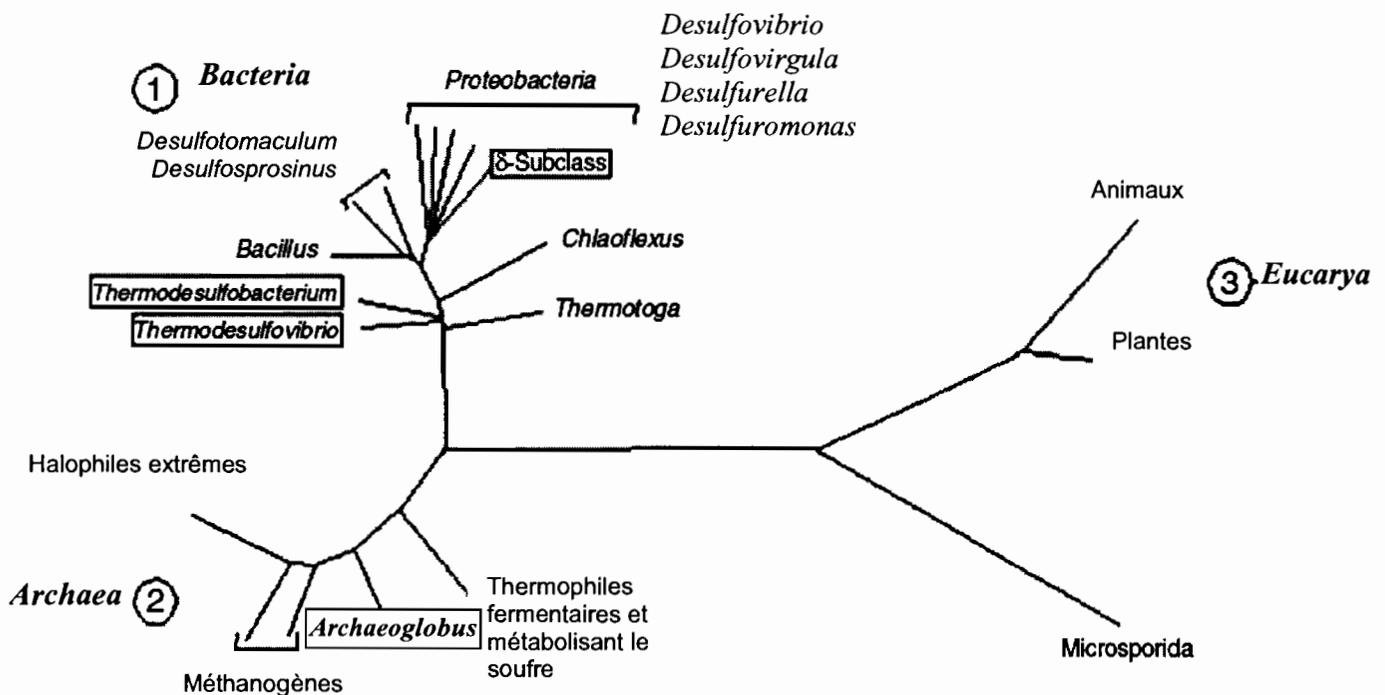


Figure 3. Arbre phylogénétique des BSR basé sur les séquences d'ARNr 16S (l'arbre est adapté de Achenbach-Richter, 1987 et Devereux *et al.*, 1989)

Le domaine des *Archaea* n'est lui représenté que par trois genres : *Archaeoglobus*, *Caldivirga* et *Thermocladium* (Castro *et al.*, 2000 ; Fauque et Ollivier, 2004 ; Itoh *et al.*, 1998, 1999).

Que ce soit dans le domaine des *Bacteria* ou dans celui des *Archaea*, les BSR se sont adaptées aux températures extrêmes (de la psychrophilie à la thermophilie), à de fortes concentrations en sels, aux pH alcalins mais pas acides et à la pression hydrostatique. Ce volet sera détaillé dans le paragraphe suivant.

II.2. ASPECTS PHYSIOLOGIQUES

La souplesse catabolique dont jouissent les BSR est liée à leur parfaite adaptation aux conditions physiologiques des différents environnements planétaires.

En effet, les BSR ont su s'adapter à une amplitude de températures assez large.

On trouve ainsi des BSR psychrophiles capables de croître jusqu'à des températures légèrement inférieures à 0°C, c'est le cas des espèces du genre *Desulfotalea* (Knoblauch *et al.* 1999), de l'espèce *Desulfofaba gelida* (Knoblauch *et al.*, 1999), et des espèces du genre *Desulfofrigus* isolées de sédiments marins. Les BSR mésophiles sont les plus nombreuses et les plus étudiées. On les retrouve parmi les δ -*proteobacteria* et chez les Gram positif.

Les BSR thermophiles sont classées parmi les thermophiles modérées (optimum de température pour la croissance inférieur à 60°C) et les bactéries strictement thermophiles (optimum de température pour la croissance supérieur à 60°C). Certaines de ces BSR sont capables de se développer jusqu'à 92°C et sont considérées comme étant hyperthermophiles.

Physiologiquement, les BSR peuvent être aussi légèrement halophiles (croissance optimale à des salinités comprises entre 1 et 4% de NaCl), le plus souvent d'origines marines, appartenant en particulier aux genres *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* et *Desulfonema*. Il existe peu de BSR halophiles modérées. Parmi celles-ci, *Desulfohalobium retbaense* est la seule BSR halophile connue se développant en présence de 250g/l de NaCl (Ollivier *et al.*, 1994), mais il existe d'autres espèces appartenant au genre *Desulfovibrio* (*D. halophilus* et *D. salexigens*) capables de croître en présence de concentrations en NaCl supérieures à 10%.

La majorité des BSR sont neutrophiles, mais certaines BSR sont également alcalophiles, mais jamais acidophiles, appartenant aux genres *Desulfonatronovibrio* et

Desulfonatronum (Zhilina *et al.*, 1997 ; Pikuta *et al.*, 1998) et barophiles appartenant au genre *Desulfovibrio* (Alazard *et al.*, 2003 ; Bale *et al.*, 1997).

II.3. POTENTIALITÉS MÉTABOLIQUES

L'utilisation par les BSR de donneurs et d'accepteurs d'électrons multiples et variés leur confère une souplesse catabolique remarquable (Fauque et Ollivier, 2004).

Comme chez d'autres bactéries anaérobies, la majeure partie du donneur d'électrons est oxydée pour la conservation d'énergie, et seulement une fraction mineure est assimilée dans la biomasse cellulaire (figure 4).

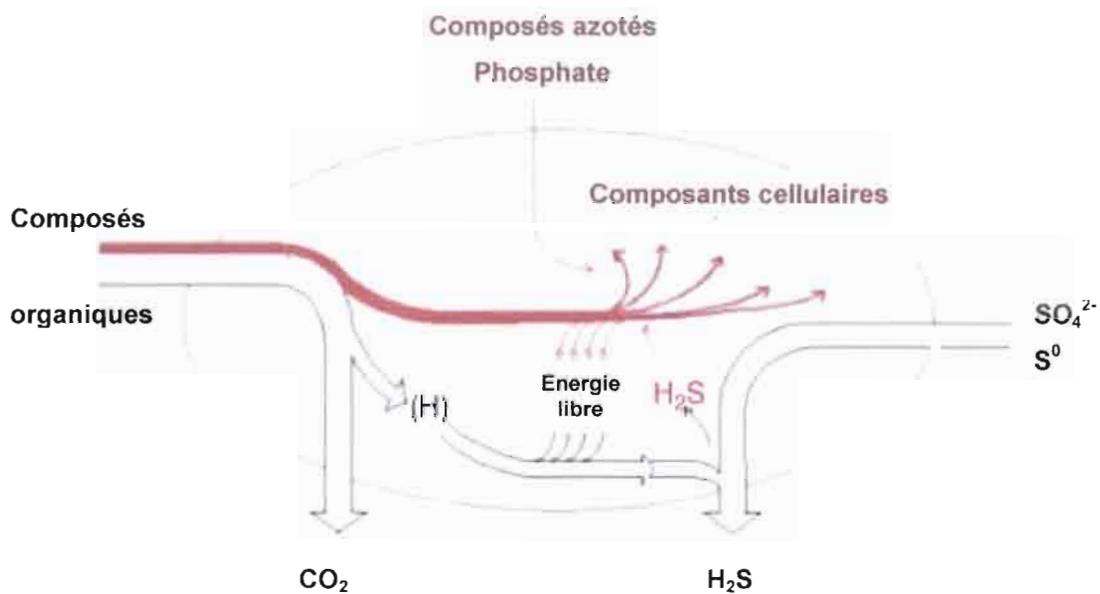


Figure 4. Principe métabolique de la sulfato-réduction chez les BSR. Le catabolisme (métabolisme énergétique) est montré en trait fin noir ; l'anabolisme (synthèse de cellules) est montré en trait gras rouge (Rabus *et al.*, 2006)

II.3.1. Les accepteurs d'électrons

La réduction dissimilatrice du sulfate chez les espèces de *Desulfovibrio* est liée à des phosphorylations oxydatives couplées au transfert des électrons lors de la réduction du bisulfite, du thiosulfate, du soufre élémentaire, du fumarate ou du nitrite (Fauque *et al.*, 1991).

Les BSR du genre *Desulfovibrio* possèdent quelques caractéristiques physiologiques et biochimiques uniques comme le besoin d'ATP pour réduire le sulfate (Peck, 1993), la localisation cytoplasmique des enzymes impliquées dans le système respiratoire de réduction du sulfate (APS réductase et sulfite réductase), la localisation périplasmique de

certaines hydrogénases (Fauque *et al.*, 1988) et l'abondance de cytochromes de type c multihémiques (LeGall et Fauque, 1988; Fauque *et al.*, 1991 ; Fauque *et al.*, 2004).

Le mécanisme bioénergétique de la réduction dissimilatrice du sulfate implique deux principales voies biochimiques mettant en jeu des molécules d'ATP et des protéines d'oxydo-réduction diverses : (i) l'activation du sulfate et sa réduction en sulfite et (ii) la réduction de ce dernier en sulfure, selon la séquence suivante (figure 5).

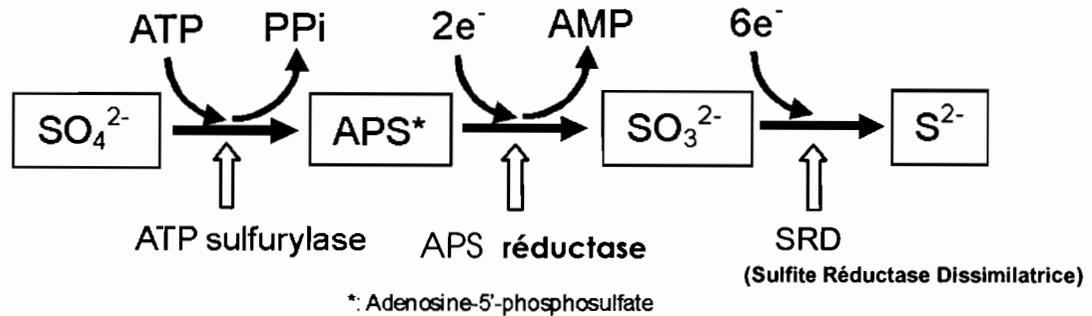


Figure 5. Les voies de réduction du sulfate

La première voie, nécessitant une molécule d'ATP, commence par l'activation du sulfate par la formation d'adénosine-5'-phosphosulfate (APS) grâce à l'ATP sulfurylase.

L'APS est le substrat direct de l'APS réductase qui le réduit en sulfite et en AMP (adénosine monophosphate).

La deuxième voie est catalysée par la sulfite réductase dissimilatrice conduisant au sulfure d'hydrogène (H₂S). Les BSR présentent différents types de sulfite réductases qu'on peut classer en 4 espèces moléculaires en se basant sur leur spectre d'absorption optique. Ce sont : la désulfovirdine, (qui caractérise le genre *Desulfovibrio*), la désulfurubidine, la protéine P582 (présente chez le genre *Desulfotomaculum*) et la désulfofuscidine (présente chez *Thermodesulfovibrio*).

L'existence d'une chaîne de transport d'électrons chez les BSR dépend de la présence de cytochromes de type c et de protéines à centre fer-soufre au niveau de la membrane cytoplasmique. Chez *Desulfovibrio*, sept types de ces dernières ont été isolés (Fauque *et al.*, 1991). Leur classification repose sur le nombre d'hèmes par molécule plutôt que sur le poids moléculaire (pour les cytochromes). Plusieurs autres protéines de transport d'électrons ont aussi été identifiées.

En plus de la réduction dissimilatrice du sulfate, du sulfite ou du thiosulfate, les BSR peuvent utiliser d'autres procédés de conservation d'énergie.

En effet, elles sont capables de croître en fermentation, en dismutant des composés organiques (fumarate) et minéraux (thiosulfate) (Fauque et Ollivier, 2004), et elles peuvent aussi réduire d'autres accepteurs terminaux d'électrons, tels que le soufre élémentaire, le nitrate et l'oxygène (Moura *et al.*, 2007 ; Fauque *et al.*, 1991). La réduction de ce dernier accepteur d'électrons a été récemment mise en évidence (Dilling et Cypionka, 1990).

En effet, jusqu'en 1980, les BSR étaient considérées comme des micro-organismes anaérobies stricts, puis il a été démontré qu'elles pouvaient tolérer la présence transitoire de l'oxygène moléculaire (LeGall et Xavier, 1996; Cypionka, 2000). La capacité d'une vraie respiration aérobie couplée à une conservation d'énergie a été mise en évidence chez quelques souches de *Desulfovibrio*, *Desulfococcus multivorans*, *Desulfobulbus propionicus* et *Desulfobacterium autotrophicum* (Cypionka, 2000). Cependant, aucune croissance de BSR avec l'oxygène comme accepteur d'électrons n'a été rapportée (Fauque et Ollivier, 2004). La respiration aérobie des BSR est microaérophile et elle n'est pas inhibée par le cyanure (Cypionka, 2000). Plusieurs systèmes de réduction de l'oxygène existent chez les sulfato-réducteurs du genre *Desulfovibrio* : (i) une activité NADH oxydase, responsable de la réduction de l'oxygène en eau, est présente chez plusieurs espèces de *Desulfovibrio* (Cypionka, 2000), (ii) une réduction d'oxygène, liée à une translocation de protons et une conservation d'ATP, a été mise en évidence chez *D. desulfuricans*, *D. termitidis* et *D. vulgaris*, une hydrogénase périplasmique et le cytochrome c_3 tétrahémique jouant un rôle majeur dans la réduction de l'oxygène chez ces trois espèces (Cypionka, 2000). Les BSR utilisent les superoxyde réductases qui catalysent plutôt la réduction que la dismutation du superoxyde en eau oxygénée.

En fait, toutes les BSR n'ont pas la même relation avec l'oxygène. Une explication qui peut rendre compte des distributions particulières observées dans plusieurs biotopes, est basée sur la variabilité du degré de tolérance à l'oxygène des BSR.

Un des effets positifs de l'oxygène sur la croissance des BSR serait une réoxydation chimique de l'hydrogène sulfuré en thiosulfate et sulfate régénérant l'accepteur d'électrons pour la sulfato-réduction. Abdollahi et Wimpenny (1990) ont également suggéré que l'oxygène pourrait être utilisé comme accepteur terminal d'électrons pour la croissance. De plus, les BSR perdent leur viabilité et leur mobilité en présence de fortes concentrations et d'expositions prolongées à l'oxygène (Marshall *et al.*, 1993).

Les BSR peuvent aussi réduire une large gamme de métaux lourds incluant: Cr(VI), Mo(VI), Se(VI), Fe(III), As(V) et Mn(IV) (Lovley, 1993). Cet axe de recherche ne cesse

d'attirer l'attention d'une part des microbiologistes, afin d'isoler des BSR convenant à la bioremédiation des sols et des eaux contaminées par les métaux lourds et d'autre part des biochimistes voulant comprendre l'enzymologie de la réduction des métaux par les BSR. Les processus d'oxydo-réduction de l'arsenic en particulier seront détaillés plus loin dans ce document.

II.3.2. Les substrats

Les BSR sont capables d'utiliser une multitude de substrats qu'elles peuvent dégrader complètement pour certains.

Parmi les substrats utilisables par les BSR en présence de sulfate comme accepteur final d'électrons, on compte les acides organiques (lactate, pyruvate, propionate, fumarate, acétate, butyrate,...), les alcools (méthanol, éthanol, propanol, ...), les corps aromatiques (benzoate, furfural, ...), les sucres (le fructose en particulier), les acides aminés et même les hydrocarbures aliphatiques. On leur reconnaît également la capacité d'intervenir dans la biodégradation de polluants environnementaux. Certains composés organiques peuvent être fermentés par les BSR. Le plus commun de ces composés fermentescibles est le pyruvate qui est converti en CO₂ et H₂ par une réaction dite phosphoroclastique (Madigan et Martinko, 2007).

Les BSR restent cependant incapables de cataboliser des biopolymères tels que les protéines, l'amidon et le glycogène, sauf pour *Caldivirga maquilensis* (Itoh *et al.*, 1999), appartenant au domaine *Archaea*, capable d'oxyder le glycogène et la gélatine. Dans les environnements riches en protéines, elles peuvent intervenir en particulier dans l'oxydation des acides aminés ou des peptides (Stams *et al.*, 1985 ; Baena *et al.*, 1998). La L-alanine peut être dégradée par *Desulfotomaculum ruminis* (Coleman, 1960) et le glutamate par plusieurs espèces du genre *Desulfobacterium* (Rees *et al.*, 1998).

La plupart des BSR utilisent l'hydrogène comme source d'énergie et certaines ont une croissance autotrophe par fixation du CO₂. Elles possèdent plusieurs types d'hydrogénases qui catalysent le processus d'oxydo-réduction de l'hydrogène. Dans le genre *Desulfovibrio*, Fauque *et al.* (1988) distinguent trois classes d'hydrogénases sur la base de leur contenu en métal : [Fe], [NiFe], [NiFeSe] qui diffèrent dans leurs localisations, leurs structures métalliques, la composition de leurs sous-unités, leurs séquences en acides aminés, leurs réactivités immunologiques et leurs propriétés catalytiques (Fauque *et al.*, 1988, 1991).

Widdel (1988) a proposé de classer les BSR en deux groupes en fonction de l'état d'oxydation de leurs substrats. Les bactéries sulfato-réductrices du groupe 1, chez

lesquelles l'oxydation du lactate et de l'éthanol est incomplète et s'arrête au stade acétate. C'est le cas de la plupart des *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum nigrificans* et des espèces du genre *Desulfomonas*. Le groupe 2 est constitué de bactéries qui peuvent oxyder le substrat jusqu'au CO₂, c'est le cas de *Desulfobacterium autotrophicum* et des espèces des genres *Desulfonema* et *Desulfobacter* (Pelmont, 1993).

Cette grande versatilité physiologique et métabolique des BSR font d'elles des micro-organismes incontournables dans le « turn-over » de la matière organique, leur permettant ainsi de se développer dans la plupart des écosystèmes terrestres et subterrestres de la planète. Elles jouent par conséquent un rôle écologique, mais également biogéochimique majeur dans les écosystèmes qu'elles habitent.

II.4. HABITATS

Les BSR sont largement ubiquistes dans la nature. Leur présence se détecte facilement par le noircissement de l'eau ou des sédiments qu'elles colonisent (par précipitation du sulfure de fer (FeS) et par dégagement de l'odeur de l'hydrogène sulfuré (H₂S).

A côté des environnements marins, les BSR prospèrent aussi dans les environnements profonds et/ou extrêmes : les milieux souterrains aquifères (Fry *et al.*, 1997), les sources chaudes terrestres (Hugenholtz *et al.*, 1998 ; Koji *et al.*, 2003), les sources marines hydrothermales profondes (Takai et Horikoshi, 1999 ; Ollivier *et al.*, 2007), les sédiments marins froids (Ravenschlag *et al.*, 2000 ; Vandieken *et al.* 2006) et les milieux salés et alcalins (Ollivier *et al.*, 1994 ; Foti *et al.*, 2007).

Chez les espèces peuplant les milieux présentant une carence en sulfate, tels que l'eau douce, un transport actif de sulfate s'impose. En effet, les espèces présentes dans l'eau douce comme *Desulfovibrio desulfuricans* ou *Desulfovibrio propionicus* sont effectivement capables de concentrer le sulfate à partir de leur milieu.

Enfin, les activités humaines génèrent des biotopes propices à la prolifération de bactéries dissimilatrices de composés soufrés.

Les sulfato-réducteurs peuvent se trouver aussi dans les boues et les sédiments de cours d'eau et des lacs pollués, dans des lagunes et des digesteurs d'eaux d'égouts ainsi que dans des sols imbibés d'eau.

Les BSR sont aussi détectées dans les rizières, dans les raffineries de pétrole et dans certains réseaux industriels et même dans les intestins des moutons et des humains (Widdel et Bak, 1992).

La production massive d'H₂S dans les sédiments anaérobies où se développent les sulfato-réducteurs a des répercussions écologiques considérables car il s'agit d'un gaz toxique pour de nombreuses espèces vivantes. Il inhibe la croissance des bactéries pourpres non sulfureuses et gêne le développement des méthanogènes (Abram et Nedwell, 1978). Plusieurs phénomènes naturels viennent heureusement limiter son accumulation, soit par diffusion de gaz dans l'atmosphère, soit par oxydation microbienne, soit par réaction avec les sels de fer dans le sol et les milieux aquatiques pour donner un sulfure insoluble.

II.5. IMPACT ENVIRONNEMENTAL

Les BSR sont de très bons candidats pour la décontamination de milieux, sols ou effluents pollués (par des métaux lourds notamment). Cet aspect environnemental des BSR est relativement récent (une dizaine d'années), et à l'heure actuelle, de nombreux procédés industriels mettant en jeu ces bactéries voient le jour.

La réduction des métaux lourds par les BSR peut se faire de manière chimique (réduction des métaux par l'H₂S produit au cours du métabolisme anaérobie des ces bactéries) et/ou enzymatique, grâce à l'activité métal-réductase mise en évidence chez les cytochromes tétrahémiques de type c₃ ou les hydrogénases (Bruschi *et al.*, 2007) présents chez les BSR. Les sulfato-réducteurs manifestent aussi une action dépolluante au niveau des estuaires et des zones côtières où se répandent les déchets provenant des villes et des installations industrielles. Ils contribuent efficacement à la destruction de la matière organique globale dans tous les milieux anaérobies où le sulfate est abondant.

L'aniline, le résorcinol, les mono- et dichlorophénols sont parmi les polluants susceptibles d'être éliminés par les sulfato-réducteurs (Schnell *et al.*, 1989).

Le mercure, polluant redoutable de l'air et de l'eau, peut être à la fois méthylé et déméthylé par ces bactéries (King *et al.*, 2000).

Les potentialités des sulfato-réducteurs comme agents de dépollution anaérobie sont également soulignées par l'isolement d'une souche Hxd3 capable de coupler l'oxydation complète d'hydrocarbures saturés en présence de sulfate comme accepteur d'électrons (Aeckersberg *et al.*, 1991). Il a été montré récemment que certaines BSR étaient capables également d'oxyder les hydrocarbures polyaromatiques. C'est le cas des bactéries du genre *Desulfobacterium* (Harms *et al.*, 1999).

Certes, les BSR ont certains impacts environnementaux bénéfiques, mais elles constituent un danger économique considérable particulièrement pour les industries pétrolières ; elles sont impliquées dans la contamination des gaz et des huiles stockées,

dans l'activation de la corrosion des métaux (fer, acier...) et menacent l'état des moyens d'exploitation (Stetter, 1996).

Au cours de la corrosion anaérobie des métaux, les BSR peuvent agir directement par le phénomène de dépolarisation cathodique où le sulfate joue le rôle d'accepteur d'électrons. L'oxydation du métal se traduit alors par un déplacement permanent des atomes d'hydrogène en surface.

La corrosion des métaux par les BSR peut être aussi le résultat d'une attaque chimique par certains composés produits par les bactéries comme l'H₂S et les acides organiques (Miranda-Tello *et al.*, 2003)

D'autres types d'activités industrielles sont aussi concernés par les risques d'une contamination par les BSR. Dans l'industrie du papier, l'H₂S entraîne le noircissement du papier. Ces bactéries sont également responsables de l'avarie des aliments dans l'industrie agro-alimentaire.

La production d'hydrogène sulfuré par les BSR se développant dans les égouts, pose également des problèmes aux collectivités (odeur et toxicité de ce gaz).

L'ensemble de ces études montre l'ubiquité et la diversité des BSR et aussi l'importance du métabolisme de la sulfato-réduction avec ses côtés positifs et négatifs dans les écosystèmes naturels et suggèrent que de nombreuses espèces, voire genres ou familles de BSR restent à découvrir et à isoler et peuvent faire l'objet de recherches fondamentale ou appliquée enrichissantes.

Dans la suite de cette synthèse bibliographique, les BSR des milieux marins et hydrothermaux traités au cours de cette thèse seront détaillés d'avantage.

III. LES BSR DU MILIEU MARIN

Dans les sédiments marins côtiers, la zone oxygénée ne dépasse pas, en général, quelques millimètres d'épaisseur. En absence d'oxygène, les micro-organismes capables de respirations anaérobies utilisent d'autres accepteurs finaux d'électrons, dont le sulfate, pour la minéralisation de la matière organique (figure 6).

Ainsi la matière organique est minéralisée principalement par fermentation, par dénitrification, par réduction du sulfate ou par méthanogénèse.

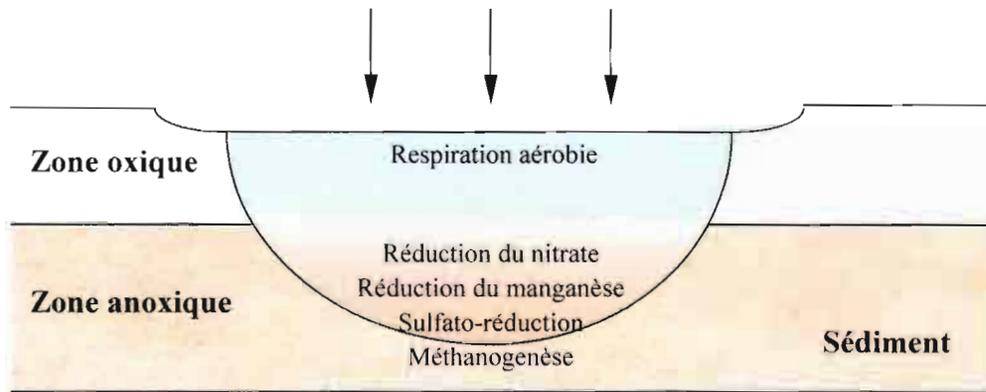


Figure 6. Représentation schématique des zones biogéochimiques montrant les principaux processus anaérobies dans les sédiments marins

A cause de sa haute concentration dans les sédiments marins côtiers (aux alentours de 28 mmole l^{-1} (Goldhaber et Kaplan, 1974)), le sulfate est rarement le facteur limitant de croissance, intervenant ainsi dans les processus bactériens oxydatifs et réducteurs de ces milieux (figure 7). En effet, la sulfato-réduction assure jusqu'à 50% de la minéralisation de la matière organique, comme indiqué précédemment (Jørgensen, 1982; Jørgensen et Kasten, 2006).

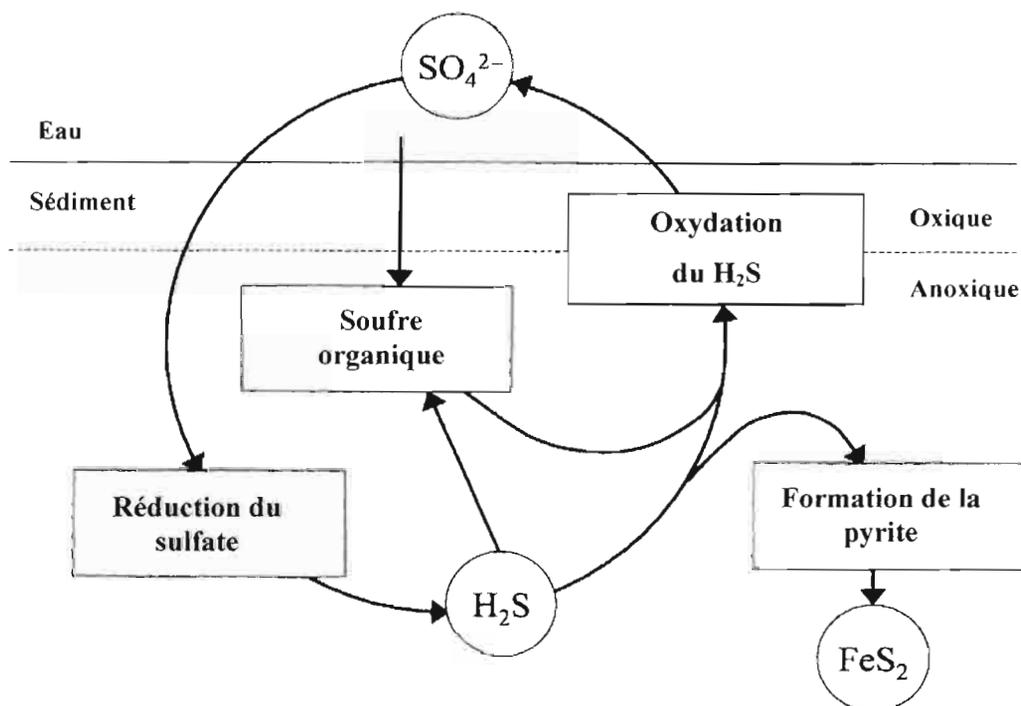


Figure 7. Présentation schématique du cycle du soufre dans les sédiments marins (modifiée d'après Jørgensen, 1988)

Bien que les BSR soient des micro-organismes anaérobies stricts, leur distribution dans ces environnements est phylogénétiquement différente en fonction de la concentration d'oxygène : certains genres de BSR nichent dans les zones non oxygénées tandis que d'autres genres se retrouvent dans les couches oxygénées ou encore à l'interface de zones oxygénées / non oxygénées. L'activité de sulfato-réduction dans les zones oxygénées est importante et parfois du même ordre de grandeur que celle mesurée dans les couches non oxygénées. Dans les sédiments du lac de Constance en Allemagne et de la baie du Kattegat au Danemark par exemple, des taux importants de sulfato-réduction, associés à une grande population de BSR, ont été mesurés dans la couche supérieure (Bak et Pfennig, 1991 ; Jørgensen et Bak, 1991).

Bien que l'environnement naturel de la plupart des BSR marines soit très certainement un environnement froid, puisque 90% des fonds marins présentent des températures souvent inférieures à 4°C, très peu de BSR psychrophiles sont connues comme étant capables de croître jusqu'à des températures légèrement inférieures à 0°C (*Desulfotalea*, *Desulfofaba*, *Desulfofrigus*). Ces bactéries isolées de sédiments marins poussent en effet à -1,7°C, température correspondant à celle mesurée *in situ* dans leur milieu d'origine.

La grande partie des BSR isolées de milieux marins sont mésophiles et légèrement halophiles. Les BSR marines appartiennent surtout à la sous classe des δ -*proteobacteria*, et notamment à la famille des *Desulfobacteriaceae* et à un degré moindre à la famille des *Desulfovibrionaceae*. Les BSR marines sont aussi retrouvées dans le groupe des bactéries Gram positif, plus particulièrement dans la famille des *Peptococcaceae* (tableau 3).

Tableau 3. Les bactéries sulfato-réductrices isolées de sédiments marins

Espèces	Tm. opt. (°C)	Salinité opt. (% NaCl)	G+C %	Origine
Famille des <i>Desulfobacteriaceae</i>				
<i>Desulfonema ishimotonii</i> ¹	28	-	-	Boue marine au Japon
<i>Desulfosarcina variabilis</i> ²	30-33	-	-	France
<i>Desulfobacterium anilini</i> ³	35	-	-	Sédiment marin en Allemagne
<i>Desulfofaba fastidiosa</i> ⁴	28	1-1.6	48.8	Boue marine à Aarhus, Danemark
Famille des <i>Desulfovibrionaceae</i>				
<i>Desulfovibrio acrylicus</i> ⁵	30	-	45.1	Mer de Wadden près du Westernieland
<i>Desulfovibrio bizertensis</i> ⁶	40	2	51	Sédiment marin de la mer de Bizerte, Tunisie
<i>Desulfovibrio marinus</i> ⁷	37	2.5-5	60.4	Eau de mer de Sfax, Tunisie
<i>Desulfovibrio inopinatus</i> ⁸	30	-	49.7	Sédiment marin de la mer de Venise, Italie
Famille des <i>Peptococcaceae</i>				
<i>Desulfotomaculum arcticum</i> ⁹	44	1-1.5	48.9	Sédiment marin au Svalbard, Norvège

Tm. opt. : Température optimale de croissance

Salinité opt. : Salinité optimale de croissance

G+C %: Teneur en G+C mol %

¹ Données de Fukui *et al.* (1999)² Données de Widdel (1988)³ Données de Schnell *et al.* (1989)⁴ Données de Abildgaard *et al.* (2004)⁵ Données de van der Maarel *et al.* (1996)⁶ Données de Haouari *et al.*, (2006)⁷ Données de Ben Dhia Thabet *et al.* (2007)⁸ Données de Reichenbecher et Schink (1997)

⁹ Données de Vandieken *et al.* (2006)

En fait, la diversité des BSR dépend de la zone occupée, selon sa richesse ou non en sulfate. Leloup *et al.* (2007) ont démontré, suite à l'étude moléculaire, basée sur l'analyse de la séquence du gène de fonction codant pour la sulfite réductase dissimilatrice *dsrAB*, qu'une grande diversité des BSR occupaient les sédiments marins de la Mer Noire et que la zone de transition méthane-sulfate était colonisée majoritairement par des membres de la famille des *Desulfobacteriaceae*. La zone supérieure riche en sulfate et la zone profonde où sont détectées les méthanogènes sont plutôt colonisées par des bactéries sporulantes Gram positif sulfato et/ou sulfito réductrices.

La prépondérance des membres de la famille des *Desulfobacteriaceae* est due à leur adaptation à différentes concentrations en sulfate, leur capacité à réduire une grande variété d'accepteurs d'électrons et l'aptitude à oxyder complètement divers donneurs d'électrons en CO₂, faisant d'eux ainsi des colonisateurs efficaces des environnements marins anoxiques (Ravenschlag *et al.*, 2000 ; Purdy *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2003 ; Mußmann *et al.*, 2005).

La grande majorité des membres du genre *Desulfobacterium*, appartenant à la famille des *Desulfobacteriaceae*, a été isolée de sédiments marins et a la capacité de coupler la réduction dissimilatrice du sulfate à la dégradation de divers hydrocarbures aromatiques (Schnell *et al.*, 1989 ; Harms *et al.*, 1999 ; Nakagawa *et al.*, 2002 ; Kniemeyer *et al.*, 2003).

IV. LES BSR DES SOURCES HYDROTHERMALES TERRESTRES

La tectonique des plaques a généré à la surface du globe des zones d'infractuosités, sièges de phénomènes hydrothermaux. Les sites hydrothermaux, qu'ils soient continentaux ou océaniques, sont liés à la rencontre d'eau d'infiltration avec le magma profond. Quand le magma s'écoule, sa remontée crée des poches situées à quelques kilomètres de profondeur (chambres magmatiques). L'eau infiltrée dans le plancher, s'échauffe à l'approche de la chaleur et sous la pression, remonte en se chargeant de minéraux pour rejaillir sous forme de sources hydrothermales. Ainsi la température et le parcours de l'eau dans la roche vont conditionner la composition chimique du fluide ainsi que sa forme d'émergence. Les sources géothermales sont des émanations d'eau, de vapeur d'eau et d'anhydride carbonique à température élevée (figure 8).



Figure 8. Geysers de Old Faithful du Parc National de Yellowstone dans la Wyoming aux USA (à gauche) et Fumerolles de Tatio au Chili (à droite)

En général, le fluide contient de l'hydrogène sulfuré (H_2S), du dioxyde de carbone (CO_2), du méthane (CH_4), de l'hydrogène moléculaire (H_2), de l'ammoniaque (NH_3), des oligo-éléments et des composés organiques de faible poids moléculaire (Brock, 1986).

Ces sources sont réparties sur plusieurs régions de notre planète, plus particulièrement autour des plaques tectoniques et dans les zones où la croûte terrestre est relativement fine (Johnson *et al.*, 2003).

Les points chauds continentaux, bien que constituant une part minime de l'hydrothermalisme, ont été les plus étudiés. Les sources chaudes continentales sont particulièrement abondantes à l'ouest des Etats Unis, en nouvelle Zélande, au Japon et en Islande. La concentration la plus importante de sources chaudes continentales se trouve dans le parc national de Yellowstone aux Etats Unis et c'est d'ailleurs dans une source chaude de ce parc que la bactérie *Thermus aquaticus* a été isolée, en 1969 par Brock et Freeze.

Le tableau 4 présente un exemple de composition minérale d'une source hydrothermale terrestre située au nord de la Tunisie et dont la température est de $60^\circ C$.

Tableau 4. Composition de l'eau hydrothermale de la source Ain Atrous de Korbous au nord de la Tunisie (Office du thermalisme, 2003)

Eléments majeurs				Eléments en traces
Anions (en g/l)		Cations (en g/l)		
Chlore Cl^-	5	Sodium Na^+	3	Pb, Sr, B, Li, Fe, Mn, Zn, Cu, SiO_2
Sulfate SO_4^{2-}	2.1	Magnésium Mg^{++}	0.24	
Bicarbonates HCO_3^-	0.54	Calcium Ca^{++}	0.80	
Fluor F^-	0.003	Potassium K^+	0.09	

En Tunisie, toutes les sources chaudes appartiennent à la classe des eaux météoriques, issues des précipitations infiltrées dans les couches profondes par gravité (Jellouli, 2000). Le pays compte plus d'une cinquantaine d'émergences naturelles d'eaux thermales, s'étalant du sud au nord (Office du thermalisme, 2003).

Dans les écosystèmes géothermaux, longtemps considérés comme impropres au développement de la vie, l'existence de micro-organismes thermophiles a été mise en évidence, il y a bientôt quarante ans, grâce aux travaux de Brock et Freeze (1969) menés sur les sources chaudes du Park de Yellowstone. De nombreuses études microbiologiques classiques et moléculaires, réalisées par différentes équipes de recherche à travers le monde, ont permis d'identifier de nombreux micro-organismes originaux dans ces écosystèmes. Elles ont démontré la prédominance de la sulfato-réduction au sein de ces sources chaudes terrestres (Hugenholtz *et al.*, 1998; Blank *et al.*, 2002), due à l'abondance d'accepteurs d'électrons soufrés en conditions anaérobies et aux concentrations élevées en hydrogène moléculaire, donneur d'électrons important chez les BSR. Ces dernières jouent donc un rôle central dans le cycle du soufre dans ces environnements chauds naturels.

Les micro-organismes thermophiles sulfato-réducteurs isolés des sources géothermales terrestres appartiennent aux genres *Thermodesulfovibrio*, *Thermodesulfobacterium* et *Thermodesulfovibium* qui constituent trois lignées profondes à l'intérieur du domaine *Bacteria* (figure 3). On compte cinq espèces dont *Thermodesulfovibrio yellowstonii* (Henry *et al.*, 1994), *T. islandicus* et *Thermodesulfobacterium hveragerdense* (Sonne-Hansen et Ahring, 1999), *T. commune* (Hatchikian et Zeikus, 1983) et *Thermodesulfovibium narugense* (Mori *et al.*, 2003).

Deux espèces sulfato-réductrices du genre *Desulfotomaculum*, appartenant au

groupe phylogénétique de BSR Gram positif à faible teneur en G+C%, ont aussi été isolées de sites hydrothermaux terrestres. Ce sont, *Desulfotomaculum solfataricum* utilisant le sulfite, le thiosulfate et le sulfate comme accepteur final d'électrons (Goorissen *et al.*, 2003) et *Desulfotomaculum luciae* utilisant le thiosulfate et le sulfate comme accepteur final d'électrons (Liu *et al.*, 1997).

Une sulfato-réductrice appartenant au phylum des δ -Proteobacteria a été récemment isolée d'une source chaude Colombienne : *Desulfomicrobium thermophilum* (Thevenieau *et al.*, 2007).

Le tableau 5 récapitule les espèces sulfato-réductrices isolées de sources chaudes terrestres.

Tableau 5. Les espèces sulfato-réductrices isolées de sources hydrothermales terrestres

Espèces	Tm. Opt. (°C)	G+C %	Origine
<i>Desulfomicrobium thermophilum</i> ¹	55	58.7	Source chaude Colombienne
<i>Desulfotomaculum luciae</i> ²	55	51.4	Sédiment de source chaude Canadienne
<i>Desulfotomaculum solfataricum</i> ³	60	48.3	Solfatare
<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> ⁴	65	29.5	Source chaude de Yellowstone
<i>Thermodesulfovibrio islandicus</i> ⁵	65	38	Source chaude Islandaise
<i>Thermodesulfobacterium commune</i> ⁶	70	34	Source chaude de Yellowstone
<i>Thermodesulfobacterium hveragerdense</i> ⁷	70-74	40	Source chaude Islandaise
<i>Thermodesulfobium narugense</i> ⁸	50	35.1	Source chaude Japonaise

Tm. Opt. : Température optimale de croissance

G+C %: Teneur en G+C mol %

¹ Données de Thevenieau *et al.* (2007)

² Données de Liu *et al.* (1997)

³ Données de Goorissen *et al.* (2003)

⁴ Données de Henry *et al.* (1994)

^{5,7} Données de Sonne-Hansen et Ahring (2000)

⁶ Données de Zeikus *et al.* (1983)

⁸ Données de Mori *et al.* (2003)

A ce jour, très peu de BSR ont été testées pour leur capacité à réduire les métaux lourds. Au cours de ce travail, l'arsenic a été choisi comme métalloïde de référence susceptible d'être réduit par les BSR. Le choix de ce composé est lié au fait que c'est un élément toxique, très répandu dans la nature et qui contamine beaucoup de sols et d'effluents.

V. LES PROCESSUS D'OXYDO-RÉDUCTION DE L'ARSENIC

V.1. LES FORMES SPÉCIFIQUES DE L'ARSENIC

L'arsenic peut exister sous 4 états d'oxydation : As(-III) [arsine], As(0) [arsenic natif], As(III) [arsénite] et As(V) [arséniate]. L'arsenic natif, (élémentaire) est rarement présent, tandis que des traces d'arsines toxiques peuvent être détectées dans les gaz qui émanent des environnements anoxiques (Oremland et Stolz, 2003). La forme prédominante de l'arsenic inorganique dans l'eau et les environnements aérobies est l'arséniate [As(V) ou H_2AsO_4^- et HAsO_4^{2-}], tandis que l'arsénite [As(III) ou H_3AsO_3^0 et H_2AsO_3^-] est plus présent dans les environnements anoxiques. L'arséniate est fortement adsorbé à la surface de différents minéraux très répandus comme la ferrihydrite et l'alumine, une propriété qui diminue sa mobilité dans l'eau. L'arsénite s'adsorbe moins facilement et sur moins de minéraux, ce qui fait que c'est l'anion le plus mobile (Smedley et Kinniburgh, 2002). De plus, l'As(III) est considéré comme étant 60 fois plus toxique que l'As(V) selon les conditions du milieu (Squibb et Fowler, 1983 ; Tamaki et Frankenberger, 1992). L'arsenic inorganique peut être méthylé par les micro-organismes par remplacement d'un ou deux groupements hydroxyles par un groupement méthyle CH_3 pour former l'acide monométhylarsonique $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ (MMA) et l'acide diméthylarsinique $(\text{CH}_3)_2\text{AsOOH}$ (DMA). La méthylation de l'arsenic est le principal processus de détoxification pour les organismes.

V.2. LES SOURCES DE L'ARSENIC

Bien que peu abondant (0.0001%), l'arsenic est très répandu dans la nature et est communément associé aux minerais de cuivre, de plomb et d'or (Oremland et Stolz, 2003). Sa présence dans l'eau provient de la dissolution de roches et de minerais ; dans certaines régions, les eaux souterraines en contiennent parfois des quantités importantes en raison de l'érosion. Smedley et Kinniburgh (2002) ont passé en revue la source, le comportement et la distribution de l'arsenic dans les eaux naturelles.

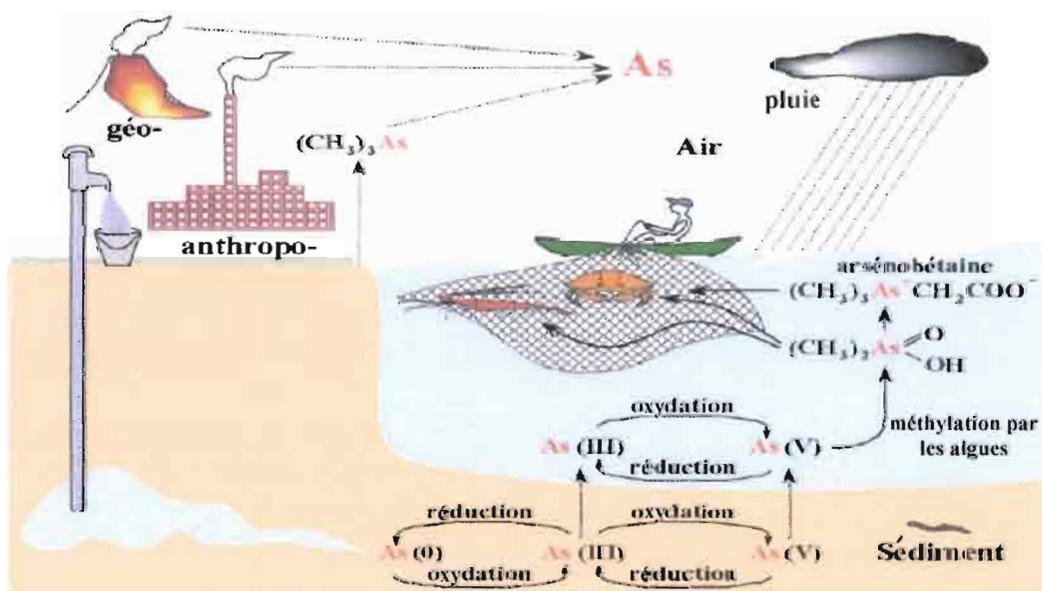


Figure 9. Le cycle géochimique de l'arsenic (Mukhopadhyay *et al.*, 2002)

V.3. LA TOXICITÉ DE L'ARSENIC ET LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCES MICROBIENNES

Le mode de toxicité dépend de la forme chimique de l'arsenic (Smedley *et al.*, 2001). L'arséniate est un analogue moléculaire du phosphate et inhibe la phosphorylation oxydative, court-circuitant ainsi le principal système de génération d'énergie. Il pénètre habituellement dans la cellule par les transporteurs du phosphate. L'arsénite est généralement plus toxique car il se lie aux groupes sulfhydryles, altérant la fonction de nombreuses protéines. Il affecte également la respiration en se liant sur les thiols de la pyruvate déshydrogénase et la 2-oxyglutarate déshydrogénase. Plus récemment, il a été montré qu'il interagissait avec les récepteurs des glucocorticoïdes (Kaltreider *et al.*, 2001).

Différents mécanismes ont été élaborés par les cellules pour se débarrasser de l'arsenic. On y trouve la méthylation et l'expulsion impliquant des transporteurs

spécifiques de l'As(III) méthylé. Les bactéries peuvent produire des MMA et des DMA (Hall *et al.*, 1997). Des microbes aussi divers que les méthanoarchaea anaérobies et les eubactéries aérobies peuvent également former des arsines méthylées (Oremland et Stolz, 2003).

Le mécanisme de détoxification et de résistance le plus étudié est le système ArsC (Rosen, 2002 ; Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Au moins trois arséniate réductases différentes mais structurellement proches ont évolué de façon convergente chez les bactéries et les levures. L'ArsC, arséniate réductase soluble de faible masse moléculaire (13 à 16 kD) entraîne la réduction de l'As(V) en As(III) dans le cytoplasme. Bien que l'As(III) soit plus toxique, il peut être excrété par un transporteur spécifique de l'As(III), l'ArsB. La réduction de l'arséniate en As(III) a été décrite chez plusieurs bactéries isolées de sols contaminés par l'arsenic, suggérant que la résistance à l'As(V) joue un rôle important dans le cycle biogéochimique de cet élément dans la nature (Oremland et Stolz, 2003).

V.4. LA RÉDUCTION DE L'ARSÉNIATE CHEZ LES PROCARYOTES

L'arsenic étant toxique à la fois pour les procaryotes et les eucaryotes, la découverte, assez récente par Ahmann et ses collègues en 1994, que l'As(V) pouvait servir d'accepteur d'électrons à certaines bactéries anaérobies en fonctionnant comme leur oxydant respiratoire fut une véritable surprise.

La réaction est énergétiquement favorable quand elle est couplée avec l'oxydation de la matière organique car le potentiel d'oxydo-réduction de l'As(V)/As(III) est de + 135 mV. Deux représentants étroitement liés aux *Proteobacteria* du groupe ϵ , *Sulfurospirillum arsenophilum* et *Sulfurospirillum barnesii*, ont été les premiers micro-organismes décrits comme ayant cette capacité (Ahmann *et al.*, 1994 ; Stolz *et al.*, 1999). Tous les deux peuvent tirer leur énergie en liant l'oxydation du lactate à la réduction de l'As(V) en As(III) [$(\Delta G^\circ) = -295$ kJ/mol lactate]. A présent, il y a au moins 16 espèces isolées qui ont cette capacité, comprenant des représentants des groupes γ -, δ - et ϵ - des *Proteobacteria*, des bactéries à Gram positif avec un faible taux de G+C%, des eubactéries thermophiles et des *Archaea*. Ce sont des procaryotes réduisant l'arséniate (PRAs) (figure 10).

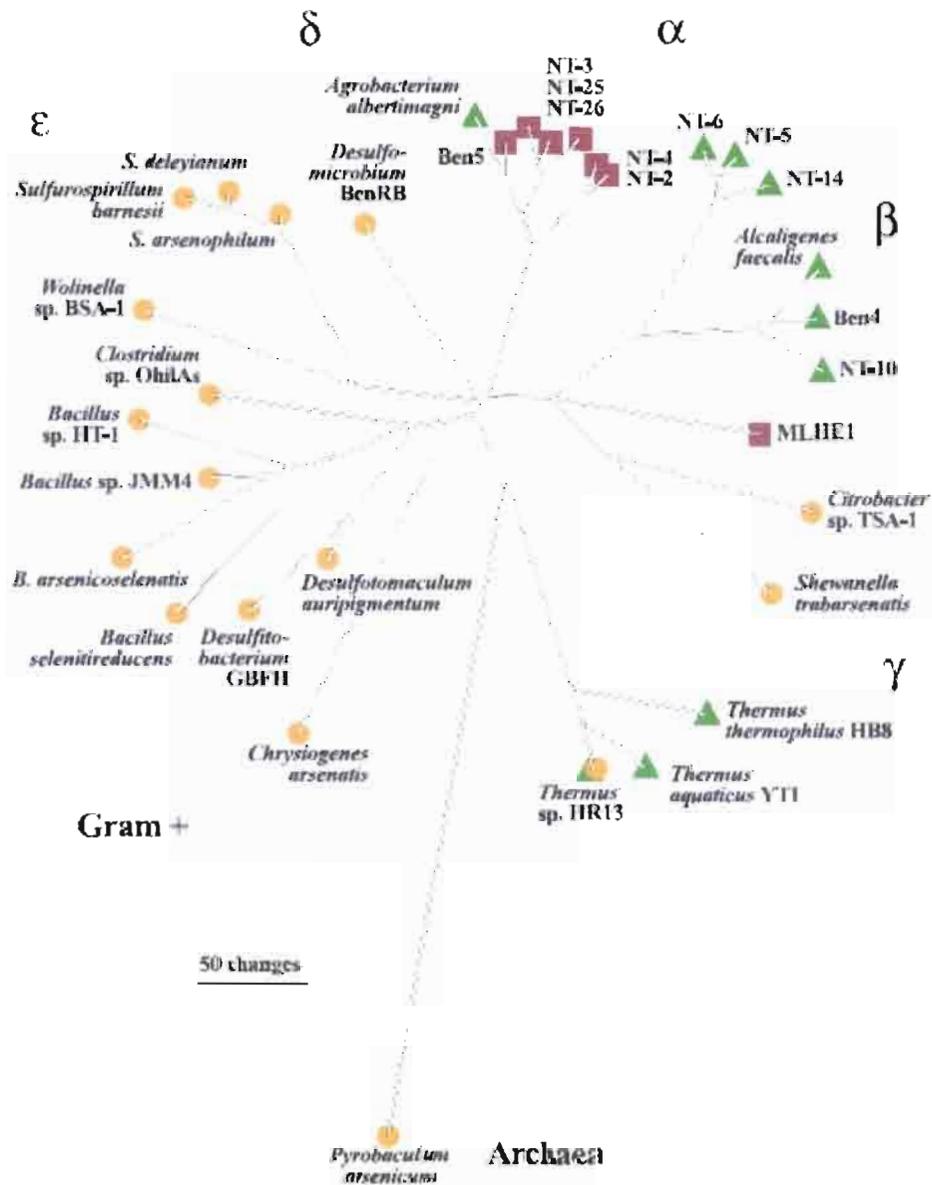


Figure 10. Diversité phylogénétique des procaryotes métabolisant l'arsenic. Cette étude est basée sur l'analyse des séquences codant pour l'ARNr 16S (Oremland et Stolz, 2003). Les procaryotes réduisant l'arsénite (PRAs) sont indiqués par des cercles jaunes, les hétérotrophes oxydant l'arsénite (HOAs) sont indiqués par des triangles verts et les chimiolithoautotrophes oxydant l'arsénite (COAs) sont indiqués par des carrés rouges

Elles ont été isolées de sédiments d'eau douce, d'estuaires, de lacs alcalins, de sources thermales et de mines d'or (Oremland *et al.*, 2001) et de l'appareil gastro-intestinal d'animaux (Herbel *et al.*, 2002). Elles comprennent plusieurs extremophiles adaptés aux fortes températures, un pH alcalin et/ou une salinité importante (Gihring et Banfield, 2001 ; Switzer Blum *et al.*, 1998).

Ces organismes peuvent utiliser différents donneurs d'électrons incluant l'hydrogène, des acides organiques comme l'acétate, le formate, le pyruvate, le butyrate, le citrate, le succinate, le fumarate, le malate et des sucres comme le glucose (Niggemeyer *et al.*, 2001).

V.4.1. Cas des BSR réduisant l'arséniate

La première souche sulfato-réductrice, *Desulfotomaculum auripigmentum*, isolée du lac Mystique supérieur aux Etats Unis, capable de réduire, en présence de lactate, l'As(V) en tant qu'accepteur final d'électrons n'a été décrite qu'en 1997 par Newman et ses collègues. Aucune souche n'a été auparavant décrite comme étant dotée de la capacité de réduction dissimilatrice de l'arsenic et du sulfate, bien que la souche SES-3 réduise l'arsenic, le thiosulfate et le soufre élémentaire (Laverman *et al.*, 1995).

La réduction de l'arséniate en arsénite peut être un mécanisme de détoxification, comme rapporté chez *Desulfovibrio* Ben-RA (Macy *et al.*, 2000) et *Desulfovibrio desulfuricans* G20 (Li et Krumholz, 2007) qui sont incapables de croître dans un milieu ne contenant que l'As(V) comme seul accepteur d'électrons.

Il n'a pas encore été démontré si la capacité à réduire l'arséniate est universellement présente chez les sulfato-réducteurs et si la réduction d'arséniate est typiquement utilisée pour la respiration ou la détoxification (Li et Krumholz, 2007), mais bon nombre de BSR réalisent cette réduction.

Desulfotomaculum auripigmentum présente par exemple un meilleur taux de croissance en présence d'arséniate (5.6g de cellules/mol de lactate) qu'en présence de sulfate seulement (2.3g de cellules/mol de lactate). Ceci n'est pas étonnant étant donné que l'arséniate est un meilleur oxydant que le sulfate et apporterait une énergie libre plus élevée une fois sa réduction couplée à l'oxydation du lactate en acétate, à pH 7 (Morel et Hering, 1993).

La réduction du sulfate et de l'arsenic peut se faire d'une manière simultanée, comme dans le cas de *Desulfovibrio* Ben-RA et *Desulfomicrobium* Ben-RB (Macy *et al.*, 2000), ou successive comme chez *Desulfotomaculum auripigmentum*, qui ne commence à réduire le sulfate qu'après transformation totale de l'As(V), existant dans le milieu, en As(III) (Newman *et al.*, 1997) et ceci vraisemblablement pour des raisons énergétiques.

Macy et ses collègues (2000) mirent en évidence le premier système de résistance à l'arsenic chez les anaérobies et notamment les sulfato-réducteurs. En effet, la souche *Desulfovibrio* Ben-RA dispose d'une protéine membranaire ArsC-like semblable à celle

codée par le gène *arsC* du système de résistance à l'arsenic de *Escherichia coli* R773, et qui permet de réduire probablement l'arséniate en arsénite.

Etonnamment, des homologues ni de l'*arsA* ni de l'*arsB* n'ont été détectés chez la souche *Desulfovibrio* Ben-RA. Le mécanisme employé par cette bactérie pour la détoxification de l'arsénite n'est donc pas encore élucidé.

Les mécanismes utilisés par la souche *Desulfomicrobium* Ben-RB et *Desulfotomaculum auripigmentum* pour réduire l'arséniate ne sont également pas encore identifiés.

Les gènes du système respiratoire de l'arsenate réductase (*arrAB*) sont entièrement identifiés (Saltikov et Newman, 2003) chez les bactéries aérobies, contrairement à leurs homologues chez les BSR. Ce n'est que très récemment que Li et Krumholz (2007) ont pu proposer un modèle de réduction de l'arséniate chez *Desulfovibrio desulfuricans* G20 (figure 11). Ils ont montré que cette souche dispose d'une seule copie du gène *arsC* et d'un opéron *arsRBCC* localisés sur différents endroits du génome et ils considèrent que l'arsénite produit par expression du gène *arsC*, induit l'opéron pour une rapide détoxification de l'arséniate.

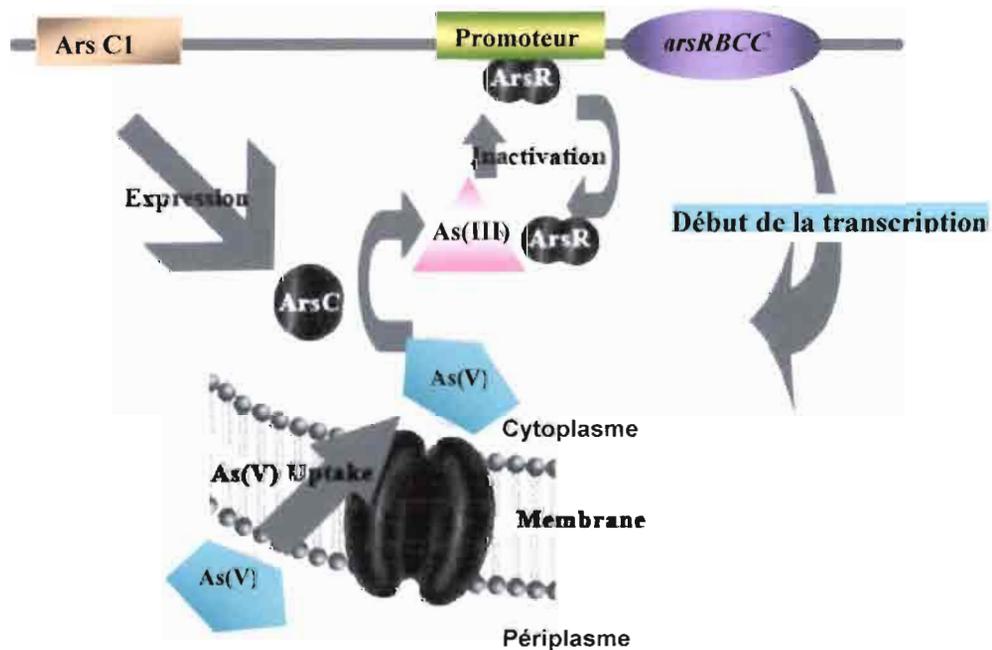


Figure 11. Modèle du système de réduction de l'arséniate chez *Desulfovibrio desulfuricans* G20 (Li et Krumholz, 2007)

Li et Krumholz (2007) ont aussi mis en évidence la capacité de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, *Desulfovibrio* sp. souche ASR et *Desulfovibrio desulfuricans* G20 à réduire l'arséniate en arsénite.

D'après ces travaux et ceux décrivant l'aptitude de croître et de réduire l'arséniate de *Desulfovibrio* Ben-RA et *Desulfomicrobium* Ben-RB (Macy *et al.*, 2000), il s'avère que ces capacités seraient largement présentes chez les *Desulfovibrionales*.

V.5. L'OXYDATION DE L'ARSÉNITE CHEZ LES PROCARYOTES

L'oxydation microbiologique de l'As(III) en As(V) peut avoir un impact sur la mobilité et la spéciation de l'arsenic dans l'environnement. Le processus est connu depuis plusieurs années (Stolz *et al.*, 2006) et plus de 30 souches représentant au moins 9 genres ont ces capacités, incluant des α -, β -, et γ -Protéobactéries, des *Deinocci* (*Thermus*) et des *Archaea* (figure 10). Physiologiquement divers, ces genres incluent à la fois des bactéries hétérotrophes oxydant l'arsénite (HOAs) et plus récemment des chimiolithoautotrophes oxydant ce composé (COAs). L'oxydation hétérotrophe de l'As(III) a été vue au départ comme une réaction de détoxification qui convertit l'As(III) à l'extérieur de la membrane de la cellule dans la forme moins toxique As(V), qui entre probablement moins facilement dans la cellule. Les COAs couplent l'oxydation de l'arsénite (donneur d'électron) à la réduction de l'oxygène ou des nitrates et utilisent l'énergie dérivée pour fixer le CO₂. Pour les HOAs, l'oxydation de l'As(III) est catalysée par une enzyme périplasmique distincte de l'arséniate dissimilatrice réductase. La description de cette enzyme a été faite par différents auteurs, (Stolz et Basu, 2002), cependant la structure de l'arsénite oxydase de COAs n'est pas encore bien comprise.

L'oxydation de l'arsénite est étudiée comme base pour la bioremédiation de systèmes où l'As(III) est un polluant, parce que l'As(V) peut être immobilisé à l'aide de forts adsorbants (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002). Récemment, plusieurs nouvelles espèces de bactéries aérobies oxydant l'As(III), à la fois autotrophes et hétérotrophes ont été isolées à partir d'environnements riches en arsenic (Santini *et al.*, 2002 ; Salmassi *et al.*, 2002).

V.5.1. Oxydation de l'arsénite chez les BSR

Si quelques travaux ont été consacrés aux mécanismes de réduction de l'arsenic par les bactéries sulfato-réductrices, l'oxydation de l'As(III) en As(V), jusqu'à présent n'a pas

été étudiée, malgré le fait que l'As(V) soit moins toxique et moins mobile que l'As(III), notamment en conditions microaérobies.

En effet, à ce jour aucune bactérie sulfato-réductrice n'a été décrite comme étant capable d'oxyder l'arsénite quel que soit l'accepteur d'électrons utilisé.

MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE

Oufa HAOUARI ép. BEN SASSI

Etude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices originaires d'écosystèmes marins et hydrothermaux terrestres Tunisiens : Potentialités oxydo-réductrices de l'arsenic



I. ORIGINE DES ÉCHANTILLONS

L'étude microbiologique a porté sur 13 échantillons différents provenant des eaux et/ou des sédiments (i) marins, (ii) de lacs (iii) et de sources hydrothermales terrestres situés au nord de la Tunisie.

Les caractéristiques physico-chimiques des écosystèmes où nous avons prélevés sont présentées dans le tableau 6 :

Tableau 6. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons étudiés

Echantillons	Température (°C)	pH	Salinité (g/l)
Mer de Bizerte (MB)	20-30	7.8	39.0
Mer de Korbous (MK)	20-30	6.9	39.1
Lac de Tunis (LT)	29	7.6	33.5
Lac de Bizerte (LB)	20-30	7.3	40.0
Lac Ichkeul (L.Ich)	20-30	7.5	34.2
Lac Sijoumi (L.Sij)	20-30	7.5	25.5
Source de Hammam Zriba / eau	44	6.9	0.5
Source de Hammam Zriba / boue	44	7.1	1.3
Source de Hammam Jedidi / eau	60	6.8	1.9
Source de Hammam Jedidi / boue	60	6.9	1.8
Source Ennegrez (A.nag)	45	7.0	1.4
Source Ain Atrous (SK)	58.6	6.7	1.5
Source Hammam Essalhine (HEs)	73	6.9	0.50

Les photos ci-dessous présentent deux des sites de prélèvement.

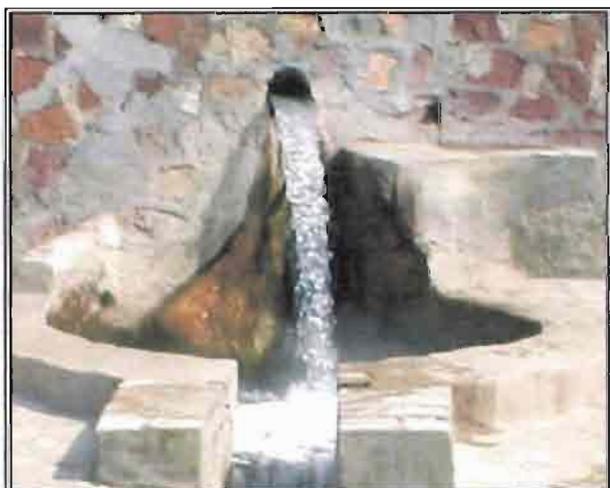


Photo 1. Source hydrothermale de Ain Atrous à Korbous qui jaillit sous un rocher à quelques mètres de la mer



Photo 2. Lac Ichkeul situé au pied d'une montagne

II. PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

Pour la préparation des milieux de culture anoxiques, les techniques mises au point par Hungate (1969) et développées par Miller et Wollin (1974) ont été utilisées. Les milieux doivent être totalement exempts d'oxygène. Un indicateur d'oxydo-réduction coloré, la résazurine, permet de connaître à tout moment le degré d'oxydation d'un milieu. Elle est bleue ou rose (selon le pH) en présence d'oxygène, incolore quand le milieu est anoxique. Le pH du milieu est ajusté, sous agitation, à l'aide d'une solution de potasse (KOH) 10 N.

D'une manière générale, les milieux sont portés à ébullition sous un flux d'azote exempt d'oxygène (photo3). Une fois le milieu réduit (décoloration de la résazurine), il est refroidi sous azote à température ambiante puis réparti dans des tubes de Hungate (5 ml de milieu) préalablement soumis à un flux d'azote.



Photo 3. Préparation des milieux de cultures sous flux d'azote en présence de la résazurine

Les milieux gélosés sont préparés dans les tubes Hungate en ajoutant, avant la répartition des milieux, 2% d'agar noble.

Ces tubes sont fermés hermétiquement, par des septums en caoutchouc imperméables aux gaz, retenus par des capsules vissées. Ces fixations laissent un espace où le caoutchouc est apparent, permettant d'effectuer les prélèvements et les inoculations. Après cela, l'atmosphère des tubes est remplacée par un mélange azote-dioxyde de carbone (80-20 %) pendant une minute, afin d'être parfaitement dans les conditions anaérobies et d'augmenter le pouvoir tampon du carbonate que l'on ajoute ultérieurement.

Par la suite, les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C, pendant 45 minutes.

Avant chaque inoculation, les tubes gélosés sont chauffés pour liquéfier l'agar (1 à 2 minutes au micro-onde), puis maintenus dans un bain-marie à 50°C.

II.1. COMPOSITION DES MILIEUX DE BASE

Au cours de cette étude, la composition du milieu de culture utilisé est la suivante (par litre) : 0.3g KH_2PO_4 ; 0.3g K_2HPO_4 ; 1.0g NH_4Cl ; 2.0g NaCl (ou 23.0g pour l'enrichissement et l'isolement des BSR provenant de milieux marins); 3.0g Na_2SO_4 ; 0.1g KCl ; 0.1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.5g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.1g d'extrait de levure (Difco laboratories); 0.5g cystéine-HCl; 1 ml de la solution de Widdel (Widdel et Pfennig, 1984) et 1ml de résazurine à 0.1 %.

II.2. PRÉPARATION DES SOLUTIONS EN ANAÉROBIOSE

Avant l'inoculation des milieux, certaines solutions sont ajoutées stérilement et de façon anoxique après l'autoclavage car elles risquent (le chlorure de magnésium essentiellement) de réagir avec les autres substances et de former des précipités, sous l'effet de la chaleur.

Pour 5 ml de milieu : 0,1 ml de Na_2S , $9\text{H}_2\text{O}$ à 2% (réducteur) ;
0,1 ml de NaHCO_3 à 10% (tampon) ;
0,1 ml de MgCl_2 , $6\text{H}_2\text{O}$ à 150g/l (rajouté seulement dans le milieu de culture à forte teneur en NaCl (23g/l).

II.3. MANIPULATION DES SOLUTIONS ET DES MILIEUX ANAÉROBES

Une fois les solutions et les milieux préparés, toutes les manipulations effectuées doivent respecter l'anaérobiose et en aucun cas rompre l'environnement anaérobie. Les seringues stériles Becton-Dickson® sont préalablement purgées à l'azote (gaz stérilisé par filtration) pour ne pas rompre l'anoxie (photo 4). Par ailleurs, toutes les manipulations sont réalisées dans un environnement stérile près du bec Bensen.



Photo 4. Technique de manipulation en anaérobiose

III. ENRICHISSEMENTS

Les conditions de culture des différents échantillons varient en fonction de la composition minérale du milieu, des substrats ajoutés, de la salinité et de la température et ceci afin de s'approcher au mieux des conditions physico-chimiques des différents écosystèmes étudiés.

En effet, au cours de l'enrichissement et en présence de SO_4^{2-} comme accepteur final d'électrons, pour enrichir puis isoler des bactéries sulfato-réductrices, sept températures d'incubation, deux concentrations en NaCl et cinq substrats (H_2 [2 bars] + 2mM acétate [source de carbone], lactate, acétate, butyrate et peptone à 20mM) ont été testés.

Le tableau suivant présente les différentes conditions de culture testées, pour chaque échantillon :

Tableau 7. Les conditions de culture testées

<i>Echantillons</i>	<i>Substrats testés</i>	<i>Températures d'incubation</i>	<i>Concentrations en NaCl</i>
Mer de Bizerte (MB) Mer de Korbous (MK) Lac de Tunis (LT) Lac de Bizerte (LB)	lactate, acétate, butyrate, peptone, H_2	30°C	23 g/l
Lac Ichkeul (L.Ich) Lac Sijoumi (L.Sij) Hammam Zriba eau (HEE) Hammam Zriba boue (HEB) Hammam Jedidi eau (HJE) Hammam Jedidi boue (HJB) Ain Ennegrez (A.nag) Source Ain Atrous (SK)	lactate, acétate, butyrate, peptone, H_2	37°C, 60°C et 80°C	23 g/l et 2g/l
Hammam Essalhine (HEs)	lactate, acétate, H_2	55°C et 70°C	2g/l

Le volume d'inoculum correspond à 10% du volume de culture.

A partir de chaque enrichissement, trois repiquages ont été effectués dans les mêmes conditions de culture.

Le passage d'un repiquage à un autre n'est effectué que pour les cultures qui ont présenté une croissance bactérienne (déterminée par observation microscopique et par mesure de la densité optique à 580 nm) et une quantité de H_2S produit [mesurée selon la méthode de Cord-Ruwisch (1985)] significatives.

IV. ISOLEMENT DES BACTÉRIES

L'isolement des colonies bactériennes s'effectue grâce à la technique des Roll tubes décrite par Hungate en 1969. Une fois le milieu (contenant de l'agar) inoculé avec 10% de la culture bactérienne, des dilutions en cascade sont effectuées (10^{-1} à 10^{-10}).

Ensuite les tubes sont placés horizontalement sur un tour (tube spinner), afin de répartir de façon homogène le milieu gélosé sur la paroi du tube, tout en le refroidissant avec des glaçons pour le solidifier. (photo 5)

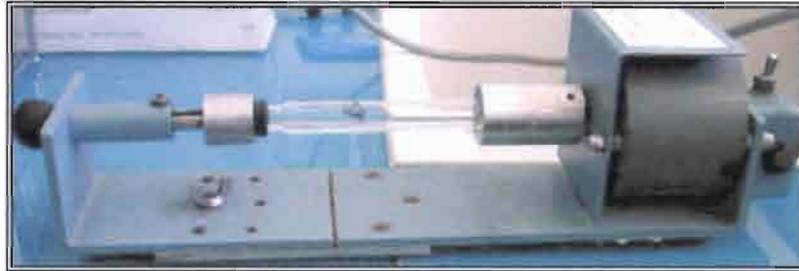


Photo 5. Tube spinner

Les tubes sont incubés aux températures appropriées (tableau 7). Les observations et le choix des colonies se font à l'aide d'une loupe binoculaire.

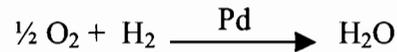
Les différentes colonies sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur stérile incurvée à son extrémité, à partir du milieu positif correspondant à la plus forte dilution positive.

Ceci se fait dans une chambre anaérobie (appelée couramment « boîte à gants ») dont l'atmosphère est contrôlée. Elle est munie d'un sas d'où l'on introduit le matériel nécessaire au prélèvement des colonies (photo 6).



Photo 6. Boîte à gants anaérobie

L'oxygène pénétrant dans la hotte soit par diffusion au travers de l'enveloppe en PVC, soit lors des opérations d'utilisation du sas d'entrée, est transformé en eau (qui sera piégée par du silicagel) grâce à une réaction catalysée par le chlorure de palladium :



Chaque colonie prélevée est suspendue dans un tube contenant du milieu liquide qui servira à effectuer une nouvelle série de dilutions en milieu gélosé.

En ce qui concerne les tubes contenant H₂ comme substrat, après réalisation des roll-tubes, nous injectons ce gaz en allant de la plus forte à la plus faible dilution pour éviter les contaminations.

Enfin, les colonies repérées et diluées sont prélevées une nouvelle fois dans la dernière dilution positive en milieu solide, puis inoculées en cascade en milieu liquide de dixième en dixième (10⁻¹ à 10⁻¹⁰).

La dernière dilution liquide positive correspond à la souche purifiée et servira aux études physiologiques et moléculaires. Une observation microscopique permet de vérifier la présence d'un seul type de cellules.

L'inoculation de milieux riches et complexes contenant de l'extrait de levure, des peptones et des sucres nous permettent de détecter la présence d'éventuels contaminants. S'il n'y a ni apparition de nouvelles formes de bactéries (fermentaires en particulier), ni augmentation anormale de leur nombre, alors les souches sulfato-réductrices sont considérées comme étant pures.

V. CARACTÉRISATION PHYLOGÉNÉTIQUE

Les bactéries ainsi purifiées, sont repiquées en présence de leur substrat utilisé respectivement lors de leur isolement. Il est alors réalisé une extraction d'ADN en vue d'une amplification par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne).

Cette analyse phylogénétique a pour but d'identifier les bactéries isolées et de trouver d'éventuelles relations avec celles déjà connues par comparaison de leurs ADNr 16S.

V.1. EXTRACTION DE L'ADN

L'extraction d'ADN génomique des souches isolées est réalisée au cours de leur phase exponentielle de croissance à l'aide du kit de purification d'ADN génomique Wizard (Promega) à partir de 5 ml de culture selon le protocole du fabricant.

V.2 AMPLIFICATION PAR PCR ET ÉLECTROPHORESE

La PCR consiste à amplifier la séquence d'ADNr 16S, considérée comme spécifique à chaque espèce, par action répétée d'une ADN polymérase.

Les amplifications ont été réalisées à l'aide d'un T3 thermocycleur (Whatman Biometra).

Le couple d'amorces des *Bacteria* utilisé pour l'amplification de l'ADNr 16S est :

Fd1 : 5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3' (amorce sens)

Rd1 : 5'-AAG-GAG-GTG-ATC-CAG-CC-3' (amorce anti-sens)

La suspension d'ADN obtenue après PCR est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% afin de vérifier son état et d'estimer sa taille et sa concentration en comparant les bandes obtenues avec celles du marqueur de taille (Smart Ladder Promega).

V.3. SÉQUENÇAGE ET ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE

Le séquençage est réalisé par les sociétés Génome Express (Grenoble, France) et GATC (Constance, Allemagne), selon la méthode de Sanger, améliorée par l'utilisation de fluochromes. A partir de ces résultats, le positionnement phylogénétique des souches est réalisé. Les recherches de similitude entre la séquence d'ADNr 16S et une banque d'ADN (GenBank) se font par l'intermédiaire du programme BLAST disponible sur le site INFOBIOGEN (<http://www.genome.infobiogen.fr/>). Le but de cette étape est d'affilier l'isolat étudié à un groupe taxonomique.

VI. CARACTÉRISATION DES SOUCHES

Seule la caractérisation des souches les plus intéressantes du point de vue phylogénétique et physiologique a été réalisée.

VI.1. ÉTUDE DE LA MORPHOLOGIE

VI.1.1. Coloration de Gram

On utilise des cellules d'une culture en phase exponentielle, lesquelles ont été colorées à l'aide du Kit GRAM (SIGMA Diagnostics), en suivant les instructions du fabricant. Les lames sont lavées pour enlever l'excès de colorant, séchées à température ambiante et observées au microscope optique de contraste de phase (NIKON optiphot) à l'objectif d'immersion 100x.

VI.1.2. Microscopie optique

Appareillage :

Microscope à contraste de phase : Nikon optiphot (Nikon, Tokyo, Japon)

Les prises de vues sont effectuées avec un appareil *Nikon FX-35*.

Conditions opératoires :

Les caractéristiques morphologiques (forme et taille de la cellule, mobilité, présence et position des spores) sont directement observées au microscope optique. Pour effectuer les prises de vue, les cellules sont d'abord concentrées par centrifugation (13000 tours.min⁻¹ pendant 10 minutes, centrifugeuse de paillasse Biofuge 13, Heraeus).

VI.1.3. Microscopie électronique

Les préparations et photographies des coupes cellulaires ont été réalisées en collaboration avec Pierre Thomas (Université de la Méditerranée, Marseille).

Appareillage :

Microscopie électronique *Hitachi H600*

Préparation des échantillons

Coloration négative :

L'observation des cellules est effectuée après coloration par une solution d'acide phosphotungstique à 1%.

Coupes et coloration :

Les cellules sont fixées pendant 1 heure avec 3% (p/v) de glutaraldéhyde préparé dans une solution tampon de cacodylate de sodium (pH 6,0) contenant 0,7 M de saccharose.

Après fixation, les cellules sont lavées dans du tampon de cacodylate de sodium, incluses dans 2% d'agarose et colorées avec 4% d'acétate d'uranyle. Le bloc d'agarose est sectionné en petits cubes qui sont déshydratés et inclus dans l'epon (epoxyrésine) où on pratique des coupes ultrafines. Celles-ci sont alors contrastées avec une solution d'acétate d'uranyle à 5% pendant 20 min puis avec du citrate de plomb à 2% pendant 10 min.

VI.2. CONDITIONS DE CROISSANCE ET PROPRIÉTÉS MÉTABOLIQUES

VI.2.1. Température optimale de croissance

La gamme de température permettant la croissance des différentes souches étudiées est déterminée en mesurant la vitesse maximale de croissance lors d'incubation dans des bains-marie thermostatés (Memmert WB/OB7-45) (Fisher Scientific France). On entend par vitesse maximale de croissance μ_{max} (exprimée en h⁻¹), la vitesse mesurée pendant la phase exponentielle de croissance. Cette vitesse correspond à la pente de la droite : $\log(DO) = \mu_{max} \times (\text{temps d'incubation}) + \log(DO)_{t_0}$ (où t_0 est le temps initial d'incubation).

Ces études sont réalisées en tubes de Hungate, afin de pouvoir mesurer directement la croissance par lecture de la densité optique à 580nm par insertion des tubes dans le

spectrophotomètre (Varian, Cary50). Pour chaque température, la mesure de la vitesse maximale de croissance est effectuée sur 2 tubes inoculés à 10% avec une culture en phase exponentielle réalisée dans les mêmes conditions. La moyenne de ces deux répétitions est retenue pour définir les profils de température.

VI.2.2. Influence de la concentration en NaCl

Afin d'étudier l'influence de la salinité sur la croissance des différentes souches étudiées, nous avons mesuré leurs vitesses maximales de croissance en fonction des différentes concentrations en NaCl. Comme précédemment, nous avons réalisé deux répétitions pour chacune des salinités testées et retenu la moyenne de ces deux essais. Le sel est directement pesé dans les tubes avant répartition d'un milieu exempt de NaCl. Le test a été réalisé à la température et au pH optimum de croissance de chaque souche.

VI.2.3. Effet du pH

La vitesse maximale de croissance de chaque souche est mesurée à plusieurs pH ajustés par addition de différentes quantités de NaHCO_3 à 10% (p/v) ou de Na_2CO_3 à 8% (p/v), dans un milieu initial à pH 5. Le pH du milieu est mesuré après inoculation en prenant un aliquot de 0,5ml.

VI.2.4. Les accepteurs d'électrons potentiellement utilisables

Pour tester l'aptitude d'une souche à réduire les composés soufrés oxydés ou les autres accepteurs d'électrons, nous avons ajouté au milieu : 20mM de sulfate, 2mM de sulfite, 20mM de thiosulfate, 2% de soufre élémentaire (p/v) (pesé directement dans les tubes avant la répartition du milieu), ou 20mM de fumarate, 20mM nitrate, 2mM nitrite. Pour chaque souche, toutes les cultures sont doublées et nous ne prenons en considération que les résultats issus d'un deuxième repiquage. La réduction de chacun de ces composés est contrôlée par dosage des sulfures totaux en fin de culture ou par la présence de succinate pour la réduction du fumarate ou bien la présence de nitrite, N_2O ou ammonium dans le cas de la réduction du nitrate ou du nitrite.

VI.2.5. Dégradation des substrats

Pour chaque substrat, testé à 10mM, deux tubes sont inoculés à partir d'une culture dans les mêmes conditions expérimentales.

Une analyse par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) est réalisée afin de déterminer les produits du métabolisme pour s'assurer à la fois de l'oxydation des substrats (sucres, acides organiques ou autres) et de la réduction des accepteurs d'électrons

présents formés durant l'utilisation du substrat carboné pour évaluer l'effet des accepteurs d'électrons sur le métabolisme.

VI.2.6. Test d'anaérobiose

Afin de vérifier si les souches étudiées sont bien anaérobies strictes, celles-ci sont inoculées dans des milieux oxygénés (exempts de réducteurs). Les tubes sont alors incubés à la température optimale de croissance de chaque souche, sous agitation, de manière à faciliter la diffusion de l'oxygène dans le milieu de culture. La capacité de la souche à croître en aérobiose est vérifiée par mesure de la densité optique, par observation au microscopique optique et par analyse des substrats utilisés ou non.

VI.2.7. Recherche de formes de résistance à la chaleur

La recherche de formes de résistance à la chaleur est réalisée en incubant, après croissance, deux tubes dans chacune des conditions suivantes : 10 min à 80°C , 20 min à 80°C , 5 min à 90°C ou 10 min à 90°C. Chaque tube est alors repiqué dans un nouveau milieu. Une éventuelle croissance après incubation à la température optimale témoigne de la présence de spores ou autres formes de résistance à la chaleur.

VI.2.8. Résistance aux antibiotiques

L'effet des antibiotiques est testé à une concentration de 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 puis 500 µg/ml en fonction des résultats des premiers tests. Des solutions concentrées d'antibiotiques sont préparées et l'antibiotique est injecté dans le tube juste avant l'inoculation. L'étude est réalisée en double et un deuxième repiquage est réalisé. Certains antibiotiques ont une faible solubilité dans l'eau, alors les solutions concentrées sont préparées dans d'autres solvants, tels que l'éthanol (chloramphénicol) ou le DMSO (rifampicine). Les témoins sans antibiotique reçoivent la même quantité de solvant que les cultures en présence d'antibiotique.

VI.3. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉTIQUES

VI.3.1. Détermination du G+C% de l'ADN génomique

Cette analyse a été effectuée par la DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb, Braunschweig, Allemagne) selon la méthode de Cashion *et al.* (1977) et Mesbah *et al.* (1989).

VI.3.2. Hybridation ADN/ADN

Cette analyse n'a été réalisée que pour la souche HEB223 qui est phylogénétiquement proche de l'espèce *Desulfovibrio alaskensis* avec 99% d'homologie de séquence du gène codant pour l'ADNr 16S.

Cette analyse a également été effectuée par la DSMZ selon la méthode de Cashion *et al.* (1977) avec les modifications décrites par Huss *et al.* (1983) et Escara et Huton (1980).

VI.4. RECHERCHE DE LA DÉSULFOVIRIDINE

Appareillage : Spectrophotomètre *Varian Cary50* (Varian)

Il s'agit de suspendre un culot cellulaire (2 à 3g) dans du tampon TRIS-HCL 10 mM, pH 7,6. Les bactéries sont cassées ensuite aux ultra-sons, puis l'extrait est centrifugé à 10000 x g pendant 15 min. Le surnageant est prélevé délicatement puis dilué à 50% dans le même tampon. Le spectre d'absorption (Postgate et Campbell, 1966) de l'extrait est alors déterminé en balayant les longueurs d'onde de 300 à 750 nm.

Si l'extrait contient de la désulfovirdine, il apparaît sur le spectre un pic symétrique centré à 628 nm. Dans cette région du spectre (au-dessus de 600 nm), rien d'autre n'absorbe et il n'y a pas d'interférence avec d'autres protéines, ce qui n'est pas le cas en dessous de 600 nm où de nombreuses protéines d'oxydo-réduction absorbent (cytochromes, flavoprotéines, protéines à centres fer-soufre comme les ferrédoxines).

VII. ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'ARSENIC

La capacité des souches isolées à réduire l'arséniate [As(V) ou H_2AsO_4^- et HAsO_4^{2-}] et/ou d'oxyder l'arsénite [As(III) ou H_3AsO_3^0 et H_2AsO_3^-] a été étudiée.

La spéciation de l'arsenic est réalisée par HPLC couplée à un générateur d'hydrures et un détecteur par fluorescence de spectrométrie atomique (HPLC-HG-AFS). Cette méthode, décrite par Bohari *et al.*, (2001), a une limite de détection de 2.3 nM pour l'As(III) et 6.1 nM pour l'As(V). La précision est de 5%.

Deux repiquages sont effectués pour chaque condition. Des témoins biologiques et chimiques ont été réalisés.

SYNTHÈSE DES RÉSULTATS ET DISCUSSION

Olfa HAOUARI ép. BEN SASSI

Etude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices originaires d'écosystèmes marins et hydrothermaux terrestres Tunisiens : Potentialités oxydo-réductrices de l'arsenic

Ce chapitre est constitué de deux grandes parties. La première se rapporte à la biodiversité et l'étude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices isolées de milieux marins et hydrothermaux Tunisiens.

La seconde partie décrit la capacité de certains de ces isolats à réduire mais également à oxyder un métalloïde lourd, l'arsenic.

**I. BIODIVERSITÉ ET ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE
DE BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES DES
MILIEUX MARINS ET DES SOURCES
HYDROTHERMALES TERRESTRES TUNISIENS**

Afin d'appréhender la biodiversité des bactéries sulfato-réductrices (BSR) issues des milieux marins et des sources hydrothermales terrestres Tunisiens, dont on sait qu'elles jouent un rôle important d'un point de vue écologique, nous avons dans un premier temps isolé puis caractérisé phylogénétiquement, phénotypiquement et génotypiquement certaines souches qui nous ont paru originales.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence à partir de six échantillons de milieux marins et sept de sources hydrothermales Tunisiens la présence d'une grande diversité de BSR, en utilisant divers donneurs d'électrons, et le sulfate comme accepteur final d'électrons (tableau 8). Ce tableau présente toutes les BSR mésophiles et thermophiles isolées, avec le pourcentage d'identité avec le parent phylogénétique le plus proche, sur la base du gène codant pour l'ARNr16S ainsi que les substrats sur lesquels les souches ont été isolées.

Tableau 8. Bactéries sulfato-réductrices isolées des milieux marins et hydrothermaux Tunisiens

Nom de la souche	Nom de l'espèce la plus proche	Pourcentage d'identité	Substrat	Référence
<u>BSR mésophiles d'origine marine</u>				
MB2	<i>Desulfovibrio</i> TBP-1	99.31 %	peptone	Boyle <i>et al.</i> , 1999
MB3	<i>Desulfovibrio</i> <i>senezii</i>	91 %	H ₂	Tsu <i>et al.</i> , 1998
LB2	<i>Desulfovibrio</i> TBP-1	99.3 %	peptone	Boyle <i>et al.</i> , 1999
LB3	<i>Desulfovibrio</i> <i>senezii</i>	91 %	H ₂	Tsu <i>et al.</i> , 1998
LB4	<i>Desulfovibrio</i> <i>senezii</i>	99.9 %	H ₂	Tsu <i>et al.</i> , 1998
LT3	<i>Desulfovibrio</i> <i>senezii</i>	91 %	H ₂	Tsu <i>et al.</i> , 1998
KM2	<i>Desulfovibrio</i> <i>senezii</i>	93.77 %	peptone	Tsu <i>et al.</i> , 1998
SIJ23	<i>Desulfovibrio</i> <i>alaskensis</i>	99.68 %	extrait de levure	Feio <i>et al.</i> , 2004
<u>BSR mésophiles d'origine thermale</u>				
HEB123	<i>Desulfovibrio</i> <i>alaskensis</i>	99.5 %	peptone	Feio <i>et al.</i> , 2004
HEB223	<i>Desulfovibrio</i> <i>alaskensis</i>	99 %	lactate	Feio <i>et al.</i> , 2004
HEB323	<i>Desulfobotulus</i> BG 14	99.16 %	butyrate	(non publié)
<u>BSR thermophiles d'origine thermale</u>				
Hbr7	<i>Desulfotomaculum</i> <i>australicum</i>	99%	H ₂	Love <i>et al.</i> , 1993
Lam5	<i>Desulfotomaculum</i> <i>putei</i>	96%	lactate	Liu <i>et al.</i> , 1997
Hbr5	<i>Thermodesulfovibrio</i> <i>yellowstonii</i>	95%	H ₂	Henry <i>et al.</i> , 1994

Ce tableau montre qu'il existe une grande biodiversité de BSR mésophiles appartenant au genre *Desulfovibrio* dans les environnements aussi bien marins qu'hydrothermaux Tunisiens. Bon nombres d'entre elles (MB3, LB3, LT3, KM2, SIJ23, HEB123 et HEB223) sont apparentées en particulier aux espèces *Desulfovibrio senezii* et *Desulfovibrio alaskensis* qui ont été isolées respectivement d'un marais salant en Californie et d'un puits de pétrole en Alaska. Ces deux vibrios, mobiles via un seul flagelle polaire, sont Gram négatif, non sporulants, mésophiles, halotolérants et chimio-organotrophes, oxydant de manière incomplète les composés organiques. Elles possèdent toutes les deux une bisulfite réductase de type désulfovirdine.

Par ailleurs, les BSR thermophiles d'origine thermale isolées (Hbr5, Lam5 et Hbr7) appartiennent à deux genres originaires de milieux chauds : *Desulfotomaculum* et *Thermodesulfovibrio* et les espèces auxquelles elles sont apparentées sont respectivement *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, *Desulfotomaculum putei* et *Desulfotomaculum australicum*. Les deux premières ont été isolées de deux sources chaudes profondes aux Etats Unis (une située au parc de Yellowstone et l'autre au bassin Triasique), la dernière du grand bassin Artésien en Australie.

Cette première approche nous a permis de mettre en évidence des BSR qui présentent un intérêt taxonomique certain, si nous tenons compte des faibles similarités observées entre nos isolats et leurs plus proches parents phylogénétiques.

Ainsi, cette partie des résultats constitue une première étape dans la caractérisation phylogénétique des souches isolées de milieux marins et hydrothermaux Tunisiens. Il est désormais intéressant d'étudier ces micro-organismes d'un point de vue taxonomique et physiologique. Ceci fait l'objet de la partie qui suit.

I.1. CARACTÉRISATIONS PHYLOGÉNÉTIQUE, PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE DES NOUVEAUX ISOLATS

Nous avons caractérisé les souches les plus intéressantes, d'un point de vue phylogénétique, dont deux mésophiles halophiles d'origine marine et deux thermophiles, d'origine thermale qui sont respectivement : MB3, HEB223, Lam5 et Hbr5.

Le tableau 9 récapitule les caractéristiques phylogénétiques, phénotypiques et génotypiques de ces quatre isolats.

Les valeurs optimales sont indiquées entre parenthèses. (-) pas de croissance; (+) bonne croissance, (ND) non déterminé. DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, JCM : Japan Collection of Microorganisms.

Tableau 9. *Caractéristiques physiologiques et génotypiques des souches isolées*

Caractéristiques	Souche MB3 ¹	Souche HEB223	Souche Lam5 ¹	Souche Hbr5 ¹
	DSM 18034 JCM 14199	(non déposée)	DSM 18033 JCM 13992	DSM 18151 JCM 13991
Forme des cellules	Vibrio	Vibrio	Bâtonnets ovales	Vibrio
Gamme de température °C	15-45 (40)	25-50 (35)	40-60 (45)	50-70 (65)
Gamme de pH	6-8.1 (7)	6.2-8.2 (7.5)	5.8-8.2 (7.2)	6.1-8.5 (7.1)
Gamme de Salinité (%w/v, NaCl)	0.5-5 (2)	0-80 (30)	0-0.02	0-0.02
Teneur en G + C mol %	51	ND	46.8	36.1
Désulfovirdine	+	+	-	-
Donneurs d'électrons utilisés				
H ₂ + acétate (2mM)	+	+	+	+
Pyruvate	+	+	+	+
Ethanol	+	+	+	-
Fumarate	+	+	-	-
Malate	+	+	-	-
Cystéine	-	+	-	-
Formate	ND	+	+	+
Propanol	+	+	+	-
Succinate	+	+	-	-
Accepteurs d'électrons utilisés				
Sulfite	+	+	+	+
Soufre élémentaire	+	+	-	+
Nitrate	-	-	-	-

La souche HEB223 n'ayant que 33.9% d'homologie sur l'ADN chromosomique avec *Desulfovibrio alaskensis*, devrait représenter une nouvelle espèce du genre *Desulfovibrio*.

Les informations phénotypiques, physiologiques et phylogénétiques dont nous disposons nous permettent de classer les souches :

- (i) MB3^T, ayant comme plus parent phylogénétique *Desulfovibrio senezii* avec 91 % d'homologie de séquences d'ARNr16S (Tsu *et al.*, 1998), dans une nouvelle espèce du genre *Desulfovibrio* (*D. bizertensis* ; Int J Syst Evol Microbiol (2006) 56, 2909-2913) ;
- (ii) Lam5^T, proche de la bactérie *Desulfotomaculum putei* avec 96 % de similitude de séquence (Liu *et al.*, 1997), dans une nouvelle espèce du genre *Desulfotomaculum* (*D. hydrothermale*; article en révision dans Int J Syst Evol Microbiol) ;
- (iii) Hbr5^T, qui a 95% d'identité de séquence avec l'espèce *Thermodesulfovibrio yellowstonii* (Henry *et al.*, 1994), dans une nouvelle espèce du genre *Thermodesulfovibrio* (*T. hydrogenophilus* ; article en révision dans Systematic and Applied Microbiology).

La partie qui suit présente ces trois articles.

ARTICLE n°1

Isolement de bactéries sulfato-réductrices de sédiments marins Tunisiens et description de *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov.

Olfa Haouari, Marie-Laure Fardeau, Laurence Casalot, Jean-Luc Tholozan, Moktar Hamdi, Bernard Ollivier

Int J Syst Evol Microbiol.(2006) 56, 2909-2913.

Plusieurs souches de bactéries sulfato-réductrices ont été isolées de sédiments marins Tunisiens près de Tunis, Korbous et Bizerte. Elles appartiennent au genre *Desulfovibrio*. Une de ces souches, MB3^T, a été caractérisée. Elle est Gram négatif et non-sporulante. Ses cellules sont des bâtonnets en forme de vibrios, minces, incurvés et mobiles et possède une bisulfite réductase : la désulfovirdine. MB3^T croît d'une manière optimale à 40°C, à un pH de 7,0 et en présence de 20 g.l⁻¹ de NaCl. Elle utilise H₂ en présence d'acétate avec le sulfate comme accepteur d'électrons. Elle utilise également le lactate, l'éthanol, le pyruvate, le malate, le fumarate, le succinate, le butanol et le propanol comme donneurs d'électrons. Le lactate est oxydé incomplètement en acétate. La souche MB3^T fermente le pyruvate et le fumarate (faiblement). Les accepteurs d'électrons utilisés sont le sulfate, le sulfite, le thiosulfate, le soufre élémentaire et le fumarate, mais pas le nitrate, ou le nitrite. La teneur de l'ADN génomique en G+C% est de 51 mol%. La souche MB3^T se différencie des autres souches de *Desulfovibrio* par ses caractéristiques génotypiques, phénotypiques et phylogénétiques. Elle représente une nouvelle espèce du genre *Desulfovibrio*, *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov. (DSM18034^T, NCIMB14199^T).

Isolation of sulfate-reducing bacteria from Tunisian marine sediments and description of *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov.

**Olfa Haouari^{1,2}, Marie-Laure Fardeau¹, Laurence Casalot¹, Jean-Luc Tholozan¹,
Moktar Hamdi², Bernard Ollivier¹**

1- IRD, UMR 180, IFR-BAIM, Universités de Provence et de la Méditerranée, ESIL, 163 Avenue de Luminy, F-13288 Marseille cedex 09, France.

2- UR-Procédés Microbiologiques et Alimentaires, INSAT, 1080 Tunis Tunisia.

*Corresponding author. Dr. Bernard Ollivier, Laboratoire de Microbiologie IRD, Universités de Provence et de la Méditerranée, ESIL case 925, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 09, France.

Phone +33 (0)4 91 82 85 76.

Fax:+33 (0)4 91 82 85 70.

E-mail: ollivier@esil.univ-mrs.fr

Running title: *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov.

Keywords: *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov., anaerobe, sulfate-reducing bacterium, taxonomy.

The Genbank accession number for the 16S rDNA sequence for the MB3^T is DQ422859.

SUMMARY

Several strains of sulfate-reducing bacteria were isolated from marine sediments recovered near Tunis, Korbous and Bizerte, Tunisia. They all showed characteristics consistent with members of the genus *Desulfovibrio*. One of these strains, designated MB3^T, was characterized further. Cells of strain MB3^T were slender, curved, vibrio-shaped, motile, Gram negative, non-spore-forming rods. They were positive for desulfovibrin as bisulfite reductase. Strain MB3^T grew at temperatures of 15–45°C (optimum 40°C) and at pH 6,0–8,1 (optimum pH 7,0). NaCl was required for growth (optimum 20 g NaCl l⁻¹). Strain MB3^T utilized H₂ in the presence of acetate with sulfate as electron acceptor. It also utilized lactate, ethanol, pyruvate, malate, fumarate, succinate, butanol and propanol as electron donors. Lactate was oxidized incompletely to acetate. Strain MB3^T fermented pyruvate and fumarate (poorly). Electron acceptors utilized included sulfate, sulfite, thiosulfate, elemental sulfur and fumarate, but not nitrate or nitrite. The G+C content of the genomic DNA was 51 mol%. On the basis of genotypic, phenotypic and phylogenetic characteristics, strain MB3^T (=DSM 18034^T = NCIMB 14199^T) is proposed as the type strain of a new species, *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov.

In marine ecosystems, sulfate because of its high concentration in sea water (2.65 g/l), is a suitable electron acceptor for growth of sulfate-reducing bacteria (SRB). In such ecosystems, Sulfate reduction ensures a significant part (50%) of the mineralization of organic matter (Jørgensen, 1982, Widdel & Bak, 1992). Despite the fact that it has been clearly established that completely oxidizing SRB (e.g. acetate oxidizers) dominated marine sediments (Jørgensen & Bak, 1991), several authors reported that hydrogenotrophic SRB of the *delta-proteobacteria*, family *Desulfovibrionaceae* were common inhabitants of marine ecosystems. Within this latter family, several *Desulfovibrio* species have been isolated so far. They include *D. acrylicus* (van der Maarel *et al.*, 1996), *D. africanus* (Campbell *et al.*, 1966), *D. giganteus* (Esnault *et al.*, 1988), *D. gigas* (Weber *et al.*, 1970), *D. inopinatus* (Reichenbecher & Schink, 1997) which have been recovered from shallow marine ecosystems, while *D. profundus* (Bale *et al.*, 1997) together with *D. hydrothermalis* (Alazard *et al.*, 2003) originated from the deep-marine environments. All these species are recognized as incomplete oxidizers that may contribute to organic matter mineralization through hydrogen oxidation coupled to sulfate respiration. Beside sulfate, other potential electron acceptors such as 2,4,6-tribromophenol, or acrylate may be used by marine *Desulfovibrio* species (Boyle *et al.*, 1999), thus emphasizing the significant ecological role that they may play in marine sediments.

In an attempt to have a better knowledge of the biodiversity of SRB inhabiting marine ecosystems, we have undertaken microbiological studies to isolate hydrogenotrophic SRB in particular from various marine sediments located in Tunisia, near Tunis, Korbous, and Bizerte. Beside hydrogen, peptone and yeast extract were also used as energy source in the presence of sulfate as terminal electron acceptor. In these culture conditions (hydrogen, peptone or yeast extract), we isolated only members of the genus *Desulfovibrio*. Amongst them, one strain (strain MB3^T) is proposed to be assigned to a novel species, *D. bizertensis*, sp. nov.

Sediment samples were collected in sterile plastic bottles from the sea of Korbous, Tunis, and Bizerte in North of Tunisia, and kept at 5°C until used. The *in situ* temperature, pH and conductivity of samples were respectively 30°C, 7.8 and 62 ms/cm.

The Hungate technique (Hungate, 1969) was then used throughout the studies. The basal medium contained (per liter): 0.3 g of KH₂PO₄; 0.3 g of K₂HPO₄; 1.0 g of NH₄Cl; 23 g of NaCl; 3 g of Na₂SO₄; 0.1 g of KCl; 0.1 g of CaCl₂.2H₂O; 0.1 g of yeast extract (Difco laboratories); 0.5 g of cysteine-HCl; 1 ml trace mineral element solution (Widdel and Pfennig, 1984) and 1 ml of 0.1 % Resazurin. pH was adjusted to 7.2 with 10 M KOH. The

basal medium was boiled under a stream of O₂-free N₂ gas, cooled to room temperature and 5 ml aliquots were distributed in Hungate tubes under a stream of O₂-free N₂ gas. The N₂ gas phase was replaced with N₂-CO₂ (80:20, v/v) and the tubes were autoclaved for 45 min at 110°C. Prior to inoculation, 0.1 ml of 2 % Na₂S.9H₂O, 0.1 ml of 10 % NaHCO₃ and 0.1 ml of 15% MgCl₂.6H₂O were added.

Enrichments were performed in Hungate tubes containing 5 ml of medium and inoculated with 10% of sample. H₂+CO₂ (2bars), peptone (10g/l) or yeast extract (0.2g/l) were used as substrates. Acetate (2mM) was added as the carbon source in the presence of hydrogen as electron donor. The tubes were incubated at 30°C for 3 days. Three enrichment series were performed in the same medium before isolation. Cultures were purified by repeated use of the Hungate roll-tube method with medium solidified with 2.5% (w/v) agar (Difco). Several colonies that developed were picked and cultured in the corresponding culture medium. The process of isolation was repeated several times until isolates were deemed to be axenic. Physiological optimal growth conditions (for strain MB3^T only) were determined in duplicate experiments conducted in basal medium containing lactate (20 mM) and thiosulfate (20mM) as previously described (Fardeau *et al.*, 1993). Growth was measured by inserting tubes directly into a model Cary 50 Scan spectrophotometer (Varian) and measuring the OD (580nm). Sulfide was determined photometrically as colloid CuS by the method of Cord-Ruwisch (1985).

Genomic DNAs were extracted according to the protocol described for the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega). The 16S rRNA genes were amplified using Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and Rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') and the following reaction conditions : 1 min at 94°C, 30 cycles of 30s at 94°C, 1 min at °C and 2 min at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C. PCR fragments were then cloned into pGEM-T-easy (Promega) as recommended by the manufacturer. Recombinant clones, with the right-length inserts, were sequenced by using SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3') and T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') (Genome Express, Grenoble, France). The nucleotide sequences of the 16s RNA genes were compared with reference sequences from the Genbank database (Benson *et al.*, 1999). The 16sRNA gene sequence for strain MB3^T was aligned with reference of various *Desulfovibrio* using programs provided by the Ribosomal Database Project II (Maidak *et al.*, 2001). The sequence alignment was manually verified using the sequence alignment editor BioEdit (Hall, 1999). Position of sequence and alignment uncertainty were omitted from the analysis. Pairwise evolutionary distances based on 1436 unambiguous bp was

computed by using the Jukes & Cantor method (1969). The dendrogram was constructed by using the neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987). Confidence in the tree topology was determined by bootstrap using 100 resamplings of the sequences (Felsenstein, 1985).

Several sulfate-reducing bacteria were isolated from Tunisian marine sediments near Tunis, Korbous, and Bizerte in the presence of hydrogen, peptone or yeast extract as substrates and sulfate as the terminal electron acceptor. All isolates were found to be phylogenetically related to the genus *Desulfovibrio* (Table 1). Strains LB2 and MB2, isolated from marine sediments near Bizerte (Tunisia) were closely related (> 99% similarity) to an uncharacterized *Desulfovibrio* (strain TBP-1) (Boyle *et al.*, 1999), whereas strain SIJ 23 isolated from marine sediments near Tunis, and strain LB4 isolated from marine sediments near Bizerte, were related (99-100% similarity) to *D. alaskensis* and *D. senezii*, respectively (Feio *et al.*, 2004; Tsu *et al.*, 1998). Four other strains (KM2, LB3, LT3, MB3^T) isolated from marine sediments near Korbous, Bizerte, and Tunis (Tunisia) had also *D. senezii* as their closest phylogenetic relative, but had low similarity (96%) with this latter species thus justifying that they should belong to a novel species of the genus *Desulfovibrio*. Strain MB3^T was further characterized.

Cells of strain MB3^T were slender, curved, vibrio-shaped (Fig. 1a), motile, Gram negative (Fig. 1b), non-spore-forming rods.

This strain was strictly anaerobic and mesophilic; optimal temperature for growth was 40°C (range 15-45°C) (Fig. 2a). For pH studies, the medium was adjusted to the desired pH using anaerobically prepared stock solutions of NaHCO₃ (10 %) or Na₂CO₃ (10 %). Strain MB3^T was neutrophilic; the optimum pH for growth was 7 and growth occurred between pH 6 and 8.10 (Fig. 2b). For studies of NaCl requirements, NaCl was weighed directly in the tubes for concentrations ranging from 0 to 13 % NaCl before dispensing a basal medium exempt of NaCl. The isolate was slightly halophilic and grew in the presence of NaCl concentrations ranging from 5 to 50 g l⁻¹, with an optimum at 20 g l⁻¹ (Fig. 2c).

The following substrates (20 mM) were used as carbon and energy sources: lactate, ethanol, pyruvate, malate, fumarate, succinate, H₂/CO₂ with acetate (2mM), butanol and propanol. Acetate, propionate, butyrate, casamino-acids (0.1%), fructose, glucose and methanol (40 mM) were also tested but did not support growth.

Sulfate (20 mM), thiosulfate (20 mM), elemental sulfur (0.1 %), sulfite (2 mM), fumarate (20mM) were used as terminal electron acceptors but not nitrate (20 mM) nor nitrite (2 mM).

Fermentation products were determined as described by Fardeau *et al.* (1993).

Strain MB3^T fermented pyruvate and poorly fumarate.

The end-products from lactate metabolism in the presence of thiosulfate as terminal electron acceptor were acetate, CO₂, and H₂S.

Growth of this isolate was inhibited by the addition of chloramphenicol (50 µg ml⁻¹), ampicillin (100 µg ml⁻¹), and vancomycin (300 µg ml⁻¹).

The presence of sulfite reductase (desulfovirodin) was confirmed by measuring the absorbance of cell-free extracts at 630nm (Badziong *et al.*, 1978). In addition, cytochrome *c*₃ was detected by reduction of extracts with sodium dithionite with two peaks occurring at 410 and 550nm, respectively.

The G+C content determined by the Identification Service of the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb, Braunschweig, Germany) using the method of Mesbah *et al.* (1989) was 51mol%.

Analysis of the almost complete sequence (1436 bp) of the 16s rRNA gene of strain MB3^T revealed that this novel isolate groups with members of the *Desulfovibrionales* in the δ -subclass of *Proteobacteria*. The phylogenetic tree is shown in figure 3. As indicated above, strain MB3^T clustered with *Desulfovibrio senezii*, an isolate from solar saltern in California (Tsu *et al.*, 1998), with a similarity of 96%. Beside phylogenetic differences, phenotypic differences were observed between strain MB3^T and *D. senezii*. They include not only the range of used substrates (Table 2), but also the salt tolerance. In contrast to strain MB3^T, *D. senezii* does not use fumarate, succinate, and ethanol as electron donors and elemental sulfur as terminal electron acceptor and grows at NaCl concentrations higher than 5%. *D. senezii* also differed from strain MB3^T by having a higher G+C content of the DNA (62% for *D. senezii* and 51% for strain MB3^T). Beside the taxonomic significance of strain MB3^T as a new representative of the SRB belonging to the *delta* subdivision of the *Proteobacteria*, it is noteworthy that enrichments, performed with marine sediments samples originating from different locations in Tunisia, have led to the isolation of only *Desulfovibrio* strains when using hydrogen as the substrate. In this respect, despite the fact that acetate-oxidizing SRB, belonging to the latter subdivision, are known to dominate in marine sediments (e.g., *Desulfobacter*) (Jørgensen & Bak, 1991; Sahm *et al.*, 1999; Widdel & Hansen, 1992), it is obvious that their hydrogenotrophic counterparts in this subdivision,

and particularly the *Desulfovibrio* species, should also contribute significantly to the mineralization of organic matter in marine ecosystems through hydrogen oxidation. Amongst the *Desulfovibrio* strains recovered from Tunisian marine sediments, we have isolated some of them using peptone as substrate, and this provides further evidence that SRB may play a decisive role in the regulation of the electron flow in protein, amino acid turnover through sulfate-reduction in marine ecosystems (Hansen & Blackburn, 1995; Baena *et al.*, 1998). One of our isolate from Tunisian marine sediments (strain SIJ23) was phylogenetically related to *D. alaskensis* (Feio *et al.*, 2004), a SRB isolated from a soured oil reservoir, thus suggesting that this latter microorganism could have entered the reservoir during offshore oil recovery processes after injection of seawater and that SRB in general might be considered rather as contaminant than indigenous to oil reservoirs (Magot, 2005). Finally, two Tunisian marine SRB (strains MB2 and LB2) were found phylogenetically identical (almost 100% similarity) to an unidentified marine *Desulfovibrio* strain (TPB-1), that has the ability of reductive dehalogenation of 2,4,6-tribromophenol (Boyle *et al.*, 1999). A closely phylogenetic marine relative of *Desulfovibrio* strain TPB-1, *D. acrylicus* was found to reduce acrylate (van der Maarel *et al.*, 1996). All together, these results emphasize the significant ecological role that marine members of the genus *Desulfovibrio* may play in the sulfur cycle but also in the organic matter transformation through oxido-reductive processes in saline ecosystems.

Description of *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov.

Desulfovibrio bizertensis (bi.zer.ten'sis. N.L. masc. adj. *bizertensis* from Bizerte, referring to the place of isolation).

Cells are Gram negative, vibrio-shaped, motile, non spore-forming rods. They are approximately 2.0-3.0 μm in length and 0.5 μm in diameter and occur singly or in pairs. Sporulation was never observed. Strictly anaerobic, mesophilic, neutrophilic and slightly halophilic. The temperature range for growth is 15-45°C, the optimum being 40 °C. The optimum pH is 7. Vitamins, biotrypcase and yeast extract are not required for growth. Strictly anaerobic. Reduces sulfate, sulfite, thiosulfate, elemental sulfur and fumarate. Nitrate and nitrite are not used as terminal electron acceptors. Substrates that are oxidized by sulfate reduction are lactate, ethanol, pyruvate, malate, fumarate, succinate, H_2 + acetate, butanol, and propanol. Desulfovirdin-type sulfite reductase is present. The G+C content of DNA of the type strain is 51mol%.

The type strain is MB3^T (=DSM18034^T= NCIMB 14199^T), which was isolated from Tunisian marine environments.

REFERENCES

- Alazard, D., Dukan, S., Urios, A., Verhé, F., Bouabida, N., Morel, F., Thomas, P., Garcia, J.-L. & Ollivier, B. (2003). *Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 173-178.
- Badziong W., Thauer, R.K. & Zeikus, J.G. (1978). Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source. *Arch Microbiol* **116**, 41-9.
- Baena, S., Fardeau, M.-L., Labat, M., Ollivier, B., Garcia, J.-L. & Patel, B.K.C. (1998). *Desulfovibrio aminophilus* sp. nov., a novel amino acid degrading and sulfate reducing bacterium from an anaerobic dairy wastewater lagoon. *Syst Appl Microbiol* **21**, 498-504.
- Bale, S.J., Goodman, K., Rochelle, P.A., Marchesi, J.R., Fry, J.C., Weightman, A.J. & Parkes, R.J. (1997). *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 515-521.
- Benson, D. A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J., Ouellette, B. F. F., Rapp, B.A. & Wheeler, D. L. (1999). GenBank. *Nucleic Acids Res* **27**, 12-17.
- Boyle, A.W., Phelps, C.D. & Young, L.Y. (1999). Isolation from estuarine sediments of a *Desulfovibrio* strain which can grow on lactate coupled to the reductive dehalogenation of 2,4,6-Tribromophenol. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1133-1140.
- Campbell, L., Kasprzycki, M.A. & Postgate, J.R. (1966). *Desulfovibrio africanus* sp. nov., a new dissimilatory sulfate-reducing bacterium. *J Bacteriol* **92**, 1122-1127.
- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* **4**, 33-36.
- Esnault, G., Caumette, P., & Garcia, J.-L. (1988). Characterization of *Desulfovibrio giganteus* sp. nov., a sulfate reducing bacterium isolated from a brackish coastal lagoon. *Syst Appl Microbiol* **10**, 147-151.
- Fardeau, M.-L., Cayol, J.-L., Magot, M. & Ollivier, B. (1993). H₂ oxidation in the presence of thiosulfate, by a *Thermoanaerobacter* strain isolated from an oil-producing well. *FEMS Microbiol Lett* **113**, 327-332.
- Feio, M.J., Zinkevich, V., Beech, I.B., Llobet-Brossa, E., Eaton, P., Schmitt, J. & Guezennec J. (2004). *Desulfovibrio alaskensis* sp. nov., a sulphate-reducing bacterium from a soured oil reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1747-1752.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95-98.
- Hansen, L.S. & Blackburn, T.H. (1995). Amino acid degradation by sulfate-reduction bacteria: evaluation of four methods. *Limnol Oceanogr* **40**, 502-510.
- Hungate, R. E. (1969). Roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes. In *Methods in microbiology*, vol. 3B, pp. 117-132. Edited by R. Norris & D. W. Ribbons. New York: Academic Press.
- Jørgensen, B.B. (1982). Mineralization of organic matter in the sea-bed – The role of sulfate reduction. *Nature*. **269**, 643-645.
- Jørgensen, B.B. & Bak, F. (1991). Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Appl Environ Microbiol* **57**, 847-856.

- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969).** Evolution of proteins molecules. In *Mammalian protein metabolism*, pp. 211-232. Edited by H. N. Murno. New York: Academic Press.
- Magot, M. (2005).** Indigenous microbial communities in oil fields. In *Petroleum microbiology*, pp. 21-34. Edited by B. Ollivier & M. Magot. Washington, D.C.: ASM Press.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T. Jr, Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M. & Tiedje, J. M. (2001).** The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* **29**, 173-174.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989).** Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159-167.
- Reichenbecher, W. & Schink, B. (1997).** *Desulfovibrio inopinatus*, sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium that degrades hydroxyhydroquinone (1,2,4-trihydroxybenzene). *Arch Microbiol* **168**, 338-344.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Sahm, K., MacGregor, B.J., Jørgensen, B.B. & Stahl, D.A. (1999).** Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment. *Environ Microbiol* **1**, 65-74.
- Tsu, I.I., Huang, C., Garcia, J.-L., Patel, B.K.C., Cayol, J.L., Baresi, L. & Mah, R.A. (1998).** Isolation and characterization of *Desulfovibrio senezii* sp. nov., A halotolerant sulfate reducer from a solar saltern and phylogenetic confirmation of *Desulfovibrio fructosovorans* as a new species. *Arch Microbiol* **170**, 313-317.
- van der Maarel, M. J., van Bergeijk, S., van Werkhoven, A.F., Laverman, A.M., Meijer, W.G., Stam, W.T. & Hansen, T.A. (1996).** Cleavage of dimethylsulfoniopropionate and reduction of acrylate by *Desulfovibrio acrylicus* sp. nov. *Arch Microbiol* **166**, 109-115.
- Weber, M.M., Matschinger, J.T. & Peck, H.D. (1970).** Menaquinone-6 in the strict anaerobes *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio gigas*. *Biochem Biophys Res Commun* **38**, 197-204.
- Widdel, F. & Bak, F. (1992).** Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *the prokaryotes*, 2nd edition, vol IV, pp. 3352-3378. Edited by A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. New York: Springer.
- Widdel, F. & Hansen, T. (1992).** The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In *the prokaryotes*, 2nd edition, vol I, pp. 583-624. Edited by A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. New York: Springer
- Widdel, F. & Pfennig, N. (1984).** Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. 1. Isolation of a new sulphate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. *Arch Microbiol* **129**, 395-400.

Table 1. Strains isolated from Tunisian marine sediments

Strain	nearest phylogenetic relative	Similarity	Substrate	Reference
MB2	<i>Desulfovibrio</i> TBP-1	99.31 %	peptone	Boyle <i>et al.</i> , 1999
MB3	<i>Desulfovibrio senezii</i>	91 %	H ₂	Tsu <i>et al.</i> , 1998
LB2	<i>Desulfovibrio</i> TBP-1	99.3 %	peptone	Boyle <i>et al.</i> , 1999
LB3	<i>Desulfovibrio senezii</i>	91 %	H ₂	Tsu <i>et al.</i> , 1998
LB4	<i>Desulfovibrio senezii</i>	99.9 %	H ₂	Tsu <i>et al.</i> , 1998
LT3	<i>Desulfovibrio senezii</i>	91 %	H ₂	Tsu <i>et al.</i> , 1998
KM2	<i>Desulfovibrio senezii</i>	93.77 %	peptone	Tsu <i>et al.</i> , 1998
SIJ23	<i>Desulfovibrio alaskensis</i>	99.68 %	yeast extract	Feio <i>et al.</i> , 2004

Table 2. Comparison of the morphological and physiological properties of strain MB3^T and *Desulfovibrio senezii* DSM 8436

Optimum values are shown in parentheses. (-) no growth; (+) good growth. Data for *D. senezii* were taken from Tsu *et al.* (1998).

Characteristic	Strain MB3 ^T	<i>D. senezii</i> DSM 843
Cell size (µm)	0.5 x 2.0 - 3.0	0.3 x 1.0-1.3
Temperature range °C	15-45 (40)	25-45 (37)
pH range	6-8.11 (7)	6.4-8.3 (7.6)
Salinity range (% w/v, NaCl)	0.5-5 (2)	0-12.5 (2.5)
G + C content mol %	51	62
Utilization of electron donors		
H ₂ + acetate (2mM)	+	+
Pyruvate	+	+
Ethanol	+	-
Fumarate	+	-
Malate	+	-
Cysteine	-	+
Succinate	+	-
Electron acceptors		
Elemental sulfur	+	-
Nitrate	-	-

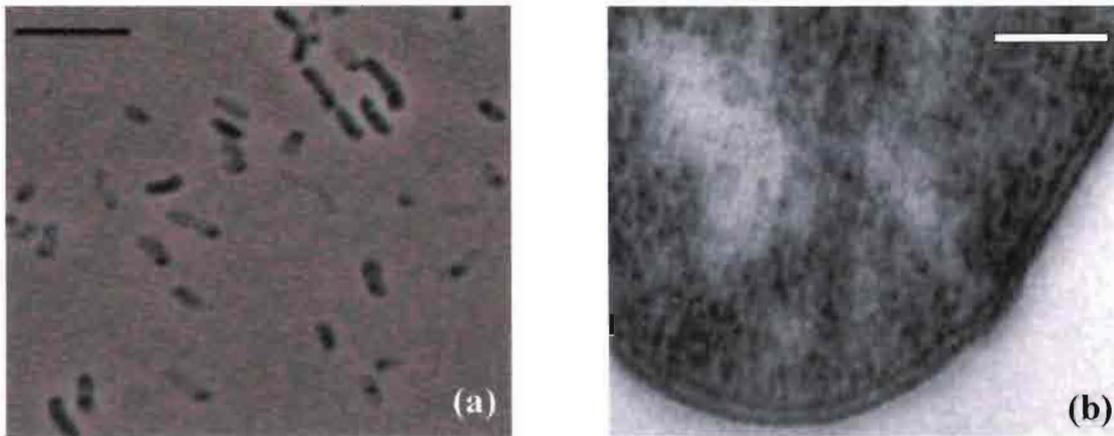


Fig. 1. (a) Phase-contrast micrograph of *D. bizertensis*, *bar*, 10µm (b) transmission electron micrograph of ultrathin section showing the Gram negative cell-wall structure, *bar* 0.22µm.

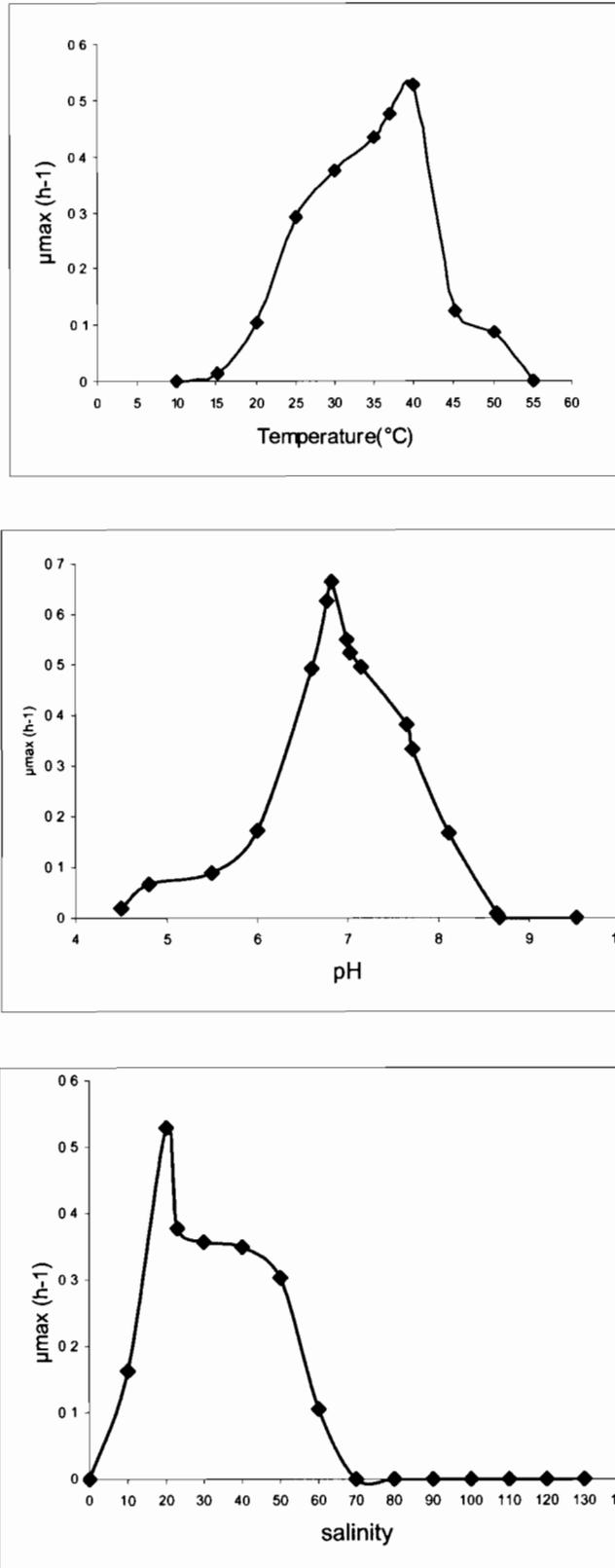


Fig. 2. Effect of (a) temperature, (b) pH, and (c) NaCl on the growth of *D. bizertensis* in basal medium containing lactate with sulfate.



Fig. 3. Phylogenetic dendrogram based on 16S rRNA gene sequence comparison indicating the position of strain MB3^T among the closest members of the genus *Desulfovibrio*. *Desulfonatronum lacustre* was taken as an outgroup.

ARTICLE n°2

***Desulfotomaculum hydrothermale* sp. nov., une nouvelle bactérie sulfato-réductrice thermophile isolée d'une source chaude terrestre Tunisienne**

Olfa Haouari, Marie-Laure Fardeau, Jean-Luc Cayol, Corinne Casiot, Françoise Elbaz-Poulichet, Moktar Hamdi, Bernard Ollivier

(En révision pour Int J Syst Evol Microbiol)

Une nouvelle bactérie sulfato-réductrice (souche Lam5^T), modérément thermophile, a été isolée d'une source chaude terrestre, située au Nord de la Tunisie et a été caractérisée phénotypiquement et phylogénétiquement. La bactérie est Gram négatif, mais la structure de sa paroi est typiquement celle d'une bactérie Gram positif. Elle est anaérobie stricte, forme des endospores et se présente sous forme de bâtonnets légèrement incurvés, avec des flagelles péritriches. Elle ne possède pas de désulfovirdine. La souche Lam5^T se développe dans des conditions anaérobies à 55°C, à un pH de 7.1 et elle n'exige pas la présence de NaCl dans le milieu, mais elle tolère jusqu'à 1.5% (w/v) de ce sel. Elle dégrade le lactate, le pyruvate, le formiate, l'éthanol, le butanol, le glycérol, le propanol, et l'H₂ (+acétate) comme donneurs d'électrons. Lam5^T utilise comme accepteurs d'électrons : le sulfate, le sulfite, le thiosulfate, l'As(V) et le Fe(III), mais pas le soufre élémentaire, le fumarate, le nitrate ou le nitrite. La teneur de l'ADN génomique en G+C% est de 46.8 mol%. L'analyse phylogénétique basée sur l'alignement de l'ADNr 16S a montré que la souche Lam5^T a comme plus proche parent phylogénétique *Desulfotomaculum putei* avec 96% de similitude. Sur la base des caractéristiques phylogénétiques, génotypiques et phénotypiques, la souche Lam5^T (= DSM 18033^T = JCM 13992^T) représente une nouvelle espèce bactérienne: *Desulfotomaculum hydrothermale* sp. nov..

***Desulfotomaculum hydrothermale* sp. nov., a new thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial Tunisian hot spring**

Olfa Haouari^{1,2}, Marie-Laure Fardeau¹, Jean-Luc Cayol¹, Corinne Casiot³, Françoise Elbaz-Poulichet³, Moktar Hamdi², Bernard Ollivier¹

¹IRD, UMR 180, Microbiologie et Biotechnologie des Environnements Chauds, IFR-BAIM, ESIL, Universités de Provence et de la Méditerranée, 163 Avenue de Luminy, F-13288 Marseille cedex 09, France

²Laboratoire d'écologie et de technologie microbiennes INSAT, 1080 Tunis Tunisia

³Laboratoire Hydrosociences Montpellier, UMR 5569, Universités Montpellier 2 et 1, CNRS, IRD, Place E. Bataillon, Case MSE, 34095 Montpellier Cedex 05, France

*Corresponding author. Dr. Bernard Ollivier, Laboratoire de Microbiologie IRD, Universités de Provence et de la Méditerranée, ESIL case 925, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 09, France.

Phone +33 (0)4 91 82 85 86.

Fax:+33 (0)4 91 82 85 70.

E-mail: bernard.ollivier@univmed.fr

Running title: *Desulfotomaculum hydrothermale* sp. nov.

Abbreviation: SRB, sulfate-reducing bacteria.

The Genbank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rDNA gene sequence for strain Lam5^T is EF081293.

The Genbank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rDNA gene sequence for strain Lam7 is EF494253.

Summary

A novel strictly anaerobic moderately thermophilic sulfate-reducing bacterium, strain Lam5^T (T=type strain), was isolated from a hot spring in North East Tunisia and characterized phenotypically and phylogenetically. The isolate stained Gram negative but had a Gram positive type of cell wall. It was an endospore-forming, slightly curved rod-shaped cell, with peritrichous flagella. It did not possess desulfovibrin. Strain Lam5^T grew anaerobically at temperatures between 40 and 60°C (optimum 55°C), and at pH between 5.8 and 8.2 (optimum 7.1); it did not require NaCl but tolerated it up to 1.5% (w/v). It utilized lactate, pyruvate, formate, ethanol, butanol, glycerol, propanol, and H₂ (+acetate) as electron donors. Lactate was oxidized and pyruvate was fermented into acetate. Sulfate, sulfite, thiosulfate, As(V) and Fe(III), but not elemental sulfur, fumarate, nitrate or nitrite were used as electron acceptors. The G+C content of the genomic DNA was 46.8 mol%. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequencing showed that strain Lam5^T was a member of the genus *Desulfotomaculum* with *D. putei* being its closest relative (similarity of 96%). On the basis of genotypic, phenotypic and phylogenetic characteristics, strain Lam5^T (=DSM 18033^T =JCM 13992^T) is proposed as the type strain of a new species, *Desulfotomaculum hydrothermale* sp. nov.

Introduction

Microorganisms associated with hot springs of geothermal areas have received considerable interest in recent years. Because the primary production in these extreme environments is most probably sustained by hydrogen-oxidizing bacteria, special attention has been paid to the microaerophilic members of the order *Aquificales* (Aguilar *et al.*, 2004), recognized as dominant hydrogen oxidizers within the terrestrial hot springs (Reysenbach *et al.* 1994; Hugenholtz *et al.* 1998; Reysenbach & Shock 2002). Beside hydrogen oxidation performed under microaerophilic conditions by the *Aquificales*, hydrogen oxidation in anaerobiosis should be also of importance in hot springs, as temperature and sulfide concentrations can maintain a low redox potential in situ. Under these physico-chemical conditions, sulfate-reducing bacteria (SRB) may therefore contribute to hydrogen oxidation, and be also considered as primary producers in these extreme environments, where sulfate (SO₄²⁻) is not limiting (Fishbain *et al.*, 2003). It is therefore not surprising that several cultivation-based and culture-independent molecular phylogenetic surveys provided evidence of a wide diversity of SRB inhabiting the geothermal terrestrial hot springs (Blank *et al.*, 2002; Ferris *et al.*, 2003; Fishbain *et al.*,

2003; Hugenholtz *et al.*, 1998; Meyer-Dombard *et al.*, 2005; Skirnisdottir *et al.*, 2000). Most of the SRB isolated so far from terrestrial hot springs, with the exception of the crenarchaeote *Caldivirga maquilingsis* (Itoh *et al.*, 1999), have been reported to oxidize hydrogen. They comprise bacterial members of (i) the genus *Thermodesulfobacterium* (Zeikus *et al.*, 1983; Sonne-Hansen & Ahring 1999) representing one of the deepest branches within the phylogenetic tree, (ii) the genus *Thermodesulfovibrio* (Henry *et al.* 1994; Sonne-Hansen & Ahring 1999) belonging to the *Nitrospira* phylum, (iii) the genus *Thermodesulfobium* peripherically related to the *Nitrospira* phylum, (iv) the genus *Desulfomicrobium* (Thevenieau *et al.*, 2007) as the representative of the delta-*Proteobacteria*, and (v) the genus *Desulfotomaculum* (Goorissen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1997), belonging to the low G+C DNA containing Gram positive group. Within this latter genus, only two species have been described. They include *D. luciae* isolated from an hot spring in Canada, and *D. solfataricum* isolated in Iceland.

Here we report on isolation of three hydrogenotrophic thermophilic SRB originating from a terrestrial hot spring in Tunisia, and belonging to the genera *Thermodesulfovibrio* and *Desulfotomaculum*. We also propose to assign one of these isolates to a novel species of genus *Desulfotomaculum*.

Materials and methods

Sampling site and origin of the strains

Samples were collected from the hot spring “Hamam Essalhine” (HEs) located 10 km North of Fernana on the road Fernana-Ben Mtir, in the North East of Tunisia at 280 m elevation. Hot spring waters discharge in the river Wad’Ellil. They emerge at a flow rate of approximately 4 liters sec⁻¹. The dissolved-sulfide concentration in the springwater was 70 mg l⁻¹, thus favoring anoxic conditions in the water and underlying sediments.

On the basis of these physical and chemical characteristics, it is clear that hydrothermal waters in HEs hot springs are propitious for the growth of anaerobic microorganisms involved in the sulfur cycle, notably the sulfate-reducing bacteria (SRB).

SRB were isolated from a mixed sediment-water samples collected in sterile plastic bottles in January 2005, and kept at 4°C until used. The temperature at the sampling site was 73 °C, pH was 6.9, salinity was around 0.5 % NaCl.

Media and conditions of cultivation

The Hungate technique (Hungate, 1969) was then used throughout for cultivation. The basal medium contained (per litre of distilled water): 0.3 g of KH_2PO_4 ; 0.3 g of K_2HPO_4 ; 1.0 g of NH_4Cl ; 1.0 g of NaCl ; 3.0 g of Na_2SO_4 ; 0.1 g of KCl ; 0.1 g of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.5 g of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.1 g of yeast extract (Difco laboratories); 0.5 g of cysteine-HCl; 1 ml trace mineral element solution (Widdel & Pfennig, 1984) and 1 ml of 0.1 % resazurin. pH was adjusted to 7.2 with 10 M KOH. The basal medium was boiled under a stream of O_2 -free N_2 gas, cooled to room temperature and 5 ml aliquots were distributed in Hungate tubes under a stream of O_2 -free N_2 gas. The N_2 gas phase was replaced with N_2/CO_2 (80:20, v/v) and the tubes were autoclaved for 45 min at 110 °C. Prior to inoculation, 0.1 ml 2 % $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ and 0.1 ml 10 % NaHCO_3 were added.

Enrichment and isolation

Enrichments were performed in Hungate tubes containing 5 ml of medium and inoculated with 10 % of sample. H_2 from a mixture of H_2/CO_2 [80:20 (v/v), 2 bar], acetate (20 mM) or lactate (20 mM) were used as substrates. Acetate (2 mM) was added as the carbon source in the presence of hydrogen as electron donor. Three enrichment series were performed in the same medium before isolation. The culture was purified by repeated use of the Hungate roll-tube method with medium solidified with 2.5 % (w/v) Noble agar (Difco) or with 0.8 % Phytigel (Sigma) for cultures incubated at, respectively, 55 °C or 70 °C. Several colonies that developed were picked and cultured in the corresponding culture medium. The process of isolation was repeated several times until isolates were deemed to be axenic. Cultures were routinely checked by microscopy for contaminations using media with glucose in the presence of yeast extract as substrate.

Characterization

Duplicate experiments were performed to determine physiological optimal growth conditions (temperature, pH and NaCl). They were conducted in basal medium with the addition of lactate (20 mM) as electron donor and sulfate (20 mM) as electron acceptor. The ability to utilize organic substrates was tested in basal medium supplemented with autoclaved or filter-sterilized substrates. Butyrate, succinate, propionate, fumarate,

pyruvate, lactate, acetate, malate, formate + acetate (2 mM), butanol, propanol, pentanol, methanol, glycerol, ethanol, lactose, glucose, fructose, and mannose were tested as energy sources at a final concentration of 20 mM. Casaminoacids was tested at 0.25 %, whereas H₂ in the presence or absence of acetate as carbon sources was added in the gas phase (2 bars). The use of lactate, pyruvate, formate, ethanol, butanol, glycerol, and propanol was tested in the absence of sulfate as terminal electron acceptor. To test for electron acceptors, sodium thiosulfate (final concentration 20 mM), sodium sulfate (20 mM), sodium sulfite (2 mM), elemental sulfur (2 % (w/v), sodium fumarate (20 mM), sodium nitrate (20 mM), and sodium nitrite (2 mM) were added to the medium. Sensitivity to antibiotics was determined by transferring an exponentially growing culture into basal medium containing filter-sterilized antibiotics, penicillin, streptomycin, and chloramphenicol, at 25, 50, 100, 200, 300, 500, 750, and 1000 µg ml⁻¹.

Phase-contrast microscopy (model Eclipse E600; Nikon) was used for routine examination of the cultures and to obtain photomicrographs. Light and electron microscopy observations were performed as previously described (Miranda-Tello *et al.*, 2004). Growth was measured by inserting tubes directly into a model Cary 50 Scan spectrophotometer (Varian) and measuring the OD₅₈₀. Sulfide was determined photometrically as colloid CuS by the method of Cord-Ruwisch (1985). The end-products of organic compounds metabolism were measured as described previously (Haouari *et al.*, 2006) by High Pressure Liquid Chromatography after 2 weeks of incubation at optimal temperature and pH. Cytochromes and desulfoviridin were determined as described by Postgate (1959).

The G+C content of DNA was determined at the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb, Braunschweig, Germany) using the method of Mesbash *et al.* (1989).

Phylogenetic analysis

The analysis and the determination of As species (As(V) and As(III)) was performed by high performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HPLC-HG-AFS). The method, described by Bohari *et al.* (2001), has a detection limit of 2.3 nM for As(III) and 6.1 nM for As(V). Total dissolved Fe was determined by flame atomic absorption spectrometry. Fe(II) was determined using

colorimetry at 510 nm after complexation with 1.10-phenanthroline chloride solution in buffered samples (pH 4.5) (Rodier *et al.*, 1996).

Methods for the purification and extraction of DNA and the amplification and sequencing of the 16S rRNA gene have been described previously by Miranda-Tello *et al.* (2003) except for the use of primer Rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') instead of primer R6.

The 16S rRNA gene sequences of strains Lam5^T, Hbr5 and HBr7 were imported into the sequence editor BIOEDIT version 5.0.9 (Hall, 1999), the base calling was examined and a contiguous consensus sequence was obtained for each isolate. A non-redundant BLASTN search (Altschul *et al.*, 1997) of the full sequence through GenBank (Benson *et al.*, 1999) identified its closest relative. Sequences used in the phylogenetic analysis were obtained from RDP and GenBank. They were aligned using programs provided by the Ribosomal data Project II (Maidak *et al.*, 2001). Position of sequence and pairwise evolutionary distances based on 1138 unambiguous nucleotides were calculated using the method of Jukes & Cantor (1969). Dendrograms were constructed using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987).

Results and discussion

Enrichment cultures were performed on H₂+CO₂ 80:20 % (v/v) (2 bar) and at atmospheric pressure at 55 °C and 70 °C, on acetate, and lactate as energy sources in the presence of sulfate as terminal electron acceptor. Growth and sulfide production were positive in the presence of hydrogen, lactate, but not acetate as electron donor. Single, brown, disc-shaped colonies (1 mm in diameter) developed after 8 days of incubation at 55 °C (lactate and H₂) and 70 °C (H₂). They were picked and serially diluted in roll-tubes before the culture was considered pure. Two strains (Lam5^T, Hbr5) were isolated at 55 °C and one strain (Hbr7) was isolated at 70 °C. Strains that we isolated were found to be phylogenetically related to the genera *Desulfotomaculum* or *Thermodesulfovibrio* (Table 1). Strains Lam5^T and Hbr7 had *Desulfotomaculum putei* (96 % similarity) and *D. australicum* (99 % similarity) as their closest phylogenetic relatives, respectively, whereas *Thermodesulfovibrio yellowstonii* was the closest relative of strain Hbr5. Phylogenetic results indicated that strains Lam5^T and Hbr5 were novel species of SRB. Strain Lam5^T was further characterized.

The purity of the strains was confirmed by morphological homogeneity observed under a phase-contrast microscope and by the absence of growth in liquid sulfate-free SRB medium supplemented with 1 g yeast extract l⁻¹ and 20 mM glucose under aerobic or anaerobic conditions.

Cells of strain Lam5^T were slightly curved rods, 2-5 µm long and 0.5 µm wide and occurred mainly singly (Fig. 1a). They were motile by peritrichous flagella (Fig. 1b). Endospores were observed in malachite green-stained preparations and by phase-contrast microscopy. They were oval and subterminal to terminal, deforming the cells (Fig. 1a). No gas vacuoles were observed. Cells of Lam5^T stained Gram negative. Electron micrographs of thin sections of cells revealed an atypical Gram positive cell wall with a periodic arch-like surface layer (Fig. 2).

Strain Lam5^T was strictly anaerobic, growing optimally at 55 °C (temperature growth range between 40 and 60 °C) (Fig. 3a). The optimum pH for growth was around 7.1 (pH growth range 5.8 to 8.2) (Fig. 3b). It did not require NaCl for growth. The upper NaCl concentration for growth was 1.5 % (w/v) (Fig. 3c). The cells contained b-type cytochromes, but not desulfovidirin, similarly to members of the genus *Desulfotomaculum*. Strain Lam5^T did not require yeast extract, peptides or vitamins for growth but 0.1 % biotrypcase enhanced it. Under optimal growth conditions, in the presence of sulfate as an electron acceptor, strain Lam5^T used H₂ (+acetate as carbon source), formate (+acetate as carbon source), lactate, pyruvate, ethanol, butanol, glycerol and propanol as electron donors. The main end-products resulting from lactate oxidation were acetate, CO₂ and H₂S. In the absence of sulfate, strain Lam5^T fermented only pyruvate into acetate. The following compounds did not support growth of strain Lam5^T: glucose, fructose, mannose, acetate, propionate, butyrate, succinate, fumarate, malate, methanol, glycerol, starch, and casamino acids. Sulfate, sulfite, thiosulfate but not elemental sulfur, fumarate, nitrate or nitrite, served as electron acceptors in the presence of lactate as energy and carbon source. Strain Lam5^T also reduced As(V) at 5 mM and Fe (III) at 10 mM.

Growth was inhibited by chloramphenicol (25 µg ml⁻¹), streptomycin (750 µg ml⁻¹) and penicillin (1000 µg ml⁻¹).

Physiological characteristics of strain Lam5^T (temperature optimum for growth + spore formation in particular), suggested that this isolate may survive but not grow in the Tunisian hot spring studied as it does not grow over 60 °C. This also suggested that strain

Lam5^T may play only a significant ecological role in the cooler parts of the thermal spring studied.

Analysis of the almost complete sequence (1565 bp) of the 16S rRNA gene of strain Lam5^T indicated that this novel isolate groups with the members of the family *Peptococcaceae*, order *Clostridiales*. The phylogenetic tree (Fig. 4) showed that strain Lam5^T clustered with *Desulfotomaculum putei* DSM 12395^T, an isolate recovered from a deep terrestrial subsurface in Virginia, in USA (Liu *et al.*, 1997), with a 16S rRNA gene sequence similarity of 96%, thus indicating that this strain should belong to a novel species of the genus *Desulfotomaculum*. Pertaining of this strain to genus *Desulfotomaculum* is ascertained by both phenotypic and genotypic characteristics (the G+C content of DNA of strain Lam5^T was 46.8 mol%) of the isolate. Beside phylogenetic differences, phenotypic differences were observed between strain Lam5^T and *D. putei*. They include the range of substrates used (Table 2), but also the temperature range. In contrast to the thermophile *D. putei*, strain Lam5^T should be considered as a moderately thermophilic SRB. The latter differs from *D. putei*, by not growing autotrophically and by not using methanol as electron donors (Table 2).

Members of the spore-forming genus *Desulfotomaculum* have been recovered several times from hot ecosystems (Stackebrandt *et al.*, 1997), thus suggesting their significant ecological role in such ecosystems by oxidizing hydrogen or organic compounds with concomitant reduction of sulfate and other sulfur oxyanions to sulfide. Despite the widespread of thermophilic *Desulfotomaculum* within the hot biosphere, few thermophilic SRB belonging to genus *Desulfotomaculum* have been isolated from terrestrial hot springs. They include *D. luciae* (Liu *et al.*, 1997), and *D. solfataricum* (Goorissen *et al.*, 2003). Here we provide evidence with the isolation of strain Lam5^T, but also strain Hbr7 that *Desulfotomaculum* species should be considered as common inhabitants of terrestrial hot springs as already confirmed by previous culture-independent analysis (Fishbain *et al.*, 2003), thus emphasizing their ecological significance not only in the subterrestrial, but also the terrestrial hot biosphere.

Beside the taxonomic significance of strain Lam5^T as a new representative of the SRB belonging to the low G+C containing Gram positive group, it is noteworthy that enrichments that we have performed using hot spring water samples, at the two studied temperatures (55 °C and 70 °C), have led to the isolation of hydrogenotrophic SRB (Table 1), H₂ being generated geothermally from hot springs. In contrast, like in our study, acetate

oxidation through sulfate reductive activity has never been reported to occur in terrestrial hot springs. Therefore, complete oxidation in anaerobic condition of organic matter, when available in these hot ecosystems, should result from alternative metabolisms such as methanogenesis or iron reduction (Chang *et al.*, 2001).

All together, these results emphasize the ecological significant role that SRB, and particularly the genus *Desulfotomaculum* may play in the sulfur cycle but also in the organic matter transformation through oxydo-reductive processes in hot ecosystems.

On the basis of its phenotypic, genotypic and phylogenetic characteristics, strain Lam5^T is proposed as the type strain of a novel species, *Desulfotomaculum hydrothermale* sp. nov.

Description of *Desulfotomaculum hydrothermale* sp. nov.

***Desulfotomaculum hydrothermale* (hy.dro.ther.ma'le. Gr.n, hydro water; Gr. N. thermos heat; M.L. neut. adj hydrothermale from a hydrothermal area).**

Anaerobic, moderately thermophilic. Cells are rods slightly curved shaped, about 0.5 µm in width and 2-5 µm in length that stain Gram negative. Oval non deforming subterminal to terminal spores. Motile by peritrichous flagella. Growth occurs between 40°C and 60°C (optimum 55 °C). The pH range for growth is 5.8 - 8.2 (optimum 7.1). Growth does not occur at NaCl concentrations above 1.5 % (w/v). Sulfate, thiosulfate and sulfite are used as electron acceptors, but not elemental sulfur, fumarate, nitrate or nitrite. Reduces As(V) and Fe(III). Electron donors utilized in the presence of sulfate as electron acceptor are lactate, pyruvate, formate, ethanol, butanol, glycerol, propanol and H₂. Lactate is oxidized into acetate. Ferments pyruvate into acetate.

The G+C content of genomic DNA is 46.8 % (HPLC). The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence is EF081293. The type strain is Lam5^T (=DSM 18033^T, =JCM 13992^T). It has been isolated from a terrestrial hot spring (Tunisia).

Acknowledgments

We thank Pierre Thomas for electron microscopy, Manon Joseph (IRD, UMR 180, microbiologie et biotechnologie des environnements chauds), Chrystelle Bancon (Laboratoire Hydrosiences UMR 5569 Montpellier) for technical assistance and Pierre Roger for his comments on the manuscript.

References

- Aguiar, P., Beveridge, T. J. & Reysenbach, A.-L. (2004). *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 33-39.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Benson, D. A., Boguski, M. S., Lipman, D. J., Ostell, J., Ouellette, B. F. F., Rapp, B. A. & Wheeler, D. L. (1999). GenBank. *Nucleic Acids Res* **27**, 12-17.
- Blank, C. E., Cady, S. L. & Pace, N. (2002). Microbial composition of near-boiling silica-depositing thermal springs throughout Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5123-5135.
- Bohari, Y., Astruc, A., Astruc, M. & Cloud, J. (2001). Improvements of hydride generation for the speciation of arsenic in natural freshwater samples by HPLC-HG-AFS. *J Anal At Spectrom* **16**, 774-778.
- Chang, Y.-J., Peacock, A. D., Long, P., Stephen, J. R., McKinley, J. P., Macnaughton, S. J., Hussain, K. M. A., Saxton, A. M. & White, D. C. (2001). Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3149-3160.
- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* **4**, 33-36.
- Ferris, M. L., Magnuson, T. S., Fagg, J.A., Thar, R., Kühn, M., Sheehan, K. B. & Henson, J. M. (2003). Microbially mediated sulfide production in a thermal acidic algal mat community in Yellowstone National Park. *Environ Microbiol* **5**, 954-960.
- Fishbain, S., Dillon, J. G., Gough, H. L. & Stahl, D. A. (2003). Linkage of high rates of sulfate reduction in Yellowstone hot springs to unique sequence types in the dissimilatory sulfate respiration pathway. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3663-3667.
- Goorissen, H. P., Boschker, H. T. S., Stams, A. J. M. & Hansen, T. A. (2003). Isolation of thermophilic *Desulfotomaculum* strains with methanol and sulfite from solfataric mud pools, and characterization of *Desulfotomaculum solfataricum* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1223-1229.
- Hall, T.A. (1999). BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95-98.
- Haouari, O., Fardeau, M.-L., Casalot, L., Tholozan, J.-L., Hamdi, M. & Ollivier, B. (2006). Isolation of sulfate-reducing bacteria from Tunisian marine sediments and description of *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2909-2913.
- Henry, E. A., Devereux, R., Maki, J. S., Gilmour, C. C., Woese, C. R., Mandelco, L., Schauder, R., Remsen, C. C. & Mitchell, R. (1994). *Thermodesulfobacterium yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain. *Arch Microbiol* **161**, 62-69.
- Hugenholz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. & Pace, N. R. (1998). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* **180**, 366-376.
- Hungate, R. E. (1969). Roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes. In *Methods in microbiology*, vol 3B, pp. 117-132. Edited by R. Norris, D.W. Ribbons. New York: Academic Press.

- Itoh, T., Suzuki, K.-I., Sanchez, P. C. & Nakase, T. (1999).** *Caldivirga maquilingsensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1157–1163.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969).** Evolution of proteins molecules. In *Mammalian protein metabolism*, pp. 211-232. Edited by H. N. Murno. New York: Academic Press.
- Liu, Y., Karnauchow, T. M., Jarrell, K. F., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Ringelberg, D., Clarno, R. & Boone, D. R. (1997).** Description of two new thermophilic *Desulfotomaculum* sp., *Desulfotomaculum putei* sp. nov., from a deep terrestrial subsurface, and *Desulfotomaculum luciae* sp. nov., from a hot spring. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 615-621.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T. Jr, Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M. & Tiedje, J. M. (2001).** The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* **29**, 173-174.
- Mesbash, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989).** Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159-167.
- Meyer-Dombard, D. R., Shock, E. L. & Amend, J. P. (2005).** Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA. *Geobiology* **3**, 211–227.
- Miranda-Tello, E., Fardeau, M.-L., Fernández, L., Ramírez, F., Cayol, J.-L., Thomas, P., Garcia, J.-L. & Ollivier, B. (2003).** *Desulfovibrio capillatus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from an oil field separator located in the Gulf of Mexico. *Anaerobe* **9**, 997-103.
- Miranda-Tello, E., Fardeau, M.-L., Thomas, P., Ramírez, F., Casalot, L., Cayol, J.-L., Garcia, J.-L. & Ollivier, B. (2004).** *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylyanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 169-174.
- Postgate, J. R. (1959).** A diagnostic reaction of *Desulphovibrio desulphuricans*. *Nature* **183**, 481-482.
- Reysenbach, A.-L. & Shock, E. (2002).** Merging genomes with geochemistry in hydrothermal ecosystems. *Science* **296**, 1077-82.
- Reysenbach, A.-L., Wickham, G. S. & Pace, N. R. (1994).** Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2113-2119.
- Rodier, J., Broutin, J. P., Chambon, P., Champsaur, H. & Rodi, L. (1996).** L'analyse de l'eau, pp 1383. Paris: Dunod.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing Phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Skirnisdottir, S., Hreggvidsson, O. G., Hjörleifsdottir, S., Marteinson, V. T., Petursdottir, S. K., Holst O. & Kristjansson, J. K. (2000).** Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2835–2841.
- Sonne-Hansen, J. & Ahring, B. K. (1999).** *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp. nov., and *Thermodesulfovibrio islandicus* sp. nov., two thermophilic sulfate reducing bacteria isolated from a Icelandic hot spring. *Syst Appl Microbiol* **22**, 559-64.
- Stackebrandt, E., Sproer, C., Rainey, F. A., Burghardt, J., Pauker, O. & Hippe, H. (1997).** Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum*

and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1134-1139.

Thevenieau, F., Fardeau, M.-L., Ollivier, B., Joulian, C. & Baena, S. (2007). *Desulfomicrobium thermophilum* sp. nov., a novel thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Colombia. *Extremophiles* **11**, 295-303.

Widdel, F. & Pfennig, N. (1984). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of a new sulphate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. *Arch Microbiol* **129**, 395-400.

Zeikus, J. G., Dawson, M. A., Thompson, T. E., Ingvorsen, K. & Hatchikian, E. C. (1983). Microbial ecology of volcanic sulfidogenesis: isolation and characterization of *Thermodesulfotobacterium commune* gen. nov. and sp. nov. *J Gen Microbiol* **129**, 1159-1169.

Table 1. Sulfate-reducing bacteria isolated from the Tunisian terrestrial hot spring.

Strain	Substrate	Temperature (°C)	16S rRNA sequence similarity %	Nearest phylogenetic relative
Lam5 ^T	Lactate	55	96	<i>Desulfotomaculum putei</i> ^a DSM 12395 ^T
Hbr7	H ₂	70	99	<i>Desulfotomaculum australicum</i> ^b DSM 11792 ^T
Hbr5	H ₂	55	95	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> ^c DSM 11347 ^T

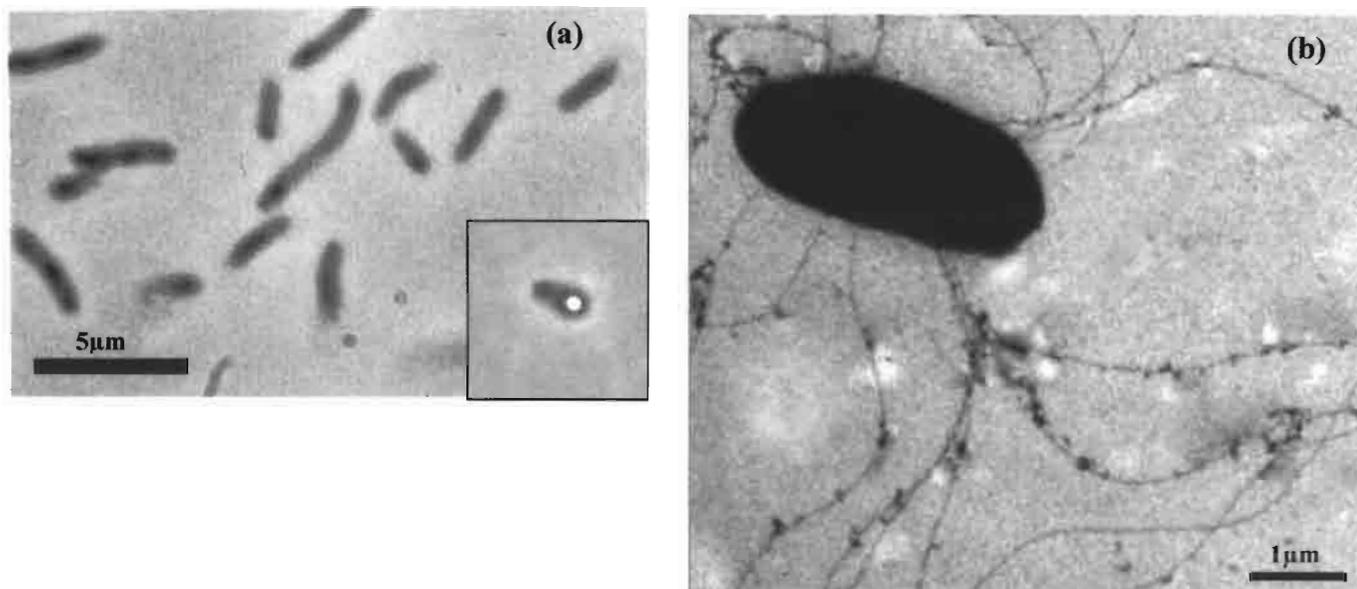


Fig. 1. Phase contrast micrograph (a) and transmission electron photomicrograph of negative stained cell (b) of strain Lam5^T grown in the medium containing lactate and sulfate.

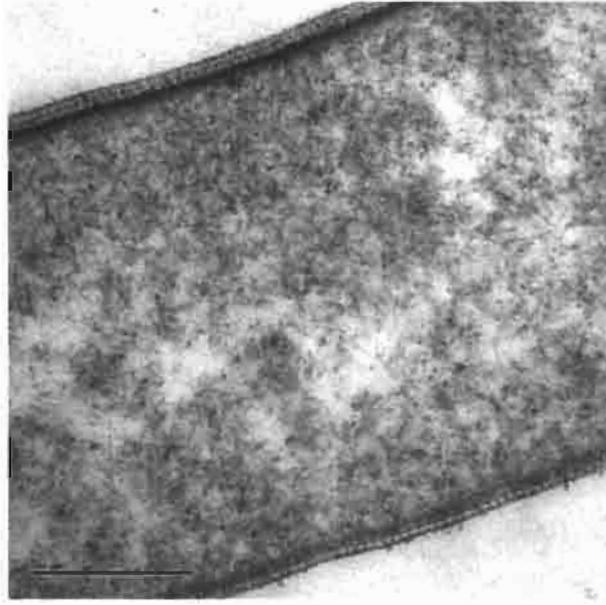


Fig. 2. Electron micrograph of an ultrathin section of a cell of strain Lam5^T. *Bar* = 0.2 μm .

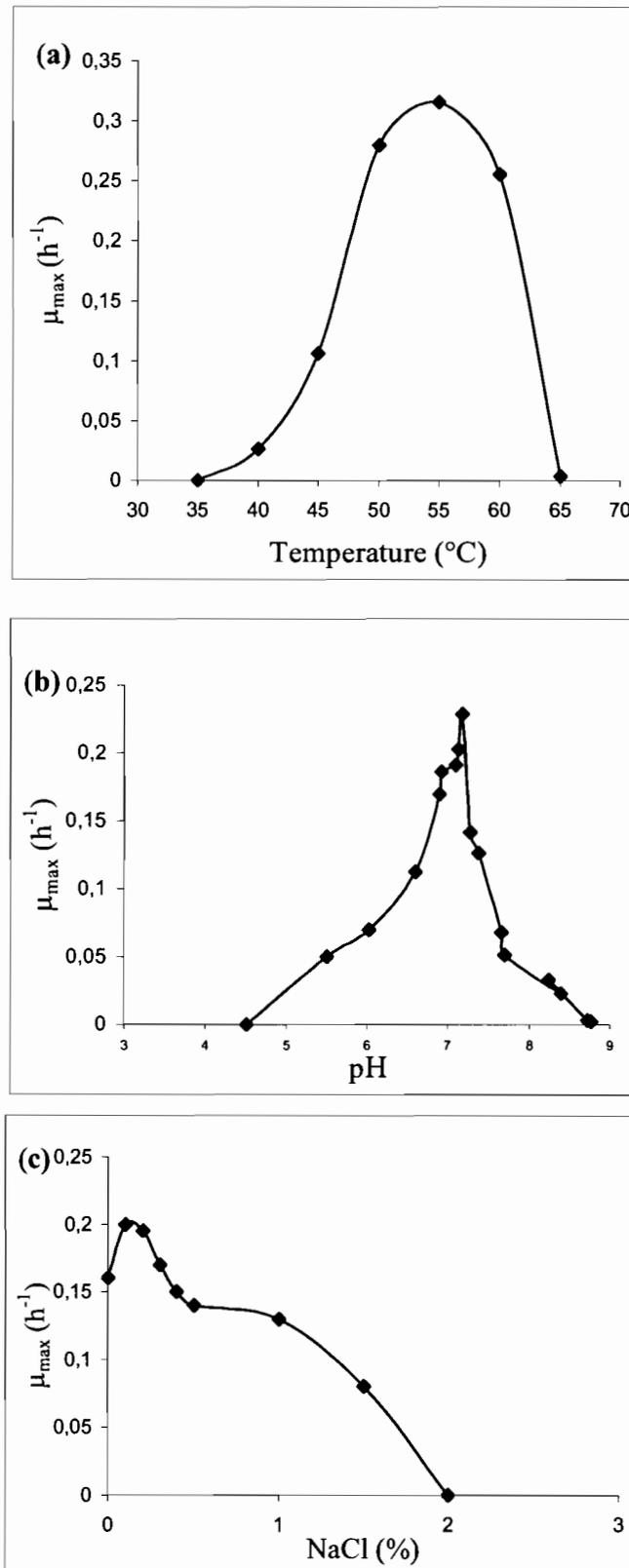


Fig. 3. Effect of : (a) temperature, (b) pH, and (c) NaCl concentration on the growth of strain Lam5^T cultivated in basal medium supplemented with lactate and sulfate. μ_{\max} represents the growth rate measured during the exponential phase.

Table 2. Discriminating characteristics of strain Lam5^T and *Desulfotomaculum putei* (DSM 12395^T). Optimum values are shown in parentheses. - no growth; + good growth. Data for *D. Putei* were taken from Liu *et al.* (1997).

Characteristic	Strain Lam5 ^T	<i>D. putei</i> (DSM 12395 ^T)
Isolation source	Terrestrial hot spring	Deep terrestrial subsurface
Morphology and cell size (μm)	Rods slightly curved 1 x 3-6	Rods 1.0-1.1 x 2-5
Spore location	Terminal	Paracentral
Temperature range °C	40-60 (55)	40-65 (64)
pH range	5.8-8.20 (7)	6-7.9 (7.5)
G + C content mol %	46.8	47.1
Utilization of electron donors		
H ₂	-	+
H ₂ + acetate (2 mM)	+	+
Methanol	-	+

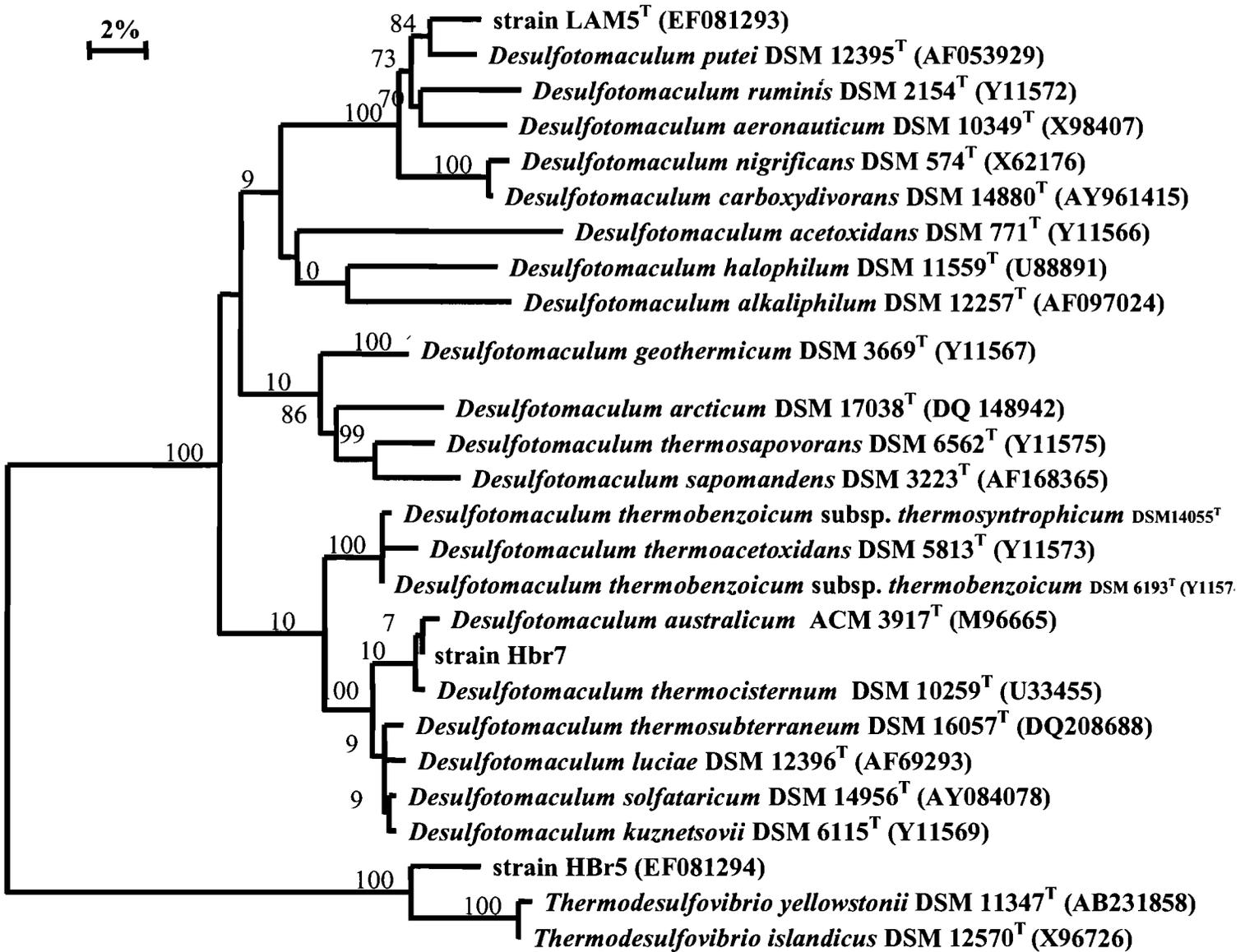


Fig. 4. Phylogenetic dendrogram based on 16S rRNA gene sequence comparison indicating the position of strain Lam5^T among the closest members of the genus *Desulfotomaculum*. Bootstrap values based on 100 resamplings are given at nodes. Bar, 2 % sequence divergence.

ARTICLE n°3

***Thermodesulfovibrio hydrogenophilus* sp. nov., une nouvelle bactérie sulfato-réductrice thermophile isolée d'une source chaude terrestre Tunisienne**

Olfa Haouari, Marie-Laure Fardeau, Manon Joseph, Jean-Luc Cayol, Guy Fauque, Corinne Casiot, Françoise Elbaz-Poulichet, Moktar Hamdi, Bernard Ollivier

(En révision pour Systematic Applied and Microbiology)

Une nouvelle bactérie sulfato-réductrice thermophile, nommée Hbr5^T, a été isolée d'une source hydrothermale terrestre Tunisienne. La souche Hbr5^T est Gram négatif, non sporulante et a une forme de bâtonnets incurvés, séparés ou en longues chaînettes. Elle est très mobile grâce à un flagelle polaire. Elle possède la désulfofuscidine comme bisulfite dissimilatrice réductase. La croissance s'effectue à des températures comprises entre 50 et 70°C avec un optimum à 65°C. En présence du sulfate, en tant qu'accepteur final d'électrons, la souche Hbr5^T consomme seulement trois donneurs d'électrons : le pyruvate, l'H₂ (avec de l'acétate comme source de carbone) et faiblement le formiate (avec de l'acétate comme source de carbone). La souche Hbr5^T peut utiliser le sulfate, le thiosulfate, le sulfite ou l'arséniate [l'As(V)] comme accepteurs d'électrons mais pas le soufre élémentaire, le fumarate, le nitrate ou le nitrite. Le pyruvate est le seul substrat fermenté et il est transformé en acétate, hydrogène et CO₂. Le contenu en G+C% de l'ADN génomique de la souche Hbr5^T est de 36.1 mol%. L'analyse phylogénétique basée sur l'analyse de l'ADNr 16S a montré que la souche Hbr5^T est un membre du genre *Thermodesulfovibrio* avec 95% de similitude avec l'espèce *T. yellowstonii* et 95.1% avec l'espèce *T. islandicus*. La souche Hbr5^T, étant donné ses caractéristiques phylogénétiques, phénotypiques, et génomiques, représente une nouvelle espèce du genre *Thermodesulfovibrio*, *T. hydrogenophilus* sp. nov. (DSM 18151^T, JCM 13991^T).

***Thermodesulfovibrio hydrogenophilus* sp. nov., a new thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a Tunisian hot spring**

Olfa Haouari^{a,b}, Marie-Laure Fardeau^a, Manon Joseph^a, Jean-Luc Cayol^a, Guy Fauque^{a,c}, Corinne Casiot^d, Françoise Elbaz-Poulichet^d, Moktar Hamdi^b, Bernard Ollivier^{a,*}

a- Laboratoire de Microbiologie IRD, UMR D180, Microbiologie et Biotechnologie des Environnements Chauds, IFR-BAIM, ESIL, Case 925. Universités de Provence et de la Méditerranée, 163 Avenue de Luminy, F-13288 Marseille Cedex 09, France

b- Laboratoire d'écologie et de technologie microbiennes, INSAT, 1080 Tunis Tunisia.

c- Laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie Marines, CNRS UMR 6117, Campus de Luminy, Case 901, 13288 Marseille Cedex 09, France

d- Laboratoire Hydrosociences Montpellier, UMR 5569, Universités Montpellier 2 et 1, CNRS, IRD, Place E. Bataillon, Case MSE, 34095 Montpellier Cedex 05, France

*Corresponding author. Dr. Bernard Ollivier, Laboratoire de Microbiologie IRD, UMR D180, Universités de Provence et de la Méditerranée, ESIL Case 925, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France.

Phone +33 (0)4 91 82 85 86.

Fax:+33 (0)4 91 82 85 70.

E-mail: bernard.ollivier@univmed.fr

Running title: *Thermodesulfovibrio hydrogenophilus* sp. nov..

The Genbank accession number for the 16S rDNA sequence for strain Hbr5^T is EF081294.

Abstract

A new thermophilic sulfate-reducing bacterium (SRB), designated as strain Hbr5^T (T=type strain), was enriched and isolated from a terrestrial Tunisian hot spring. Strain Hbr5^T was a non spore-forming Gram negative curved or vibrio-shaped bacterium. It appeared singly or in long chains and was actively motile by a polar flagellum and possessed c-type cytochromes and desulfofuscin as dissimilatory bisulfite reductase. Growth occurred between 50 and 70 °C with an optimum at 65 °C at pH 7.1. In the presence of sulfate as terminal electron acceptor, strain Hbr5^T used H₂ (with acetate as carbon source) and poorly formate (with acetate as carbon source), and pyruvate as electron donors. Strain Hbr5^T can use sulfate, thiosulfate, sulfite or arsenate as electron acceptors but not elemental sulfur, fumarate, nitrate or nitrite. Pyruvate was the only substrate supporting fermentative growth and was converted into acetate, hydrogen and CO₂.

The DNA G+C of strain Hbr5^T content was 36.1 mol%. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequence showed that strain Hbr5^T was a member of the genus *Thermodesulfovibrio* with *T. islandicus* (similarity of 95.1%) and *T. yellowstonii* (similarity of 95%) being its closest relatives.

On the basis of phenotypic, genomic, and phylogenetic characteristics, strain Hbr5^T (DSM 18151^T, JCM 13991^T) is proposed to be assigned to a novel species of genus *Thermodesulfovibrio*, *T. hydrogenophilus* sp. nov.

Keywords: *Thermodesulfovibrio hydrogenophilus*; sulfate-reducing bacterium; hot spring; thermophilic; taxonomy.

Introduction

Thermophilic sulfate reducers (TSR) are found in a wide range of hot terrestrial and subterrestrial habitats including hot springs [19,29,38,51,53], oilfield environments [3,5,39,40,43,45,50], geothermal groundwaters [10,25,26], deep aquifer of the Great Artesian Basin [27,30,42] and deep-sea hydrothermal vents [2,23,40]. In these hot environments TSR may contribute significantly to the *in situ* biogeochemical processes by oxidizing geothermal hydrogen, and reducing sulfate into sulfide in particular. Within the domain *Bacteria*, TSR belong to four phylogenetic groups including (i) the low G+C Gram positive *Bacillus/Clostridium* group (e.g. *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*), (ii) the deep-branching bacterium consisting of the genera *Thermodesulfobacterium* and *Thermodesulfatator*, (iii) genera *Thermodesulfobacterium* or *Thermodesulfobium* directly or peripherally related to the *Nitrospira* phylum and (iv) at a less extent the *delta* subdivision of the *Proteobacteria* (e.g. *Desulfomicrobium*) [8,12,26,37]. TSR pertaining to the *Archaea* domain are represented by members of genera *Archaeoglobus* and *Calditerrivibrio*, the only species, *Calditerrivibrio maquilensis*, of this latter genus being ascribed as non hydrogenotrophic [22].

Beside classic microbiological approaches, culture-independent studies have also demonstrated that an important TSR diversity inhabited thermal ecosystems [6,12,13,14,20,33,47], thus suggesting their ecological significance as possibly primary producers in the hot biosphere, because of their hydrogen-oxidizing capabilities. This biodiversity is directly linked to the physico-chemical conditions existing *in situ* (pH, temperature, water mineral content, etc...). Improving our knowledge of such diversity is still a challenge for microbiologists.

The aim of the present study was to look for novel populations of hydrogenotrophic TSR originating from the hot biosphere. We describe here a new member of the genus *Thermodesulfobacterium* originating from a terrestrial hot spring in Tunisia.

Materials and Methods

Sampling site and origin of the strains

Samples were collected from the hot spring “Hamam Essalhine” (HEs) located 10 km North of Fernana on the road Fernana-Ben Mtir, in the North-East of Tunisia at 280m

elevation. Hot spring waters discharge in the river Wad'Ellil. They emerge at a flow rate of approximately 4 L/s. The dissolved-sulfide concentration in the springwater was 70 mg/L, thus favoring anoxic conditions in the water and underlying sediments.

TSR were isolated from a mixed sediment-water samples collected in sterile plastic bottles in January 2005, and kept at 4°C until used. The temperature at the sampling site was 73°C, pH was 6.9, and salinity was around 0.5% NaCl.

Media and conditions of cultivation

The Hungate technique [21] was then used throughout for cultivation. The basal medium contained (per litre of distilled water): 0.3 g KH_2PO_4 ; 0.3 g K_2HPO_4 ; 1.0 g NH_4Cl ; 1.0 g NaCl; 3.0 g Na_2SO_4 ; 0.1 g KCl; 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.1 g yeast extract (Difco laboratories); 0.5 g cysteine-HCl; 1 ml trace mineral element solution [52] and 1 ml of 0.1 % resazurin. pH was adjusted to 7.2 with 10 M KOH. The basal medium was boiled under a stream of O_2 -free N_2 gas, cooled to room temperature and 5 ml aliquots were distributed in Hungate tubes under a stream of O_2 -free N_2 gas. The N_2 gas phase was replaced with N_2/CO_2 (80:20, v/v) and the tubes were autoclaved for 45 min at 110°C. Prior to inoculation, 0.1 ml 2% $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ and 0.1 ml 10% NaHCO_3 were added.

Enrichment and isolation

Enrichments were performed in Hungate tubes containing 5 ml of medium and inoculated with 10% of sample. H_2 from a mixture of H_2/CO_2 [80:20 (v/v), 2 bar], was used as an energy source and acetate (2mM) was used as the carbon source. Three enrichment series were performed in the same medium before isolation. The culture was purified by repeated use of the Hungate roll-tube method with medium solidified with 2.5% (w/v) Noble agar (Difco) and incubated at 55°C. Several colonies that developed were picked and cultured in the corresponding culture medium. The process of isolation was repeated several times until isolates were deemed to be axenic. Cultures were routinely checked by microscopy for contaminations using media with glucose in the presence of yeast extract as substrate.

Characterization of strain Hbr5^T

Duplicate experiments were performed to determine physiological optimal growth conditions (temperature, pH and NaCl). They were conducted in basal medium with the addition of hydrogen as electron donor, and sulfate (20mM) as electron acceptor. The ability to utilize organic substrates was tested in basal medium supplemented with autoclaved or filter-sterilized substrates. Formate, acetate, butyrate, propionate, lactate, fumarate, succinate, malate, pyruvate, methanol, ethanol, propanol, butanol, pentanol, glycerol, glucose, fructose, lactose, and mannose were tested as energy sources at a final concentration of 20mM. Casaminoacids were tested at 0.25%. The use of pyruvate was tested in the absence of sulfate as terminal electron acceptor. To test for electron acceptors, sodium thiosulfate (final concentration 20mM), sodium sulfate (20mM), sodium sulfite (2 and 5mM), elemental sulfur (2% (w/v)), sodium fumarate (20mM), sodium nitrate (20mM), sodium nitrite (2mM), and sodium arsenate (1mM) were added to the medium. Sensitivity to antibiotics was determined by transferring an exponentially growing culture into basal medium containing filter-sterilized antibiotics, such as penicillin, streptomycin, and chloramphenicol, at 25, 50, 100, 200, 300, and 400µg/ml.

Phase-contrast microscopy (model Eclipse E600; Nikon) was used for routine examination of the cultures and to obtain photomicrographs. Light and electron microscopy observations were performed as previously described [35]. Growth was measured by inserting tubes directly into a model Cary 50 Scan spectrophotometer (Varian) and measuring the optical density at 580 nm. Sulfide was determined photometrically as colloid CuS by the method of Cord-Ruwisch [9]. The end-products of organic compounds metabolism were measured as previously described [17] by high pressure liquid chromatography (HPLC) after 2 weeks of incubation at optimal temperature and pH. Cytochromes and desulfovirdin (bisulfite reductase) were determined as described by Postgate [41].

The G+C content of DNA was determined at the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb, Braunschweig, Germany) using the method of Mesbash *et al.* [32].

The analysis and the determination of As species [As(V) and As(III)] was performed using HPLC coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HPLC-HG-AFS). The method, described by Bohari *et al.* [7], has a detection limit of 2.3 nM for As(III) and 6.1 nM for As(V).

Phylogenetic analysis

Methods for the purification and extraction of DNA and for the amplification and sequencing of the 16S rRNA gene have been described previously by Miranda-Tello *et al.* [34] except for the use of primer Rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') instead of primer R6.

The 16S rRNA gene sequence of strain Hbr5^T were imported into the sequence editor BIOEDIT version 5.0.9 [16], the base calling was examined and a contiguous consensus sequence was obtained for each isolate. A non-redundant BLASTN search [1] of the full sequence through GenBank [4] identified its closest relative. Sequences used in the phylogenetic analysis were obtained from RDP and GenBank. They were aligned using programs provided by the Ribosomal data Project II [31]. Position of sequence and pairwise evolutionary distances based on 1356 unambiguous nucleotides were calculated using the method of Jukes and Cantor [24]. Dendrograms were constructed using the neighbour-joining method [46].

Results

Enrichment and isolation

Enrichment cultures in the basal medium containing H₂/CO₂ 80:20 % (v/v) (2bar), and in the presence of sulfate as terminal electron acceptor were positive after 5 days of incubation at 55°C. Several thermophilic strains similar in morphology (cells were spirilloid) and oxidizing hydrogen were isolated. The strain, designated Hbr5^T, was further characterized.

Morphological characteristics of strain Hbr5^T

Cells of strain Hbr5^T were Gram negative, curved or vibrio-shaped measuring 0.5 µm long and 2 µm wide. The cells occurred singly or in short to very long chains (Fig. 1a). Cells were motile by a polar flagellum (Fig. 1b). Occasionally, visible creamy aggregates that corresponded to large clumps of cells could be observed in the liquid medium. Spores were never observed. Electron micrographs of thin sections of cells revealed a typical Gram negative cell wall with an undulated outer membrane (Fig. 2).

Growth characteristics

Strain Hbr5^T was strictly anaerobic, growing optimally at 65°C (temperature growth range between 50 and 70°C) (Fig. 3a). The optimum pH for growth was around 7.1 (pH growth range 6 to 8.5) (Fig. 3b). It did not require NaCl for growth. A NaCl concentration of 1.5% (w/v) inhibited growth (Fig. 3c).

Utilization of carbon sources

Under optimal growth conditions, in the presence of sulfate as electron acceptor and acetate as carbon source, strain Hbr5^T used hydrogen. Pyruvate together with formate were also poorly used. Strain Hbr5^T fermented pyruvate into acetate, hydrogen and CO₂ (Table 1).

The following substrates were tested, but not utilized: glucose, fructose, mannose, acetate, propionate, butyrate, lactate, succinate, fumarate, malate, methanol, ethanol, butanol, propanol, glycerol, and casamino acids. Strain Hbr5^T did not require yeast extract, biotrypcase, or vitamins for growth, but 0.1 % yeast extract enhanced its growth when oxidizing hydrogen.

Possible electron acceptors

Sulfate, thiosulfate, sulfite but not elemental sulfur, fumarate, nitrate or nitrite, served as electron acceptors in the presence of H₂ with acetate as carbon source (Table 1).

Strain Hbr5^T reduced also arsenate to arsenite with the concomitant oxidation of pyruvate to acetate plus CO₂.

Antibiotic sensitivity

Strain Hbr5^T was resistant to chloramphenicol at 25 µg ml⁻¹, penicillin at 300 µg ml⁻¹ and streptomycin at 400 µg ml⁻¹. In the presence of these antibiotics no noticeable morphological changes in cells were observed.

Cytochromes and bisulfite reductase contents

The cells contained c-type cytochromes (absorption peaks at 552 and 418 nm in the dithionite reduced form) and desulfofuscidin (weak band around 576 nm in the oxidized state) but not desulfovidirin, as dissimilatory bisulfite reductase.

G + C content of DNA and phylogeny

The G+C content of strain Hbr5^T was 36.1 mol%.

Analysis of the almost complete sequence (1518 bp) of the 16S rRNA gene of strain Hbr5^T revealed that this novel isolate groups with the members of the family *Nitrospiraceae*, order *Nitrospirales*. The phylogenetic tree (Fig. 4) indicated that strain Hbr5^T clustered with *Thermodesulfovibrio yellowstonii* DSM 11347^T, an isolate recovered from a hydrothermal vent water in Sedge Bay of Yellowstone Lake [19], and *Thermodesulfovibrio islandicus* DSM 12570^T isolated from hot spring in Iceland [48], with a 16S rRNA gene sequence similarity of 95% and 95.1% respectively.

Discussion

Microbial studies of hot environments including terrestrial and subterrestrial habitats revealed the presence of complex bacterial communities with several of them being involved in the reduction of sulfur-containing compounds (sulfate, thiosulfate, sulfite, elemental sulfur) to sulfide [28,40]. Among them, SRB have been commonly isolated from such ecosystems, thus indicating their significant ecological role with regards to the sulfur cycle through oxido-reductive processes (e.g. H₂ oxidation and sulfate reduction).

Culture-independent techniques have provided evidence of the existence of SRB in thermal springs [14] and importance of this trophic group of microorganisms is congruent with the isolation of several SRB from these extreme niches. All SRB oxidize hydrogen and belong to the domain *Bacteria*, with the exception of the crenarchaeote *Caldivirga maquilingsensis* [22]. They comprise members of the genera *Thermodesulfobacterium* [48,53], *Desulfotomaculum* [15,29], *Desulfomicrobium* [51], *Thermodesulfobium* [36], and *Thermodesulfovibrio* [19,48]. Two species of the latter genus have been described so far. *Thermodesulfovibrio yellowstonii* [19] was isolated from thermal vent water in Yellowstone Park, USA, whereas *T. islandicus* [48] was recovered from microbial mats collected from an Icelandic hot spring. Based on morphological and phylogenetical characteristics, strain Hbr5^T that we have isolated from a Tunisian hot spring is clearly affiliated to the genus *Thermodesulfovibrio*. Our thermophilic vibrioid isolate has *T. islandicus* (similarity of 95.1%) and *T. yellowstonii* (similarity of 95%) as its closest phylogenetic relatives. Pertaining of strain Hbr5^T to the genus *Thermodesulfovibrio* was ascertained by the absence of desulfovirdin, and the presence of desulfofuscin as dissimilatory bisulfite reductase as already reported in *T. yellowstonii* [19] and *Thermodesulfobacterium* species [11,18]. Physiological characteristics of strain Hbr5^T (e.g., pH, temperature, and NaCl optima for growth) indicate that it is well adapted to the physico-chemical conditions existing in the hot spring studied and that hydrogen is most probably its preferred substrate to be oxidized in situ. Indeed it is noteworthy that in contrast to *T. yellowstonii* and *T. islandicus*, the hydrogenotrophic strain Hbr5^T does not oxidize lactate in the presence of sulfate as terminal electron acceptor. Furthermore, the other substrates (formate and pyruvate) to be possibly oxidized by strain Hbr5^T, are only poorly used. In this respect H₂, known to result from geothermal abiotic and biotic processes [44,49] appears as an essential electron donor to sustain growth of strain Hbr5^T. In this respect, this isolate could be a potential primary producer in the studied hot spring where sulfate is not a limiting factor for growth. Since strain Hbr5^T is not

chemolithoautotrophic, we may expect that acetate as carbon source is available in the Tunisian hot spring, resulting from incomplete oxidation of organic matter or homoacetogenesis. Such acetate-dependence type of metabolism appears to be a common feature of the SRB originating from hot springs which generally cannot grow autotrophically at the exception of a few of them. Beside lactate oxidation, phenotypic differences were observed between strain Hbr5^T and *T. yellowstonii* or *T. islandicus*. They include the range of electron donors and electron acceptors used (Table 1).

Finally, this study extends our knowledge of the biodiversity of SRB inhabiting thermal springs and suggests with further isolation of strain Hbr5^T that members of the genus *Thermodesulfovibrio* are most probably indigenous to these biotopes.

Taking into account its phenotypic, genotypic, and phylogenetic characteristics, we propose to assign strain Hbr5^T (T=type species) as a new species of genus *Thermodesulfovibrio*, family *Nitrospiraceae*, order *Nitrospirales*, *Thermodesulfovibrio hydrogenophilus* sp. nov.

Description of *Thermodesulfovibrio hydrogenophilus*

Thermodesulfovibrio hydrogenophilus (hy;dro.ge.no.phi'lus. *M.L. neut. n. hydrogenium hydrogen; Gr. adj. philos loving; M.L. masc. adj. hydrogenophilus hydrogen loving*).

The isolate was a non spore-forming Gram negative curved bacterium appearing singly or in chains. Cells were motile by a single polar flagellum. Possessed desulfofuscidin, but not desulfovirdin, as bisulfite reductase. Growth occurred between 50 and 70 °C with an optimum at 65 °C at pH 7.1. Growth was inhibited in the presence of 1.5 % NaCl (v/v). In the presence of sulfate, the isolate used hydrogen (with acetate) and poorly formate (with acetate) and pyruvate as electron donors. It can use sulfate, thiosulfate, sulfite or arsenate as electron acceptors but not elemental sulfur, fumarate, nitrate or nitrite. Pyruvate was the only substrate supporting fermentative growth.

The DNA G+C content was 36.1 mol%. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequencing showed that the isolate had *T. islandicum* and *T. yellowstonii* as its closest relative (similarity of 95.1% and 95%, respectively). The type strain is Hbr5^T (=DSM 18151^T, =JCM 13991^T). Isolated from a thermal hot spring in Tunisia. The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence is EF081294.

Acknowledgments

We thank Dr. Pierre Thomas for electron microscopy.

References

- [1] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389-3402.
- [2] C. Audiffren, J.-L. Cayol, C. Joulian, L. Casalot, P. Thomas, J.-L. Garcia, B. Ollivier, *Desulfonauticus submarinus* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 1585-1590.
- [3] J. Beeder, T. Torsvik, T.L. Lien, *Thermodesulforhabdus norvegicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium from oil field water, *Arch Microbiol.* 164 (1995) 331-336.
- [4] D.A. Benson, M.S. Boguski, D.J. Lipman, J. Ostell, B.F.F. Ouellette, B.A. Rapp, D.L. Wheeler, GenBank, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 12-17.
- [5] N.K. Birkeland, Sulfate-reducing bacteria and archaea, in: B. Ollivier, M. Magot (Eds.), *Petroleum Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, 2005, pp. 35-54.
- [6] C.E. Blank, S.L. Cady, N. Pace, Microbial composition of near-boiling silica-depositing thermal springs throughout Yellowstone National Park, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 5123-5135.
- [7] Y. Bohari, A. Astruc, M. Astruc, J. Cloud, Improvements of hydride generation for the speciation of arsenic in natural freshwater samples by HPLC-HG-AFS, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 774-778.
- [8] H.F. Castro, N.H. Williams, A. Ogram, Phylogeny of sulfate-reducing bacteria, *FEMS Microbiol. Ecol.* 31 (2000) 1-9.
- [9] R. Cord-Ruwisch, A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria, *J. Microbiol. Methods* 4 (1985) 33-36.
- [10] S. Dumas, R. Cord-Ruwisch, J.-L. Garcia, *Desulfotomaculum geothermicum* sp. nov., a thermophilic, fatty acid-degrading, sulfate-reducing bacterium isolated with H₂ from geothermal ground water, *Antonie van Leeuwenhoek* 54 (1988) 165-178.

- [11] G. Fauque, A.R. Lino, M. Czechowski, L. Kang, D.V. DerVartanian, J.J.G. Moura, J. LeGall, I. Moura, Purification and characterization of bisulfite reductase (desulfofuscidin) from *Desulfovibrio thermophilus* and its complexes with exogenous ligands, *Biochim. Biophys. Acta* 1040 (1990) 112-118.
- [12] G. Fauque, B. Ollivier, Anaerobes: the sulfate-reducing bacteria as an example of metabolic diversity, in: A.T. Bull (Ed.), *Microbial Diversity and Bioprospecting*, ASM Press, Washington, D.C, 2004, pp. 169-176.
- [13] M.L. Ferris, T.S. Magnuson, J.A. Fagg, R. Thar, M. Kühl, K.B. Sheehan, J.M. Henson, Microbially mediated sulphide production in a thermal, acidic algal mat community in Yellowstone National Park, *Environ. Microbiol.* 5 (2003) 954-960.
- [14] S. Fishbain, J.G. Dillon, H.L. Gough, D.A. Stahl, Linkage of high rates of sulfate reduction in Yellowstone hot springs to unique sequence types in the dissimilatory sulfate respiration pathway, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3663-3667.
- [15] H.P. Goorissen, H.T.S. Boschker, A.J.M. Stams, T.A. Hansen, Isolation of thermophilic *Desulfotomaculum* strains with methanol and sulfite from solfataric mud pools and characterization of *Desulfotomaculum solfataricum* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 1223-1229.
- [16] T.A. Hall, BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41 (1999) 95-98.
- [17] O. Haouari, M.-L. Fardeau, L. Casalot, J.-L. Tholozan, M. Hamdi, B. Ollivier, Isolation of sulfate-reducing bacteria from Tunisian marine sediments and description of *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 (2006) 2909-2913.
- [18] E.C. Hatchikian, Desulfofuscidin: dissimilatory, high-spin sulfite reductase of thermophilic, sulfate-reducing bacteria, *Methods Enzymol.* 243 (1994) 276-295.
- [19] E.A. Henry, R. Devereux, J.S. Maki, C.C. Gilmour, C.R. Woese, L. Mandelco, R. Schauder, C.C. Remsen, R. Mitchell, *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain, *Arch. Microbiol.* 161 (1994) 62-69.
- [20] P. Hugenholtz, C. Pitulle, K.L. Hershberger, N.R. Pace, Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 366-376.

- [21] RE. Hungate, Roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes, in: R. Norris, D. W. Ribbons (Eds.), *Methods in Microbiology*, vol. 3B. Academic Press, New York, 1969, pp. 117-132.
- [22] T. Itoh, K.-I. Suzuki, P.C. Sanchez, T. Nakase, *Caldivirga maquilangensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1999) 1157–1163.
- [23] C. Jeanthon, S. L'Haridon, V. Cuffe, A. Banta, A.L. Reysenbach, D. Prieur, *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 765-772.
- [24] T.H. Jukes, C.R. Cantor, Evolution of proteins molecules, in : *Mammalian Protein Metabolism*, H. N. Murno (Ed.), Academic Press, New York, 1969, pp. 211-232.
- [25] A.H. Kaksonen, J. Plumb, W.J. Robertson, S. Spring, P. Schumann, P.D. Franzmann, J.A. Puhakka, Novel thermophilic sulfate-reducing bacteria from a geothermally active underground mine in Japan *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 3759-3762.
- [26] A.H. Kaksonen, S. Spring, P. Schumann, R.M. Kroppenstedt, J.A. Puhakka, *Desulfoviregula thermocuniculi* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from a geothermal underground mine in Japan, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 98-102.
- [27] H. Kimura, M. Sugihara, H. Yamamoto, B.K.C. Patel, K. Kato, S. Hanada, Microbial community in a geothermal aquifer associated with the subsurface of the Great Artesian Basin, Australia, *Extremophiles* 9 (2005) 407-414.
- [28] A. Le Faou, B.S. Rajagopal, L. Daniels, G. Fauque, Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world, *FEMS Microbiol. Rev.* 75 (1990) 351-382.
- [29] Y. Liu, T.M. Karnauchow, K.F. Jarrell, D.L. Balkwill, G.R. Drake, D. Ringelberg, R. Clarno, D.R. Boone, Description of two new thermophilic *Desulfotomaculum* spp., *Desulfotomaculum putei* sp. nov., from a deep terrestrial subsurface, and *Desulfotomaculum luciae* sp. nov., from a hot spring, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997) 615-621.

- [30] A.C. Love, B.K. Patel, P.D. Nichols, E. Stackebrandt, *Desulfotomaculum australicum*, sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from the Great Artesian Basin of Australia, *Syst. Appl. Microbiol.* 16 (1993) 244-251.
- [31] B.L. Maidak, J.R. Cole, T.G. Lilburn, C.T.Jr. Parker, P.R. Saxman, R.J. Farris, G.M. Garrity, G.J. Olsen, T.M. Schmidt, J.M. Tiedje, The RDP-II (Ribosomal Database Project), *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 173-174.
- [32] M. Mesbashi, U. Premachandran, W.B. Whitman, Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (1989) 159-167.
- [33] D.R. Meyer-Dombard, E.L. Shock, J.P. Amend, Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA. *Geobiology* 3 (2005) 211–227.
- [34] E. Miranda-Tello, M.-L. Fardeau, L. Fernández, F. Ramírez, J.-L. Cayol, P. Thomas, J.-L. Garcia, B. Ollivier, *Desulfovibrio capillatus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from an oil field separator located in the Gulf of Mexico, *Anaerobe* 9 (2003) 97-103.
- [35] E. Miranda-Tello, M.-L. Fardeau, P. Thomas, F. Ramírez, L. Casalot, J.-L. Cayol, J.-L. Garcia, B. Ollivier, *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 169-174.
- [36] K. Mori, H. Kim, T. Kakegawa, S. Hanada, A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolated from a hot spring, *Extremophiles* 7 (2003) 283-290.
- [37] H. Moussard, S. L'Haridon, B.J. Tindall, A. Banta, P. Schumann, E. Stackebrandt, A.-L. Reysenbach, C. Jeanthon, *Thermodesulfatator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 227-233.
- [38] T.N. Nazina, A.E. Ivanova, L.P. Kanchaveli, E.P. Rozanova, A new spore-forming thermophilic methylotrophic sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum kuznetsovii* sp. nov., *Microbiologiya* 57 (1988) 823–827.
- [39] R.K. Nilsen, T. Torsvik, T. Lien, *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a sulfate reducer isolated from a hot North Sea oil reservoir, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (1996) 397-402.

- [40] B. Ollivier, J.-L. Cayol, G. Fauque, Sulphate-Reducing bacteria from oil field environments and deep-sea hydrothermal vents, in: L.L. Barton, W.A. Hamilton (Eds.), *Sulphate-Reducing Bacteria, Environmental and Engineered Systems*, chapter 10, Cambridge University Press, UK, 2007, pp. 305-328.
- [41] J.R. Postgate, A diagnostic reaction of *Desulphovibrio desulphuricans*, *Nature* 183 (1959) 481-482.
- [42] A.C. Redburn, B.K.C. Patel, *Desulfovibrio longreachii* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from the Great Artesian Basin of Australia, *FEMS Microbiol. Lett.* 115 (1994) 33-38.
- [43] G.N. Rees, G.S. Grassia, A.J. Sheedy, P.P. Dwivedi, B.K.C. Patel, *Desulfacinum infernum* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium from a petroleum reservoir, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (1995) 85-89.
- [44] A.-L. Reysenbach, S.L. Cady, *Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems*, *Trends Microbiol.* 9 (2001) 79-86.
- [45] J.T. Rosnes, T. Torsvik, T. Lien, Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 2302-2307.
- [46] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406-425.
- [47] S. Skirnisdottir, O.G. Hreggvidsson, S. Hjörleifsdottir, V.T. Marteinson, S.K. Petursdottir, O. Holst, J.K. Kristjansson, Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 2835-2841.
- [48] J. Sonne-Hansen, B.K. Ahring, *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp. nov., and *Thermodesulfovibrio islandicus* sp. nov., two thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from a Icelandic hot spring, *Syst. Appl. Microbiol.* 22 (1999) 559-564.
- [49] K. Takai, T. Gamo, U. Tsunogai, N. Nakayama, H. Hirayama, K.H. Nealson, K. Horikoshi, Geochemical and microbiological evidence for a hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLiME) beneath an active deep-sea hydrothermal field, *Extremophiles* 8 (2004) 269-282.
- [50] C. Tardy-Jacquenod, P. Caumette, R. Matheron, C. Lanau, O. Arnauld, M. Magot, Characterization of sulfate-reducing bacteria isolated from oil-field waters, *Can. J. Microbiol.* 42 (1996) 259-266.

- [51] F. Thevenieau, M.-L. Fardeau, B. Ollivier, C. Joulian, S. Baena, *Desulfomicrobium thermophilum* sp. nov., a novel thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Colombia, *Extremophiles* 11 (2007) 295-303.
- [52] F. Widdel, N. Pfennig, Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. 1. Isolation of a new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp nov., *Arch. Microbiol.* 129 (1984) 395-400.
- [53] J.G. Zeikus, M.A. Dawson, T.E. Thompson, K. Ingvorsen, E.C. Hatchikian, Microbial ecology of volcanic sulphidogenesis: Isolation and characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. and sp. nov., *J. Gen. Microbiol.* 129 (1983) 1159-1169.

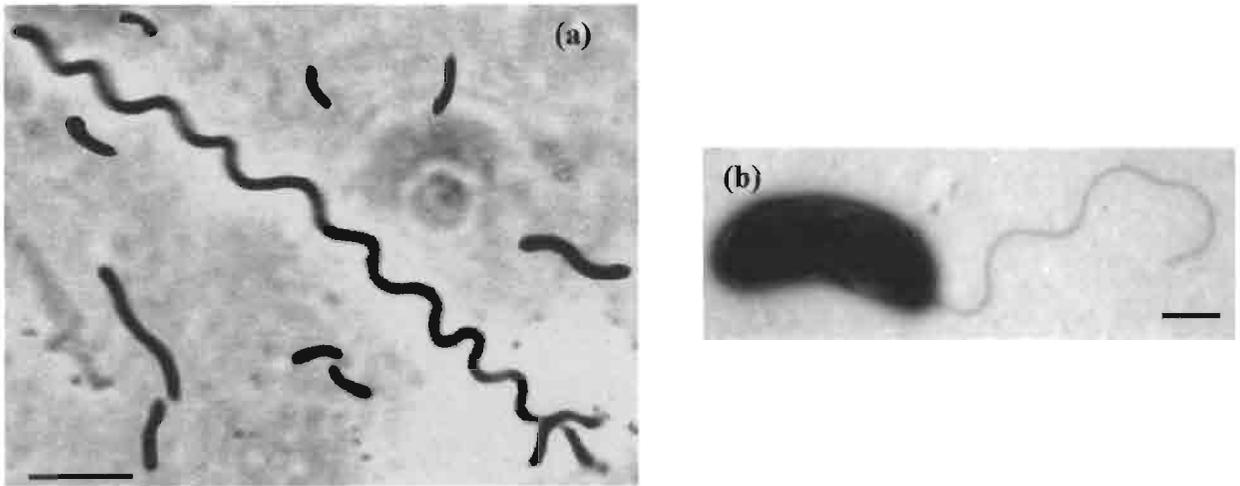


Fig. 1. Phase contrast micrograph, *Bar* = 5 μm (a) and transmission electron photomicrograph of negative stained cell, *Bar* = 0.4 μm (b) of strain Hbr5^T growing in medium containing hydrogen as electron donor and sulfate as electron acceptor.

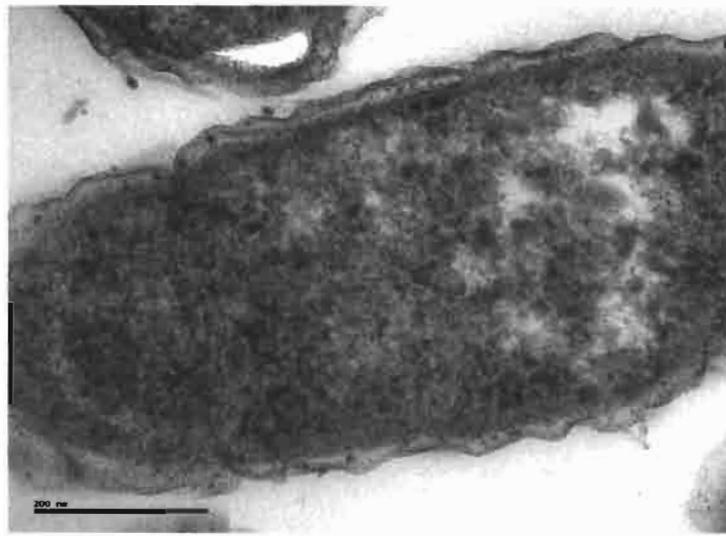


Fig. 2. Electron micrograph of an ultrathin section of a cell of strain Hbr5^T. *Bar* = 0.2 μm .

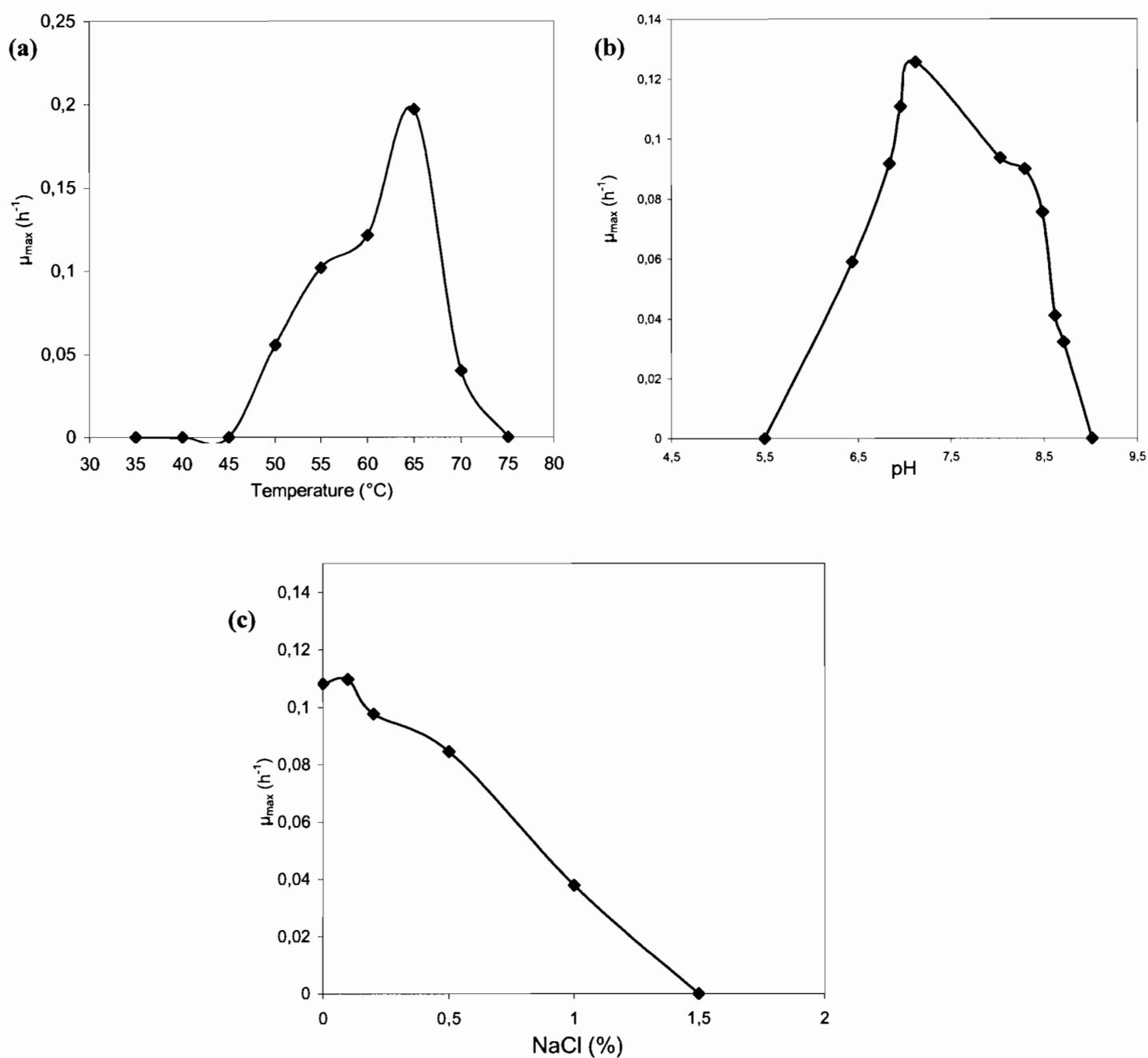


Fig. 3. Effect of (a) temperature, (b) pH and (c) NaCl concentration on the growth of strain Hbr5^T cultivated in basal medium supplemented with hydrogen and sulfate. μ_{max} represents the growth rate measured during the exponential phase.

2%

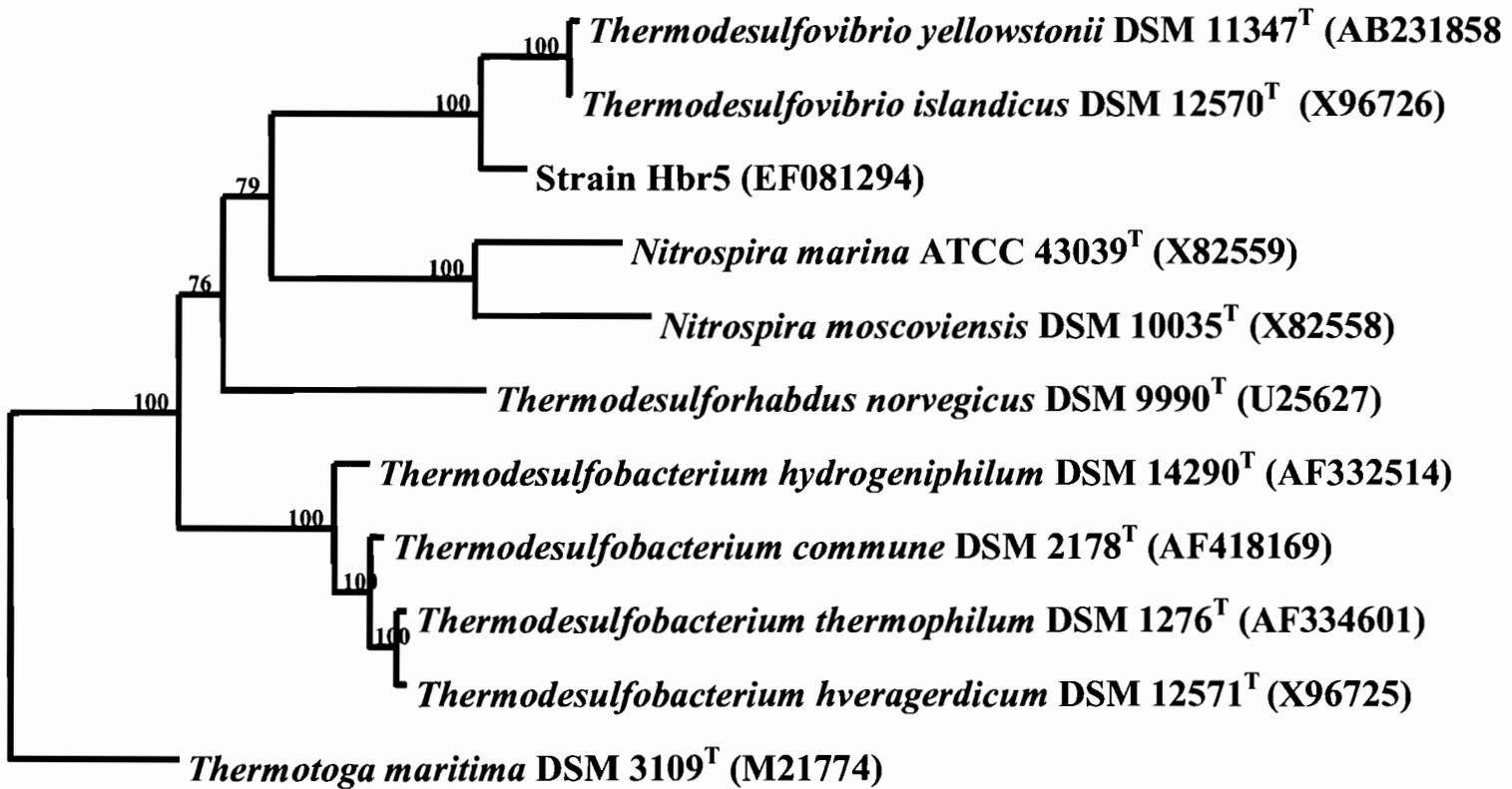


Fig. 4. Phylogenetic dendrogram based on 16S rRNA gene sequence comparison indicating the position of strain Hbr5^T among the closest members of the genus *Thermodesulfovibrio* and other genera. Bootstrap values based on 100 resamplings are given at nodes. Bar shows 2% sequence divergence.

Table 1. Discriminating characteristics of strains Hbr5^T and *Thermodesulfovibrio* species. Optimum values are shown in parentheses. - no growth; + good growth.

Characteristic	Strain Hbr5 ^T	<i>T. yellowstonii</i> ¹	<i>T. islandicus</i> ²
Isolation source	Terrestrial hot spring	Hydrothermal vent water	Terrestrial hot spring
Morphology and cell size (µm)	Vibrio 0.5 x 2	Curved rods or vibrios 0.3 x 1.5	Vibrio shaped rods 0.4 x 1.7
Temperature range °C	50-70 (65)	40-70 (65)	45-70 (65)
pH range	6.5-8.5 (7.1)	6.8-7.0	6.8-7.0
G + C content mol %	36.1	29.5	38
Utilization of electron donors			
Lactate	-	+	+
Pyruvate	+*	+	+
Formate + acetate (2mM)	+*	+*	+
H ₂ + acetate (2mM)	+	+	+
Electron acceptors			
Sulfate	+	+	+
Thiosulfate	+	+	+
Elemental sulfur	-	-	-
Sulfite	+	+	-
Nitrate	-	-	+

¹ DSM 11347^T, data from Henry *et al.* [19].

² DSM 12570^T, data from Sonne-Hansen & Ahring [48].

*: poorly used.

ND: not determined.

L'oxydo-réduction des métaux et métalloïdes a été largement étudiée chez les micro-organismes anaérobies. Parmi ces derniers, l'arsenic est un des plus toxiques et on le retrouve dans de nombreux environnements contaminés par les métaux lourds mais également à l'état naturel dans les sources géothermales terrestres et subterrestres. Ce métalloïde a finalement été sélectionné pour étudier la capacité de nos BSR à le réduire et/ou l'oxyder.

II. POTENTIALITÉS OXYDO-RÉDUCTRICES DE L'ARSENIC CHEZ CERTAINES BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES ISOLÉES D'ENVIRONNEMENTS TUNISIENS

Très peu de bactéries sulfato-réductrices (BSR) ont été testées pour leur capacité à réduire les métaux et particulièrement l'arséniate [As(V)]. Aucune n'a été décrite à ce jour comme étant capable d'oxyder l'arsénite [As(III)].

L'objectif de cette deuxième partie est de (i) définir la capacité des nouvelles souches isolées de milieux marins et hydrothermaux à réduire directement ou indirectement (par production d'H₂S) l'arsenic et (ii) découvrir de nouveaux métabolismes originaux vis à vis de l'arsenic chez les BSR, notamment en conditions de microaérophilie (oxydation de l'arsenic) sachant que certaines BSR sont capables de métaboliser quelques composés organiques sous de faibles pressions partielles d'oxygène (Mukhopadhyay *et al.*, 2007).

Des répétitions et deux repiquages successifs ont été effectués pour chaque condition de culture. Des témoins biologiques et chimiques (abiotiques) ont été réalisés, étant donné la grande réactivité en particulier du sulfure avec l'oxygène (Krekeler *et al.*, 1997). Les cultures ont été inoculées à raison de 10% (v/v).

Nous nous sommes imposés un milieu de culture qui tient compte de particularités physico-chimiques mentionnées ci-dessus (réactivité chimique entre l'H₂S et l'O₂).

II.1. ÉTAPE PRÉLIMINAIRE

Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser un substrat fermentescible, en l'occurrence le pyruvate (un des rares substrats fermentés par les BSR), afin d'éviter l'utilisation du sulfate comme accepteur d'électrons et la production de sulfure.

Les souches de BSR ont également été sélectionnées en fonction de leurs capacités à utiliser le pyruvate notamment en absence de réducteurs (cystéine, Na₂S) pour qu'il n'existe aucune interaction avec l'arsenic et l'oxygène, en particulier, dans les expériences conduites en microaérophilie.

Ces conditions de culture seront néanmoins comparées dans un premier temps à des conditions anaérobies très réductrices.

Dix de nos isolats ont été étudiés : les souches LB4, Sij23, HEB123, HEB223, Lich23, BM3 et KM2 affiliées au genre *Desulfovibrio*, les souches Lam5 et Hbr7 affiliées au genre *Desulfotomaculum* et la souche Hbr5 affiliée au genre *Thermodesulfovibrio*.

Le tableau 10 rassemble les temps de génération, sous deux conditions (réductrices et non réductrices) propres à chacune des souches mésophiles et thermophiles isolées dans le cadre de cette étude.

Tableau 10. Temps de génération (en heures) des isolats en conditions réductrices et non réductrices, sur pyruvate et en absence d'accepteur d'électrons

Souches	Temps de génération (en heures)	
	non réductrice	réductrice
LB4	6.31	5.27
Sij23	5.50	3.36
HEB123	5.66	3.96
HEB223	5.53	4.26
Lich23	6.50	5.33
BM3	6.75	5.06
KM2	5.56	4.23
Lam5	7.17	6.80
Hbr5	7.98	5.20
Hbr7	7.88	6.23

On note que, pour tous les isolats, en condition réductrice, le temps de génération est inférieur à celui en condition non réductrice. Ce résultat est prévisible puisque l'une des caractéristiques de croissance des BSR est qu'elles préfèrent croître sur des milieux anaérobies avec des potentiels redox faibles (Widdel, 1988). On remarque néanmoins que tous les isolats, qu'ils soient mésophiles ou thermophiles poussent en l'absence de réducteurs.

Ces souches, dotées de la capacité de croître sur un milieu non réduit feront l'objet d'études précises quant à leurs capacités oxydo-réductrices de l'arsenic.

II.2. RÉDUCTION DE L'As(V) PAR LES BSR

La réduction de l'As(V) en As(III), par les micro-organismes anaérobies, a été récemment découverte (Ahmann *et al.*, 1994).

Cependant, la première souche sulfato-réductrice, *Desulfotomaculum auripigmentum*, capable de réduire l'As(V) en tant qu'accepteur final d'électrons n'a été décrite qu'en 1997 par Newman et ses collègues (Newman *et al.*, 1997). Depuis, de nombreuses BSR se sont montrées capables d'effectuer cette réaction (Bruschi *et al.*, 2007). Mais vu la toxicité de ce métal, cette réduction devient impossible au-delà d'une certaine concentration en As(V) dans le milieu.

La recherche du seuil de toxicité pour chacune de nos souches a donc fait l'objet du paragraphe qui suit.

II.2.1. Détermination du seuil de toxicité en As(V)

La capacité à croître sur un milieu contenant l'arséniate [As(V)] a été testée pour toutes les BSR isolées qui ont poussé sur un milieu non réduit. Pour cela, plusieurs concentrations ont été choisies. Les tests ont été d'abord effectués sur pyruvate, en présence de 0,1mM d'arsenic, puis en présence de 1 et 5mM de ce composé. Le temps d'incubation a été fixé à 8 jours.

Le tableau 11 rapporte les taux de réduction d'As(V) dans le milieu de toutes les BSR testées.

Tableau 11. Taux de réduction de différentes concentrations d'As(V), par les BSR isolées

Souches	Genres des souches	Température d'incubation (°C)	Concentration initiale d'As(V) dans le milieu (mM)		
			0.1	1	5
			Taux de réduction d'As(V) (en %)		
BM3	<i>Desulfovibrio sp.</i>	37°C	0	0	0
Lich23	<i>Desulfovibrio sp.</i>	37°C	10,90	0	0
Sij23	<i>Desulfovibrio sp.</i>	37°C	47,90	53,79	0
HEB 223	<i>Desulfovibrio sp.</i>	37°C	49,19	54,6	11,72
LB4	<i>Desulfovibrio sp.</i>	37°C	12,34	0	0
HEB 123	<i>Desulfovibrio sp.</i>	37°C	43,76	70,56	17,24
KM2	<i>Desulfovibrio sp.</i>	37°C	0	0	0
Lam5	<i>Desulfotomaculum sp.</i>	55°C	22,32	59	10,63
Hbr5	<i>Thermodesulfovibrio sp.</i>	65°C	17,70	32.3	0
Hbr7	<i>Desulfotomaculum sp.</i>	70°C	ND	ND	0

ND : non déterminé

Les valeurs des taux de réduction d'As(V) indiquées sont la moyenne des valeurs calculées pour deux tubes.

Le diagramme suivant (figure 12) nous donne une idée plus claire des taux de réduction d'As(V) présent à 0,1 mM dans le milieu de culture, pour toutes les BSR testées.

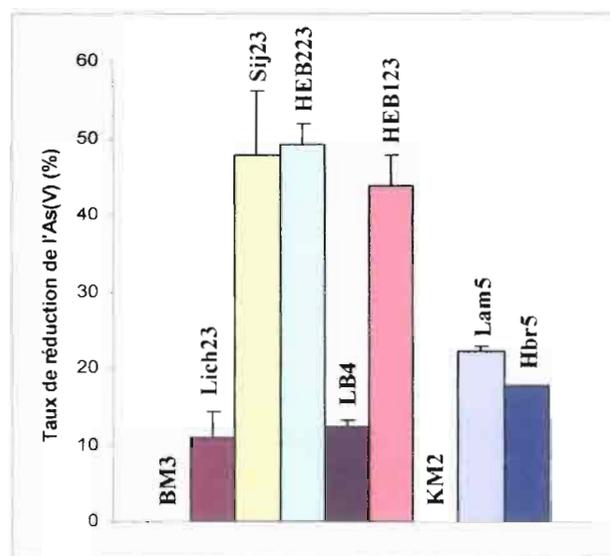


Figure 12. Taux de réduction d'As(V) (0,1 mM) pour les dix souches testées

Sur les dix souches testées et en présence de 0,1 mM d'As(V), sept ont pu utiliser le pyruvate (20 mM) et réduire l'As(V) en As(III) avec un taux de réduction compris entre 11 et 49%.

Les souches MB3 et KM2 n'ont pas poussé dans ces conditions ; l'As(V) à une concentration de 0,1mM s'avère donc déjà toxique pour ces deux BSR. Ces souches ne disposeraient peut-être pas de mécanismes de résistance à l'arséniate notamment via l'arséniate réductase.

Le meilleur taux de réduction est observé pour les souches mésophiles HEB223, Sij23 et HEB123 qui réduisent 49.2%, 47.9% et 43.76% d'As(V) en As(III), respectivement.

Aucune des souches ne produit, à partir d'As(V), les formes méthylées de l'arsenic [l'acide monométhylarsonique $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ (MMA) et l'acide diméthylarsinique $(\text{CH}_3)_2\text{AsOOH}$ (DMA)] (analyse effectuée par HPLC-HG-AFS en mode gradient).

La croissance des souches, tolérant l'As(V) à 0.1mM, a été par la suite testée en présence de concentrations plus élevées en As(V) (soit 1 et 5mM), afin de déterminer leurs capacités à réduire le métalloïde en présence de fortes concentrations de ce dernier (tableau 11, figure 13).

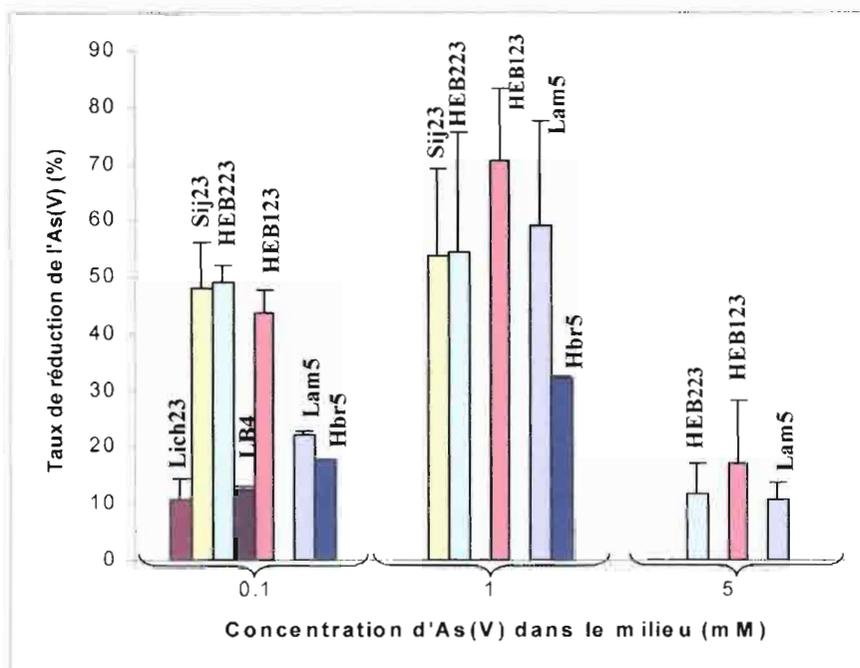


Figure 13. Taux de réduction d'As(V) en fonction de la concentration initiale d'As(V) dans le milieu pour les dix souches testées

Les résultats révèlent qu'en présence de 1mM d'As(V), les souches mésophiles HEB223 et HEB123 et thermophiles Lam5, Hbr5 le réduisent en As(III) avec un taux de réduction variant entre 32 et 70,5%, seuil supérieur aux taux de réduction obtenus à 0.1 mM.

Par conséquent, la concentration de 1mM en As(V), relativement élevée, n'est toujours pas létale pour ces souches fermentant le pyruvate. Cela laisse suggérer que, ces micro-organismes peuvent laisser la place à une plus grande oxydation du pyruvate couplée à la fermentation de ce dernier, dans la mesure où l'arsenic présent n'est pas suffisant pour oxyder ce composé organique.

Par contre, en présence de 5 mM d'As(V), le pourcentage de réduction a nettement diminué pour les souches Lam5, HEB223 et HEB123 et devient nul pour toutes les autres souches testées. En effet, les souches mésophiles (Lich23, LB4 et Sij23) et thermophiles (Hbr5, Hbr7) n'ont pas toléré une telle concentration et aucune croissance n'a d'ailleurs été relevée.

Le seuil de toxicité de l'arséniate, ne dépend donc ni du genre bactérien ni de la température de croissance, il est plutôt spécifique à chaque souche.

La détermination du seuil de toxicité en As(V) va de ce fait nous faciliter la tâche pour le choix de la concentration en arsenic à tester.

Ainsi, le choix d'une concentration appropriée d'arsenic (< 5mM), nous permettra de suivre l'évolution (i) de la croissance bactérienne (ii) et des teneurs en As(V) et en

As(III) lors de la réduction du pyruvate pour un plus grand nombre de souches et d'analyser à quel stade de croissance cette réduction a lieu, notamment en absence de sulfate, accepteur final d'électrons (réduction directe).

II.2.2. Cinétique de croissance

(i) Réduction directe

La croissance bactérienne (mesure de la densité optique à 580nm) lors de la réduction d'As(V) en As(III) a été suivie en fonction du temps, en présence de 0.2mM d'As(V) ($2 \cdot 10^4$ ppb) comme accepteur final d'électrons, de 20mM de pyruvate comme donneur d'électrons et en absence de sulfate (réduction du sulfate).

Les figures suivantes (figure 14 A, B, C) montrent l'évolution de la croissance bactérienne et la quantité d'As(V) restante, la quantité d'As(III) produite en fonction du temps pour les trois souches les plus performantes : la thermophile Lam5 et les mésophiles : HEB223 et Sij23.

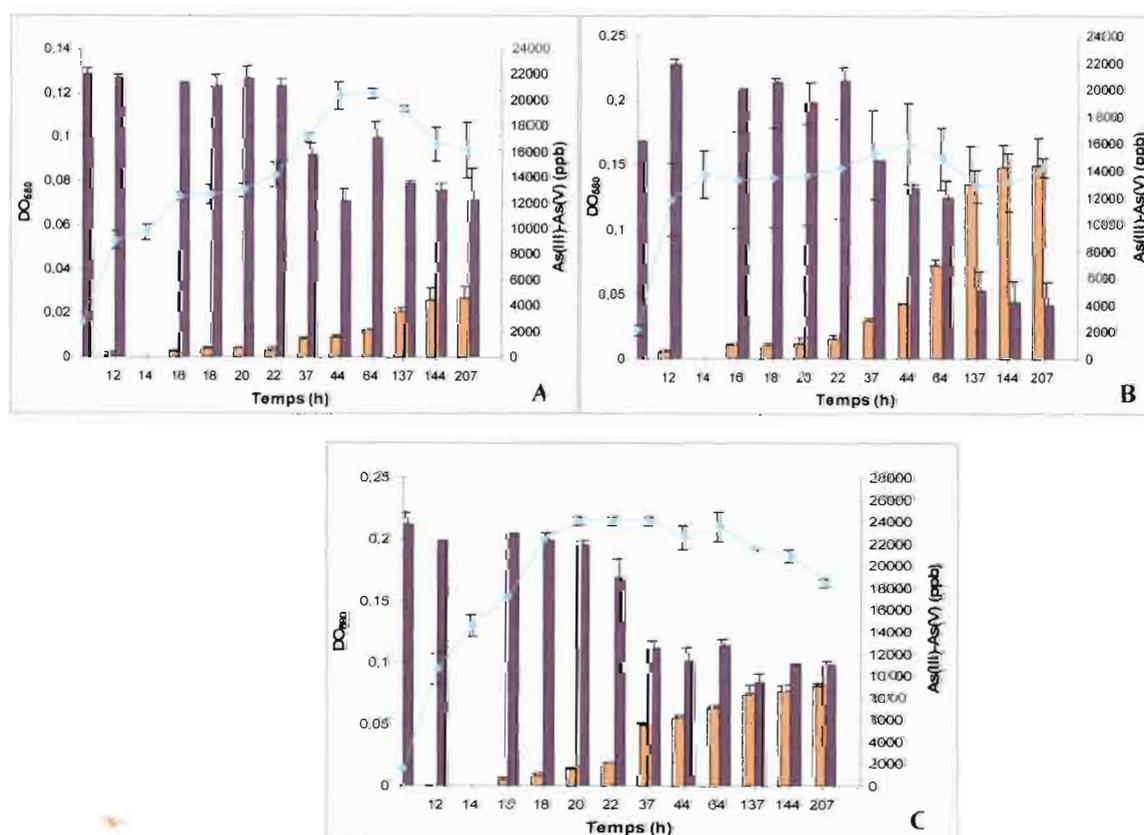


Figure 14. Evolution (i) des croissances en présence de pyruvate et (ii) des teneurs en As(V) et As(III) en fonction du temps. (A) HEB223, (B) Sij23 et (C) Lam5. ♦ Densité optique (580 nm) ; ■ As(V) consommé ; ■ As(III) produit. ($1\text{mM}=100\text{ppm}=10^5\text{ppb}$)

Il apparaît d'après l'analyse de ces résultats, que la réduction d'As(V), comme accepteur terminal d'électrons, en As(III) n'est pas couplée à la croissance des bactéries puisque cette réduction ne commence qu'à la fin de la phase exponentielle, au début de la phase stationnaire. Donc, les bactéries sembleraient utiliser le pyruvate par la voie fermentaire dans un premier temps pour utiliser ensuite l'arséniate comme accepteur d'électrons plutôt dans un but de détoxification. La réduction d'arsenic ne serait donc pas couplée à une synthèse d'ATP (pas de phosphorylation oxydative), sans phénomène respiratoire contrairement à la réduction des composés soufrés chez les BSR.

La capacité de nos souches sulfato-réductrices à croître dans de telles conditions rappelle celle de *Desulfomicrobium* Strain Ben-RB (Macy *et al.*, 2000), apte à pousser puis réduire l'As(V) comme accepteur d'électrons. Cette capacité n'est cependant pas présente chez toutes les BSR puisque *Desulfovibrio* Strain Ben-RA (Macy *et al.*, 2000) et *Desulfovibrio desulfuricans* G20 (Li et Krumholz, 2007) sont incapables de pousser sur un milieu ne contenant que l'arséniate et dépourvu de sulfate. Cela nous conduit à penser que les mécanismes de réduction de l'arsenic seraient différents d'une BSR à l'autre. Cette différence de réponse vis à vis de l'arsenic dépendrait en fait du système de régulation, notamment du type arsénate réductase présent chez la bactérie (Li et Krumholz, 2007).

(ii) Réduction indirecte

L'objectif de cette partie d'étude est de voir si les souches de BSR testées sont plus aptes à réduire l'arsenic lors de l'oxydation du pyruvate en présence de sulfate comme accepteur final d'électrons. La croissance bactérienne (par mesure de la densité optique à 580 nm), la réduction d'As(V) en As(III) et la production d'H₂S (par mesure de la densité optique à 480 nm) en fonction du temps ont été également suivies, en présence de 1 mM d'As(V) (10⁵ppb), de 20 mM de pyruvate et de 0.3% (20mM) de sulfate (figure 15).

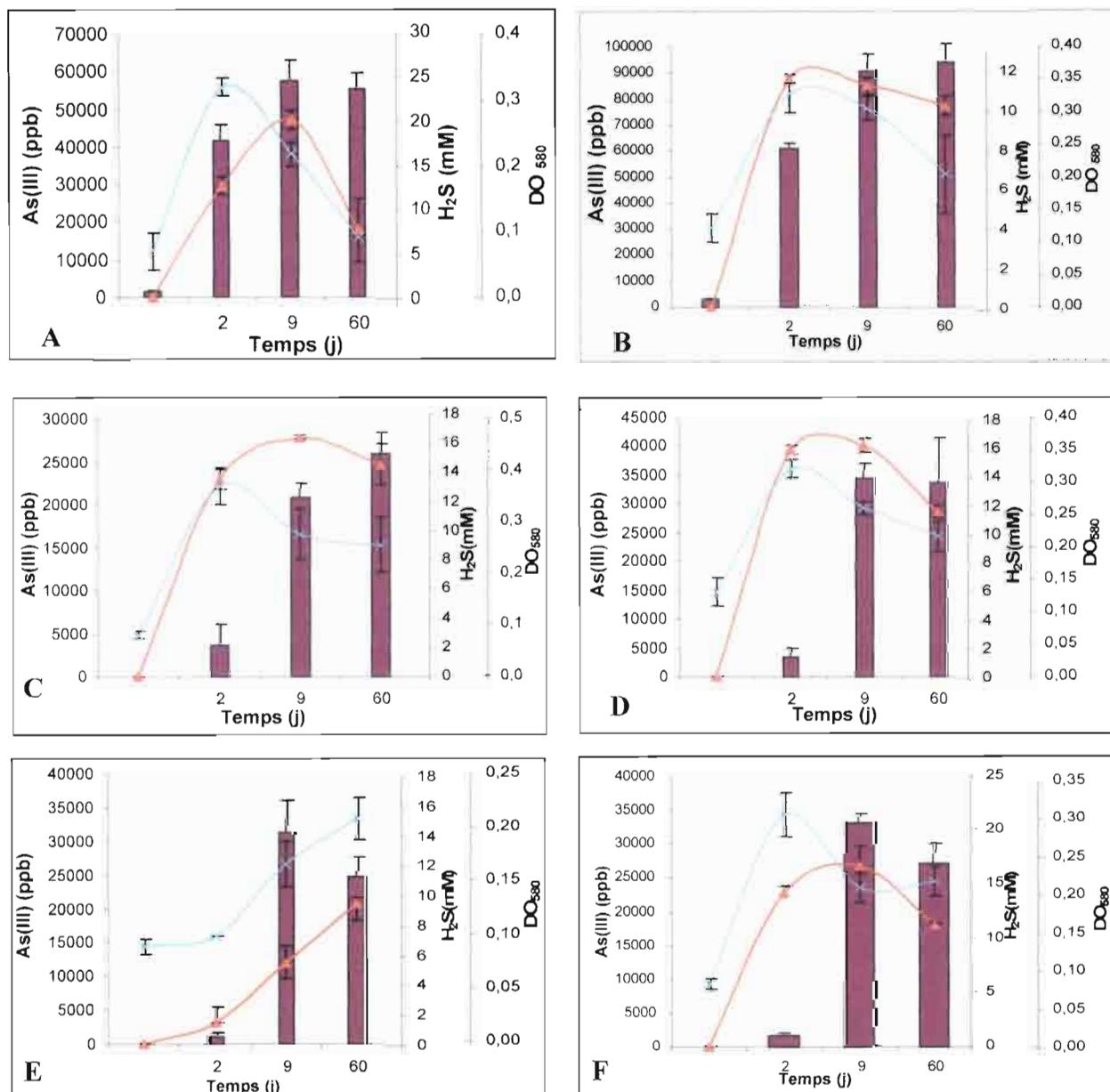


Figure 15. Evolution (i) des croissances de (A)Lam5, (B)Hbr5, (C)HEB123, (D)HEB223, (E)Sij23 et (F)LB4 sur milieu contenant du pyruvate et du sulfate et (ii) des teneurs en As(III) et en H₂S en fonction du temps.

\times H₂S produit (en mM). \blacktriangle DO₅₈₀ : Densité optique à 580 nm ; \blacksquare As(III) produit (en ppb) (1mM=100ppm=10⁵ppb)

Parmi les souches testées (Lam5, Hbr5, HEB123, HEB223, Sij23 et LB4), c'est la souche thermophile Hbr5 (figure 15.B) qui a montré le meilleur taux de réduction puisqu'elle a réduit la presque totalité d'As(V), présent dans le milieu, en As(III) après 9 jours environ.

Comme précédemment, en présence de sulfate, la croissance bactérienne n'est pas couplée à la réduction d'As(V).

Il y a toujours un décalage entre la croissance et la formation d'As(III). En revanche, les productions d'H₂S et d'As(III) sont corrélées. Ces observations nous rappellent celles faites chez *Desulfovibrio* Strain Ben-RA et *Desulfomicrobium* Strain Ben-RB (Macy *et al.*, 2000) qui réduisent également, via le sulfure produit lors de la réduction du sulfate (réduction indirecte), l'arséniate. A l'opposé, *Desulfotomaculum auripigmentum* ne commence à réduire le sulfate qu'après transformation totale d'As(V) existant dans le milieu, en As(III) engendrant ainsi la formation de l'orpiment (As₂S₃) (Newman *et al.*, 1997).

Afin de déterminer le rôle du sulfate dans la levée de la toxicité vis à vis d'As(V), des cinétiques de croissance de chaque souche, en présence et en absence de sulfate ont été effectuées avec une cinétique « témoin » où il n'y a pas de métalloïde dans le milieu.

Les deux courbes suivantes (figure 16 A, B) montrent un exemple de ces cinétiques de croissance, pour deux isolats de BSR (une mésophile Lich23 et une thermophile Lam5) : en présence de pyruvate (20mM), et en présence ou pas de sulfate ou d'As(V) à 1 mM.

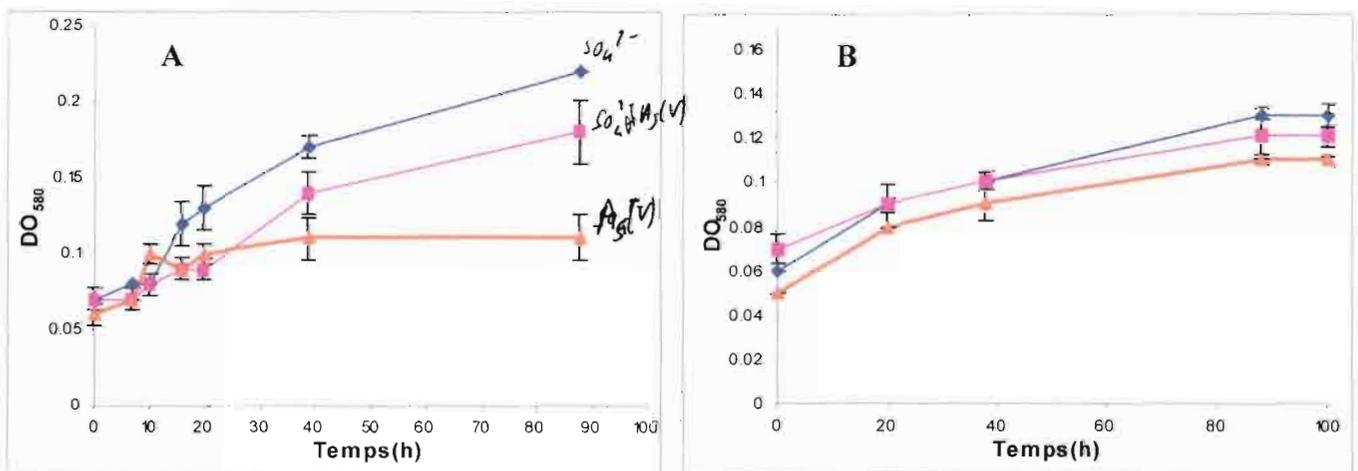


Figure 16. Evolution des croissances d'une souche mésophile (A) Lich23 et d'une souche thermophile (B) Lam5. ♦ + sulfate - As(V) ; ■ + sulfate + As(V) et ▲ - sulfate + As(V)

La croissance bactérienne sur un milieu additionné de sulfate et d'As(V) est meilleure que celle en présence d'arsenic seulement. Le sulfate permet aux bactéries de croître plus rapidement en présence du métalloïde toxique et soulève, partiellement sa

toxicité. Mais cette croissance reste inférieure à celle du témoin, où il n'y a pas d'As(V). Ceci est particulièrement vrai pour la souche Lich23.

On peut supposer dans ces deux cas de figure que la réduction de l'arsenic est indirecte, plutôt que directe, résultant de la production d'H₂S par les bactéries (les sulfures réduisent chimiquement l'arsenic) comme indiqué précédemment.

Pour la souche Sij23, un résultat original est obtenu : la croissance en présence de sulfate et d'As(V) dépasse celle obtenue en présence du sulfate seulement (figure 17).

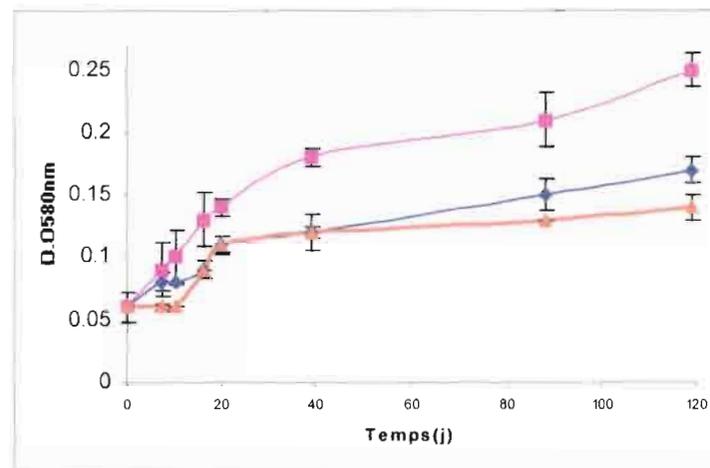


Figure 17. Evolution de croissance de la souche mésophile Sij23.

◆ + sulfate - As(V) ; ■ + sulfate + As(V) et ▲ - sulfate + As(V)

Cela laisse suggérer d'une part que l'As(V) n'est pas toxique pour cette souche à cette concentration et qu'au contraire, il constitue une source supplémentaire d'énergie, lors de sa réduction.

Newman et ses collègues (1997) expliquent que, chez *Desulfotomaculum auripigmentum*, une meilleure croissance bactérienne en présence d'As(V) et de sulfate est due à l'énergie libre de la réaction de réduction de l'arsenic qui est relativement plus élevée que celle du sulfate. Ceci serait certainement le cas de la souche Sij23.

Nous avons pu constater que la réduction des métaux peut donc être obtenue non seulement par une réduction directe mais aussi par une réaction chimique indirecte quand du sulfate est ajouté dans le milieu de culture, selon la réaction suivante : $S^{2-} + M^{+2} \rightarrow MS$ (où M est un ion métallique bivalent) favorisant ainsi une production concomitante de sulfure et la précipitation des métaux.

Certes la réduction de l'arséniate chez les BSR est un sujet qui a déjà suscité l'intérêt des scientifiques, cependant l'oxydation de l'arsénite par ces bactéries reste non abordée, à ce jour, en particulier en microaérophilie.

Comme cela a déjà été rapporté dans la partie bibliographique de cette étude, l'As(III) est très toxique. Il était donc important de savoir, au début de cette partie, dans quelle mesure cette forme réduite de l'arsenic n'était pas limitante pour la respiration sulfate.

Avant d'entamer cette partie, il était nécessaire de voir si nos isolats sulfato-réducteurs arrivaient à oxyder l'As(III) en poussant sur un milieu contenant du sulfate.

Ainsi, ils ont été mis en culture en présence d'As(III) à 3ppm, du sulfate à 20mM et avec une source de carbone qui est l'acétate à 2mM.

Aucune croissance n'a été notée, même après cinq mois d'incubation. Nos souches ne font donc pas intervenir de phosphorylation oxydative pour oxyder l'As(III) en présence de sulfate.

II.3. LEVÉE DE LA TOXICITÉ DE L'As(III) EN CONDITIONS SULFATO-RÉDUCTRICES

Pour élucider l'effet du sulfate sur la croissance bactérienne, en présence du métalloïde toxique : As(III), nous avons donc effectué des cinétiques de croissance sur des milieux pourvus et dépourvus de sulfate. Une cinétique témoin, croissance sur milieu avec sulfate et sans arsenic, a été aussi réalisée.

Ainsi la croissance bactérienne (densité optique à 580nm) et la production d'H₂S en fonction du temps ont été suivies et ceci en présence de 20 mM de pyruvate. L'As(III) et le sulfate sont rajoutés dans le milieu à une concentration respective de 0,04 mM (soit 4ppm) et 20 mM.

Les sept isolats testés (quatre mésophiles : Sij23, HEB223, LB4 et Lich23 et trois thermophiles : Lam5, Hbr5 et Hbr7) ont pu croître en présence d'As(III) à 4ppm, que le sulfate soit présent ou pas. Pour la clarté de la présentation de nos résultats, seulement les résultats obtenus avec deux souches : une souche mésophile (LB4) et une souche thermophile (Lam5) (figure 18), sont présentés.

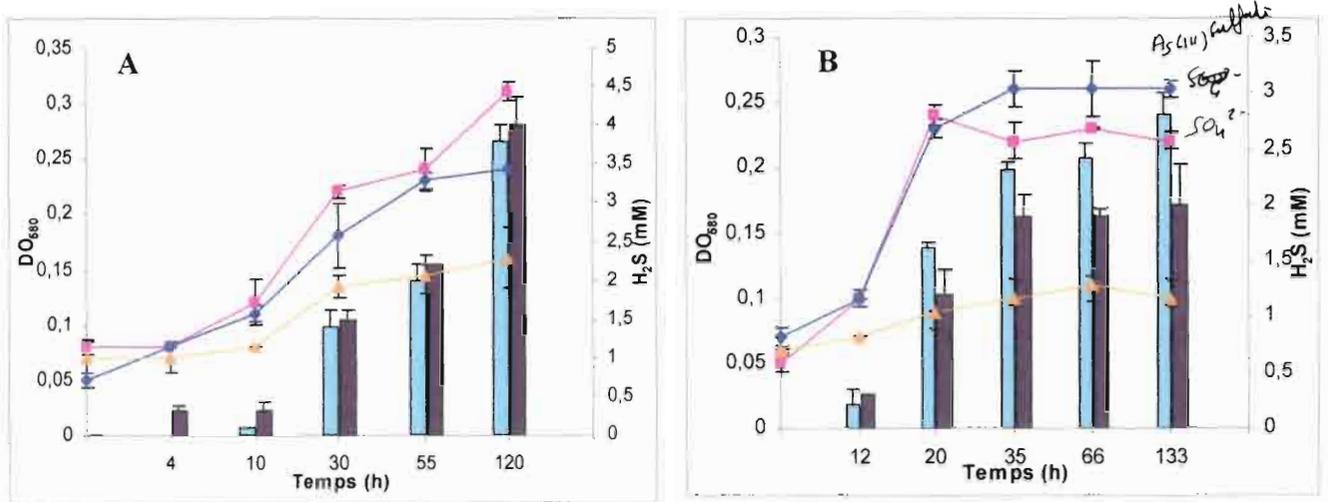


Figure 18. Courbes de croissance de la souche mésophile (A) LB4 et de la souche thermophile (B) Lam5 cultivées sur pyruvate en présence ou en absence (i) de sulfate et (ii) d'As(III) à 4 ppm et évolution de la production d'H₂S.

■ + sulfate - As(III) (cinétique témoin) ; ◆ + sulfate + As(III) ; ▲ - sulfate + As(III) ;
 ■ quantité d'H₂S produite en présence d'As(III) et ■ en son absence

La présence du sulfate dans le milieu améliore nettement la croissance bactérienne des deux BSR en présence d'arsenic. La présence de ce dernier inhibe en effet la croissance par fermentation sur pyruvate (Figure 18 A,B).

En revanche, la croissance bactérienne en présence seulement de sulfate (cinétique témoin), reste légèrement supérieure à celle avec sulfate et arsenic indiquant que l'As(III) a tendance à inhiber la croissance lors de la respiration sulfate. Ceci est particulièrement vrai pour la souche mésophile. La quantité d'H₂S produite et son évolution en fonction du temps n'ont pas été altérées par la présence de l'arsenic, puisqu'elles rappellent celles du témoin.

Nous aboutissons également aux mêmes conclusions avec la souche thermophile Lam5, si ce n'est que pour cette souche, la croissance sur milieu contenant du sulfate et de l'arsénite va au delà de celle sur milieu contenant du sulfate et la quantité d'H₂S produite est aussi plus élevée. Ceci est également remarqué chez les autres souches thermophiles (Hbr5 et Hbr7). Ceci laisse suggérer qu'à haute température, la toxicité de l'As(III) est atténuée et que ce métalloïde pourrait être une source potentielle d'électrons en présence de pyruvate conduisant à une phosphorylation oxydative.

II.3.1. Recherche du seuil de toxicité en As(III)

Afin de déterminer le seuil de toxicité en As(III) pour les BSR étudiées, des concentrations plus élevées ont été étudiées (0.1 et 0.5 mM, soit 10ppm et 50ppm), et ceci en présence ou en absence de sulfate, toujours en présence de 20mM de pyruvate. Un témoin sans arsenic a aussi été réalisé.

Les cinétiques de croissance des isolats mésophile (Lich23) et thermophile (Hbr5) et la production d'H₂S (figure 19) mettent en évidence et confirment l'effet favorable du sulfate, en présence de 10ppm d'As(III) sur la croissance bactérienne. La croissance sur pyruvate en présence d'arsenic est fortement affectée.

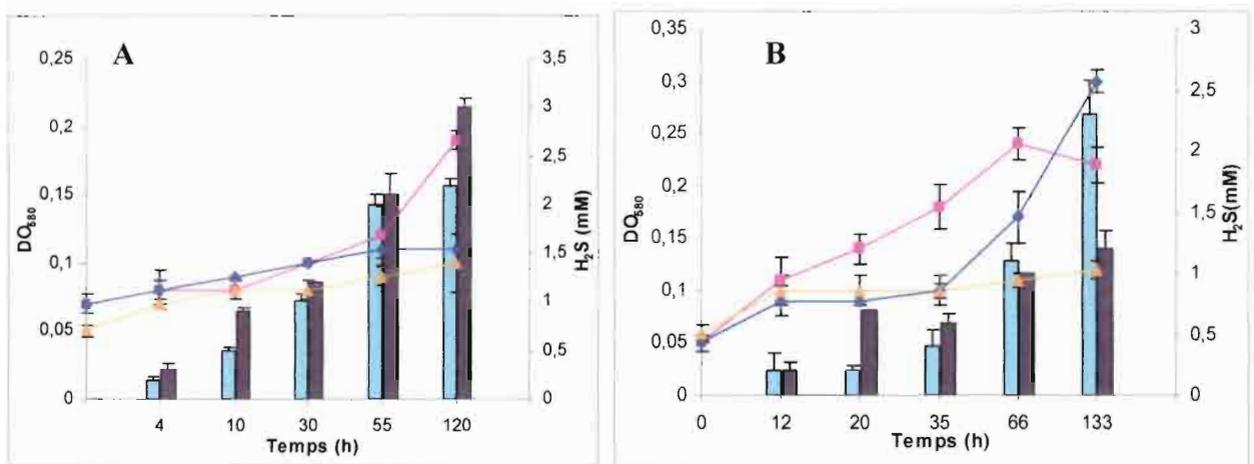


Figure 19. Courbes de croissance de la souche mésophile (A) Lich23 et de la souche thermophile (B) Hbr5 cultivées sur pyruvate en présence ou en absence (i) de sulfate et (ii) d'As(III) à 10ppm et évolution de la production d'H₂S.

■ + sulfate - As(III) (cinétique témoin) ; ◆ + sulfate + As(III) ; ▲ - sulfate et + As(III).
 ■ quantité d'H₂S produite en présence d'As(III) et ■ en son absence

L'analyse de ces diagrammes confirme aussi ce qui a été constaté en présence de 4ppm d'As(III) (expériences précédentes). En effet, la croissance et la production d'H₂S en présence de sulfate et d'arsénite dépasse la croissance du témoin, ne contenant que du sulfate, notamment à la fin de la phase exponentielle.

Si les deux souches mésophiles : Lich23 et Sij23 et toutes les souches thermophiles : Lam5, Hbr5 et Hbr7 ont pu pousser en présence seulement d'As(III) à 10ppm, la croissance des souches mésophiles LB4 et HEB223 n'a été constatée qu'après l'ajout de sulfate dans le milieu.

Les cinétiques de croissance à 50 ppm d'As(III) ne sont pas présentées, aucune des souches n'a pu pousser à cette concentration, même en présence de sulfate. Cette concentration devient létale pour les BSR étudiées.

Par conséquent, Le seuil de toxicité d'As(III), en présence de sulfate, pour toutes les BSR étudiées se trouve entre 10 et 50ppm.

A la différence d'autres bactéries anaérobies, certaines BSR tolèrent, sous des conditions particulières, l'exposition à l'oxygène (LeGall et Xavier, 1996) malgré une augmentation du potentiel d'oxydo-réduction du milieu.

La tolérance des BSR à l'oxygène est due au fait qu'elles ont développé des mécanismes de détoxification de l'O₂ (implication d'enzymes participant à la dégradation des métabolites cytotoxiques de l'oxygène comme la catalase, la superoxyde dismutase, la rubrédoxine oxydo-réductase, ...) tout en ayant la capacité d'oxyder certaines molécules organiques dont le polyglucose (LeGall et Xavier, 1996).

La respiration des BSR est essentiellement microaérophile. De ce fait des expositions prolongées à de fortes concentrations en oxygène, font perdre aux BSR non seulement leur viabilité mais également leur mobilité (Marshall *et al.*, 1993).

La question qui se pose, est maintenant de savoir quel est le comportement des BSR isolées en présence d'As(III) à de faibles pressions partielles en oxygène, dans le milieu de culture ? Les BSR sont-elles capables de l'oxyder et de récupérer de l'énergie de cette réaction, bien que l'As(III) soit considéré 60 fois plus toxique que l'As(V) (Squibb et Fowler, 1983 ; Tamaki et Frankenberger, 1992) ?

Certaines de ces réponses sont apportées dans la partie qui suit.

II.4. OXYDATION DE L'As(III) PAR LES BSR

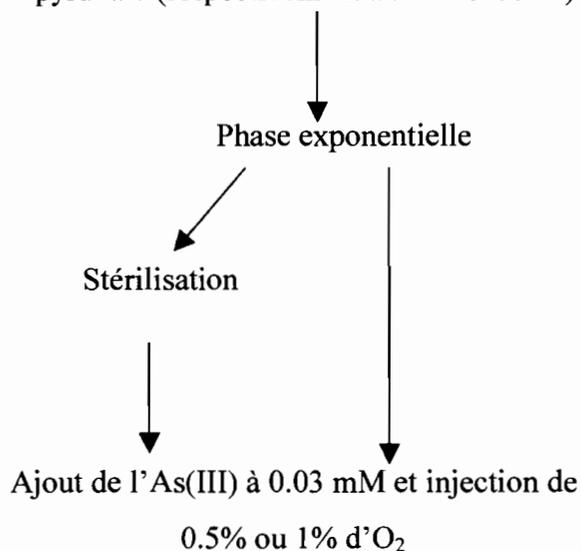
En amont de cette partie, une série de témoins biotiques et abiotiques en particulier ont été effectués. L'intérêt de ces témoins sera expliqué ultérieurement.

Le but de ce travail est de découvrir, chez ces micro-organismes, de nouveaux métabolismes originaux notamment dans le cadre de l'oxydation de l'arsenic sous de faibles pressions d'oxygène.

La capacité des BSR à oxyder l'arsénite [As(III)] en arséniate [As(V)] en conditions microaérophiles a été testée en mettant en culture deux souches, l'une thermophile (Lam5) et l'autre mésophile (HEB223) dans un milieu sélectif additionné de 0.03 mM d'As(III) et en injectant 0.5% ou 1% d'oxygène.

Nous avons adopté la méthodologie expérimentale suivante du fait qu'aucune croissance n'a pu être obtenue en présence seulement d'As(III) :

Culture des souches de BSR en présence de 20 mM de pyruvate (respectivement à 37°C et 55°C)



L'oxydation d'As(III) en As(V) est suivie en fonction du temps comme le montrent la figure 20 et le tableau 12 suivants.

Il est à noter que le milieu de culture contient 0.1g/l d'extrait de levure.

T : Témoin abiotique (= culture stérilisée) ; ND : non déterminé.

TI : Témoin inoculé

Tableau 12. Cinétique d'oxydation d'As(III) en présence de différentes quantités d'O₂
(100ppm=1mM=10⁵ppb)

Temps (j)	0	7	35	78	0	7	35	78
en ppm	As(III)	As(III)	As(III)	As(III)	As(V)	As(V)	As(V)	As(V)
HEB223								
TI - O ₂	2.87	2.61	2.97	1.03	0	0.37	0.51	1.63
TI + 0,5% O ₂	2.83	2.87	3.96	3.06	0	0.26	0.21	0.34
TI + 1% O ₂	2.83	2.44	3.56	3.27	0	ND	0.13	0.03
T - O ₂	2.53	2.59	2.81	2.58	0	0.03	0.08	0.16
T + 0,5% O ₂	2.94	3.01	3.59	3.18	0	0.09	0.17	0.11
T + 1% O ₂	3.19	3.28	3.97	3.48	0	0.10	0.13	0.03

Temps (j)	0	7	35	78	0	7	35	78
en ppm	As(III)	As(III)	As(III)	As(III)	As(V)	As(V)	As(V)	As(V)
Lam5								
TI - O ₂	3.03	2.43	1.36	1.19	0	0.68	1.52	1.77
TI + 0,5% O ₂	3.49	2.17	2.10	2.01	0	0.69	0.64	0.59
TI + 1% O ₂	3.10	2.60	2.38	2.49	ND	0.45	1.09	0.99
T - O ₂	3.48	3.26	3.87	3.74	0	0.07	0.17	0.24
T + 0,5% O ₂	2.84	2.76	2.87	3.07	0	0.07	0.08	0.12
T + 1% O ₂	3.03	2.74	3.61	3.41	0	0.06	0.13	0.13

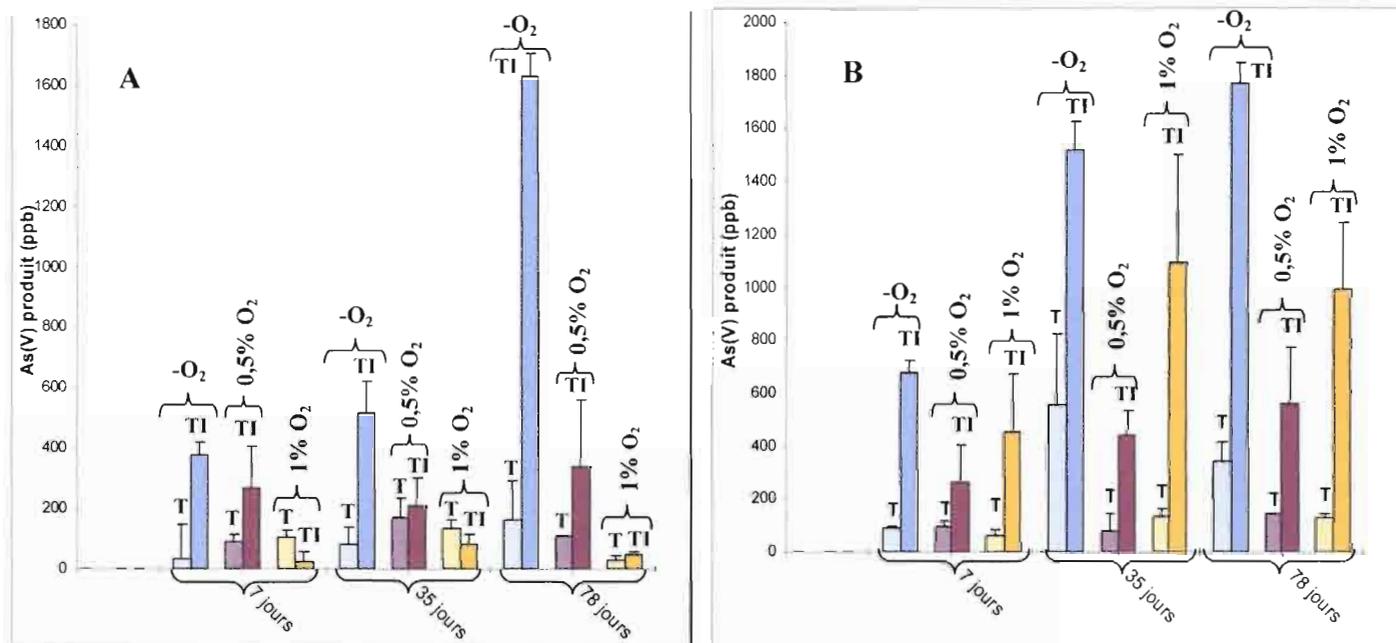


Figure 20. Cinétiques d'oxydation d'As(III) en présence de différentes quantités d'O₂ pour la souche (A)HEB223 et la souche (B)Lam5. (1mM=100ppm=10⁵ppb) (T= Témoin abiotique, TI=Témoin Inoculé)

La première conclusion que nous pouvons tirer de ces résultats est que, bien que l'As(III) soit plus toxique que l'As(V), comme nous l'avons dit précédemment (Squibb et Fowler, 1983 ; Tamaki et Frankenberger, 1992), il a été toléré, mais également oxydé par la souche mésophile HEB223 et la souche thermophile Lam5, en condition de microaérophilie. Ce qui signifie d'une part que les deux souches étudiées disposent du ou des mécanisme(s) de détoxification et de résistance enzymatiques vis-à-vis de l'As(III) (possession putative de l'arsénite oxydase), et d'autre part qu'elles sont à priori capables aussi d'utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons. En effet, aucun autre oxydant que l'oxygène n'est présent dans le milieu de culture. Certains composés soufrés comme le thiosulfate, le sulfate ou le sulfite (accepteurs d'électrons potentiels de nos souches) susceptibles d'apparaître après oxydation chimique du sulfure pouvant provenir de la fermentation de la cystéine contenue dans l'extrait de levure n'ont pas été détectés par HPLC ionique. Par ailleurs, nos souches se sont montrées incapables d'utiliser la cystine comme accepteur final d'électrons pouvant résulter de l'oxydation de la cystéine par l'oxygène présent dans le milieu.

Pour les deux souches, les meilleurs taux d'oxydation sont observés quand le milieu, est anaérobie mais non réduit, en absence théoriquement d'oxygène. Cependant, des traces d'O₂ sont susceptibles d'être présentes, mais non mesurables, en absence de réducteurs puissants comme le Na₂S ou la cystéine dans le milieu de culture. Malgré tout, plus le pourcentage d'oxygène augmente dans la phase gazeuse, et plus le taux d'oxydation d'As(III) en As(V) diminue, mais il reste supérieur au témoin stérilisé dans les mêmes conditions physico-chimiques du milieu. Des deux bactéries testées, Lam5 cultivée optimalement à 55°C apparaît comme étant la plus performante vis à vis de l'oxydation d'As(III).

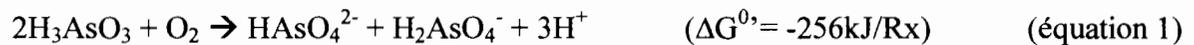
Il semblerait donc qu'une augmentation sensible de l'O₂ soit défavorable à cette réaction. Cette dernière se serait possible de manière optimale à de très faibles pressions partielles d'oxygène (nanoaérophilie ?).

D'une manière générale, les taux d'oxydation les plus élevés sont observés chez la souche thermophile (Lam5) plutôt que chez la souche mésophile (HEB223). En effet, la température agit sur l'énergie d'activation de la réaction d'oxydation (par phosphorylation oxydative) et l'accélère. Ceci peut aussi s'expliquer par l'augmentation du degré de solubilité de l'oxygène dissous sous l'effet de la température et donc la diminution de sa

biodisponibilité dans la phase gazeuse, conduisant à une moins grande toxicité de l'O₂ pour les BSR thermophiles.

Alors qu'au sein des bactéries aérobies, la première souche, *Bacillus arsenoxydans*, capable d'oxyder l'arsénite en arséniate, en présence d'oxygène, a été isolée par Green en 1918, il n'a jamais été rapporté chez les bactéries anaérobies comme les BSR, décrites pour certaines comme des microaérophiles, la capacité de pouvoir oxyder les métaux.

L'oxydation d'As(III), (équation 1) par les bactéries hétérotrophes, non sulfato-réductrices est considérée plutôt comme un mécanisme de détoxification, que comme un support de croissance, malgré le fait que la réaction soit exergonique (Santini *et al.*, 2000). Tel est probablement le cas aussi pour la plupart des BSR que nous avons isolées.



Nous pouvons conclure que pour le moment, les deux BSR testées ne révèlent aucune croissance en présence d'As(III) seul et d'O₂. Néanmoins, l'oxygène serait apparemment utilisé pour détoxifier l'arsénite en l'expulsant de la cellule sous la forme la moins toxique et la moins mobile, l'arséniate, qui entre probablement moins facilement dans la cellule (Oremland et Stolz, 2003).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Oifa HAOUARI ép. BEN SASSI

Etude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices originaires d'écosystèmes marins et hydrothermaux terrestres Tunisiens : Potentialités oxydo-réductrices de l'arsenic

Les études de microbiologie que nous avons menées sur 13 échantillons différents provenant des milieux marins et hydrothermaux du nord de la Tunisie, nous ont permis de mettre en évidence diverses populations bactériennes sulfato-réductrices mésophiles et thermophiles, en utilisant différents donneurs d'électrons et le sulfate comme accepteur final d'électrons.

Ces bactéries sulfato-réductrices (BSR) que nous avons isolées appartiennent d'une part aux Gram négatif avec des représentants de la famille des *Desulfovibrionaceae*, notamment le genre *Desulfovibrio* mais également à des Gram positif à faible teneur en G+C%, dont la famille des *Peptococcaceae* représentée par le genre *Desulfotomaculum*. Certaines de ces BSR appartiennent à des branches basses de l'arbre phylogénétique (famille des *Nitrospiraceae*) et plus précisément au genre *Thermodesulfovibrio*.

Dans le cadre de ce travail nous avons pu sélectionner trois BSR originales puis les caractériser phylogénétiquement, phénotypiquement et physiologiquement. La souche mésophile, modérément halophile MB3^T isolée d'un milieu marin Tunisien, constitue une nouvelle espèce du genre *Desulfovibrio* (*D. bizertensis*). La souche thermophile Lam5^T représente une nouvelle espèce du genre *Desulfotomaculum* (*D. hydrothermale*), alors que la souche thermophile Hbr5^T est une nouvelle espèce du genre *Thermodesulfovibrio* (*T. hydrogenophilus*). Ces deux dernières souches ont été isolées d'une source chaude terrestre située au nord de la Tunisie.

L'isolement de nombreuses BSR d'environnements marins et chauds confirment leur ubiquité et leur importance d'un point de vue biogéochimique notamment dans les sources hydrothermales terrestres où elles peuvent bénéficier d'une grande biodisponibilité de l'H₂ produit par des réactions abiotiques à haute température.

A cet égard, nous avons pu constater que *Thermodesulfovibrio hydrogenophilus*, isolée d'une source hydrothermale terrestre Tunisienne n'utilisant quasiment que l'hydrogène comme source d'énergie, phénomène rare chez les BSR qui sont capables d'utiliser également des acides organiques (lactate), des alcools primaires (éthanol, propanol et butanol) ou des sucres (fructose). Etant donné ses caractéristiques métaboliques, cette bactérie peut être considérée comme un producteur primaire de la source hydrothermale terrestre Tunisienne étudiée.

Les deux autres représentants du genre *Thermodesulfovibrio* : *T. yellowstonii* et *T. islandicus* présentent des phénotypes différents de la souche *T. hydrogenophilus* et ont été également isolées de sources hydrothermales terrestres.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les espèces du genre *Thermodesulfovibrio* seraient donc indigènes aux sources hydrothermales terrestres, avec des particularités métaboliques certainement conditionnées par la physico-chimie de leur milieu d'origine.

Nous avons également tenu au cours de ce travail à déceler des voies métaboliques originales chez nos isolats notamment dans le cadre de processus oxydo-réductifs.

En effet, les capacités métaboliques des BSR s'étendent jusqu'à la réduction des métaux lourds et métalloïdes : le chrome, le molybdate, le sélénium, le fer, le manganèse, l'uranium et l'arsenic (Lovley et Philips, 1992 ; Lovley, 1993 ; Newman *et al.*, 1997). Ce dernier a été choisi comme modèle d'étude au cours de ce travail, étant donné sa toxicité, son expansion dans la nature, et la rareté des expériences portant en particulier sur les capacités oxydo-réductrices de l'arsenic chez les BSR.

Ainsi, nous avons relevé, chez sept de nos BSR, leur aptitude à réduire l'arséniate [As(V)] en arsénite [As(III)], dénotant ainsi les mécanismes de résistance à ce métalloïde qui pourraient faire intervenir une arséniate réductase chez ces microorganismes.

Dans tous les cas de figure, la réduction directe d'As(V) en As(III) (en présence de pyruvate et en absence de sulfate) n'améliore cependant pas la croissance bactérienne. Elle n'est donc à priori pas couplée à une phosphorylation oxydative, contrairement à la réduction de composés soufrés chez les BSR. Ceci nous mène à conclure que les souches sulfato-réductrices testées fermentent préférentiellement le pyruvate tout en utilisant une partie des électrons libérés par oxydation de ce composé pour réduire l'arséniate et ainsi l'éliminer.

La réduction de l'arséniate peut être aussi obtenue d'une manière indirecte. Le suivi de l'évolution de la croissance bactérienne, en présence de sulfate comme accepteur final d'électrons a montré que les souches de BSR testées sont plus aptes, dans ces conditions, à réduire l'arsenic lors de l'oxydation du pyruvate. Le sulfate permet aux bactéries de croître plus rapidement malgré la présence du métalloïde en diminuant ainsi sa toxicité. Cette réduction indirecte de l'arsenic est chimique et elle est due vraisemblablement à l'action d'H₂S produit par les BSR sur le métalloïde. Dans ces conditions de croissance (pyruvate +

arséniate + sulfate), l'une de nos souches (souche SIJ23) se montrerait capable de réduire l'arséniate en récupérant de l'énergie lors de cette réduction.

Nous avons pu montrer également aussi qu'en présence de sulfate, la toxicité de l'arsénite [As(III)] était amoindrie. En effet, la voie sulfato-réductrice améliore nettement la croissance bactérienne des isolats cultivés en présence d'arsenic et permet à deux souches mésophiles, (LB4 et HEB223) en particulier, de croître sur un milieu contenant jusqu'à 10ppm d'As(III). A cette concentration d'arsenic, aucune croissance n'était possible en absence de sulfate.

Le comportement de certains de nos isolats vis à vis de l'As(III) a été également étudié en conditions d'oxydation, notamment en condition microaérophile.

En présence d'As(III) (3ppm) et de faibles pressions partielles en oxygène (0%, 0.5% et 1% d'O₂) dans le milieu de culture, les BSR isolées ont pu croître malgré la toxicité élevée de cette forme réduite de l'arsenic.

Les meilleurs taux d'oxydation ont cependant été observés dans un milieu ne contenant pas de réducteurs où des traces d'O₂ sont susceptibles d'être présentes. De manière assez surprenante, l'augmentation de l'O₂ dans la phase gazeuse diminue cette capacité oxydative de l'As(III) suggérant que cette réaction ne s'effectuerait que dans des conditions de très faibles pressions partielles en oxygène en deçà du seuil minimum détectable par catharométrie. A la suite de ces expériences, nous avons pu conclure que deux souches, l'une mésophile (HEB223) et l'autre thermophile (Lam5) ont la capacité d'utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Néanmoins, nous ne connaissons pas les mécanismes biologiques mis en place par ces BSR lors de ce processus oxydatif.

C'est donc la première fois qu'il est mis en évidence chez les anaérobies et plus particulièrement les BSR de telles capacités oxydatives.

Nos résultats viennent donc dévoiler d'autres aspects métaboliques originaux chez ces microorganismes reconnus pour certains comme étant capables de réduire l'O₂ en condition micro-nanoaérophile.

Nous avons montré au cours de cette étude que les BSR les plus performantes dans le cas de réduction et d'oxydation de l'arsenic sont plutôt les souches thermophiles. Concernant le processus oxydatif, la température pourrait agir sur l'énergie d'activation de la réaction d'oxydation en accélérant de ce fait ce processus. Elle diminuerait d'autre part la solubilisation de l'oxygène qui serait donc moins toxique vis à vis des BSR thermophiles lors des réactions oxydatives de l'arsenic.

La résistance constatée des BSR à l'arsenic laisse donc suggérer qu'elles jouent un rôle important dans le cycle biogéochimique des métaux et des métalloïdes en particulier dans la nature, pouvant aussi bien les réduire que les oxyder en micro-nanoaérophilie.

Par ailleurs, les performances obtenues par ces microorganismes nous laissent envisager leur utilisation dans des procédés biotechnologiques de bioremédiation d'environnements contaminés par les métaux lourds, et nous permettent de mieux définir leur rôle écologique notamment à l'interface aérobie-anaérobie.

A cet effet, le génome de la souche thermophile Lam5 : *Desulfotomaculum hydrothermale*, est actuellement en cours de séquençage. Elle a en effet montré les meilleures potentialités oxydo-réductrices vis à vis de l'arsenic. Nous pourrions savoir bientôt si elle possède des gènes codant pour des protéines intervenant dans la réduction comme dans l'oxydation de l'arsenic et éventuellement rechercher les cytochromes qui pourraient également jouer un rôle dans la tolérance à l'arsenic.

Sur la base de nos résultats, il apparaît désormais nécessaire d'entreprendre des études post-génomiques, (protéomique) sur les souches qui ont montré des capacités potentielles d'oxydo-réduction de l'arsenic afin d'aboutir à une analyse assez exhaustive de l'impact de ce métalloïde sur la physiologie et le métabolisme de ces microorganismes. Ainsi, nous pourrions mieux appréhender leur rôle in situ et leur implication dans les processus biogéochimiques d'oxydo-réduction de l'arsenic. Grâce à l'approche protéomique en particulier, il sera possible de (i) faire l'inventaire des protéines des bactéries sulfato-réductrices étudiées et les quantifier durant chaque phase de croissance, en présence d'arsenic et sous différentes conditions de culture (suivi de la dynamique des protéomes), (ii) caractériser les entités moléculaires (protéines anti stress, protéines chélatantes, transporteurs d'électrons, etc) et les voies biochimiques perturbées, modifiées ou induites par le métalloïde afin d'expliquer soit sa toxicité, soit sa tolérance par la bactérie, et (iii) analyser la perception du stress métallique par la bactérie et la cascade de réactions biochimiques mises en jeu dans la signalisation de celui-ci.

Une telle approche nous permettra de comprendre davantage le comportement de la souche mésophile Sij23 dont nous avons vu qu'elle était capable de mieux croître sur un milieu contenant du sulfate et de l'As(V) qu'en présence de sulfate seulement.

Bien que notre étude n'ait concerné qu'un seul métalloïde toxique : l'arsenic, il serait intéressant d'étudier d'autres métaux afin de connaître les réelles potentialités

biotechnologiques de nos isolats, dans le cadre de la bioremédiation des effluents contaminés par les métaux lourds.

BIBLIOGRAPHIE

Olfa HAOUARI ép. BEN SASSI

Etude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices originaires d'écosystèmes marins et hydrothermaux terrestres Tunisiens : Potentialités oxydo-réductrices de l'arsenic

A

- Abdollahi H. and Wimpenny J.W.T. (1990).** Effects of oxygen on the growth of *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1025-1030.
- Abildgaard L., Ramsing B.N. and Finster K. (2004).** Characterization of the marine propionate-degrading, sulfate-reducing bacterium *Desulfofaba fastidiosa* sp. nov. and reclassification of *Desulfomusa hansenii* as *Desulfofaba hansenii* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 393-399.
- Abram J.W. and Nedwell D.B. (1987).** Inhibition of methanogenesis by sulphate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. *Arch Microbiol.* 117, 89-92.
- Achenbach-Richter L., Stetter K.O., and Woese C.R.. (1987).** A possible biochemical missing link among *Archaeobacteria*. *Nature.* 327, 348–349.
- Aeckersberg F., Bak F. and Widdel F. (1991).** Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch Microbiol.* 156, 5-14.
- Ahmann D., Roberts A.L., Krumholz L.R. and Morel F.M. (1994).** Microbe grows by reducing arsenic. *Nature.* 371, 750.
- Alazard D., Dukan S., Urios A., Verhé F., Bouabida N., Morel F., Thomas P., Garcia J.-L. and Ollivier B. (2003).** *Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 53, 173-178.
- Audiffren C., Cayol J.-L., Joulain C., Casalot L., Thomas P., Garcia J.-L. and Ollivier B. (2003).** *Desulfonauticus submarinus* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 53, 1585-1590.

B

- Baena S., Fardeau M.-L., Labat M., Ollivier B., Garcia J.-I. and Patel B.K.C. (1998).** *Desulfovibrio aminophilus* sp. nov., a novel aminoacid degrading and sulfate reducing bacterium from an anaerobic dairy wastewater lagoon. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 498-504.
- Bak F. and Pfennig N. (1991).** Microbial sulfate-reducing in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. letters.* 85, 31-42.
- Bale S.J., Goodman K., Rochelle P.A., Marchesi J.R., Fry J.C., Weightman A.J. and Parkes R.J. (1997).** *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing

bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea. *Int. J. System. Bacteriol.* 47, 515-521.

Bastin E., Anderson B., Greer F.E., Merrit C.A., and Moulton G. (1926). The problem of the natural reduction of sulphates. *Bulletin of the American Association of the Petroleum Geologists Rev.* 10, 1270-1299.

Battaglia-Brunet F., Dictor M.-C., Garrido F., Crouzet C., Morin D., Dekeyser K., Clarens M. and Baranger P. (2002). An arsenic(III)-oxidising bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *J. Appl. Microbiol.* 93, 656-667.

Beeder J., Torsvik T. and Lien T.L. (1995). *Thermodesulforhabdus norvegicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium from oil field water. *Arch Microbiol.* 164, 331- 336.

Ben Dhia Thabet O., Fardeau M.-L., Suarez-Nuñez C., Hamdi M., Thomas P., Ollivier B. and Alazard D. (2007). *Desulfovibrio marinus* sp. nov., a novel moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from marine sediments in Tunisia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2167-2170.

Blank C.E., Cady S.L. and Pace N.R. (2002). Microbial composition of near-boiling silica-depositing thermal springs throughout Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5123–5135.

Bohari Y., Astruc A., Astruc M. and Cloud J. (2001). Improvements of hydride generation for the speciation of arsenic in natural freshwater samples by HPLC-HG-AFS. *J. Anal. At. Spectrom.* 16, 774-778.

Boyle A.W., Phelps C.D. and Young L.Y. (1999). Isolation from estuarine sediments of a *Desulfovibrio* strain which can grow on lactate coupled to the reductive dehalogenation of 2,4,6-tribromophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1133-1140.

Brandt K.K., Shneider C., Fuchs G. and Widdel F. (1999). *Desulfocella halophila* gen. nov., sp. nov., a halophilic, fatty-acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of the Great Salt Lake. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 193-200.

Brock T.D. (1986). Introduction: an overview of the thermophiles. In 'Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology'. T.D. Brock (ed). Wiley inter-science, New-York. pp 1-16.

Brock T.D. and Freeze H. (1969). *Thermus aquaticus* gen.n. and sp.n., a non sporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* 98, 289-297.

Brock T.D., Madigan M.T., Martinko J.N. and Parker J. (2003). Biology of microorganisms. Pearson Education, Inc. pp. 632-376.

Bruschi M., Barton L.L., Goulhen F. and Plunkett R.M. (2007). Enzymatic and genomic studies on the reduction of mercury and selected metallic oxyanions by sulphate-reducing bacteria. In 'Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems'. Barton L.L. and Hamilton W.A. (eds). Chapitre 15. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 435-457.

C

Cashion P., Holder-Franklin M.A., McCully J. and Franklin M. (1977). A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem.* 81, 467-476.

Castro H.F., Williams N.H. and Orgam A. (2000). Phylogeny of sulfate reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 1-9.

Coleman G.S. (1960). A sulfate-reducing bacteria from the sheep rumen. *J. Gen. Microbiol.* 22, 423-436.

Cord-Ruwisch R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 4, 33-36.

Cypionka H. (2000). Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 54, 827-848.

Cypionka H., Widdel F. and Pfennig N. (1985). Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiol. Lett.* 31, 39-45.

D

Devereux R., Delaney M., Widdel F. and Stahl D.A. (1989). Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria. *J. Bacteriol.* 171, 6689-6695.

Dilling W. and Cypionka H. (1990). Aerobic respiration in sulphate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 71, 123-128.

E

Escara JF. and Huton J.R. (1980). Thermal stability and renaturation of DNA in dimethyl sulfoxide solutions: acceleration of the renaturation rate. *Biopolymers.* 19, 1315-1327.

F

Fauque G. and Ollivier B. (2004). Anaerobes: The Sulfate-Reducing Bacteria as an example of metabolic diversity. In 'Microbial Diversity and Bioprospecting'. Chapitre 17. Bull A.T. (ed.), ASM Press, Washington. pp.169-176.

- Fauque G., Peck H.D. Jr., Moura J.J.G., Huynh B.H., Berlier Y., DerVartanian D.V., Teixeira M., Przybyla A.E., Lespinat P.A., Moura I. and LeGall J. (1988).** The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. *FEMS Microbiol. Rev.* 54, 299-344.
- Fauque G., Cayol J-L. and Ollivier B. (2004).** Les bactéries sulfato-réductrices: aspects environnementaux et métaboliques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 19, 85-91.
- Fauque G., LeGall J. and Barton L.L. (1991).** Sulfate-reducing and sulfur-reducing Bacteria. In 'Variations in Autotrophic Life'. J.M. Shively and L.L. Barton (eds), Academic Press Limited, London , pp. 271-337.
- Fauque G.D. (1995).** Ecology of sulfate reducing bacteria. In 'Sulfate reducing bacteria'. L.L. Barton (ed.), Biotechnology Handbooks, vol.8,. Plenum Press, New York. pp. 217-241.
- Feio M.J., Zinkevich V., Beech I.B., Llobet-Brossa E., Eaton P., Schmitt J. and Guezennec J. (2004).** *Desulfovibrio alaskensis* sp. nov., a sulphate-reducing bacterium from a soured oil reservoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1747-1752.
- Finster K., Liesack W. and Tindball B.J. (1997).** *Desulfospira joergensenii*, gen. nov., sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium isolated from marine surface sediment. *System. Appl. Microbiol.* 20, 201-208.
- Foti M., Sorokin D.Y., Lomans B., Mussman M., Zacharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G. and Muyzer G. (2007)** Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2093-2100.
- Fournier M., Zhang Y., Wildschut J.D., Dolla A, Voordouw J.K., Schriemer D.C. and Voordouw G. (2003).** Function of oxygen resistance proteins in the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. . *J. Bacteriol.* 185, 71-79.
- Fry N.K., Fredrickson J.K., Fishbain S., Wagner M. and Stahl D.A. (1997).** Population structure of microbial communities associated with two deep, anaerobic, alkaline aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1498-1504.
- Fukui M., Teske A., Aßmus B., Muyzer G. and Widdel F. (1999).** Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*). *Arch. Microbiol.* 172, 193-203.
- G**
- Gihring T.M. and Banfield J.F. (2001).** Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 335-340.

Goldhaber M.B. and Kaplan I.R. (1974). The sulfur cycle. In 'Marine chemistry. The sea: ideas and observations on progress in the study of the seas'. E.D. Goldberg (ed.). pp. 569-655.

Goorisen H.P., Boschker H.T., Stam A.J. and Hansen T.A. (2003). Isolation of thermophilic *Desulfotomaculum* strains with methanol and sulfite from solfataric mud pools, and characterization of *Desulfotomaculum solfataricum* sp. nov. *Int. J. Evol. Microbiol.* 53, 1223–1229.

Green H.H. (1918). Description of a bacterium which oxidizes arsenite to arsenate, and of one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. *S. Afr. J. Sci.* 14, 465-467.

H

Hall L.L., George S.E., Kohan M.J., Styblo M. and Thomas D.J. (1997). In vitro methylation of inorganic arsenic in mouse intestinal cecum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 101-109.

Haouari O., Fardeau M.-L., Casalot L., Tholozan J.-L., Hamdi M. and Ollivier B. (2006). Isolation of sulfate-reducing bacteria from Tunisian marine sediments and description of *Desulfovibrio bizertensis* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2909-2913.

Harms G., Zengler K., Rabus R., Aeckersberg F., Minz D., Rosselló-Mora R. and Widdel M. (1999). Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 999–1004.

Hatchikian E.C. and Zeikus J.G. (1983). Characterization of a new type of dissimilatory sulfite reductase present in *Thermodesulfobacterium commune*. *J. Bacteriol.* 153, 1211–1220.

Hattori S., Kamagata Y., Hanada S. and Shoun H. (2000). *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1601-1609.

Henry E.A., Devereux R., Maki J.S., Gilmour C.C., Woese C.R., Mandelco L., Schauder R., Remsen C.C. and Mitchell R. (1994). Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain. *Arch. Microbiol.* 161, 62–69.

Herbel M.J., Blum J.S., Hoefft S.E., Cohen S.M., Arnold L.L., Lisak J., Stolz J F. and Oremland R.S. (2002). Dissimilatory arsenate reductase activity and arsenate-respiring bacteria in bovine rumen fluid, hamster feces, and the termite hindgut. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41, 59-67.

Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K.L. and Pace N.R. (1998). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* 180, 366-376.

Hungate R.E. (1969). Roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes. In 'Methods in microbiology'. vol. 3B. R. Norris and D. W. Ribbons (eds). New York: Academic Press. pp. 117-132.

Huss VAR., Festel H. and Scheifer K.H. (1983). Studies on the spectrometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst. Appl. Microbiol.* 44, 184-192.

I

Itoh T., Suzuki K.-I., Sanchez P.C. and Nakase T. (1999). *Caldivirga maquilingensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines. *Int. J. System. Bacteriol.*, 49, 1157-1163.

Itoh T., Suzuki K.-I. and Nakase T. (1998). *Thermocladium modestius* gen. nov. sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48, 879-887.

J

Jellouli A. (2000). La Tunisie thermale. Office du thermalisme. 193 p.

Johnson D.B., Okibe N. and Roberto F.F. (2003). Novel thermo-acidophilic bacteria isolated from geothermal sites in Yellowstone National Park: physiological and phylogenetic characteristics. *Arch. Microbiol.* 180, 60-68.

Jørgensen B.B. (1982). Mineralization of organic matter in the sea-bed – The role of sulfate reduction. *Nature.* 269, 643-645.

Jørgensen B.B. (1988). Ecology of the sulphur cycle: Oxidative pathways in sediments. In 'The Nitrogen and Sulphur Cycles'. J.A. Cole and S.J. Ferguson (eds). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 31-63.

Jørgensen B.B. and Bak F. (1991). Pathways and microbiology of thiosulfate transformation and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 847- 856.

Jørgensen B.B. and Kasten S. (2006). Sulfur cycling and methane oxidation. In 'Marine Geochemistry' H.D. Schulz and M. Zabel (eds) Springer, Second edition. Chapter 8. pp. 271-309.

K

Kaltreider R.C., Davis A.M., Lariviere J.P. and Hamilton J.W. (2001). Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environ. Health Perspect.* 109, 245-251.

King J.K., Kostka J.E., Frrisher M.E. and Saunders F. (2000). Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture sediments. *App. Environ. Microbiol.* 66, 2430-2437.

Kniemeyer O., Fischer T., Wilkes H., Glöckner F.O. and Widdel F. (2003). Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 69, 760-768.

Knoblauch C, Sahm K. and Jørgensen B.B. (1999). Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1631-1643.

Koji M., Hongik K., Takeshi K. and Satoshi H. (2003). A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. *Extremophiles.* 7, 283-290.

Krekeler D., Sigalevich P., Teske A., Cypionka H. and Cohen Y. (2004). A sulfate-reducing bacterium from the oxic layer of a microbial mat from Solar Lake (Sinai), *Desulfovibrio oxycliniae* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 167, 369-375.

L

Larkin JM. and Strohl W.R. (1983). *Beggiatoa, Thiothrix and Thioploca.* *Annu. Rev. Microbiol.* 37, 341-367.

Laverman A. M., Blum J. S., Schaefer J. K., Phillips E., Lovley D. R. and Oremland R. S. (1995). Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3556-3561.

- Le Faou A., Rajagopal B. S., Daniels L. and Fauque G. (1990).** Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world. *FEMS Microbiol. Rev.* 75, 351-382.
- Le Gall J. and Xavier A.V. (1996).** Anaerobes response to oxygen: the sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe.* 2, 1-9.
- LeGall J. and Fauque G. (1988).** Dissimilatory reduction of sulfur compounds. In 'Biology of Anaerobic Microorganisms'. A.J.B. Zehnder (ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 587-639.
- Leloup J., Loy A., Knab N.J., Borowski C., Wagner M. and Jørgensen B.B. (2007).** Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ. Microbiol.* 9, 131-142.
- Li X. and Krumholz L.R. (2007).** Regulation of arsenate resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* G20 by an *arsRBCC* operon and an *arsC* gene. *J Bacteriol.* 189, 3705-3711.
- Liu X., Bagwell C.E., Wu L., Devol A.H. and Zhou J. (2003).** Molecular diversity of sulfate-reducing bacteria from two different continental margin habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6073-6081.
- Liu Y., Karnauchow T.M., Jarrell K.F., Balkwill D.L., Drake G.R., Ringelberg D., Clarno R. and Boone D.R. (1997).** Description of two new thermophilic *Desulfotomaculum* sp., *Desulfotomaculum putei* sp. nov., from a deep terrestrial subsurface, and *Desulfotomaculum luciae* sp. nov., from a hot spring. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 615-621.
- Love A.C., Patel B.K., Nichols P.D. and Stackebrandt E. (1993).** *Desulfotomaculum australicum*, sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from the Great Artesian Basin of Australia. *Syst. Appl. Microbiol.* 16, 244-251.
- Lovley D.R. (1993).** Dissimilatory metal reduction. *Ann. Rev. Microbiol.* 47, 263-290.
- Lovley D.R. and Philips E.J.P. (1992).** Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 850-856.

M

- Macy J. M., Santini J. M., Pauling B. V., O'Neill A. H. and Sly L. I. (2000).** Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Arch. Microbiol.* 173, 49-57.

- Madigan M. and Martinko J. (2007).** Brock Biologie des micro-organismes. 11^{ème} édition (Edition Française). Pearson Education France. Paris. 1047p.
- Marschall C., Frenzel C. and Cypionka H. (1993).** Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 135, 168-173.
- Mesbah M., Premachandran U. and Whitman W.B. (1989).** Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 159-167.
- Miller T.L. and Wolin M.J. (1974).** A serum bottle modification of Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* 27, 985-987.
- Miranda-Tello E., Fardeau M-L., Fernández L., Ramírez F., Cayol J-L., Thomas P., Garcia J-L. and Ollivier B. (2003).** *Desulfovibrio capillatus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from an oil field separator located in the Gulf of Mexico. *Anaerobe.* 9, 997-1003.
- Morel F.M.M. and Hering J.G. (1993).** Principles and applications of aquatic chemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York. 371p.
- Mori K., Kim H., Kakegawa T. and Hanada S. (2003).** A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. *Extremophiles.* 7, 283-290.
- Moura J.J.G., Gonzalez P., Moura I. and Fauque G. (2007).** Dissimilatory nitrate and nitrite ammonification by sulphate-reducing eubacteria. In 'Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems'. Barton L.L. and Hamilton W.A. (eds). Chapter 8. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 241-264.
- Mukhopadhyay A., Redding A.M., Joachimiak M.P., Arkin A.P., Borglin S.E., Dehal P.S., Chakraborty R., Geller J.T., Hazen T.C., He Q., Joyner D.C., Martin V.J., Wall J.D., Yang Z.K., Zhou J. and Keasling J.D. (2007).** Cell-wide responses to low-oxygen exposure in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Bacteriol.* 189, 5996-6010.
- Mukhopadhyay R., Rosen B.P., Phung L.T. and Silver S. (2002).** Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 311-325.
- Mußmann M., Ishii K., Rabus R., and Amann R. (2005).** Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured *Deltaproteobacteria* in an intertidal mudflat of the Wadden Sea. *Environ. Microbiol.* 7, 405-418.

N

Nakagawa T., Sato S., Yamamoto Y. and Fukui M. (2002). Successive changes in community structures of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. *Water Res.* 36, 2813–2823.

Newman D.K., Kennedy E.K., Coates J.D., Ahmann D., Ellis D.J., Lovley D.R. and Morel F.M.M. (1997). Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 168, 380-388.

Niggemeyer A., Spring S., Stackenbrandt E. and Rosenzweig R.F. (2001). Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5568-5580.

O

Office du thermalisme. (2003). Principales manifestations thermominérales en Tunisie : Données utiles. Ministère du tourisme, du commerce et de l'artisanat, 207p.

Ollivier B., Caumette P., Garcia J.-L. and Mah R.A. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Rev.*, 58, 27-38.

Ollivier B., Cayol J.-L. and Fauque G. (2007). Sulphate-reducing bacteria from oil field environments and deep-sea hydrothermal vents. In 'Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems'. Barton L.L. and Hamilton W.A. (eds). Chapitre 10. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 305-328.

Oremland R.S. and Stolz J.F. (2003). The ecology of arsenic. *Science.* 300, 939-944.

Oremland R.S., Newman D.K., Wail B.W. and Stolz J.F. (2001). Bacterial respiration of arsenate and its significance in the environment. In 'Environmental Chemistry of Arsenic'. Frankenberger Jr. W.T. (ed). Marcel Dekker, New York, pp. 273-296.

P

Peck H.D.Jr. (1993). Bioenergetics strategies of the sulfate-reducing bacteria, In 'The Sulfate-Reducing Bacteria : Contemporary Perspectives. Brock / Springer Series in Contemporary Bioscience'. Odom J.M. and Singleton R.Jr. (eds), Springer Verlag, New York Inc., pp. 41-76.

Pelmont J. (1993). Soufre et hydrogène. In 'Bactéries et environnement, adaptations physiologiques'. Chapitre 25. Presses Universitaires de Grenoble. pp. 633-668.

Pikuta E.V., Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Kostrikina N.A., Osipov G.A. and Raynet F.A. (1998). *Desulfonatronum lacustre* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic sulfate-reducing bacterium utilizing ethanol. *Microbiology (Engl. Tr. Mikrobiologiya)*, 67, 123-131.

Postgate J.R. and Campbell L.L. (1966). Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 30, 732-738.

Purdy K.J., Nedwell D.B., Embley T.M., and Takii S. (2001). Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulfate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 165–168.

R

Rabus R., Hansen T.A. and Widdel F. (2006). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In 'Prokaryotes 2'. Chapter 1.22. pp. 659–768.

Ravenschlag K., Sahn K., Knoblauch C., Jørgensen B.B. and Amann R. (2000). Community structure, cellular rRNA content and activity of sulfate reducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3592–3602.

Rees G.N., Grassia G.S., Sheehy A.J., Dwivedi P.P. and Patel B.K.C. (1995). *Desulfacinum infernum* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate reducing bacterium from a petroleum reservoir. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 85-89.

Rees G.N., Harfoot C.G. and Sherry A.J. (1998). Amino acid degradation by mesophilic sulfate-reducing bacterium *Desulfobacterium vacuolatum*. *Arch. Microbiol.* 169, 76-80.

Reichenbecher W. and Schink B. (1997). *Desulfovibrio inopinatus*, sp. nov., a new sulphate-reducing bacterium that degrades hydroxyhydroquinone (1,2,4-trihydroxybenzene). *Arch Microbiol.* 168, 338-344.

Rosen B.P. (2002). Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 529, 86-92.

S

Salmassi T.M., Venkateswaren K., Satoni M., Nealson K.H., Newman D.K. and Hering J.G. (2002). Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiol. J.* 19, 53-66.

Saltikov C.W. and Newman D.K. (2003). Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100, 10983-10988.

Santini J.M., Sly L.I., Schnagl R.D. and Macy J.M. (2000). A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 92-97.

Santini J.M., Sly L.I., Wen A., Comrie D., De Wulf-Durand P. and Macy J.M. (2002). New chemolithoautotrophic arsenite oxidising bacteria isolated from Australian gold mining environments-phylogenetic relationships. *Geomicrobiol. J.* 19, 67-76.

- Schnell S., Bak F. and Pfennig N. (1989).** Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. *Arch. Microbiol.* 152, 556-563.
- Sievert S.M. and Kuever J. (2000).** *Desulfacinum hydrothermale* sp., nov., a thermophilic, sulfate reducing bacterium from geothermally heated sediments near Milos Island (Greece). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1239-1246.
- Smedley P.L. and Kinniburgh D.G. (2002).** A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17, 517-568.
- Smedley P.L., Kinniburgh D.G., Huq I., Zhen-dong L. and Nicolli H.B. (2001).** In 'Arsenic Exposure and Health Effects IV'. Chapell W.R., Abernathy C.O. and Calderone R.L. (eds.). Natural Environment Research Council, Elsevier Science, London. pp. 9-25.
- Smith D.W. (1993).** Ecological actions of sulfate reducing bacteria, In 'The sulfate-reducing bacteria: Contemporary Perspectives'. Odom J.M. and Singleton R.Jr. (eds.), Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer-Verlag, New York. pp. 161-188.
- Sonne-Hansen J. and Ahring B.K. (1999).** *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp. nov., and *Thermodesulfovibrio islandicus* sp. nov., two thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from a Icelandic hot spring. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 559-564.
- Squibb K.S. and Fowler B.A. (1983).** The toxicity of arsenic and its compounds. In 'Biological and Environmental Effects of Arsenic'. Fowler B.A. (ed). New York: Elsevier. pp. 223-269.
- Stackebrandt E., Sporer C., Rainey F.A., Burghardt J., Pauker O. and Hippe H. (1997).** Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1134-1139.
- Stams A.J.M., Hansen T.A. and Skyring G.W. (1985).** Utilization of amino acids as energy substrates by two marine *Desulfovibrio* strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 3, 11-15.
- Stetter K.O. (1996).** Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 149-158.
- Stolz J.F., and Basu P. (2002).** Evolution of Nitrate reductase : Molecular and structural variations on a Common Function. *ChemBioChem.* 3, 198-206.
- Stolz J.F., Basu P., Santini J.M. and Oremland R.S. (2006).** Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 107-130.

Stolz J.F., Ellis D.J., Switzer Blum J., Ahmann D. and Oremland R.S. (1999). *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. *Sulfurospirillum arseophilus* sp. nov., and the *Sulfurospirillum* clade in the Epsilon *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1177-1180.

Switzer Blum J., Burns Bindi A., Buzzelli J., Stolz J.F. and Oremland R.S. (1998). *Bacillus arsenicoselenatis* sp. nov., and *Bacillus selenitireducens* sp. nov. : two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.* 171, 19-30.

T

Takai K. and Horikoshi K. (1999). Genetic diversity of *Archaea* in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics.* 152, 1285-1297.

Tamaki S. and Frankenberger W.T.Jr. (1992). Environmental biochemistry of arsenic. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 124, 79-110.

Thevenieau F., Fardeau M.-L., Ollivier B., Joulain C. and Baena S. (2007). *Desulfomicrobium thermophilum* sp. nov., a novel thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Colombia. *Extremophiles.* 11, 295-303.

Tortora G.J., Funke B.R. and Case Ch.L. (2003). Introduction à la microbiologie. Editions du renouveau pédagogique inc (ERPI). Canada. 930p.

Trandrup B., Finster K., Hansen J.W. and Bak F. (1993). Bacterial disproportionation of element sulfur coupled to chemical reduction of iron and manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 101-108.

Trudinger P.A. and Chambers L.A. (1985). Low-temperature sulfate reduction: biological versus abiological. *Can. J. Earth Sci.* 22, 1910-1918.

Tsu I I., Huang C., Garcia J., Patel BKC., Cayol JL., Baresi L. and Mah RA. (1998). Isolation and characterization of *Desulfovibrio senezii* sp. nov., A halotolerant sulfate reducer from a solar saltern and phylogenetic confirmation of *Desulfovibrio fructosovorans* as a new species. *Arch. Microbiol.* 170, 313-317.

V

van der Maarel, M.J., van Bergeijk S., van Werkhoven A.F., Laverman A.M., Meijer W.G., Stam W.T. and Hansen T.A. (1996). Cleavage of dimethylsulfoniopropionate and reduction of acrylate by *Desulfovibrio acrylicus* sp. nov.. *Arch. Microbiol.* 166, 109-115.

Vandieken V., Knoblauch C. and Jørgensen B.B. (2006). *Desulfotomaculum arcticum* sp. nov., a novel spore-forming, moderately thermophilic, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 687-690.

W

Widdel F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. In 'Biology of anaerobic micro-organisms'. Zehnder A.J.B. (ed). John Wiley & Sons, Inc., N.Y. pp. 469-586.

Widdel F. and Bak F. (1992). Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria. In 'The Prokaryotes'. Second edition. Chapitre 183. pp. 3352-3378.

Widdel F. and Pfennig N. (1984). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids.1. Isolation of a new sulphate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. *Arch. Microbiol.* 129, 395-400.

Z

Zeikus J.G., Dawson M.A., Thompson T.E., Ingvorsen K. and Hatchikian E.C. (1983). Microbial ecology of volcanic sulfidogenesis: isolation and characterization of *Thermodesulfotobacterium commune* gen. nov. and sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1159-1169.

Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rayney F.A., Pikuta E.N., Osipov G.A. and Kostrikina N.A. (1997). *Desulfonatovibrio hydrogenovorans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 144-149.

ANNEXE

Oifa HAOUARI ép. BEN SASSI

Etude taxonomique de bactéries sulfato-réductrices originaires d'écosystèmes marins et hydrothermaux terrestres Tunisiens : Potentialités oxydo-réductrices de l'arsenic

Solutions d'oligo-éléments de Widdel et Pfennig (1984)

Acide chlorhydrique 25%	10 ml
Chlorure de fer	1.5 g
Chlorure de cobalt	190 mg
Chlorure de manganèse	100 mg
Chlorure de zinc	70 mg
Acide borique	62 mg
Chlorure de nickel	24 mg
Molybdate de sodium	36 mg
Chlorure de cuivre	17 mg
H ₂ O bidistillée q.s.p.	1000ml

Résumé

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont largement répandues dans la nature où elles contribuent de manière importante, par l'intermédiaire du cycle du soufre, à la minéralisation de la matière organique. Cette contribution est particulièrement remarquable dans les sédiments marins où les BSR peuvent participer jusqu'à 50% de l'oxydation de cette matière organique, mais leur importance écologique est également notoire dans les environnements extrêmes. A côté de leur capacité à réduire les composés soufrés (sulfate, thiosulfate, soufre élémentaire), les BSR présentent notamment une aptitude à réduire les métaux et métalloïdes.

Des études portant sur la biodiversité des BSR ont été conduites sur des échantillons de milieux marins et de sources hydrothermales, situés au nord de la Tunisie. Des méthodes de microbiologie classique associées à celles de taxonomie moléculaire basées sur l'analyse de séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, nous ont permis :

- (i) de mettre en évidence la présence d'une grande diversité de BSR appartenant essentiellement aux genres *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* et *Thermodesulfovibrio* puis,
- (ii) d'isoler et caractériser trois nouvelles espèces appartenant aux respectivement genres précités.

Les potentialités oxydo-réductives de l'arsenic ont été recherchées chez les souches isolées. Nous avons pu relever chez sept de ces BSR la capacité à réduire (réduction directe) l'arséniate [As(V)] en arsénite [As(III)], sans que cette réduction ne soit couplée à leur croissance.

La réduction indirecte de l'As(V) liée à la production de sulfures par les BSR a également été démontrée. Grâce à la présence d'H₂S, la toxicité du métal est largement amoindrie.

En condition de microaérobiose (0%, 0.5% et 1% d'O₂), nous avons pu montrer, pour la première fois, que parmi les souches isolées, deux d'entre elles (HEB223 et Lam5) étaient capables d'oxyder de l'arsénite en arséniate.

Mots clés : milieu marin, source hydrothermale, bactérie sulfato-réductrice, mésophile, thermophile, biodiversité, arsenic, anaérobiose, microaérophilie.

Abstract

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are widespread in nature where they contribute significantly to organic matter mineralization through the sulfur cycle. This contribution is particularly remarkable in marine sediments where they can take part up to 50% of organic matter oxidation, although their ecological role is important as well in the extreme environments. Beside their capacity to reduce sulfur compounds (sulfate, thiosulfate, elementary sulfur), SRB have also the ability to reduce heavy metals and metalloids.

Studies related to the biodiversity of SRB were conducted on samples of marine sediments and hydrothermal terrestrial springs, located in the North part of Tunisia. Microbiological approaches coupled with molecular taxonomy based on the analysis of sequences of genes encoding for the ARNr 16S, allowed us to:

- (i) provide evidence of the existence of a great diversity of SRB belonging to genera *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* and *Thermodesulfovibrio* then,
- (ii) to isolate and characterize three new species belonging to the above mentioned genera.

We examined the oxydo-reductive capacities of our isolates towards arsenic compounds. Seven of these SRB showed the ability to directly reduce arsenate [As(V)] to arsenite [As(III)] without energy conservation.

Indirect reduction of As(V) linked to biological sulfide production was also shown. The presence of H₂S largely decreased metal toxicity.

Under microaerobic conditions (0.5% and 1% of O₂ in the gas phase), we demonstrated for the first time, that two of our isolates, HEB223 and Lam5, were able to oxidize arsenite to arsenate.

Keywords: marine environment, hot spring, sulfate-reducing bacteria, mesophilic, thermophilic, biodiversity, arsenic, anaerobic, microaerobic.