

Thèse

présentée devant

L'Université de Provence Aix- Marseille I

pour obtenir

le grade de Docteur - Mention Sciences

Spécialité: Biologie Cellulaire, Biochimie et Microbiologie

par **Ralf CORD-RUWISCH**

Contribution à l'étude du métabolisme de H₂ par les bactéries anaérobies

Soutenue le 8 Juillet 1987 devant la commission d'examen

M. J. BARATTI

M. J.-P. BELAICH (rapporteur)

M. R. CONRAD (rapporteur)

M. J.-L. GARCIA

M. S. A. TRADRE

M. A. J. B. ZEHNDER (rapporteur)

H2 00058708
1er FDI
Non Num

Ø84 FERTEN Ø8
COR



F 26563

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie ORSTOM de l'Université de Provence à Marseille.

Je tiens à remercier tous ceux qui ont aidé à sa réalisation:

- L'ORSTOM et la C.E.E (DG XII) qui m'ont assuré une allocation pour mener à bien ces recherches.

- Monsieur Jean-Louis GARCIA, Directeur de Recherche à l'ORSTOM, qui m'a accueilli dans son équipe et a dirigé cette thèse. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a témoignée ainsi que l'aide sans réserve qu'il m'a apportée.

- Le Professeur Jean-Pierre BELAICH de l'Université de Provence ainsi que les Professeurs Ralf CONRAD de l'Université de Constance (RFA) et Alexander J.B. ZEHNDER de l'Université d'Agriculture de Wageningen (Pays Bas) pour avoir accepté de juger cette thèse et les Professeurs J. BARATTI de l'Université de Provence et S. Alfred TRAORE de l'Université de Ouagadougou (Burkina Fasso) pour leur participation à ce jury.

- les coauteurs des articles présentés ainsi que tous mes camarades de l'équipe pour leur amitié et notamment Sylvie Dumas et Vincent Jacq pour leur aide pendant la rédaction de ce mémoire.

Je remercie Ralf Conrad, Bernard Ollivier, Marc Rousset, et Alfred Traoré pour nos fructueuses discussions.

Préface

Ce travail concerne plus particulièrement l'étude des réactions d'oxydo-réduction biologiques, plutôt que l'étude des voies biochimiques et des mécanismes enzymatiques de ces réactions. On a accordé plus d'attention aux effets mesurables de l'oxydation biologique de l'hydrogène plutôt qu'au fonctionnement des hydrogénases et à la compréhension des mécanismes de l'oxydation de l'hydrogène et du transport des électrons. Cependant, les connaissances biochimiques fondamentales du métabolisme de l'hydrogène ont été exposées dans la mesure où elles sont nécessaires à la compréhension des réactions globales.

Abréviations:

ADP	Adénosine 5'-diphosphate
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BHA	Bactéries homoacétogènes
BM	Bactéries méthanogènes
BSR	Bactéries sulfato-réductrices
ER	Equivalents réducteurs
FPM	Force proton-motrice
Fd	Ferrédoxine
k_m	Constante de saturation
NADH	Nicotinamide Adénine dinucléotide réduit
NAD ⁺	Nicotinamide Adénine dinucléotide oxydé
BPOH	Bactéries productrices obligées d'H ₂
TE	Transporteurs d'électrons
TIH	Transfert interespèces d'hydrogène
μ_{max}	Taux de croissance maximum théorique

Sommaire

INTRODUCTION

1 Avant propos	6
2 Production non biologique d'hydrogène	8
3 Production biologique d'hydrogène	8
3.1 Conditions de la formation biologique d'hydrogène.....	8
3.2 Environnements typiques pour la formation biologique d'hydrogène..	9
3.3 Les organismes producteurs d'hydrogène.....	10
3.4 Le rôle de l'hydrogène comme produit de fermentation.....	11
3.5 Avantage énergétique de la production d'H ₂ à partir du NADH: première étape de la formation d'H ₂	13
3.6 Avantage énergétique de la production d'H ₂ à partir du pyruvate: deuxième étape de la formation d'H ₂	15
3.7 Effet de l'élimination de l'hydrogène sur la fermentaion.....	20
4 Transfert interespèces d'hydrogène (TIH)	
4.1 Relations particulières entre les organismes consommateurs d'H ₂ et les organismes producteurs d'H ₂	21
4.2 Transfert interespèces d'hydrogène obligatoire: les associations syntrophiques.....	22
4.3 Rôle du TIH au cours de la minéralisation de la biomasse.....	23
4.4 Théorie du recyclage de H ₂ : une "syntrophie" représentée par un seul organisme.....	24
5 Oxydation de l'H₂	26
5.1 Organismes catalysant l'oxydation de H ₂	27
5.2 Compétition pour l'hydrogène.....	28

6 Corrosion du fer	31
6.1 Le fer à la surface de la terre.....	31
6.2 Corrosion aérobie: formation de rouille.....	32
6.3 Polarisation: comportement théorique du fer en milieu aqueux exempt d'oxygène.....	33
6.4 Corrosion anaérobie: Corrosion microbienne.....	34
7 Objectifs de recherche	35

RESULTATS ET DISCUSSION

1 Détermination des sulfures dissous et précipités	37
Article 1 " A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria".....	38
2 Transfert interespèces d'hydrogène (TIH)	42
2.1 TIH à partir du fructose.....	42
Article 2 " Fructose degradation by <i>Desulfovibrio</i> sp. in pure culture and in coculture with <i>Methanospirillum hungatei</i> "	43
2.2 TIH à partir du méthanol (un composé en C ₁).....	51
Article 3 "Isolation and characterization of <i>Sporomusa acidovorans</i> sp. nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium"	52
Article 4 " Interspecific hydrogen transfer during methanol degradation by <i>Sporomusa acidovorans</i> and hydrogenophilic anaerobes"	56
3 Etude du rôle possible de H₂ dans le métabolisme d'un substrat organique	61
3.1 Objet d'étude.....	61
Article 5 "Facultative and partial interspecies hydrogen transfer - competition for reducing equivalents.....	63
3.2 Excrétion de H ₂ par les bactéries en culture pure.....	70
3.3 Expériences d'addition d'H ₂	70
3.4 Effet de H ₂ sur la fermentation de substrats organiques par les bactéries anaérobies hydrogénéophiles.....	73
3.5 Rôle possible du métabolisme de H ₂ au cours des dismutations et fermentations	76

3.6 Competition: rôle écologique de la maintenance d'une certaine concentration d' H_2	79
4 Influence possible de la variation d'énergie libre sur la vitesse d'une réactions chimiques catalysée par les bactéries: relation entre la thermodynamique et la cinétique.....	82
4.1 Effet des accepteurs d'électrons terminaux sur l'efficacité de l'oxydation des traces de l'hydrogène.....	82
Article 6 "The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor".....	83
4.2 Effet de l'accepteur terminal d'électrons sur le taux de croissance d'une syntrophie.....	108
4.3 Influence du nombre de bactéries oxydant H_2 sur le taux de croissance d'une bactérie syntrophique.....	112
4.4 Relation théorique entre la variation d'énergie libre et la vitesse d'une réaction.....	114
4.5 Influence possible des réactions inverses	
4.5.1 Oxydation anaérobie du sulfure.....	117
4.5.2 Essai de démonstration de la dégradation anaérobie du méthane.....	119
5 Corrosion bactérienne du fer	
5.1 Rôle des bactéries sulfato-réductrices dans la corrosion du fer..	121
Article 7 "Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production".....	122
Article 8 "Corroding iron as a hydrogen source for sulfate reduction in growing cultures of sulfate-reducing bacteria.....	132
5.2 Oxydation de l'hydrogène cathodique par les bactéries en l'absence de sulfate.....	138
5.3 Démonstration directe de l'oxydation de l' H_2 cathodique.....	139
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145

Introduction

1 Avant propos

Les réactions chimiques et biochimiques qui permettent le maintien de la vie sur terre ont lieu exclusivement en milieux aqueux. L'eau sert non seulement de solvant pour toutes les réactions biochimiques mais joue également le rôle de réactif dans les réactions d'oxydo-réduction. On peut considérer l'eau comme étant, quantitativement, le donneur d'électrons le plus important de toutes les réactions biochimiques globales, parce qu'elle est la source d'électrons (source d' H_2) dans la photosynthèse des plantes vertes. L'oxydation de l'eau est la source naturelle d'oxygène. Le rôle de l' H_2O comme accepteur d'électrons est moins important que son rôle comme donneur d'électrons. La réduction de l'eau aboutit à la production d'hydrogène élémentaire. Ces deux processus semblent s'exclure mutuellement dans la nature, ce qui signifie que la production d'hydrogène a généralement lieu en l'absence d'oxygène, par exemple dans les biotopes anaérobies tels que les sédiments marins.

Dans l'état actuel de nos connaissances, seuls les procaryotes sont capables d'oxyder et ainsi de recycler l'hydrogène moléculaire tandis que l' O_2 est recyclé par tous les organismes aérobies tels que les plantes, les animaux et la plupart des procaryotes. Bien que la concentration en H_2 soit négligeable par rapport à la concentration en O_2 , elle contrôle efficacement les réactions qui produisent de l'hydrogène.

Ce travail a permis d'étudier l'influence de l'oxydation bactérienne de

l'hydrogène sur les réactions qui le produisent. Ces dernières réactions interviennent dans deux domaines présentant un intérêt écologique et économique important :

- d'une part la production d' H_2 par les bactéries fermentatives qui rend possible le transfert interspèces d'hydrogène (TIH) pendant la dégradation de la matière organique.

- d'autre part la production d' H_2 au cours du processus de corrosion biologique des métaux ferreux.

2 Production non biologique d'hydrogène

En général les protons provenant de la dissociation de l'eau peuvent être réduits en H_2 par tous les agents réducteurs forts. En fait, de très puissants réducteurs tels que le sodium, le potassium, le calcium, les sels de chrome (II), les sels de titane (II) et de vanadium (II) ne sont pas stables dans l'eau parce qu'ils sont oxydables par les protons de l'eau, ce qui entraîne la formation d'hydrogène (Holleman, 1976). Des réducteurs moins puissants comme le méthanol, l'isopropanol et la dithionite ne réduisent les protons que lorsque la réaction est activée (Kisch et al., 1986; Kovacs et Der, 1986; Akiyama et al., 1986; Domen et al., 1986; Beaupère et al., 1986).

La formation d' H_2 dans la nature est susceptible de se produire dans des milieux de faible potentiel rédox. Par exemple les sources anoxiques d'origine volcanique ou les eaux souterraines profondes (Stetter et König 1983, Conrad et al. 1985) constituent une source naturelle d' H_2 . La production non biologique d' H_2 peut également intervenir de façon significative dans les milieux naturels en présence de substances artificiellement réduites comme par exemple les métaux non nobles.

3 Production biologique d'hydrogène

3.1 Conditions de la formation biologique d'hydrogène

La dégradation de la matière organique consomme des oxydants. L'oxygène moléculaire, et à un degré moindre, le nitrate sont les premiers oxydants à

être réduits dans les biotopes naturels (Ottow et Fabig 1985). Dans les milieux très riches en matière organique, l'oxygène est donc consommé en premier lieu et rapidement. Puis lorsque l'environnement devient anoxique, les bactéries fermentatives succèdent aux bactéries aérobies dans la phase initiale de l'oxydation de la matière organique. Au cours de ce processus, H_2 est l'un des produits de fermentation le plus important. En conséquence, la production d' H_2 et sa consommation interviennent habituellement dans les biotopes anaérobies (Hungate, 1967; Sorensen et al., 1981; Kaspar et Wuhrmann, 1978).

3.2 Environnements typiques pour la formation biologique d' H_2

Avec l'acétate et éventuellement le propionate, H_2 est le produit de fermentation le plus important issu de la dégradation anaérobie de la matière organique (Abram et Nedwell, 1978; Sorensen et al., 1981; Thauer et al 1977, Lovley et Klug 1983, Mountfort et al. 1980) dans les sédiments aquatiques.

Au cours du processus de digestion, il y a production d'hydrogène dans l'intestin des animaux. H_2 se dissout dans le sang et est en partie expiré (Levitt, 1969). La concentration d'hydrogène ainsi expirée au cours de la respiration humaine (hydrogen breath test) est utilisée pour le diagnostic des troubles digestifs (Thompson et al. 1986).

C'est dans le rumen des ruminants que la production biologique d' H_2 a été extensivement étudiée et décrite comme ayant un rôle clé dans la dégradation des biopolymères comme la cellulose (Hungate 1967,

Bryant 1979). L'hydrogène a un rôle similaire dans la production de biogaz (McInerney et Bryant 1980, 1981, Kaspar et Wuhrmann 1978).

3.3 Les organismes producteurs d'hydrogène

Les bactéries productrices d' H_2 ont des représentants dans presque tous les groupes de bactéries fermentatives tels que les Clostridies, les Entérobactéries, les Bacteroidaceae. Quelques représentants bien connus sont: *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum*, *C. acetobutylicum*, *Bacteroides spp.*, *Cellulomonas spp.*. Le test classique de "formation de gaz" identifie facilement le dégagement d' $H_2 + CO_2$ qui provient de l'oxydation du pyruvate (c.f. 3.4, 3.6) mais ne permet pas d'estimer les faibles concentrations d' H_2 produites à partir du NADH (c.f. 3.5). En conséquence d'autres bactéries, spécialement celles qui produisent de l'acétate en début de croissance, qui ne sont pas réputées être productrices d' H_2 par ce test, peuvent être considérées comme productrices d' H_2 dans des conditions de faibles pressions d' H_2 .

Certaines bactéries anaérobies qui dégradent l'hydrogène comme les bactéries méthanogènes, homoacétogènes et sulfidogènes peuvent également, selon les conditions de culture, produire des quantités plus ou moins importantes d'hydrogène (Winter et Wolfe, 1979, 1980, Hatchikian et al., 1976, Tsuji et Yagi, 1980, Traoré et al., 1981, Lovley et Ferry, 1985, Boone et al., 1987, Phelps et al., 1985, Krzycki et al., 1987). Les bactéries phototrophes et les cyanobactéries produisent de l'hydrogène pendant la fixation de l'azote (Chen et al. 1980, Hirayama et al. 1986). Certains organismes eucaryotes tels que les champignons anaérobies isolés du rumen (Bauschop et Mountfort, 1981), les algues vertes

planctoniques (Mahro et Grimme 1986, Mahro et al 1986, Miura et al. 1986), ou les protozoaires ciliés qui vivent en symbiose avec des bactéries méthanogènes intracellulaires hydrogénophiles (Fenchel et al. 1977, Van Bruggen et al. 1983, 1984, 1985, 1986, Yarlett et al. 1984) sont également capables de produire de l'hydrogène.

On a longtemps pensé que la formation de l'hydrogène était due exclusivement à l'activité des hydrogénases. Il a cependant été démontré récemment que même les nitrogénases pouvaient former de l'hydrogène (Crabtree 1986, Chen et al., 1986). Peut-être y a-t'il également production d'hydrogène au cours de réactions non spécifiques telles que les deshydrogénations ou les transferts d'électrons. Il semble que l'on n'ait pas encore étudié la capacité ou l'incapacité des cellules des plantes supérieures et des animaux à former de l' H_2 .

3.4 Rôle de l'hydrogène comme produit de fermentation

L'oxydation biologique des composés organiques conduit à la production d'équivalents réducteurs * (= 1 mole d'électrons transférable, par exemple sur les transporteurs d'électrons) tels que les coenzymes pyridiniques

* Note: 1 équivalent réducteur (●ER) correspond à $6,0220943 \times 10^{23}$ électrons ou 1/2 mole de NADH.
1 ER réduit 1 mole de proton en 1/2 mole de H_2 .

réduits (NADH). Par réduction des accepteurs d'électrons externes tels que l'oxygène, le nitrate ou le sulfate, les organismes qui respirent réoxydent les équivalents réducteurs le long de la chaîne de transport des électrons. Ce processus conserve l'énergie au cours de la phosphorylation liée au transport des électrons.

En l'absence d'accepteur d'électrons externe approprié, un piège à électrons doit être synthétisé à partir des produits d'oxydation du substrat organique. Ces accepteurs d'électrons internes synthétisés sont habituellement le pyruvate ou l'acétyl-CoA. Leur réduction conduit à la formation de composés de fermentation organiques réduits (c.f. 3.5, 3.6). Contrairement à la réduction des accepteurs d'électrons externes, la réduction des accepteurs internes (à l'exception de la réduction du fumarate en succinate) n'est habituellement pas liée à la conservation de l'énergie.

La réduction des protons en H_2 représente une troisième possibilité d'oxydation des équivalents réducteurs. Les protons réduits proviennent, au moins en partie, de la dissociation électrolytique de l'eau et peuvent donc être considérés comme des accepteurs d'électrons externes (Tab. 1). Contrairement à la réduction d'autres accepteurs d'électrons externes (oxygène, nitrate et sulfate), on ne connaît pas de réduction de protons associée à une phosphorylation*.

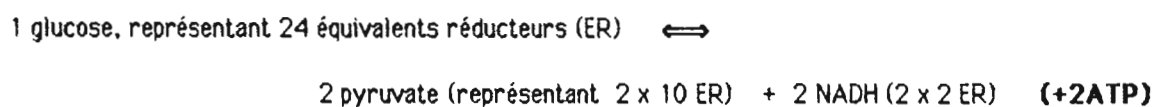
* Note: Zinder et Koch (1984) ont montré que l'oxydation de l'acétate en CO_2 et H_2 permettait apparemment la croissance d'une bactérie thermophile, à condition que la concentration d' H_2 soit suffisamment faible (présence d'un consommateur d' H_2). Cette croissance n'est pas explicable par les phosphorylations connues au niveau du substrat et pourrait être due à une phosphorylation couplée à la production d' H_2 . L'hypothèse du recyclage d' H_2 (Odom et Peck 1981, Peck et Odom 1984) fournit théoriquement la possibilité de créer un gradient de protons résultant de l'oxydation de l'hydrogène gazeux par une hydrogénase membranaire.

3.5 Avantage énergétique de la production d'H₂ à partir du NADH: première étape de la formation d'H₂

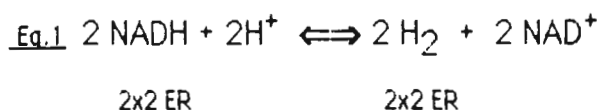
Les équivalents réducteurs qui peuvent conduire à la réduction des protons sont présentés dans le tableau 1. Il est nécessaire, pour des raisons thermodynamiques, de distinguer les deux sources principales d'électrons pouvant réduire les protons en H₂: le pyruvate, comme intermédiaire clé du métabolisme fermentaire et le NADH, transporteur d'électrons principal de la glycolyse mais aussi de la β-oxydation. Les électrons du pyruvate peuvent théoriquement produire 10¹⁰ fois plus d'hydrogène que ceux du NADH (Fig. 1). En fait, les électrons provenant du pyruvate ou du NADH sont d'abord transférés sur la ferrédoxine qui a un potentiel rédox similaire à celui de H₂ avant de réduire les protons en H₂.

La plupart des bactéries fermentatives productrices d'H₂ ont la capacité d'utiliser à la fois des accepteurs internes organiques et des protons comme piège à électrons terminal. Ces bactéries semblent ainsi avoir "le choix" de produire soit de l'hydrogène soit d'autres produits réduits de fermentation. Mais pourquoi produisent-elles de l'hydrogène? Pour répondre à cette question, il nous faut considérer les principes même des fermentations bactériennes. Nous prendrons comme exemple la glycolyse.

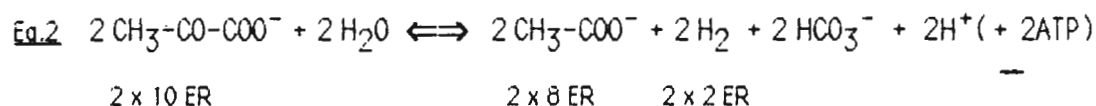
Bilan électronique de la glycolyse:



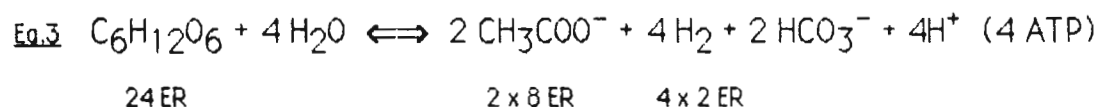
Pendant cette glycolyse et jusqu'au stade pyruvate, deux moles d'ATP sont produites. Cependant le bilan de fermentation n'est pas encore équilibré. Il est nécessaire que 2 moles de NADH soient réoxydées. Le moyen le plus simple et le plus efficace pour les bactéries fermentatives de réoxyder ces transporteurs d'électrons, est d'utiliser des protons comme accepteurs d'électrons:



Cela permet alors l'oxydation de deux moles de pyruvate en acétyl-CoA avec un gain concomittant de deux ATP supplémentaires grâce à la réaction phosphoroclastique catalysée par l'acétokinase:

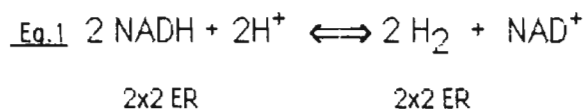


Comme le montre la réaction de fermentation globale qui en résulte:

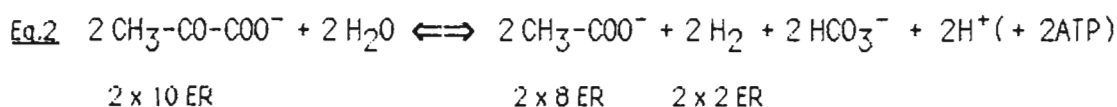


En ce qui concerne le gain d'ATP, cette réaction représente la fermentation la plus favorable car elle permet de phosphoryler 4 ADP par mole de glucose fermenté (2 pendant la glycolyse, 2 avec l'acétokinase). De ce fait, la réaction ci-dessus représente probablement la phase initiale de toutes les fermentations effectuées par les bactéries anaérobies possédant des hydrogénases (Thauer et al. 1977).

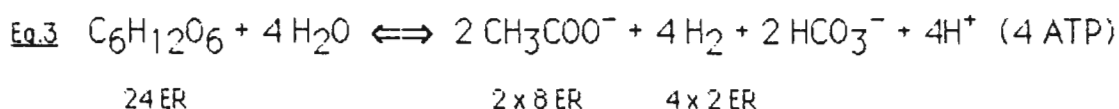
est nécessaire que 2 moles de NADH soient réoxydées. Le moyen le plus simple et le plus efficace pour les bactéries fermentatives de réoxyder ces transporteurs d'électrons, est d'utiliser des protons comme accepteurs d'électrons:



Cela permet alors l'oxydation de deux moles de pyruvate en acétyl-CoA avec un gain concomittant de deux ATP supplémentaires grâce à la réaction phosphoroclastique catalysée par l'acétokinase:



Comme le montre la réaction de fermentation globale qui en résulte:



En ce qui concerne le gain d'ATP, cette réaction représente la fermentation la plus favorable car elle permet de phosphoryler 4 ADP par mole de glucose fermenté (2 pendant la glycolyse, 2 avec l'acétokinase). De ce fait, la réaction ci-dessus représente probablement la phase initiale de toutes les fermentations effectuées par les bactéries anaérobies possédant des hydrogénases (Thauer et al. 1977).

Cependant, le potentiel du NADH étant plus positif que celui de l'hydrogène, la réduction des protons par le NADH n'est énergétiquement possible que si la concentration en H_2 est très faible (Tab. 1, Fig. 1). Cette condition est effectivement réalisée en début de fermentation ou lorsque l'hydrogène est constamment consommé au fur et à mesure de sa production.

3.6 Avantage énergétique de la production d' H_2 à partir du pyruvate : deuxième étape de la formation d' H_2

Lorsque l'hydrogène s'accumule dans les cultures pures de bactéries fermentatives, la réduction des protons par les électrons provenant du NADH devient de moins en moins favorable (Tab. 1, Fig. 1) et les bactéries sont alors obligées de synthétiser des accepteurs d'électrons carbonés internes permettant la réoxydation du NADH.

La façon la plus simple de réoxyder le NADH au moyen d'accepteurs d'électrons internes est alors de réduire le pyruvate déjà disponible. Pour visualiser le flux des électrons et des carbones, les diverses réactions de fermentation sont présentées dans les schémas ci-dessous.

Tab. 1Réactions anaérobies participants à la production de l'H₂

Réaction	ΔG° [kJ]	production d'H ₂ possible* [atm.]
Pyruvate⁻ + 2 H₂O \rightleftharpoons Acétate⁻ + H₂ + HCO₃⁻ + H⁺	-47,3	10⁸
NADH + H⁺ \rightleftharpoons NAD⁺ + H₂	+18,0	10⁻³
Formiate⁻ + H₂O \rightleftharpoons HCO₃⁻ + H₂	+1,3	10⁻³
Fe + 2H⁺ \rightleftharpoons Fe²⁺ + H₂	-78,9	10¹³

*en considérant que les concentration des autres composés sont égales 0.1 mM ou 10mM (bicarbonate).

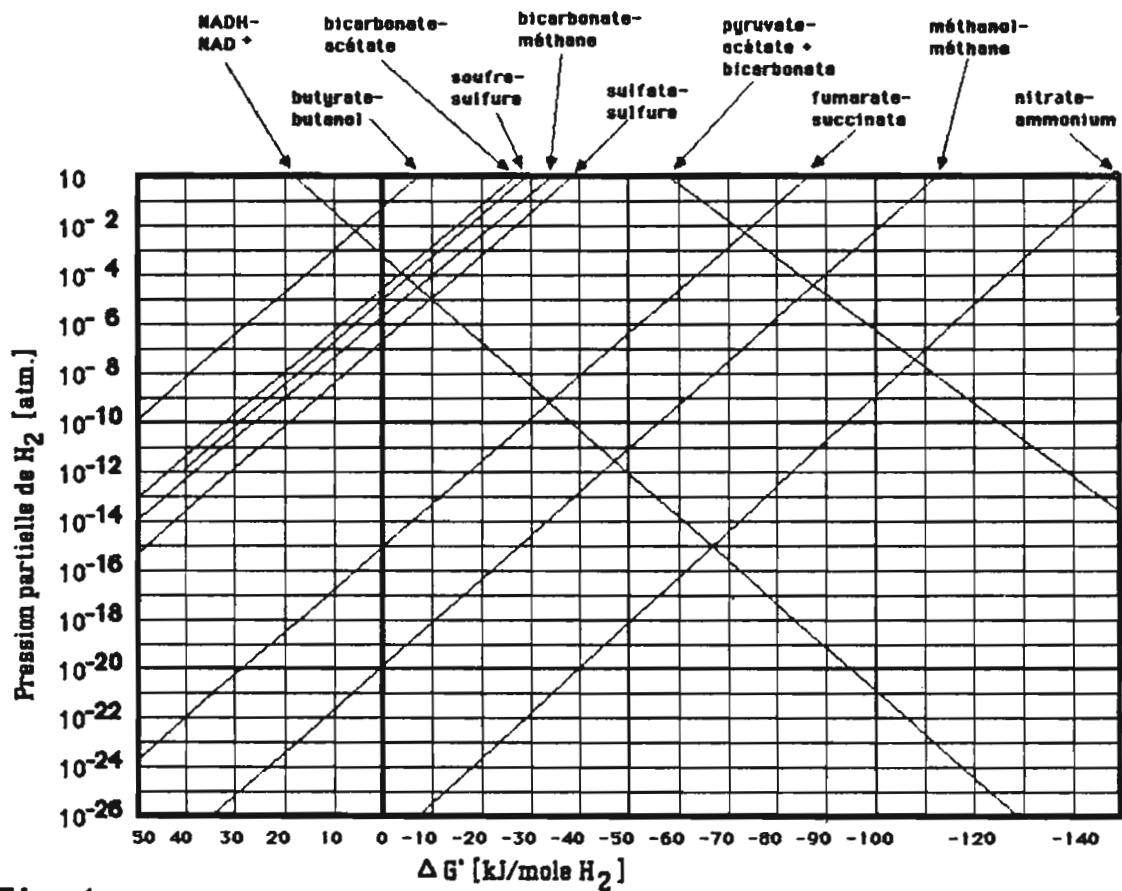


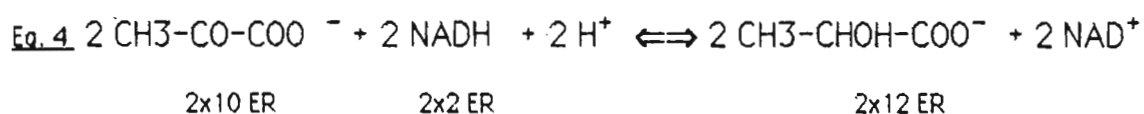
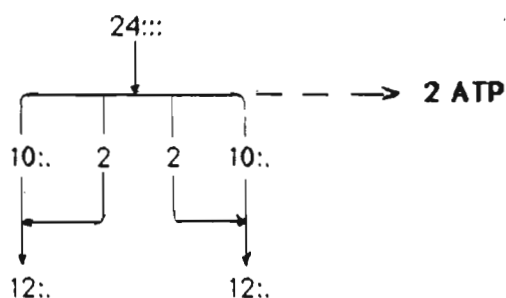
Fig.1

Relation entre la variation d'énergie libre de et la pression partielle d'hydrogène. (Tous les composés ont une concentration de 0.1mM, sauf le bicarbonate: 10 mM)

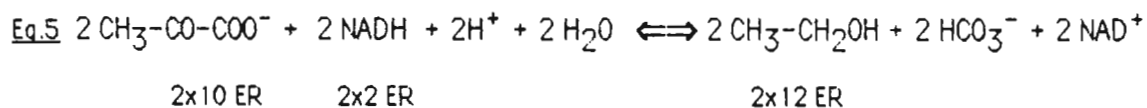
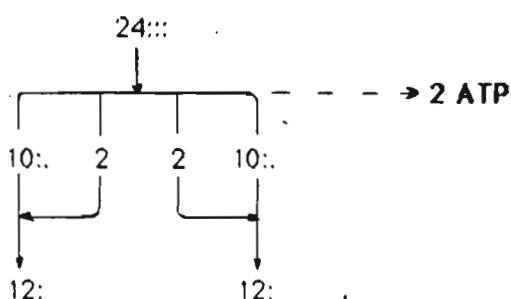
Les Chiffres représentent le nombre d'équivalents réducteurs et les points les atomes de carbone.

24::: =glucose, 10:: =Pyruvate, 2 =NADH⁻, 8 =Acétate, 12: =Ethanol, 2 =H₂, 12:: =lactate, . =CO₂

Fermentation homolactique



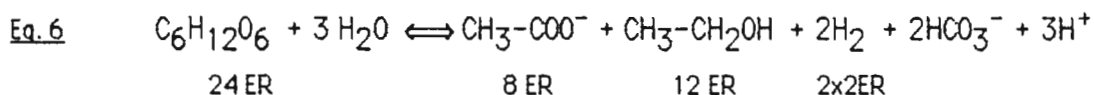
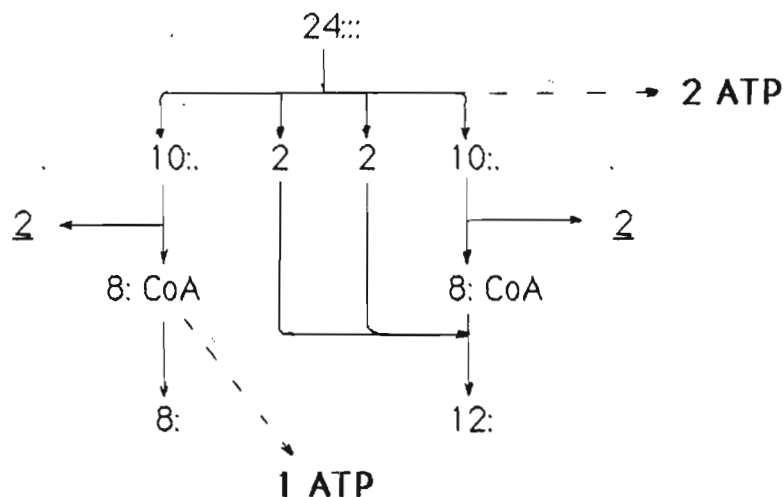
Fermentation alcoolique



Dans le cas présenté ci-dessus, pour chaque mole de pyruvate réduite, il y a perte d'une mole d'acétyl-CoA et par conséquent d'1 mole ATP. Ces deux réactions de fermentation ne produisent que 2 moles d'ATP par mole de

glucose et peuvent donc apparaître comme énergétiquement peu intéressantes. L'avantage écologique pour les organismes qui effectuent ces fermentations, réside probablement dans la simplicité de ce métabolisme qui permet une dégradation rapide des substrats à haute concentration, imposant ainsi des taux de croissance élevés à ces bactéries. L'accumulation d'énormes quantités de métabolites (acide lactique ou éthanol) inhibe en outre le développement d'autres bactéries fermentatives. Toutefois dans les environnements anaérobies naturels comme les sédiments aquatiques, où les concentrations en substrats fermentescibles sont limitantes, les bactéries lactiques et les levures à fermentation éthanolique sont dominées par d'autres bactéries fermentatives qui, malgré leur v_{max} faible, ont des meilleurs rendements de croissance et de plus fortes affinités pour les substrats.

Un rendement élevé, dû au gain supplémentaire d'ATP pendant la réaction catalysée par l'acétokinase, ne se produira que si le pyruvate est remplacé par un autre accepteur d'électrons qui reçoit les électrons des 2 NADH de la glycolyse. L'accepteur d'électrons interne le plus important chez les bactéries fermentatives productrices d' H_2 est l'acétyl CoA. Cependant, si l'acétyl-CoA sert d'accepteur d'électrons, la liaison riche en énergie est tout de même perdue (fermentation alcoolique). Pour que ces bactéries profitent de l'énergie conservée sous forme d'acétyl-CoA, la totalité des molécules d'acétyl-CoA ne doivent pas être réduites. Ainsi la réaction de fermentation théorique suivante donnera un ATP supplémentaire grâce à la phosphorylation d'une des deux molécules d'Acétyl-CoA selon la réaction de l'acétokinase, pendant que le second Acétyl-CoA recevra les électrons des 2 NADH :

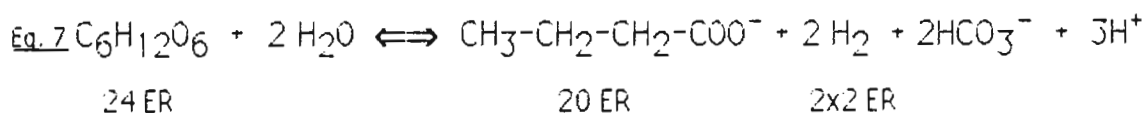
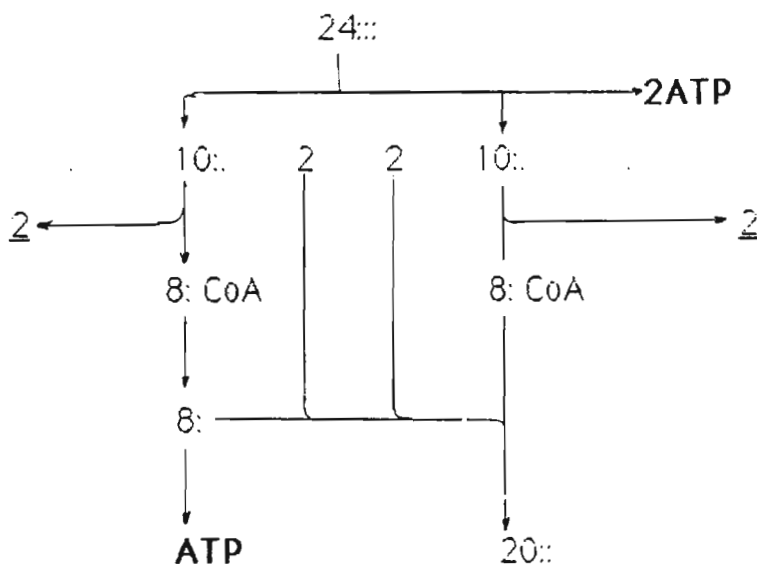


Il faut noter ici que la production d' H_2 à partir du pyruvate est thermodynamiquement très différente de la production d' H_2 à partir du NADH. Le potentiel rédox du pyruvate est suffisamment négatif pour rendre la production d' H_2 exergonique en conditions standard (Tab. 1, Fig. 1). Ce type de dégradation du glucose intervient chez les Entérobactéries. Du formiate peut être produit à la place de l' H_2 et du CO_2 ; Cela ne modifie pas sensiblement la thermodynamique du métabolisme.

Des fermentations similaires au cours desquelles l'un des deux acétyl-CoA est utilisé comme accepteur d'électrons, tandis que l'autre permet la phosphorylation d'un ADP, se produisent couramment chez les Clostridies productrices d' H_2 ; ce sont:

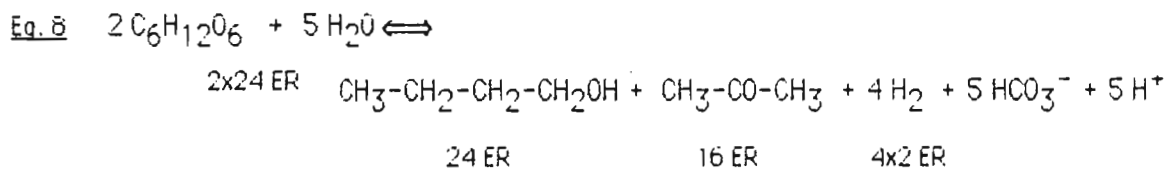
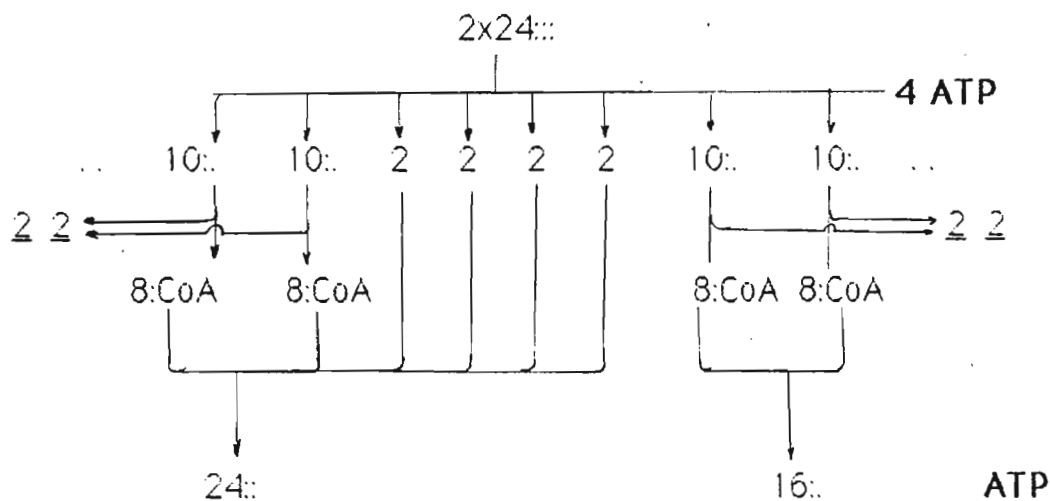
la fermentation butyrique :

20:: = butyrate



la fermentation acétone-butanolique :

24:: = butanol. 16:: = acetone



Puisque la production d'hydrogène maintient la liaison riche en énergie de l'acétyl CoA, la réduction des protons est donc un avantage énergétique comparée à celle d'accepteurs d'électrons organiques internes. Les fermentations alcoolique et lactique classiques des hydrates de carbone tels que le glucose, sont énergétiquement moins intéressantes que les fermentations qui produisent de l'hydrogène. En conclusion, plus une bactérie fermentative produira d'hydrogène, plus elle gagnera d'ATP.

Il semble donc raisonnable que les bactéries fermentatives capables de produire de l' H_2 , préfèrent en fait utiliser les protons plutôt que les composés organiques comme accepteurs terminaux d'électrons.

Cependant, lorsque H_2 s'accumule chez de telles bactéries ou lorsqu'on le rajoute dans la culture, le métabolisme est déplacé vers une réduction des accepteurs d'électrons internes, ce qui aboutit à la production de composés organiques plus réduits tels que les acides organiques autres que l'acétate et les alcools (Reddy et al., 1972; Chung, 1976; Schleifinger et al., 1975; Yerushalmi et al., 1985; Winter, 1980; Heyndrickx et al., 1987).

3.7 Effet de l'élimination de l'hydrogène sur la fermentation

Dans des environnements contenant de fortes quantités de matière organique facilement dégradable, telles que les boues d'épandage ou le bois en décomposition, H_2 s'accumule dans des proportions supérieures à celles observées dans les sédiments aquatiques (Phelps et al., 1987). Cette accumulation d'hydrogène entraîne des concentrations élevées en produits

de fermentation réduits. La disparition de H_2 peut être envisagée comme ayant un effet opposé. Le piégeage continu de H_2 par des bactéries hydrogénophiles, déplace le métabolisme des bactéries fermentatives de la production d'alcools et d'acides gras vers la production d' $H_2 + CO_2$ et d'acétate comme produits majeurs de fermentation (Thauer et al., 1977; Mc Innerney et Bryant, 1980). On a remarqué que des bactéries fermentatives connues pour la production d'un large spectre de composés organiques, produisaient presque exclusivement de l' H_2 , de l'acétate et du CO_2 lorsqu'elles étaient en coculture avec une bactérie oxydant H_2 (Chen et Wolin, 1977; Ianotti et al., 1973; Schleifinger et al., 1975; Yerushalmi et al., 1985).

4 Transfert interespèces d'hydrogène (TIH)

4.1 Relations particulières entre les organismes consommateurs d' H_2 et les organismes producteurs d' H_2

La consommation de H_2 par un second organisme ne permet pas seulement aux souches fermentatives de gagner plus d'ATP mais également d'augmenter la vitesse du processus de fermentation. En conséquence l'activité d'un consommateur d'hydrogène présentera un avantage pour le producteur d' H_2 . D'autre part, les bactéries fermentatives produisant H_2 permettent aux consommateurs d' H_2 de se développer en leur procurant leur substrat énergétique. Etant donné que les deux organismes profitent mutuellement l'un de l'autre, il est donc possible de considérer cette relation comme une véritable symbiose.

Les relations d'ordre trophique existant entre les bactéries anaérobies productrices et consommatrices d' H_2 sont encore plus étroites lorsque le substrat organique dégradé par les unes ne permet pas la synthèse d'accepteurs d'électrons internes. En effet, les substrats très réduits comme les alcools ou les acides gras saturés ne se dégradent qu'en utilisant un accepteur externe d'électrons représenté exclusivement, dans le cas de ces bactéries productrices obligatoires d' H_2 (BPOH), par les protons. Lorsque H_2 s'accumule dans le milieu, ces dernières sont alors incapables d'orienter leur métabolisme vers l'utilisation d'un autre piège à électrons. Cette accumulation d' H_2 inhibe progressivement leur métabolisme et leur croissance et ce, tant que l'agent inhibiteur (H_2) n'est pas enlevé par les bactéries hydrogénophiles. On utilise le terme de syntrophie pour qualifier cette association particulière entre bactéries anaérobies.

4.2 TIH obligatoire: les associations syntrophiques

Puisque les bactéries syntrophiques classiques qui utilisent obligatoirement les protons comme seuls accepteurs d'électrons, sont inhibées par leur métabolite H_2 , elles ne sont en général pas capables de se développer en culture pure. On ne peut les cultiver qu'en coculture avec un partenaire capable de consommer cet H_2 . Dans ces cocultures, la dépendance entre les deux organismes est si étroite qu'initialement, les associations syntrophiques ont été considérées comme un seul et même organisme, effectuant à la fois la dégradation du substrat organique et la réduction de l'accepteur terminal d'électrons (Barker 1940, Bryant et al. 1967).

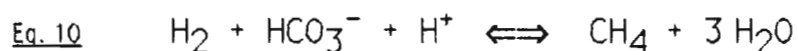
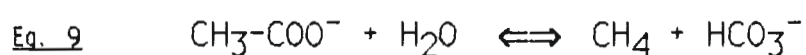
La première culture bactérienne reconnue en tant que coculture syntrophique (Bryant et al. 1967) est *Methanobacillus omelianskii* qui dégrade l'éthanol en acétate et méthane (Barker 1940).

Plus tard, d'autres associations syntrophiques dégradant le propionate (Boone et Bryant 1980), le butyrate (McInerney et al. 1979, 1981, Stieb et Schink 1985), les acides gras à longues chaînes (Stieb et Schink 1985, Roy et al. 1986), les acides gras à chaînes ramifiées (Stieb et Schink 1986), les acides aromatiques (Mountfort et Bryant 1982, Mountfort et al. 1984, Szewzyk et al. 1985, Barik et al. 1985), les acides aminés (Nanninga et Gotschal 1985, Stams et Hansen 1984) ou l'acétate (Zinder et Koch 1984) ont été découvertes. L'association *Methanobacillus omelianskii* n'est donc pas un phénomène exceptionnel.

4.3 Rôle du TIH au cours de la minéralisation de la biomasse

La découverte des associations syntrophiques a permis d'expliquer la dégradation anaérobie des substrats non fermentescibles dans des conditions standard (il faut cependant signaler, qu'il a été montré récemment que l'éthanol peut aussi être fermenté grâce à la réduction du CO₂ (Laanbroek et al. 1982, Eichler et Schink 1985, Samain et al 1982.)). Dans les environnements anoxiques exempts de sulfate et de nitrate, seul

le CO_2 est un accepteur d'électrons possible pour la dégradation des produits de fermentation tels que les alcools et les acides gras. Cependant, les bactéries qui réduisent le CO_2 , comme les bactéries méthanogènes, n'utilisent qu'un spectre très limité de substrats. Excepté le formiate et l'acétate, elles ne dégradent pas les autres acides gras et ne sont pas très performantes en ce qui concerne la dégradation des alcools autres que le méthanol (Widdel 1986). Leur rôle dans la dégradation anaérobie de la matière organique est d'oxyder l'acétate et l' H_2 .



L'utilisation des protons (amplement disponibles dans tous les milieux aqueux), en tant que piège à électrons, est limitée pour des raisons énergétiques (c.f. Introduction 2.5). Cependant, en présence de bactéries consommatrices d' H_2 , la dégradation des produits issus du processus de fermentation devient possible via le TIH. La figure 2 éclaire le rôle fondamental du TIH dans la minéralisation anaérobie de la matière organique et plus particulièrement dans la production de biogaz (Zehnder 1978, Bryant 1979, Mah 1982).

4.4 Théorie du recyclage de H_2 : une "syntrophie" représentée par un seul organisme

Les BSR classiques appartenant au genre *Desulfovibrio* sont connues pour être des bactéries oxydant efficacement H_2 (Badziong et Thauer 1978, 1980, Badziong et al. 1978, Brandis et Thauer 1981, Kristianssen et al.

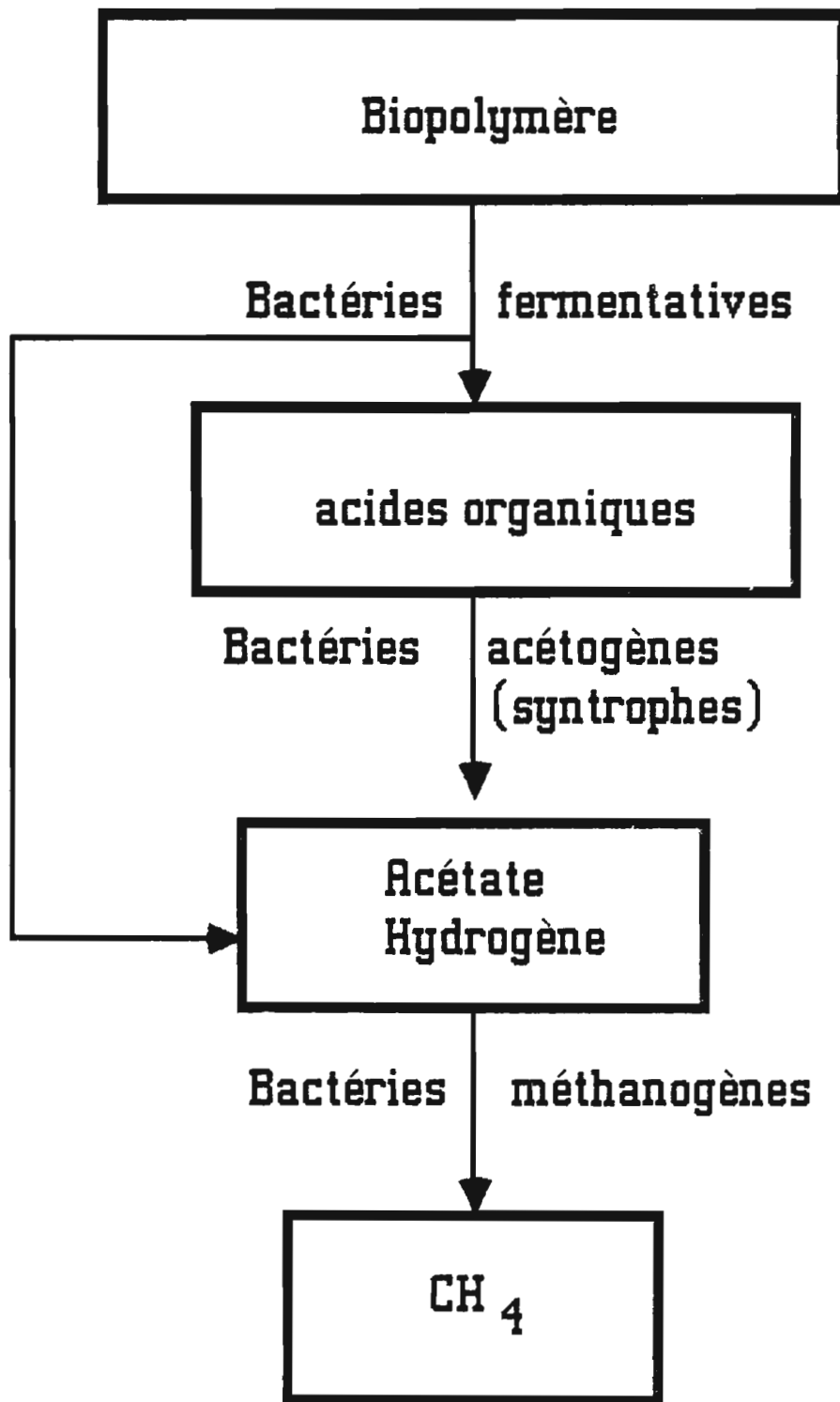


Fig. 2

Flux d'électrons au cours de la dégradation de la matière organique

1982). Il a été plus difficile de comprendre pourquoi, en présence de sulfate, ces bactéries produisaient également de l' H_2 au cours du métabolisme du lactate (Hatchikian et al 1976, Tsuji et Yagi 1980, Traoré et al. 1981) que d'expliquer pourquoi en l'absence de sulfate, elles jouaient le rôle de bactéries acétogènes produisant de l' H_2 quand elles étaient mises en présence de bactéries méthanogènes consommant cet H_2 (McInerney et Bryant 1981, Traoré et al 1983 a, b).

Dans les différentes publications traitant ce sujet, le rôle de l' H_2 produit et réoxydé pendant la dégradation d'un substrat organique par les bactéries sulfato-réductrices a été l'objet de controverses:

Odom et Peck (1981) ont conclu que H_2 est un produit intermédiaire obligatoire du métabolisme des espèces de *Desulfovibrio*, en se basant sur le fait que les sphéropastes de *Desulfovibrio* qui ont perdu l'hydrogénase périplasmique, ne dégradent H_2 qu'après addition d'hydrogénase et de cytochrome c_3 . Selon ces auteurs, il existerait un mécanisme semblable de réoxydation des équivalents réducteurs chez les BSR mais également chez les bactéries homoacétogènes (Peck et Odom 1984) qu'ils ont dénommé "recyclage d'hydrogène" ("hydrogen cycling"). Selon cette idée, une bactérie fermente un substrat organique comme le lactate, en H_2 , CO_2 et acétate et récupère l' H_2 excrété en effectuant une respiration. Son métabolisme correspond donc formellement au métabolisme d'une culture syntrophique. Cependant, Lupton et al. (1984) ont conclu de leurs observations que les espèces de *Desulfovibrio* dégradent le lactate après un jour d'incubation en présence d' H_2 presque autant qu'en l'absence d' H_2 et que H_2 n'était donc pas un produit intermédiaire mais un produit secondaire contrôlant le niveau d'oxydo-réduction des transporteurs

d'électrons internes.

A l'heure actuelle, il existe deux modèles expliquant le fait qu' H_2 est produit et consommé au cours de la dégradation du lactate par *Desulfovibrio* spp. (Fig. 3, 4). Selon le modèle de Lupton et al. (1984), le gradient de proton est créé grâce à une translocation classique des protons couplée à la réoxydation des équivalents réducteurs (Hypothèse de la respiration de Mitchell). Par contre Odom et Peck (1981) proposent la création d'un gradient de protons par la séparation des charges issues de l'oxydation de l' H_2 : les charges positives ($2 H^+$) restent alors dans l'espace périplasmique et les charges négatives ($2 e^-$) sont transférées dans le cytoplasme pour réduire le sulfate.

La mise en évidence de deux hydrogénases chez *Desulfovibrio vulgaris*, l'une périplasmique et l'autre cytoplasmique (Lupton et al 1984, Pankhania et al 1987) est en faveur de l'hypothèse d'Odom et Peck.

5 Oxydation de l' H_2

Dans l'atmosphère ambiante, l'oxydation de l'hydrogène n'est possible que lorsqu'elle est catalysée (même le 'Knallgas' constitué de 80 % d' H_2 + 20 % d' O_2 ne réagit pas spontanément). La réaction d'oxydation de l' H_2 la plus connue est celle qui est catalysée par les microorganismes. Dans les environnements contenant des sources d'énergie favorables à la croissance bactérienne, les bactéries capables de dégrader ces substrats vont se développer forcément. Par exemple, on observe de façon générale la présence de bactéries hydrogénophiles dans les biotopes contenant de

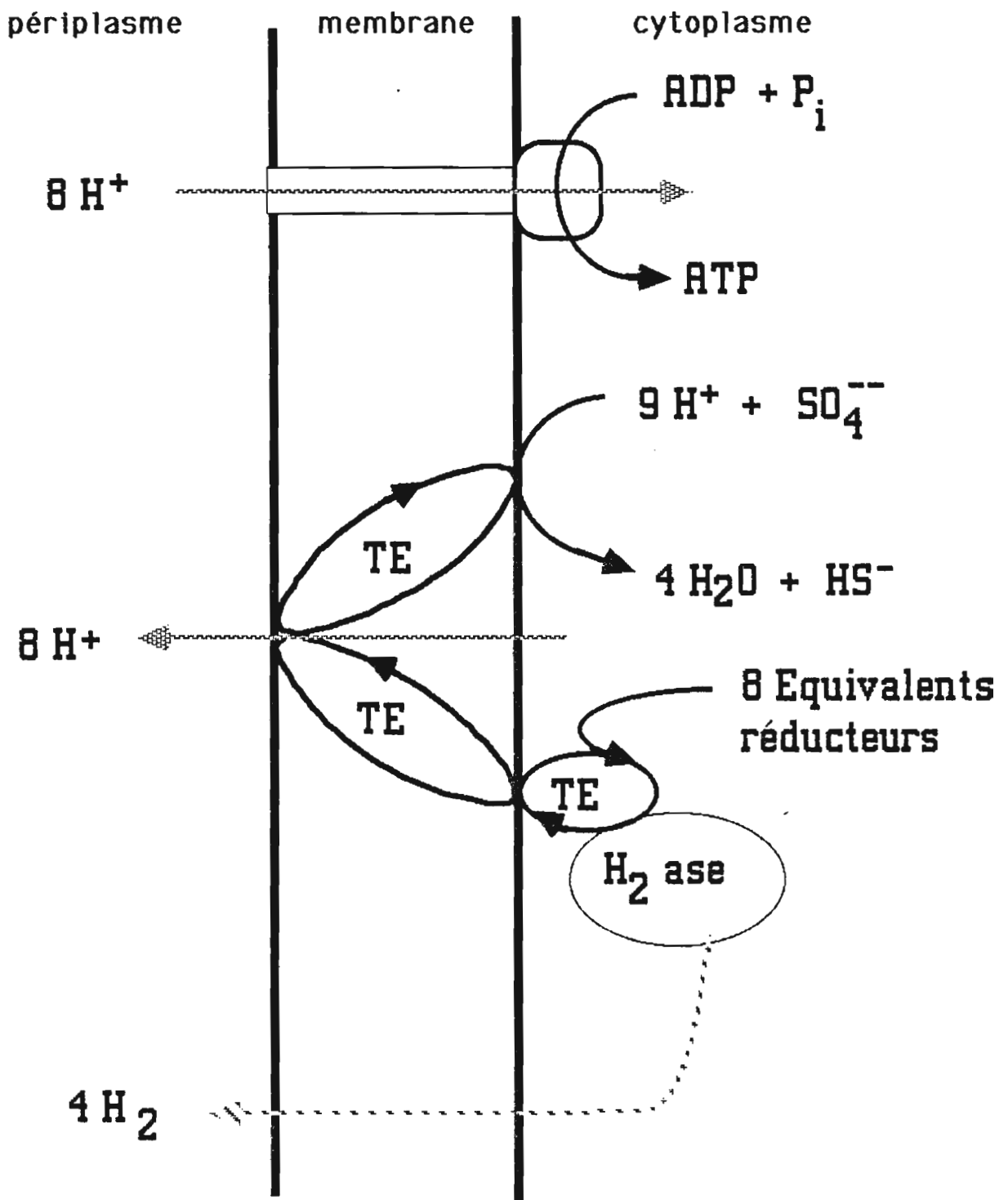


Fig. 3

Création d'un gradient de protons au cours du transport membranaire des électrons (respiration) pendant l'oxydation des équivalents réducteurs provenant de l'oxydation du lactate par *Desulfovibrio sp.*

TE = Transporteur d'électrons, H_2 ase = Hydrogénase

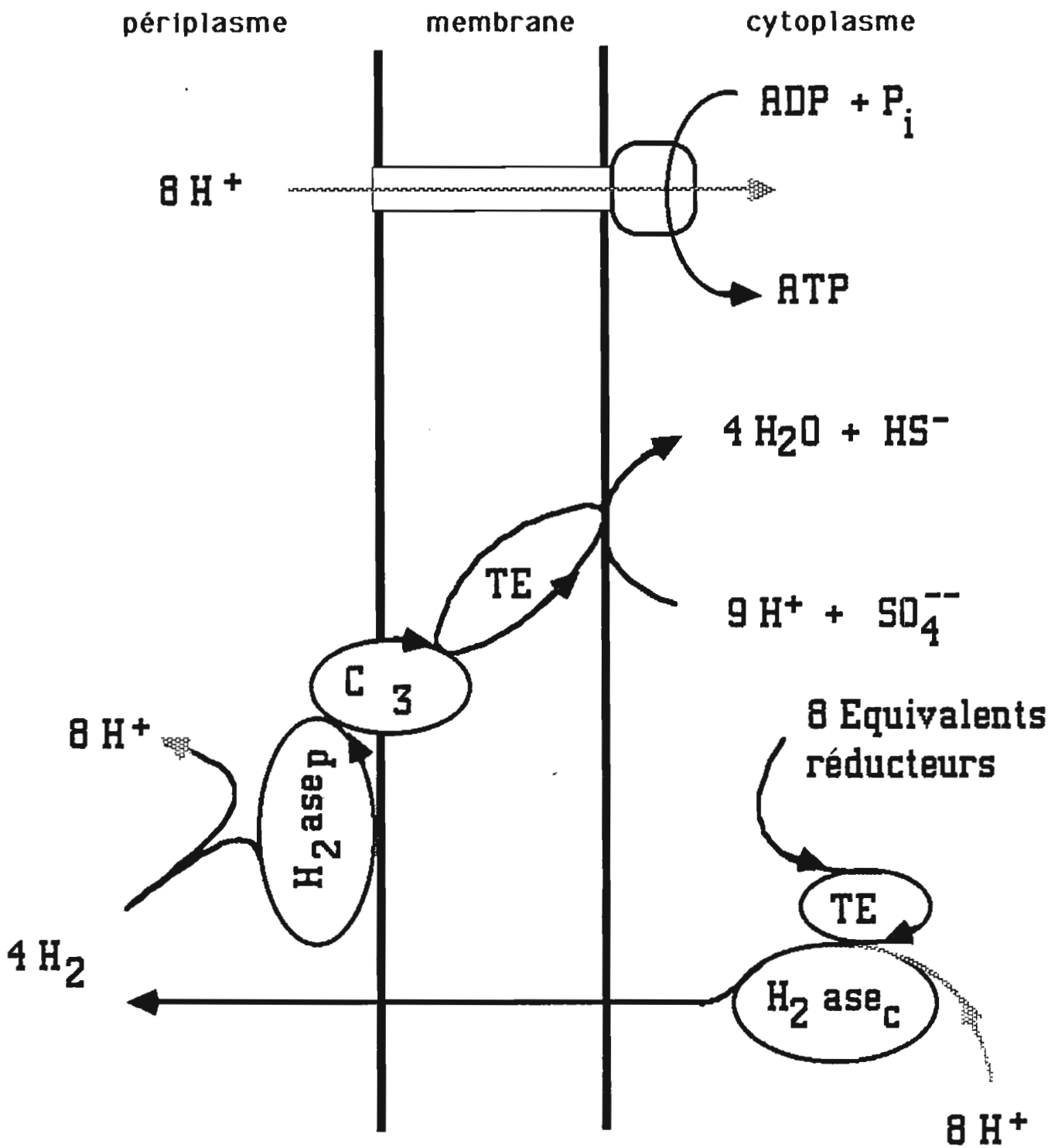


Fig. 4

Création d'un gradient de protons par le mécanisme de recyclage de l'hydrogène pendant l'oxydation des équivalents réducteurs provenant du lactate par *Desulfovibrio sp.*

TE = Transporteur d'électrons, $H_2 ase_p$ = Hydrogénase periplasmique
 $H_2 ase_c$ = Hydrogénase cytoplasmique, c_3 = Cytochrome c_3

l'hydrogène. Ces bactéries hydrogénophiles peuvent être facilement isolées sur des milieux contenant une source d'hydrogène abiotique ou biologique (Abram et Nedwell 1978a, Sorensen et al 1981). Les bactéries présentes dans les sols aérés catalysent également l'oxydation de l' H_2 , après exposition de ces sols à H_2 (Dugani et al. 1986)

5.1 Organismes catalysant l'oxydation de H_2

Les organismes qui oxydent l'hydrogène appartiennent à différents groupes bactériens physiologiquement et taxonomiquement différents. Ces groupes ont en commun les points suivants :

- des enzymes hydrogénases qui catalysent l'étape initiale d'oxydation de l' H_2 .
- utilisation d'un accepteur externe d'électrons qui reçoit les électrons produits par l'oxydation de H_2 .
- une chaîne de transport d'électrons qui permet le transfert des électrons fournis par l'oxydation de l'hydrogène vers l'accepteur d'électrons externe. Au cours de ces réactions de transfert d'électrons, il y a conservation de l'énergie par utilisation de la force proton-motrice (FPM) grâce à l'ATP-ase.

Ce dernier point indique que les bactéries oxydant l'hydrogène sont des bactéries qui respirent. Cependant, dans la littérature certains auteurs comme Lancaster (1986) n'excluent pas la possibilité d'une phosphorylation au niveau du substrat au cours de la dégradation de H_2 . Mais à l'exception de cette phosphorylation oxydative (respiration), on ne connaît pas à l'heure actuelle d'autre mécanisme de conservation de

l'énergie permettant la production d'ATP à partir de l'oxydation de l' H_2 . Par conséquent nous considérerons que les bactéries oxydant H_2 sont des bactéries qui effectuent une respiration.

On peut classer les bactéries qui oxydent H_2 en fonction des accepteurs d'électrons qu'elles utilisent et de ce fait en fonction de leurs métabolites excrétés. Tous les groupes physiologiques de bactéries possédant une chaîne respiratoire (bactéries effectuant une réduction dissimilatrice d'accepteurs d'électrons externes) ont des représentants capables d'oxyder l'hydrogène. Comme c'est surtout la réaction d'oxydation de H_2 plutôt que la position taxonomique de l'organisme catalyseur qui nous intéresse, nous avons classé les principales réactions biologiques consommant de l'hydrogène, actuellement connues, en fonction des accepteurs d'électrons mis en jeu dans ces réactions (Tab. 2, Fig. 1).

Dans la mesure où l'hydrogène est un intermédiaire important au cours de la dégradation des substrats organiques en conditions anaérobies, les bactéries qui, dans la nature, réalisent une oxydation anaérobie de l'hydrogène, présentent un intérêt particulier. Les bactéries méthanogènes (Zehnder et Ingvorsen 1982, Fardeau et Belaich 1986) et les bactéries sulfato-réductrices (Badziong et Thauer 1978, 1980, Badziong et al. 1978, Brandis et Thauer 1981, Cypionka et Pfennig 1986) sont les bactéries anaérobies oxydant H_2 les plus importantes et les mieux étudiées.

5.2 Compétition pour l'hydrogène

Dans les biotopes naturels exempts d'oxygène, les concentrations en

Tab. 2 – Accepteurs d'électrons utilisés pour l'oxydation de l'hydrogène par différents genres bactériens.

accepteur oxydé	accepteur réduit	ΔG° [kJ/ mole H_2]	genre bactérien (exemple)	références bibliographiques
HCO_3^-	acétate	-26.2	Acetobacterium	Wieringa 1940
HCO_3^-	méthane	-33.9	Methanosarcina	-
S^0	sulfure	-28.0	Desulfovibrio ,(Wolinella) Methanococcus	Biebl et Pfennig 1977 Stetter et Gaag 1983
SO_4^{--}	sulfure	-38.0	Desulfovibrio	-
$S_2O_3^{--}$	sulfure	-43.5	Desulfovibrio	-
$S_3O_3^{--}$	sulfure	-43.2	Desulfovibrio	-
fumarate	succinate	-86.2	Wolinella ,(Desulfovibrio)	Kröger 1978
méthanol	méthane	-112.5	Methanosarcina	Müller et al. 1986
ferulate	hydroferulate		Wolinella	Ohmiya et al 1986
cafféate	hydrocafféate	-85.5	Acetobacterium	Tscheck et Pfennig 1984
nitrate	ammonium	-149.9	Desulfovibrio,(Wolinella)	Seitz et Cypionka 1986
nitrite	ammonium	-145.5	Desulfovibrio	Seitz et Cypionka 1986
nitrate	azote	-224.1	Paracoccus	-
oxygène	eau	-237.3	Paracoccus	-
acétate	éthanol	-4.9	Desulfobulbus*	Laanbroek et al. 1982
butyrate	butanol	-8.2	Clostridium *	Jewell et al. 1986
propionate	propanol	-6.1	Clostridium*	Jewell et al. 1986
glycerol	propanediol		Desulfovibrio*	ce travail

* pas de croissance selon la réaction décrite

hydrogène sont extrêmement faibles. Cela est dû à une oxydation efficace de H_2 par les bactéries anaérobies hydrogénophiles. En fonction de la disponibilité des accepteurs d'électrons, les différents groupes de bactéries anaérobies oxydant H_2 entrent en compétition pour l'hydrogène excrété par les bactéries fermentatives. Dans les environnements anaérobies contenant des concentrations extrêmement faibles d' H_2 (Conrad et al. 1985, 1986, Lovley et al 1982, Robinson et al 1981, Strayer et Tiedje 1978), les bactéries les plus adaptées et les plus efficaces à utiliser cet hydrogène sont donc favorisées. La compétition pour l'hydrogène entre les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et les bactéries méthanogènes (BM) est la mieux étudiée.

Dans les sédiments marins riches en sulfate, la production de méthane s'est avérée négligeable (Jørgensen 1980, Martens et al. 1974, Oremland et Taylor 1978). L'addition de sulfate à des sédiments d'eau douce (ne contenant pas de sulfate) produisant du méthane provoque une inhibition de la méthanogénèse (Winfrey et Zeikus 1977, Sansone et Martens 1981) et simultanément une production importante de sulfures. L'idée initiale d'une inhibition des bactéries méthanogènes par le produit final de la réduction du sulfate a été rejetée lorsqu'il a été démontré que l' H_2S n'influe pas significativement la production de CH_4 aussi bien dans les environnements naturels (Jørgensen 1977) qu'en culture pure (Mountfort et Asher 1979).

L'effet inhibiteur du sulfate sur la méthanogénèse n'a été observé qu'avec des populations bactériennes naturelles et jamais en culture pure de bactéries méthanogènes. C'est pour cette raison que, dans les biotopes naturels, l'effet inhibiteur du sulfate sur la méthanogénèse est interprété comme une compétition cinétique vis-à-vis de substrats

communs entre BSR et BM. (Mountfort et al. 1980, Lovley et al 1982, Abram et Nedwell 1978). Des études cinétiques réalisées en culture pure ont finalement prouvé que les BSR l'emportaient sur les BM au cours du processus de compétition pour H_2 grâce à leur plus grande affinité pour des substrats communs importants tels que l'acétate (Schönheit et al. 1982) et l'hydrogène (Lovley et Klug 1983, Lovley et al. 1982, Robinson et Tiedje 1984, Kristianssen et al. 1982). Cependant l'inhibition totale de la méthanogénèse par la sulfoato-réduction ne s'explique pas uniquement par des paramètres cinétiques. En conséquence, Lovley (1986) a récemment proposé que le seuil de concentration d'hydrogène ("threshold concentration") utilisable par les différents organismes soit considéré, au détriment des paramètres cinétiques (μ_{max} , k_m), comme le facteur déterminant le résultat de la compétition pour l'hydrogène. Selon cette hypothèse, ce n'est pas la vitesse inférieure d'oxydation des traces d'hydrogène qui pourrait expliquer l'incapacité des bactéries méthanogènes à être compétitives pour l'hydrogène en présence de BSR actives, mais l'impossibilité d'oxyder H_2 en dessous d'une certaine concentration (seuil de concentration d' H_2). A l'heure actuelle, il est difficile de choisir entre le modèle cinétique ou le modèle de seuil de concentration pour décrire le plus exactement possible le processus de compétition pour l' H_2 . Il est d'ailleurs possible que ces modèles jouent tous les deux un rôle dans la nature.

La concentration apparente en hydrogène détermine non seulement la vitesse (modèle cinétique) ou la capacité à dégrader H_2 mais contrôle également, du moins en théorie, le taux de production de l'hydrogène et par là même le taux de croissance des bactéries syntrophiques (Powell 1984, 1985, Archer et Powell 1985). Selon les calculs de Powell, dans de

telles associations syntrophiques, la capacité du consommateur d'hydrogène à maintenir la pression partielle d'hydrogène à un bas niveau devrait déterminer le taux de croissance de la coculture entière.

6 Corrosion du fer

6.1 Le fer à la surface de la terre

A la surface de la terre, le fer ne se trouve pas naturellement sous forme métallique (fer élémentaire) pour deux raisons :

- Il s'oxyde spontanément dans des conditions humides et aérobies (c'est-à-dire dans presque tous les sols et les eaux).
- Aucun processus naturel ne peut réduire les formes oxydées du fer en les ramenant à l'état métallique (degré d'oxydation 0).

Les seules espèces du fer qui prennent part à des réactions d'oxydo-réduction naturelles sont le fer ferreux (Fe^{2+}) et le fer ferrique (Fe^{3+}). Dans les environnements naturels, on peut visualiser les différents états d'oxydation du fer. En effet, les biotopes oxydés de couleur rouge brun sont généralement riches en fer ferrique alors que les biotopes anoxiques de couleurs noires (sédiments lagunaires et sols anaérobies comme les rizières) correspondent souvent à des zones anérobies riches en fer ferreux combiné sous forme de sulfures (FeS). Dans les environnements anaérobies, le fer ferrique est donc un oxydant et dans les biotopes riches en oxygène, le fer ferreux est un réducteur.

d'hydrogène à maintenir la pression partielle d'hydrogène à un bas niveau devrait déterminer le taux de croissance de la coculture entière.

6 Corrosion du fer

6.1 Le fer à la surface de la terre

A la surface de la terre, le fer se trouve naturellement sous forme métallique (fer élémentaire) pour deux raisons :

- Il s'oxyde spontanément dans des conditions humides et aérobies (c'est-à-dire dans presque tous les sols et les eaux).
- Aucun processus naturel ne peut réduire les formes oxydées du fer en les ramenant à l'état métallique (degré d'oxydation 0).

Les seules espèces du fer qui prennent part à des réactions d'oxydo-réduction naturelles sont le fer ferreux (Fe^{2+}) et le fer ferrique (Fe^{3+}). Dans les environnements naturels, on peut visualiser les différents états d'oxydation du fer. En effet, les biotopes oxydés de couleur rouge brun sont généralement riches en fer ferrique alors que les biotopes anoxiques de couleurs noires (sédiments lagunaires et sols anaérobies comme les rizières) correspondent souvent à des zones anaérobies riches en fer ferreux combiné sous forme de sulfures (FeS). Dans les environnements anaérobies, le fer ferrique est donc un oxydant et dans les biotopes riches en oxygène, le fer ferreux est un réducteur. Par ailleurs, le fer entre dans la composition de nombreux transporteurs d'électrons (cytochromes) ainsi que dans la composition de certaines molécules chargées de véhiculer l'oxygène (hémoglobine).

Selon son degré d'oxydation, le fer élémentaire $\text{Fe}(0)$ est un réducteur plus puissant que le fer ferreux et constitue un agent réducteur aussi bien dans les environnements aérobies qu'anaérobies. On peut alors considérer le fer métallique comme un composé réduit artificiellement (au dépens d'une perte d'énergie considérable). C'est donc un donneur d'électrons puissant qui a tendance à s'oxyder en présence d'oxydants naturels (accepteurs d'électrons) au cours de réactions chimiques (accepteur d'électrons = oxygène) ou de réactions catalysées biologiquement (accepteur d'électrons = sulfate).

6.2 Corrosion aérobie : formation de rouille

Le type de corrosion le plus important sur le plan économique est certainement la corrosion aérobie qui a pour résultat la formation de rouille. La corrosion est un processus électrochimique qui se déroule spontanément à la surface du métal lorsque celui-ci est placé en milieu aqueux et en présence d'oxygène. Dans la littérature (Miller et King 1975), ce mécanisme s'explique de la façon suivante :

Lorsque qu'un métal ferreux est immergé en milieu aqueux, il commence à dissoudre très lentement des cations Fe^{2+} (qui peuvent à nouveau être oxydés en Fe^{3+} par l'oxygène). Cette réaction s'appelle la réaction anodique. Les deux électrons libérés au cours de l'oxydation d'un atome de fer (0) restent dans le réseau métallique ce qui correspond à une réduction du fer. La réaction anodique peut donc être considérée comme une dismutation du Fe^0 en Fe^{2+} et en $\text{Fe}^{\delta-}$. Les charges négatives qui restent à

la surface du fer dans le réseau métallique ne peuvent pas s'accumuler dans un système conducteur tel qu'un métal. Elles se répartissent donc à la surface du métal et peuvent être consommées (oxydation du fer) par des oxydants tels que l'oxygène (réaction cathodique, Fig. 6 de l'article 7). C'est uniquement après l'enlèvement de ces électrons que l'on observe une dégradation effective du métal. Le processus de corrosion qui correspond à l'ensemble des deux réactions anodique et cathodique se poursuit et aboutit à la dissolution du fer dans le milieu, mesurable par la perte de poids du métal.

Dans les environnements aérobies tels que les réseaux d'égout, où l'on observe généralement une activité microbienne intense, les bactéries aérobies peuvent accélérer ce processus de corrosion en produisant des acides corrosifs (Milde 1983) ou en créant des cellules d'aération différentielle (Daumas 1987). Cependant, la formation de rouille qui est le résultat de l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique, ne dépend en aucun cas de l'activité bactérienne.

6.3 Polarisation: comportement théorique du fer en milieu aqueux exempt d'oxygène

En l'absence d'oxygène, la réaction anodique, qui est la réaction de corrosion proprement dite, est identique à celle décrite dans le cas d'une corrosion aérobie. Par contre, la réaction cathodique est différente en ce sens que les électrons libérés dans le réseau métallique sont utilisés pour la réduction des protons provenant de la dissociation de l'eau avec pour conséquence la production d'hydrogène. De manière

générale, l'hydrogène formé s'adsorbe à la surface du métal sous forme d'un film protecteur et la vitesse de la réaction cathodique devient si lente qu'elle est inefficace à déplacer le système dans le sens de la consommation des électrons. L'ensemble est alors en équilibre; Ce phénomène est connu sous le nom de polarisation. Cette polarisation permet d'expliquer que le fer est généralement peu corrodé dans les environnements anoxiques (et stériles).

6.4 Corrosion anaérobie : Corrosion microbienne

Dans les environnements stériles anaérobies, la corrosion du fer n'est généralement pas significative. Par conséquent, l'importance de cette corrosion observée dans des biotopes exempts d'oxygène, a été attribuée à l'activité des bactéries. La corrosion microbienne en l'absence d'oxygène a une grande importance économique. En effet, aux Etats-Unis, les pertes occasionnées par ce type de corrosion, principalement des canalisations enterrées (habituellement limitées en O_2), ont été estimées entre 0,5 et 2×10^9 dollars (Greathouse et Wessel, 1954, cités par Postgate 1979).

C'est dans l'industrie du pétrole aussi bien au niveau de la production, du stockage que du transport (pipelines) du pétrole (c.f. article 7) et dans l'industrie géothermique (Daumas 1987) que les cas les plus importants de corrosion anaérobie ont été observés. Les ouvrages endommagés présentent généralement une morphologie de corrosion en piqûres ("pitting corrosion") qui peuvent aboutir rapidement à des perforations. La corrosion anaérobie a généralement été attribuée aux BSR.

Une revue détaillée du rôle dominant des BSR dans la corrosion anaérobie du fer est présentée dans l'article 7. Si l'enlèvement du film protecteur d' H_2 à la surface du métal par les BSR, entraînant l'accélération exclusive de la réaction cathodique, est effectivement le principal mécanisme responsable de la corrosion anaérobie, d'autres bactéries anaérobies oxydant l' H_2 , autres que les BSR, devraient être capables de provoquer ce type de corrosion. L'effet des bactéries hydrogénophiles aérobies et des bactéries méthanogènes oxydant l' H_2 , sur la corrosion anaérobie du fer a déjà été étudié et n'a pas été jugé significatif (Booth et al 1968). Ce résultat met donc en relief l'importance éventuelle de la production de sulfure par les BSR au cours du processus de la corrosion anaérobie.

L'un des buts du présent travail a été de tester l'effet d'autres bactéries oxydant H_2 mais ne produisant pas de sulfure, sur l'oxydation anaérobie du fer afin de n'étudier que le rôle de la consommation bactérienne d'hydrogène cathodique.

Si, en anaérobiose, le fer métallique réduit vraiment les protons en H_2 , on devrait alors pouvoir mesurer, dans ces conditions, une production d' H_2 à partir du fer. Un autre but de ce travail a donc consisté à démontrer la production de H_2 produit par le fer métallique immergé en milieu anoxique.

7 Objectifs de recherche

Dans l'état actuel des connaissances, il reste encore quelques questions sans réponse qui constituent les buts même du présent travail :

- Rôle du métabolisme de l' H_2 dans le TIH
- Existence d'un TIH à partir des composés en C_1 qui ne permettent pas une phosphorylation par la réaction phosphoroclastique.
- Le TIH est-il toujours un avantage pour le donneur d' H_2 ?
- Est-ce le seuil de l'oxydation de H_2 ou les paramètres cinétiques qui déterminent le succès d'un organisme dans la compétition pour l' H_2 ?
- A quoi est dû le seuil de la concentration oxydable d' H_2 ?
- Est-ce qu'il existe un transfert d' H_2 entre le fer et une BSR similaire au TIH?

Résultats et Discussion

1 Détermination des sulfures dissous et précipités

Dans la plupart des expériences présentées dans cette étude, il a été nécessaire de déterminer quantitativement les sulfures, et plus particulièrement pour les expériences de corrosion dans lesquelles les sulfures produits ont tendance à précipiter avec les ions Fe(II) dissous. La détection des sulfures par les méthodes classiques de distillation aurait demandé beaucoup de temps. Une méthode rapide et facilement réalisable pour la quantification des sulfures précipités et dissous, non disponible jusqu'à présent, a été mise au point dans ce but (article 1).

JMM 00115

A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria

Ralf Cord-Ruwisch

Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 3, Place Victor Hugo, 13331 Marseille Cédex 3 (France)

(Received 23 January 1985) (Revised version received 19 March 1985) (Accepted 22 March 1985)

Summary

Dissolved sulfide was determined spectrophotometrically as a colloidal solution of copper sulfide. Calibration curves were linear. Maximal deviation error was below 5%. Sulfide precipitated as FeS was determined after acidification of the medium.

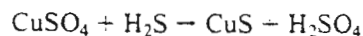
Key words: Ferrous sulfide - Spectrophotometric sulfide detection - Standard preparation - Sulfide calibration curve

Introduction

Sulfide in cultures of sulfidogenic bacteria is usually determined by the methylene blue reaction [1, 2]. This method permits quantitative analysis of traces of dissolved sulfide (e.g., in groundwater) down to concentrations of micromoles per liter. Since this reaction takes about 20 min, the presence of dissolved sulfide in cultures of sulfate-reducing bacteria (SRB) is proved rapidly by its colloidal precipitation as CuS in a copper sulfate reagent [3, 4]. After its modification, this qualitative proof can be quantified photometrically, as described in this paper.

Materials and Methods

The copper reagent consisted of HCl (50 mmol/l) and CuSO₄ (5 mmol/l). The reaction was:



Procedure

All culture vessels were completely filled. If not, the pH of the culture was increased to pH 10 to reduce loss of volatile H_2S that escaped into the gas phase. Culture fluid (0.05 ml) was removed by syringe or pipette from the culture vessel while 1.95 ml copper reagent was magnetically stirred (1000 r.p.m.) in a 2 ml, 1 cm measuring cuvette. The culture fluid was rapidly injected into the stirring reagent. Immediately after mixing for 5 s, the absorbance was measured at 480 nm in a Bausch & Lomb Spectronic 21 photometer. The mixture of 0.05 ml culture liquid and 1.95 ml HCl (50 mmol/l) served as blank.

The magnetically stirred cuvette could be replaced by a test tube posed on a whirl mixer (1000 r.p.m.). In this case, 4 ml reagent and 0.1 ml culture fluid were used.

Sulfide standard preparation

Distilled water (200 ml) was boiled to remove dissolved oxygen. The hot water was cooled under N_2 as the gas phase (Hungate technique [5, 6]) and the vessel was sealed with a rubber septum. Five ml of this anoxic water was dispensed by syringe into several 14 ml N_2 filled, septum sealed test tubes (Hungate tubes, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA).

A washed crystal of $Na_2S \cdot 9H_2O$ was dissolved in anoxic water to a known concentration (50–100 mM). Five ml of this concentrated sulfide solution was transferred by syringe into the first of the tubes containing 5 ml anoxic water. After shaking, 5 ml of this mixture were transferred anaerobically into the second tube. By this means, an anoxic dilution series of dissolved sulfide was prepared. Since solutions of Na_2S are alkaline (pH 12), volatile H_2S in the gas atmosphere was negligible.

Precipitated sulfide

In culture media containing dissolved Fe^{2+} , the produced sulfide was partly precipitated to the vessel bottom as FeS. Five percent of the FeS-free culture liquid was removed from the completely filled vessel by syringe through the rubber septum and was replaced by 4 M HCl. The tube was shaken until all FeS dissolved and total sulfide was determined as described above. Undissolved sulfide was calculated by subtraction of dissolved sulfide from total sulfide.

Results and Discussion

Aliquots of sulfate-reducing bacterial cultures, cultivated without gas phase in the medium of Widdel and Pfennig [7], when added (1:4, v/v) to the acidic $CuSO_4$ solution [1, 2], caused a dark brownish precipitation of CuS. Smaller amounts (1:40, v/v) of aliquots added to the moving copper reagent resulted in a colloidal CuS solution which remained stable for 20–40 s. During this time, the absorbance of the end product was measured at 480 nm wavelength.

At 480 nm, the reagent had the same optical density as distilled water. HCl (50 mmol/l) added by the culture aliquot served as blank. Calibration curves were linear up to an absorbance of 0.5 (Fig. 1). Therefore a factor could be used to calculate the sulfide concentration from the measured absorbance. Maximal obtained deviation from

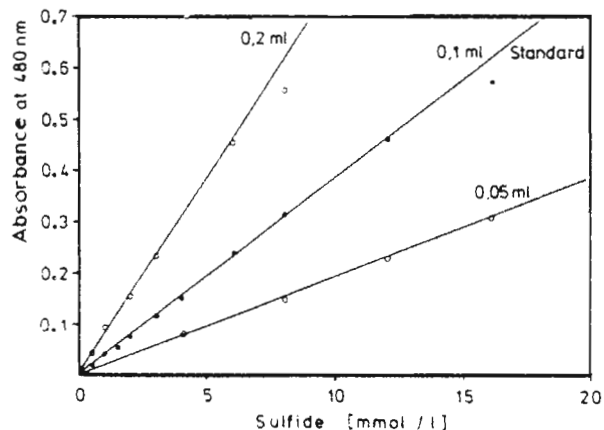


Fig. 1. Calibration curves of sulfide determination. Sulfide standards were added to 4 ml moving copper reagent.

TABLE I

	Methylene blue reaction	Copper sulfide reaction
Reaction time	20 min	0.5 min
Maximal error	below 5%	below 5%
Detection limit	0.01 mM	0.1 mM
Calibration curve	not linear	linear
Highly toxic residues	100 ml <i>N,N</i> -dimethyl-1,4-phenylene-diamonium dichloride-containing solution	none

the calculated straight regression line was less than 5%. Reproducible results were only obtained when the reagent and culture aliquot were mixed together while they were moving (magnetic stirrer or whirl mixer). Even intensive stirring of the reagent immediately after the culture liquid was added to the resting reagent, resulted in maximal deviation of about 15%.

Some culture media of SRB contain high amounts of ferrous iron salts (e.g., Postgate's medium [7]) which precipitate after bacterial growth as FeS; or dissolved iron is supplemented to trap hydrogen sulfide [8]. In the presence of elemental iron, a part of the sulfide produced also precipitates as FeS (corrosion experiments [9]). In these cases, only excess sulfide remains dissolved in the medium. After sedimentation of the FeS-flocks, the remaining dissolved sulfide was determined as above. After acidification of the culture liquid (see above), the FeS dissolved, and total produced sulfide could be determined. Compared to the methylene blue reaction [1, 2], the determination of dissolved sulfide in cultures of sulfate-reducing bacteria with the described method was more rapid with similar accuracy and no toxic products (Table I).

No other anions usually present in bacterial cultures or biological environments precipitate with copper in acidic solution. Therefore this method may also be applied directly in natural habitats of sulfate-reducing bacteria (marine sediments).

References

- 1 Pachmayr, F. (1960) Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. PhD thesis, University München, FRG.
- 2 Cline, J.D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14, 454-458.
- 3 Widdel, F. (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfat-reduzierender Bakterien. PhD thesis, University Göttingen, FRG.
- 4 Laanbroek, H.J. and Pfennig, N. (1981) Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and in marine sediments. *Arch. Microbiol.* 128, 330-335.
- 5 Hungate, R.E. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology*, Vol. 3b (Norris, R. and Ribbons, D. W., eds.) pp. 117-132, Academic Press, New York.
- 6 Bryant, M.P. (1972) Commentary on the Hungate Technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 1324-1328.
- 7 Widdel, F. and Pfennig, N. (1984) Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 (Krieg, N. R. and Holt, J. G., eds.) pp. 663-679, Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 8 King, R. A., Miller, J. D. A. and Wakerley, D. S. (1973) Corrosion of mild steel in cultures of sulfate-reducing bacteria: effects of changing the soluble iron concentration during growth. *Br. Corros. J.* 8, 89-94.
- 9 Bell, R. G., Chor Kiang Lim (1981) Corrosion of mild and stainless steel by four tropical *Desulfovibrio desulfuricans* strains. *Can. J. Microbiol.* 27, 242-245.

2 Transfert interspèces d'hydrogène (TIH)

2.1 TIH à partir du fructose

Il a été découvert fortuitement que la souche *Desulfovibrio* JJ était capable de dégrader le fructose. Le métabolisme des hydrates de carbone chez les espèces de *Desulfovibrio* n'étant pas connu, il nous a semblé intéressant d'étudier la formation des produits du métabolisme de ces souches ainsi que les rendements en biomasse obtenus au cours de la dégradation du fructose en présence et en l'absence de sulfate. Il nous a semblé plus particulièrement intéressant de voir si en l'absence de sulfate, les bactéries méthanogènes hydrogénophiles pourraient jouer le rôle d'accepteur d'hydrogène comme précédemment observé avec d'autres souches de *Desulfovibrio* utilisant le lactate (Bryant et al. 1977, Traoré et al. 1983, 1983 a) et dans ce cas, de voir également si, en enlevant l' H_2 , l'équilibre de la fermentation était déplacé vers une production accrue (ou exclusive) d' H_2 et d'acétate permettant ainsi une formation plus importante d'ATP (c.f. Introduction 3.5, 3.7)(article 2).

Fructose Degradation by *Desulfovibrio* sp. in Pure Culture and in Coculture with *Methanospirillum hungatei*

Ralf Cord-Ruwisch, Bernard Ollivier, and Jean-Louis Garcia

Laboratory of Microbiology, ORSTOM, University of Provence, Marseille, France

Abstract. In a mineral medium containing sulfate, the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio* sp. strain JJ degraded 1 mol of fructose stoichiometrically to 1 mol of H₂S, 2 mol of acetate, and presumably 2 mol of CO₂. The doubling time was 10 h, and the yield was 41.6 g dry weight/mol fructose degraded. In the absence of sulfate, the hydrogenophilic methanogen *Methanospirillum hungatei* replaced sulfate as hydrogen sink. In such cocultures, 1 mol of fructose was converted to acetate, methane, succinate, and presumably CO₂ in varying concentrations. The growth yield of the H₂-transferring association was 33 g dry weight/mol fructose. In the absence of sulfate, *Desulfovibrio* strain JJ slowly fermented 1 mol of fructose to 1 mol of succinate, 0.5 mol of acetate, and 0.5 mol of ethanol. The results are compared with those of other anaerobic hexose-degrading bacteria.

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are known as typical organisms which end-oxidize organic matter to CO₂ in strict anaerobic sulfate-containing natural environments [11, 13, 21, 26]. Their metabolism is specialized in degrading the products excreted by fermenting bacteria: acetate, propionate, butyrate, and hydrogen are their main substrates in anaerobic sediments [23]. They also degrade other fermentation products like alcohols, long-chain fatty acids, and lactate [20, 27]. The carbohydrate degradation in natural environments has never been shown to occur directly via SRB.

Only *Desulfotomaculum nigrificans* has been documented to degrade fructose [12] or autoclaved glucose [1], but no other carbohydrates. (Filter-sterilized glucose was not degraded by this species [12]; this indicates isomerization of glucose by heat, partially to fructose [12, 17].) However, growth of *D. nigrificans* on fructose is very poor and slow (R. Klemp, personal communication). Furthermore, *Desulfotomaculum* species, which are all sporulating rods, are more closely related to the fermenting and homoacetogenic bacteria of the genus *Clostridium* than the other SRB, as evidenced by 16S-rRNA homology studies [12], by their gram-positive cell wall structure [22], by their capability to reduce CO₂ to acetate [12], and by the fact that they are sporulating.

Members of the genus *Desulfovibrio* have never been shown to degrade carbohydrates in pure culture [20].

Materials and Methods

Organisms. *Desulfovibrio* strain JJ was obtained by repurification of a culture of a *Desulfovibrio* strain isolated by J.W. Jones (University of Illinois) [10]. *Methanospirillum hungatei* (DSM 864) was isolated from the defined syntrophic association with *Syntrophus bushwellii* (DSM 2612 TB).

Medium and growth conditions. The anaerobic Hungate technique [8] as modified for the use of syringes [14] was used throughout this study. The anaerobic bicarbonate-buffered, sulfide-reduced medium contained fructose and vitamins as sole organic substances. This medium was composed as described for SRB [27] and prepared as previously described [5]. In the coculture and fermentation experiments, sulfate was omitted. Stock solutions of fructose (0.5 mol/liter) were autoclaved separately.

The cells were cultivated in 300 ml medium with and without gas phase for coculture and monoculture experiments respectively. Cell dry weight of the centrifuged and washed (phosphate buffer, 50 mmol/liter) cells was determined after drying at 60°C. All chemicals used were of reagent quality.

Analytical methods. All determinations were repeated twice. Sulfide was determined spectrophotometrically as colloidal CuS [4]. Methane and alcohols were determined by gas chromatography (Varian Aerograph 2700; injection: 250°C; column: 3 m × 4 in. stainless steel. Porapak Q 80-100 mesh, 215°C; carrier gas: N₂, flow rate: 30 ml/min; detection: flame ionization 245°C).

Fructose and organic acids were measured by HPLC

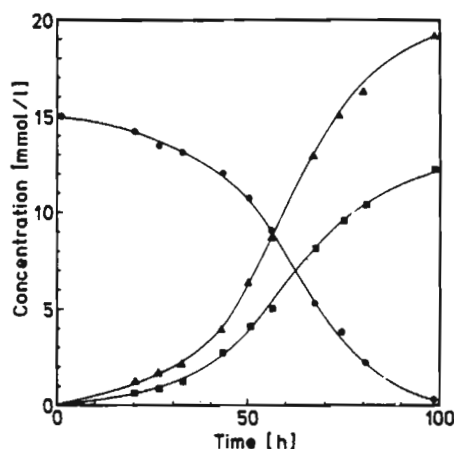


Fig. 1. Time course of fructose degradation and end-product formation by *Desulfovibrio* sp. strain JJ in the presence of sulfate: ●—●, fructose; ▲—▲, acetate; and ■—■, sulfide.

(pump: Analprep 93, Touzart et Matignon, Vitry sur Seine, France; flow rate: 0.6 ml/min; injection loop: 100 μ l; column: Amines Ion-Exclusion HPX-87H, 300 \times 7.8 mm, Bio-Rad, Richmond, California; column temperature: 40°C; detection: differential refractometer, Knauer, Berlin; recorder integrator: Chromatopak C-R3A, Shimadzu, Kyoto).

Purity tests. The purity of the isolate was tested in the same medium as described above, with addition of 1% glucose + 1% yeast extract + 1% biotrypcase. Furthermore, all isolated colonies were examined microscopically.

Purification technique. The strain was repurified by repeated application of the agar shake dilution technique [27], modified by using Hungate tubes and sterile syringes after each dilution step. Agar was washed five times with distilled water. The strain was also repurified on H_2 , according to the anaerobic roll tube technique [9]. In this case, "Noble-Agar" (Difco), acetate (1 mM), and vitamins were the only organic compounds.

Results

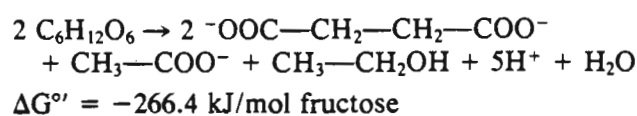
The *Desulfovibrio* sp. isolated by J.W. Jones [10] and called *D. vulgaris* strain JJ was previously used to serve as H_2 consumer in mixed defined cultures with the homoacetogenic *Sporomusa acidovorans* [17] on fructose (unpublished results). Sulfate was reduced to sulfide by this coculture as well as by the control essay, containing fructose and inoculated only with *Desulfovibrio* strain JJ. After two days of incubation, strain JJ was grown to a higher optical density (OD = 0.9 at 580 nm) than the pure culture of *S. acidovorans* (OD = 0.7).

The *Desulfovibrio* strain also grew well on lactate and hydrogen (+1 mM acetate) and poorly on ethanol and methanol. In order to confirm the purity

of the culture, strain JJ was cultivated parallel on lactate, ethanol, methanol, hydrogen (+1 mM acetate), and fructose; and after three transfers of each essay, the strain was repurified on the relative substrate as described in *Materials and Methods*. All isolates were morphologically uniform (motile vibrios). No isolate grew in the purity test medium. After transfer into fructose medium, all isolates degraded fructose without lag phase. The isolate finally used was obtained from a single colony of the last (7th) dilution step of a rolled agar tube [17] with H_2 as the energy source. The colony was suspended aseptically in liquid mineral medium and was diluted by successive transfers into a series of sterile tubes containing H_2 as the sole energy source. The last positive tube (11th) of this third dilution series served as the inoculum for the following experiments.

Fructose was degraded to acetate, sulfide, and presumably to CO_2 (Fig. 1). Traces of succinate were found after the growth in fructose-rich (20 mM) medium (Table 1). The high cell yield (about 41.6 g dry weight/mol fructose) accounted for about 28% of the whole reducing equivalents from the substrate incorporated into cell mass. The doubling time of strain JJ as calculated from fructose disappearance was 10 h.

In the absence of sulfate, strain JJ fermented fructose to acetate, succinate, and ethanol (Table 1) according to the following equation:



Under these conditions the growth of *Desulfovibrio* sp. strain JJ was extremely slow (t_d 450 h). However, even after two months of incubation most of the cells were motile. The addition of sulfate to such a two-month-old culture of strain JJ led to the degradation of the ethanol produced but not to succinate degradation.

In the absence of sulfate, the hydrogen-consuming methanogenic bacterium *Methanospirillum hungatei* served as an alternative acceptor of reducing equivalents liberated by strain JJ from fructose degradation to acetate. At the beginning of the incubation, this coculture produced only acetate, CH_4 , and presumably CO_2 as end-products (Fig. 2). When about 2 mmol of fructose per liter were degraded, succinate appeared as a further end-product. However, the ratio of the end-products was not

Table 1. Results of experiments of anaerobic fructose degradation by *Desulfovibrio* strain JJ in the presence of sulfate (lines 1–4) in the absence of sulfate (lines 9–10), and in the absence of sulfate in the presence of *Methanospirillum hungatei* (lines 5–8)

Line	Fructose degraded	OD (580 nm)	Dry weight (g/liter)	Y (g/mol)	Fructose assim.	Acetate	H ₂ S (S) or CH ₄ (M)	Succinate	Ethanol	e ⁻ Recovery
1	5.0	0.45	0.207	41.4	1.42	6.9	3.9 (S)	0.0		100
2	10.0	0.80	0.417	41.7	2.87	14.7	8.3 (S)	0.0		105
3	15.0	0.97	0.577	38.5	3.97	18.8	12.8 (S)	0.0		96
4	20.0	1.10	0.593	29.7	4.08	27.3	16.2 (S)	0.2		93
5	5.0	0.42	0.177	35.4	1.22	5.1	3.5 (M)	1.0		93
6	10.0	0.70	0.313	31.3	2.15	9.2	6.5 (M)	3.4		93
7	15.0	0.90	0.365	24.3	2.51	12.4	8.5 (M)	6.3		87
8	17.8 ^a	0.98	0.438	24.6	3.01	15.0	9.0 (M)	11.4		99
9	5.0	0.15	n.d. ^b	13.2 ^c	0.53	2.0		4.2	1.3	91
10	6.9 ^a	0.22	n.d. ^b	14.0 ^c	0.66	2.6		5.8	2.1	85

Fructose was the sole carbon and energy source. Highest growth yield was obtained on 2.5 mM fructose (45 g/mol calculated from optical density [OD]).

^a Fructose given (20 mM and 10 mM) was not completely degraded.

^b Not determined.

^c As calculated from optical density.

constant: The relative portion of succinate increased with the amount of fructose degraded (Fig. 2 and Table 1). Besides acetate, methane, and succinate, no other organic compound was produced. The doubling time of this coculture was 21 h. The maximum cell yield was 35.4 g dry weight/mol fructose degraded.

Discussion

In natural anoxic environments, carbohydrates are generally degraded by fermentative bacteria, resulting in the formation of fermentation products such as fatty acids, H₂, lactate, or alcohols.

Our results show that the direct use of carbohydrates by a strain of the genus *Desulfovibrio* is possible: *Desulfovibrio* strain JJ oxidized fructose stoichiometrically to acetate and presumably CO₂ during sulfate reduction to sulfide. The growth rate obtained (10 h) corresponded to that of fructose-degrading homoacetogenic bacteria [24, 28].

Because of the high yield of 41.6 g dry weight/mol fructose, the assimilated substrate had to be considered before the equation of the reaction was established. The empirical formula for bacterial dry mass is C₄H₈O₂N [7]. A simpler formula with the same carbon-oxidation state and nearly the same molecular weight (102 : 103) can be obtained by replacing the bound NH₃ by H₂O: C₄H₇O₃. This formula is used in assimilation equations [24, 25]. The assimilation equation for fructose is:

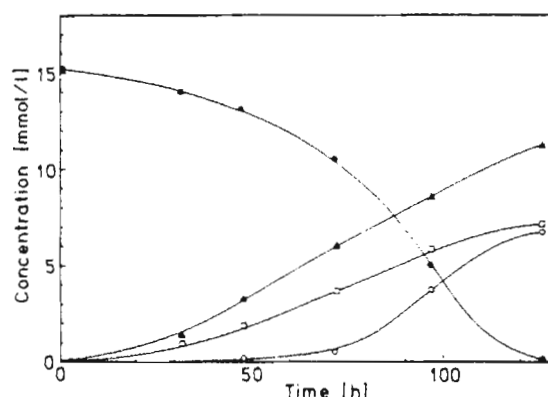
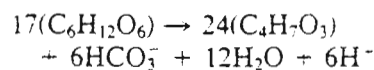
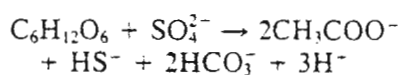


Fig. 2. Time course of fructose degradation and end-product formation by the coculture of *Desulfovibrio* sp. strain JJ and *Methanospirillum hungatei* in the absence of sulfate: ●—●, fructose; ▲—▲, acetate; □—□, methane; and ○—○, succinate.



Corresponding to this equation, 1 g of cell dry weight equals 6.88 mmol of fructose assimilated. When 41.6 g dry weight were produced/mol fructose degraded, this corresponded to 28.6% of fructose assimilated.

If one considers 28.6% of fructose assimilated, the pure dissimilatory fructose degradation corresponded approximately to the equation:



Therefore, 1 mol of fructose seems formally to be fermented to 4 mol of H₂ and 2 mol of acetate, and the hydrogen then oxidized with 1 mol of SO₄²⁻ as the electron acceptor. This assumption corresponds to the theory of hydrogen cycling involved in *Desulfovibrio* species [16, 19], and was verified by the coculture experiment with the H₂-oxidizing *M. hungatei*, which served as an alternative hydrogen sink. The way of fructose degradation via acetate, hydrogen, and CO₂ appears also in homoacetogenic bacteria [6, 18, 28].

The growth yield obtained was comparable to that of homoacetogenic bacteria grown on fructose [24]. This indicates similar ATP gains for both sulfate reduction to sulfide (1 to 1.3 ATP/sulfate [2, 15]) and CO₂ reduction to acetate, provided glycolysis and pyruvate degradation to acetate yield generally the same amounts of ATP. The rate of fructose degradation by *Desulfovibrio* strain JJ was similar to that of homoacetogenic bacteria (Table 1).

Hydrogenophilic methanogens are able to remove the intermediary H₂ formed from homoacetogenic bacteria-degrading organic products [6, 28]. In the absence of sulfate and in the presence of hydrogen-consuming methanogens, sulfate-reducing bacteria also transfer their reducing equivalents from lactate or ethanol degradation to the methanogen [3]. All these interspecific H₂-transferring cocultures produce only acetate, CO₂, and CH₄.

When grown on fructose in the absence of sulfate, *Desulfovibrio* strain JJ was able to use the H₂-consuming *M. hungatei* as alternative H₂ sink. However, this coupling was not perfect: besides CO₂, CH₄, and acetate, succinate was also produced. Therefore, *Desulfovibrio* sp. strain JJ used a part of the reducing equivalents to reduce oxaloacetate to malate and fumarate to succinate rather than protons to H₂. This is thermodynamically more favorable than ethanol or lactate production and should gain a further ATP via electron transport phosphorylation. (In the presence of both sulfate and fumarate as external electron acceptors, strain JJ reduced fumarate to succinate instead of sulfate to sulfide [data not shown].) This incomplete interspecific hydrogen-transfer indicates a limitation of the process by H₂-consumption rather than by glycolysis.

In the absence of a suitable external electron sink, the growth of *Desulfovibrio* strain JJ on fructose was extremely slow (*t*_d = 250 h). The fermentation of fructose to succinate, acetate, and ethanol by this strain could not play a significant ecological role. However, in sulfate-free anaerobic environ-

ments, the hydrogen partial pressure is lowered by methanogenic bacteria; this would allow a more rapid degradation of the sugar by means of an interspecific hydrogen transfer.

Desulfovibrio strain JJ has been deposited in the *Deutsche Sammlung für Mikroorganismen* (DSM), Göttingen, FRG, under the number DSM 3604. Further taxonomical studies of this strain are in progress.

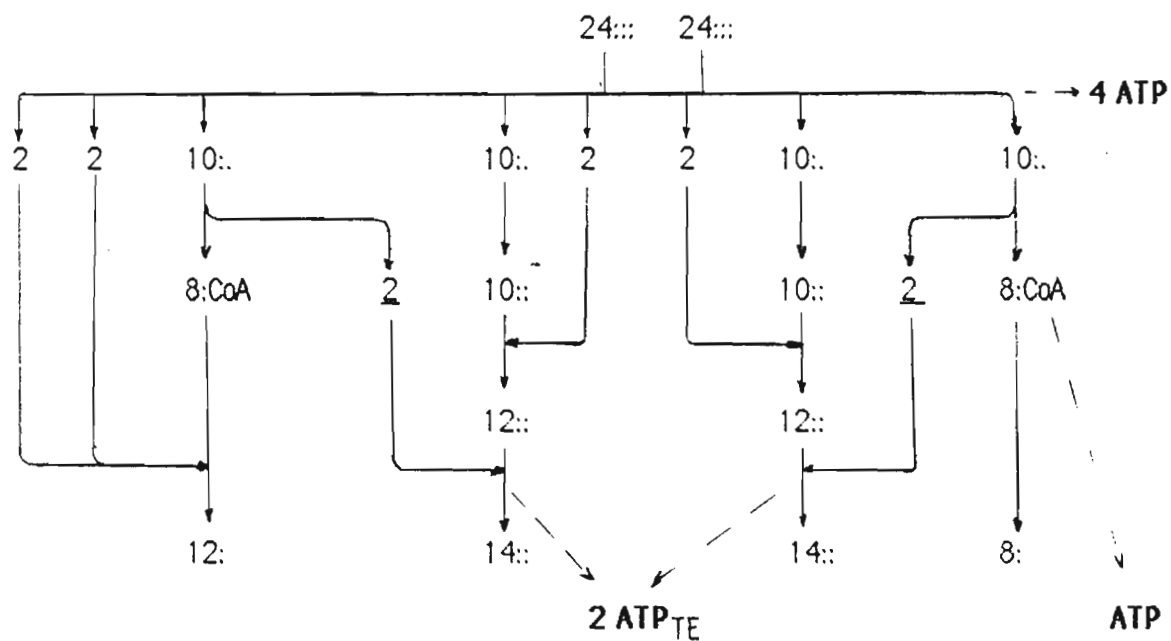
Literature Cited

1. Akagi JM, Jackson G (1967) Degradation of glucose by proliferating cells of *Desulfotomaculum nigrificans*. *Appl Microbiol* 15:1427-1430
2. Badziong W, Thauer RK (1978) Growth yields and growth rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulfate and hydrogen plus thiosulfate as sole energy source. *Arch Microbiol* 117:209-214
3. Bryant MP, Campbell LL, Reddy CA, Crabill MK (1977) Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 33:1162-1169
4. Cord-Ruwisch R (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* 4:1-13
5. Cord-Ruwisch R, Garcia JL (1985) Isolation and characterization of an anaerobic benzoate degrading spore-forming sulfate reducing bacterium, *Desulfotomaculum sapomandens* sp. nov. *FEMS Microbiol Lett* 29:325-330
6. Cord-Ruwisch R, Ollivier B (1986) Interspecific hydrogen transfer during methanol degradation by *Sporomusa acidovorans* and hydrogenophilic anaerobes. *Arch Microbiol* 144:163-165
7. Horder W, Van Dijken JP (1976) Theoretical considerations on the relations between energy production and growth of methane utilizing bacteria. In: Schlegel HG, Gottschalk G, Pfennig N (eds) *Microbial production and utilization of gases*. Göttingen: Goltze, pp 403-418
8. Hungate RE (1950) The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev* 14:1-49
9. Hungate RE (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris JB, Ribbons DW (eds) *Methods in microbiology*, vol 3B. New York: Academic Press, pp 117-132
10. Jones WJ, Guyot JP, Wolfe RS (1984) Methanogenesis from sucrose by defined immobilized consortia. *Appl Environ Microbiol* 47:1-6
11. Jorgensen BB, Fenchel T (1974) The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Marine Biol* 24:189-201
12. Klemp R, Cypionka H, Widdel F, Pfennig N (1985) Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. *Arch Microbiol* 134:203-207
13. Loveley DR, Klug MJ (1983) Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater concentrations. *Appl Environ Microbiol* 45:187-192
14. Macy JM, Snellen JE, Hungate RE (1972) Use of syringe methods for anaerobiosis. *Am J Clin Nutr* 25:1318-1323
15. Nethe-Jaenchen R, Thauer RK (1984) Growth yields and saturation constant of *Desulfovibrio vulgaris* in chemostat culture. *Arch Microbiol* 137:236-240

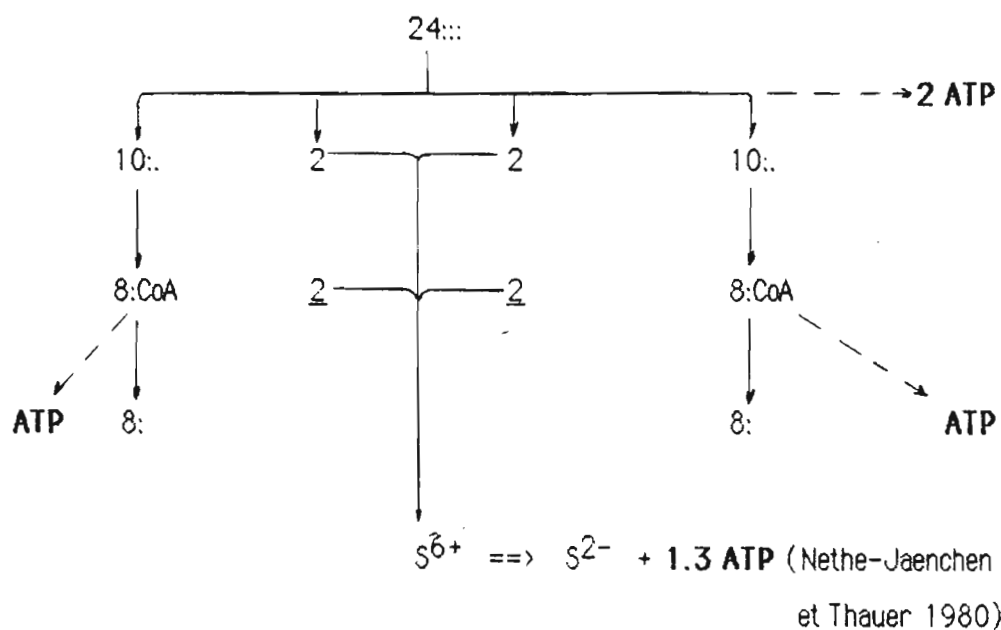
16. Odom JM, Peck HD Jr (1981) Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate reducing bacteria *Desulfovibrio* sp. FEMS Microbiol Lett 12:47-50
17. Ollivier B, Cord-Ruwisch R, Lombardo A, Garcia JL (1985) Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp.nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium. Arch Microbiol 142:307-310
18. Peck HD Jr (1984) Physiological diversity of the sulfate reducing bacteria. In: Strohl WR, Tuorinen OH (ed) Microbial chemoautotrophy. Columbus: Ohio State University Press, pp 310-335
19. Peck HD Jr, Odom JM (1984) Hydrogen cycling in *Desulfovibrio*: a new mechanism for energy coupling in anaerobic microorganisms. In: Microbial mats: stromatolites. New York: AR Liss, pp 215-243
20. Postgate JR (1984) The sulfate-reducing bacteria. Cambridge: Cambridge University Press
21. Sansone FJ, Martens CS (1981) Methane production from acetate and associated methane fluxes from anoxic coastal sediments. Science 211:707-709
22. Sleytr K, Adam H, Klaushofer H (1969) Die Feinstruktur der Zellwand und Cytoplasma-Membran von *Clostridium nigrificans* dargestellt mit Hilfe der Gefrierätz- und Ultraduennschicht-Technik. Arch Mikrobiol 66:40-58
23. Sorensen J, Christensen D, Jorgensen BB (1981) Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate reducing bacteria in anaerobic marine sediments. Appl Environ Microbiol 42:5-11
24. Tschsch A, Pfennig N (1984) Growth yield increase to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. Arch Microbiol 137:163-167
25. Widdel F (1980) Anaerober Abbau von Fettsaeuren und Benzoesaeure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierter Bakterien. Thesis, University of Göttingen
26. Widdel F (1984) Sulfate-reducing bacteria and their ecological niches. In: Barnes HG (ed) Anaerobic bacteria in habitats other than man. Oxford: Blackwell
27. Widdel F, Pfennig N (1984) Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In: Krieg NR, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, pp 663-679
28. Winter JU, Wolfe RS (1980) Methane formation from fructose by syntrophic associations of *Acetobacterium woodii* and different strains of methanogens. Arch Microbiol 124:73-79

Le schéma ci-dessous présente le bilan électronique de la fermentation du fructose par *Desulfovibrio JJ* que nous avons dénommé *D. fructosovorans* (Ollivier et al 1987):

Fermentation du fructose en succinate, éthanol et acétate:



Dégradation du fructose par réduction du sulfate:



10:: = Oxaloacétate, 12:: = fumarate, 14:: = succinate, TE = transport d'électrons, autres abréviations voir Introduction 3.6.

Ce schéma montre que la fermentation du fructose en succinate, éthanol et acétate peut aboutir à un gain théorique de 3,5 moles d'ATP. Ce résultat est proche du rendement en ATP maximal possible (4 moles d'ATP par hexose fermenté) et n'est pas loin du rendement théorique de 5,3 moles d'ATP de la dégradation du fructose en acétate et sulfure (c.f. schéma ci-dessus). Cependant la différence en gain d'ATP théoriquement possible en présence et en l'absence de sulfate ($3.5 : 5.3 \approx 1 : 1,5$) ne peut pas expliquer les différences de rendement observées (1 : 3). En outre, le rendement en ATP de la fermentation du fructose, calculé à partir de la biomasse produite, est considérablement inférieur au rendement théorique. Le gain d'ATP estimé (10.5 g biomasse sèche / mole ATP, Stouthamer 1977) à partir de la biomasse serait respectivement de 4.0 moles d'ATP/mole de fructose dégradé en présence de sulfate et de 1.3 moles d'ATP/ mole de fructose fermenté. Cela pourrait être dû à l'extrême lenteur de la croissance au cours de la fermentation (perte d'énergie pour la maintenance) ou bien indiquer que *D. fructosovorans* ne gagne aucune mole d'ATP au cours de la glycolyse jusqu'au pyruvate.

Outre le fructose, *D. fructosovorans* dégrade également, en présence de sulfate, H₂, le formiate, le méthanol, l'éthanol, le lactate, le fumarate et le glycérol. En l'absence de sulfate et en présence de *Methanospirillum hungatei*, la dégradation de tous ces substrats aboutit à une production de méthane (Tab.3).

Le fumarate a cependant été dismuté en présence de la méthanogène

Tableau 3: Dégradation de plusieurs substrats par *Desulfovibrio fructosovorans* en culture pure (avec 20mM sulfate) et en coculture avec *Methanospirillum hungatei*.

Produits formés par <i>Desulfovibrio fructosovorans</i>			
Substrat organique		en culture pure	en coculture avec
		[Sulfure]	<i>M. hungatei</i> [Méthane]
méthanol	[20]	7.3*	5.1*
Ethanol	[20]	7.9	7.8
Fumarate	[20]	0.2	0.1
Lactate	[20]	9.5	5.0
Fructose	[10]	8.3	6.5
Glycérol	[20]	9.8	8.7
Malate	[20]	0.4	0.1

concentrations en mM

* absence de croissance

consommatrice d' H_2 comme en présence de sulfate. Il n'y a eu production ni de sulfure ni de méthane. Cela montre que le fumarate en tant qu'accepteur d'électrons a été préférentiellement utilisé par rapport aux protons et au sulfate. (c.f. 3.4).

Conclusion: Quelque soit le substrat testé et dégradé, on a pu remplacer, en présence de bactéries méthanogènes consommatrices d' H_2 , le sulfate comme accepteur d'électrons par des protons. En présence des substrats qui permettent la production de fumarate et son utilisation comme accepteur d'électrons (fructose, fumarate, malate), les équivalents réducteurs n'ont pas été (cas du fumarate et malate) ou pas totalement (cas du fructose) été utilisés pour réduire le sulfate ou les protons. Par conséquent le fumarate semble être un accepteur d'électrons puissant. Un transfert interspèces d' H_2 (TIH) incomplet par réduction partielle des intermédiaires probables du métabolisme (oxaloacétate en malate et fumarate en succinate) a été observé exclusivement en présence de fructose (avec *D. fructosovorans* comme donneur d' H_2).

La vitesse de la fermentation du fructose a été apparemment limitée par la vitesse d'utilisation des équivalents réducteurs, probablement sous forme d' H_2 . On peut donc affirmer que plus l'accepteur terminal d'électrons sera efficace, plus la dégradation du substrat organique sera rapide. (C'est l'un des thèmes de recherche présentés dans l'article 6).

2.2 TIH à partir du méthanol (un composé en C₁)

Le méthanol s'est avéré être le seul substrat oxydé par *D. fructosovorans* sans permettre sa croissance que ce soit en présence de sulfate ou en coculture avec *M. hungatei*. Il est bien connu que dans les biotopes naturels, le méthanol est généralement dégradé par des bactéries méthanogènes. Dans l'écosystème étudié ici, une nouvelle bactérie homoacétogène s'est révélée être la souche la plus abondante parmi celles capables de dégrader le méthanol. Apparemment, cette souche se trouvait également impliquée dans la méthanisation de ce substrat. Le TIH semble être la seule explication de ce phénomène.

La production de faibles concentrations d'H₂ à partir du méthanol est thermodynamiquement possible (Fig. 1). Cependant, rien ne permet d'affirmer que la production d'H₂ à partir de ce substrat puisse être directement ou indirectement associée à une phosphorylation. La possibilité d'une phosphorylation par la réaction de l'acétokinase, telle qu'elle se produit en général dans les autres syntrophies connues, n'existe pas dans le cas de la dégradation des composés en C₁. Ces composés comme le méthanol et le formiate, ne sont donc pas susceptibles de former un substrat convenable pour les cocultures syntrophiques. Dans le but d'étudier le TIH qui semble intervenir dans ce cas, l'organisme responsable, *Sporomusa acidovorans* a été isolé puis testé en tant que producteur d'H₂ à partir du méthanol, en coculture avec différents consommateurs d'H₂ (Articles 3 et 4).

Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a methylo-trophic homoacetogenic bacterium

Bernard Ollivier¹, Ralf Cordruwisch¹, Anna Lombardo², and Jean-Louis Garcia¹

¹ Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 3 Place Victor-Hugo, F-13331 Marseille Cédex 3, France

² Istituto di Biologia del Mare, Riva 7 Martiri, I-30122 Venezia, Italia

Abstract. *Sporomusa acidovorans* sp. nov. was isolated from a pilot fermenter inoculated with effluent sample from the alcohol distillation industry. The isolate was a Gram-negative, motile, curved, spore-forming rod. The DNA base composition was 42% G + C. The temperature range for growth was 20 to 40°C, with an optimum at 35°C; growth occurred within a pH range of 5.4 to 7.5, with an optimum at pH 6.5. Growth substrates included methanol, H₂ – CO₂, formate, fructose, ribose, fumarate, succinate and glycerol. Yeast extract was required for growth. The organism performed the homoacetogenic reaction.

Key words: *Sporomusa acidovorans* – Homoacetogenesis – Methanol – Hydrogen – Fructose

In absence of sulfate, the anaerobic oxidation of H₂ leads to methane or acetate production. Bacteria capable of reducing CO₂ to acetate were first observed in non-defined mixed cultures by Fischer et al. (1931). In 1936 Wieringa described the enrichment and the isolation of the homoacetogenic bacterium: *Clostridium aceticum*. Within the same genus, other homoacetogenic H₂ oxidizing bacteria have been discovered. *C. thermoautotrophicum* was isolated from mud or soil samples (Wiegel et al. 1981). A non-identified methanol degrading *Clostridium* strain has been recently described by Adamse and Velzeboer (1982).

Other spore-forming H₂-oxidizing bacteria stained Gram negative and belonged to the newly described genus *Sporomusa* (Möller et al. 1984). Three non spore-forming acetate producing bacteria have been isolated on H₂ and CO₂: *Acetobacterium woodii* (Balch et al. 1977), *A. wieringae* (Braun and Gottschalk 1982) and *Acetogenium kivui* (Leigh et al. 1981), a thermophilic homoacetogen.

We report on the isolation of a new Gram negative spore-forming homoacetogenic bacterium. This rod-shaped bacterium used methanol or H₂ as energy source and is proposed as a new species of the genus *Sporomusa*: *S. acidovorans*.

Materials and methods

Chemicals. All chemicals were of reagent quality unless otherwise noted. Gases were purchased from Airgaz (Marseille, France).

Offprint requests to: J. L. Garcia, Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 3 Place Victor-Hugo, F-13331 Marseille Cédex 3, France

Inoculum. Anoxic samples of a pilot fermenter feeded with waste water of the alcohol distillation industry (INRA, Narbonne, France) served as inoculum. The major substrates in the effluent were glycerol and lactic acid.

Enrichment and isolation. Enrichment cultures were incubated at 37°C with 10% inoculum from the pilot fermenter in 60 ml serum bottles containing 20 ml medium with methanol as substrate. Cultures were transferred (2 ml) every 2 weeks into fresh media. For isolation of axenic cultures of the homoacetogenic bacterium, the enrichment was serially diluted and inoculated into roll tubes (Hungate 1969).

Media. *Sporomusa acidovorans* was grown on complex medium containing the following: NH₄Cl, 1.0 g; K₂HPO₄ · 3H₂O, 0.4 g; MgCl₂ · 6H₂O, 0.2 g; cystein-HCl, 0.5 g; fructose, 6 g; yeast extract (Difco), 1 g; resazurin, 0.001 g; mineral solution no 2 (Balch et al. 1979), 50 ml; trace element solution (Balch et al. 1979), 10 ml; distilled water, 1,000 ml. For roll tubes, agar (2%) was added in liquid medium. The medium was adjusted to pH 7.0 with KOH and was boiled under N₂. After cooling to room temperature, 20 ml of medium were transferred into 60 ml serum bottles inside an anaerobic glove box (La Calhène, Bezons, France). The bottles were stoppered with black butyl rubber closures (Bellco glass Inc., Vineland, NJ, USA) and outgassed with N₂ – CO₂. After sterilization (110°C, 35 min), 0.25 ml Na₂CO₃ (10% w/v) and 0.2 ml Na₂S · 9H₂O (2% w/v) were dispensed into each bottle.

For roll tubes preparation, agar was supplemented. Agar medium was dispensed anaerobically in portions of 4.5 ml into Hungate tubes (Bellco Glass Inc.). 0.08 ml Na₂CO₃ (10%) and 0.1 ml Na₂S (1%) were added to the medium. Stock solutions of Na₂CO₃ and Na₂S were prepared anaerobically under N₂ in 120 ml serum bottles and were autoclaved (110°C, 35 min). Sugar solutions were sterilized by filtration.

Analytical techniques. Volatile fatty acids, organic acids and H₂ were analysed as previously described (Garcia et al. 1982). Formic acid was measured using the technique of Lang and Lang (1972) as modified by Sleat and Mah (1984). Bacterial growth was quantified by measuring the optical density at 580 nm with a Spectronic 21 spectrophotometer (Baush and Lomb Inc., Rochester, NY, USA).

Microscopy. A Zeiss microscope equipped with epifluorescence was used to detect methanogenic bacteria which exhibited a blue-green fluorescence under UV illumination.

Phase contrast microscopy was performed using a Nikon microscope with an automatic camera for photography with Illford HPS film (ASA 400). Cells examined by electron microscopy were fixed with glutaraldehyde (1% v/v) and osmium tetroxide (1% w/v) and included in Epon-Araldite resin. Ultrathin sections were examined with electronic Jeol JEM 100 V microscope.

DNA preparation. DNA was isolated and purified by the method of Price et al. (1978). The mol% G + C was determined according to the method of De Ley (1970) from thermal denaturation in 0.015 M NaCl and 0.015 M trisodium citrate.

Results

Morphology. White and round colonies appeared after 3 weeks incubation in agar roll tubes at 37°C. Older colonies



Fig. 1. Phase contrast photomicrograph of *Sporomusa acidovorans*. Bar is 5.0 μ m. Note the curved rod and the subterminal spore

were dark brownish and as large as 3–4 mm. Three pure cultures were isolated from the last positive dilution (strains Mol, Mol₁ and Mol₂). All strains appeared morphologically similar in the microscope. They produced only acetate from complex medium containing sugars. They used fructose, ribose, methanol and H₂–CO₂. Strain Mol was subjected to further characterization.

The isolate was a slightly curved, spore-forming rod (5 μ m length \times 0.7 μ m width) (Fig. 1) and stained Gram negative. It was motile by laterally inserted flagella. Its motility showed some resemblance with that of moving vibrios (Fig. 2). It occurred singly or as arrangements of two or more cells. Electron microscopy showed a multilayered cell wall (Fig. 3). Spore was terminal to subterminal. Spore suspensions survived pasteurization for 20 min at 80°C.

Substrates and optimal growth conditions. Nutritional studies were performed at 37°C. Growth occurred only in presence of yeast extract. Besides methanol, the bacterium fermented a variety of substrates as shown in Table 1. The pH and temperature profiles of strain Mol were examined during growth in basal medium with 0.1% yeast extract and 0.6% fructose as energy source. The pH optimum for growth was between 6.5 and 7.0 (Fig. 4). No growth occurred at pH 8.0 or pH 5.4. The optimum growth temperature was 35°C (Fig. 5). Nitrate, sulfate and sulfite were not used as electron acceptors when the bacteria were cultivated on methanol. In carbonate free medium, fructose was used, but not methanol. Acetate was the only organic end product formed. Alcohols or H₂ were never produced.

DNA base composition. The mol % G + C content was 42.

Discussion

Anaerobic enrichment cultures on methanol from a fermenter feeded with alcohol distillation wastes led to the development of homoacetogenic bacteria. Methylo-trophic methanogenic bacteria (*Methanosarcina* sp.) were not observed. The ecological importance of the isolated homoacetogen in the pilot fermenter was presumably related to the high amount of glycerol used as growth substrate in the effluent.



Fig. 2. Transmission electron micrograph of *Sporomusa acidovorans*. Note the flagella distributed at the concave side. Bar is 0.5 μ m



Fig. 3
Electronmicrograph of thin sections
showing a multilayered cell wall.
Bar is 0.5 μ m

Table 1. Utilization of various substrates by *Sporomusa acidovorans*,
S. sphaeroides and *S. ovata*

Substrate	<i>S. acidovorans</i>	<i>S. sphaeroides</i> ^a	<i>S. ovata</i> ^a
H ₂ -CO ₂	+	+	+
Methanol	+	+	+
Ethanol	-	+	+
Glycerol	+	+	-
Formate	+	+	+
Lactate	-	+	+
Pyruvate	+	+	-
Fumarate	+	-	-
Succinate	+	-	-
Malate	+	nd	nd
Oxaloacetate	-	nd	nd
Glutamate	+	nd	nd
Trimethylamine	-	+	-
L-Serine	+	-	-
Fructose	+	-	-
Ribose	+	-	-

^a Data from Möller et al. (1984); -, no growth; +, growth; nd, not determined

The medium contained 0.5% of the organic substrate and 0.05% yeast extract. Additional compounds tested which did not support growth: malonate, citrate, lysine, threonine, glucose, maltose, lactose, xylose, melibiose, arabinose, dulcitol, galactose, saccharose, cellobiose, starch, cellulose, gelatin

The isolated homoacetogenic spore-forming bacterium showed a typical Gram-negative cell wall with lateral flagella. These features exclude it from the genus *Clostridium*. Other anaerobic H₂-oxidizing genera were ruled out for the following reasons: *Acetobacterium* sp. (Balch et al. 1977; Braun and Gottschalk 1982) stained Gram-positive, did not form spores and was motile by peritrichous flagella. The thermophilic *Acetogenium kivui* (Leigh et al. 1981) was non-motile and did not produce spores. Unlike *Desulfotomaculum* species (Campbell and Postgate 1965; Pfennig et al. 1981), strain Mol could not use sulfate as electron acceptor.

The banana-shaped cell form, the truly Gram-negative cell wall with laterally inserted flagella as well as the reduction of CO₂ to acetate indicated that strain Mol is a member

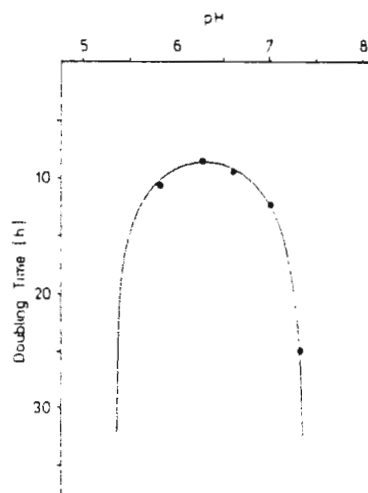


Fig. 4. Effect of pH on generation time of *Sporomusa acidovorans*. Cultures were incubated at 37°C. Medium contained 0.6% fructose and 0.1% yeast extract

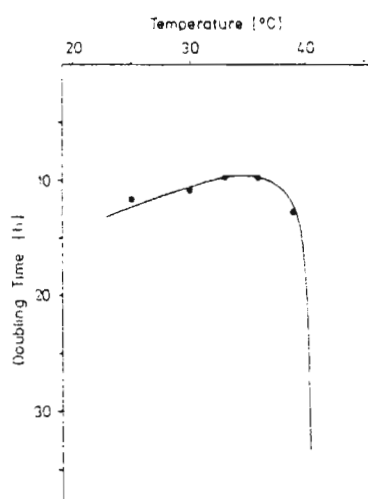


Fig. 5. Effect of temperature on generation time of *Sporomusa acidovorans*. Medium contained 0.6% fructose and 0.1% yeast extract

of the newly described genus *Sporomusa* (Möller et al. 1984). Within this genus, two species have been described. Strain Mol differed from *S. sphaeroides* by using sugars. Furthermore, strain Mol did not grow on trimethylamine. Unlike *S. ovata*, the current isolate used ribose, glycerol, L-serine and did not form oval spores. It could be distinguished from both species by the inability to use lactate, ethanol, and by requiring yeast extract for growth. *S. sphaeroides* and *S. ovata* grew on betaine in chemically defined medium containing minerals and vitamins. In contrast to *S. sphaeroides* and *S. ovata*, strain Mol grew on fumarate or succinate.

Thus we propose to place strain Mol in the genus *Sporomusa* and name it *S. acidovorans* in recognition to the utilization of acidic compounds (succinate, fumarate...).

Sporomusa acidovorans sp.nov. (a.ci.do'vo.rans; L. neut. n. *acidum* acid; L.v. *voros* to devour; M.L.part. adj. *acidovorans* acid-devouring).

Morphology. Sporulating, curved rods 2–8 µm × 0.7–1 µm with Gram-negative cell wall. Motile by laterally inserted flagella. Occurs singly or in short chains of cells. Colonies are white to darkly brown, entire and convex in shape.

Metabolism. Obligate anaerobe. Degrades H₂–CO₂, methanol, formate, pyruvate, succinate, fumarate, malate, oxaloacetate, glutamate, glycerol, serin, fructose, ribose. Yeast extract is required for growth. The only fermentation product is acetate; CO₂ is the only electron acceptor.

DNA % G + C. The mol % G + C of DNA is 42.

Source. Pilot fermenter feeded with effluent from the alcohol distillation industry.

Type strain. The type strain is Mol (DSM no. 3132). Its description is the same as the species given above.

Acknowledgements. We thank H. E. Jones for providing us with the enrichment culture, C. Frehel and coworkers (Institut Pasteur, Paris), D. Rambaud and A. Bouleau (ORSTOM, Bondy) for electron microscope facilities. We are grateful to F. Pichinoty and S. Raymond for assistance in determination of % G + C.

References

Adamse AD, Velzeboer CTM (1982) Features of a *Clostridium* strain CV-AA1, an obligatory anaerobic bacterium producing acetic

acid from methanol. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol* 48:305–313

Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Wolfe RS (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* 43:260–296

Balch WE, Schoberth S, Tanner RS, Wolfe RS (1977) *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int J System Bacteriol* 27:355–361

Braun M, Gottschalk G (1982) *Acetobacterium wieringae* sp.nov., a new species producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig C3*:368–376

Campbell LL, Postgate JR (1965) Classification of the spore forming sulfate reducing bacteria. *Bacteriol Rev* 29:359–363

De Ley J (1970) Reexamination of the association between melting point, buoyant density and the chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 101:738–754

Fischer F, Lieske R, Winzer K (1931) Die Umsetzungen des Kohlenoxyds. *Biochem Z* 236:247–267

Garcia JL, Guyot JP, Ollivier B, Trad M, Paycheng C (1982) Ecologie microbienne de la digestion anaérobie: techniques de numération et d'isolement. *Cah ORSTOM, sér Biol* 45:3–15

Hungate RE (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris JR, Ribbons DW (eds) *Methods in microbiology*, vol 3B. Academic Press, New York, pp 117–132

Lang E, Lang H (1972) Spezifische Farbreaktion zum direkten Nachweis der Ameisensäure. *Z Anal Chem* 260:8–10

Leigh JA, Mayer F, Wolfe RS (1981) *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing acetogenic bacterium. *Arch Microbiol* 129:275–280

Möller B, Obmer R, Howard BH, Gottschalk G, Hippe H (1984) *Sporomusa*, a new genus of Gram negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Arch Microbiol* 139:388–396

Pfennig N, Widdel F, Trüper HG (1981) The dissimilatory sulfate reducing bacteria. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) *The prokaryotes*, vol 1. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 926–940

Price CW, Fuson GB, Phaff HJ (1978) Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. *Microbiol Rev* 42:161–193

Sleat R, Mah RA (1984) Quantitative method for colorimetric determination of formate in fermentation media. *Appl Environ Microbiol* 47:884–885

Wiegel J, Braun M, Gottschalk G (1981) *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Curr Microbiol* 5:255–260

Wieringa KT (1936) Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Antonie von Leeuwenhoek J Microbiol Serol* 3:263–273

Received February 11, 1985/Accepted May 16, 1985

Interspecific hydrogen transfer during methanol degradation by *Sporomusa acidovorans* and hydrogenophilic anaerobes

Ralf Cord-Ruwisch and Bernard Ollivier

Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 3 Place Victor-Hugo, F-13331 Marseille, Cedex 3, France

Abstract. In the presence of active hydrogenophilic sulfate-reducing bacteria, the homoacetogenic bacterium *Sporomusa acidovorans* did not produce acetate during methanol degradation. H₂S and presumably CO₂ were the only end products. Since the sulfate-reducer did not degrade methanol or acetate, the sulfidogenesis from methanol was related to a complete interspecific hydrogen transfer between both species.

In coculture with hydrogenophilic methanogenic bacteria (*Methanobacterium formicicum*, *Methanospirillum hungatei*), the interspecific hydrogen transfer with *S. acidovorans* was incomplete. Beside CH₄ and presumably CO₂, acetate was produced. The results suggested that H₂-production and H₂-consumption were involved during anaerobic methanol degradation by *S. acidovorans* and the hydrogenophilic anaerobes play an important role during methanol degradation by homoacetogenic bacteria in anoxic environments.

Key words: Methanogenesis – Sulfidogenesis – Homoacetogenesis – Competition for H₂ – *Sporomusa acidovorans* – Interspecies hydrogen transfer

Methanol is formed in nature during the anaerobic degradation of pectin, a major component of plant cell walls (Schink and Zeikus 1981). In anoxic environments, methanol is a typical methanogenic substrate (Oremland et al. 1982). Therefore anaerobic enrichments in the absence of sulfate lead generally to the development of methylotrophic methanogenic bacteria (König and Stetter 1982; Miller and Wolin 1983; Sharak-Genthner et al. 1981).

However in anaerobic upflow reactors fed with methanolic wastes, methanol was partially degraded to acetate (Lettinga et al. 1979, 1981). A sporulating homoacetogen has been shown to be responsible for that reaction (Adamse and Vezeboer 1982).

Anaerobic CH₄ producing enrichment cultures on methanol from a fermenter fed with alcohol distillation wastes contained *Sporomusa acidovorans*, an homoacetogen as predominant methanol-degrader (Ollivier et al. 1985). Attempts to isolate methylotrophic methanogens failed. Therefore, methanogenesis was thought to result from the degradation of acetate, the only endproduct excreted by *S. acidovorans*. But aceticlastic methanogens (*Methanotherix* sp. and

Methanosarcina sp.) which differ morphologically from all other methanogens were never observed. The predominant methanogenic bacterium in this environment was a rod shaped bacterium, morphologically related to hydrogenophilic *Methanobacterium* species.

These observations indicated that H₂ rather than acetate was the intermediary product during methanogenesis from methanol.

Materials and methods

Sources of organisms

Methanospirillum hungatei (DSM 864) and *Desulfovibrio vulgaris* G6 were isolated from the defined syntrophic association with *Synthrophus bushwellii* (DSM 2612TB). *Methanobacterium formicicum* strain MF and *Methanosarcina* 227 were kindly provided by Prof. R. S. Wolfe, University of Illinois, USA. *Sporomusa acidovorans* was from the collection of our laboratory (DSM 3132).

Medium and growth conditions

The anoxic mineral, bicarbonate buffered, sulfide reduced medium was prepared as described for *Desulfotomaculum sapomandens* (Cord-Ruwisch and Garcia 1985) and supplemented with 0.1% yeast extract (Difco). Stock solutions of methanol were autoclaved separately. Transfers were carried out by sterile syringes.

Chemical determinations

Sulfide was determined photometrically as colloidal CuS (Cord-Ruwisch 1985). Methane, volatile fatty acids and alcohols were analyzed as previously described (Garcia et al. 1982).

Results

Pure cultures of the homoacetogenic bacterium *Sporomusa acidovorans* degrade methanol solely to acetate. In order to verify the assumption that *S. acidovorans* liberates reducing equivalents in the form of hydrogen, during methanol degradation, the strain was grown in coculture with the hydrogen consuming *D. vulgaris* strain G6 which degraded neither methanol nor acetate. H₂S and presumably CO₂ were the only end products of this methanol degrading coculture (Table 1). The degradation of methanol by the coculture was

Table 1
End products of methanol degradation by *Sporomusa acidovorans* in presence and in absence of H₂-consuming methanogenic or sulfidogenic bacteria

	Methanol degraded (mM)	Acetate (mM)	Methane (M) or sulfide (S) (mM)	O/R index
<i>S. acidovorans</i>	15	10.9	0	0.97
<i>S. acidovorans</i> + <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	10	0	6.9 (S)	0.92
<i>S. acidovorans</i> + <i>Methanospirillum formicicum</i>	10	5.7	1.7	0.99
	15	8.9	2.3 (M)	0.99
	20	11.5	2.5	0.93
<i>S. acidovorans</i> + <i>Methanospirillum hungatei</i>	10	4.6	3.2	1.04
	15	6.7	4.3 (M)	0.98
	20	8.3	6.4	0.98

Methanol and yeast-extract (0.1%) were the only energy sources.

Values are corrected by considering the values of controls containing only yeast-extract. The incubation time was 3 weeks

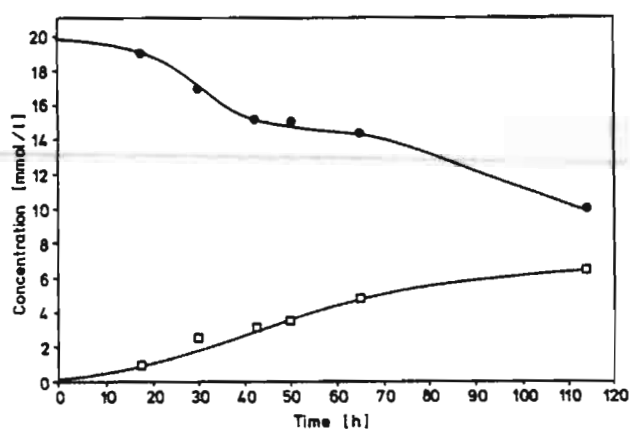


Fig. 1. Time course of methanol degradation by the coculture *Sporomusa acidovorans* - *Desulfovibrio vulgaris*; ●, methanol; □, H₂S

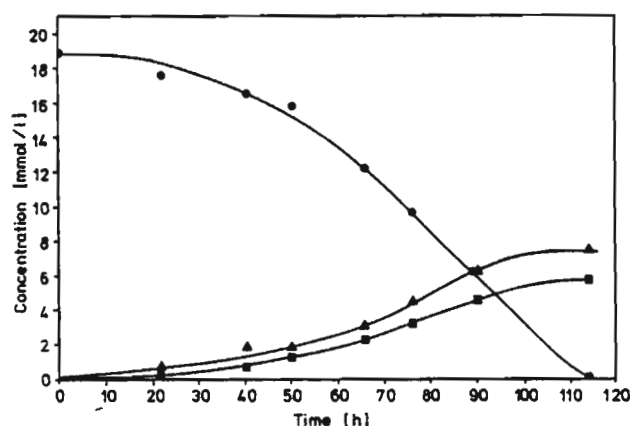


Fig. 2. Time course of methanol degradation by the coculture *S. acidovorans* - *Methanospirillum hungatei*; ●, methanol; ▲, acetate; ■, methane

not complete. Only about 10 mM methanol was degraded during 3 weeks of incubation (Fig. 1). This inhibition was probably related to the H₂S produced by the *Desulfovibrio* strain since *S. acidovorans* did not grow in the presence of 10 mM H₂S (data not shown).

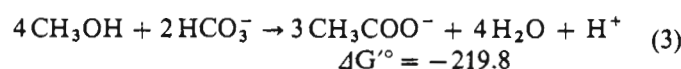
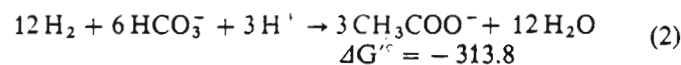
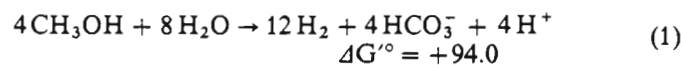
In coculture with hydrogenophilic methanogenic bacteria, *S. acidovorans* completely consumed methanol (20 mM) without detectable inhibition (Table 1, Fig. 2). Here however, in contrast to the *S. acidovorans* - *D. vulgaris*

coculture, *S. acidovorans* used a part of the reducing equivalents delivered from methanol oxidation to reduce CO₂ to acetate. The percentage of methane produced from methanol was not influenced by the initial substrate concentration but depended on the hydrogenophilic methanogen that was present (Table 1). In the coculture of *S. acidovorans* with *Methanobacterium formicicum*, a smaller part (approx. 20%) of the energy flow from methanol led to methane formation than in the coculture of *S. acidovorans* with *Methanospirillum hungatei* (approx. 40%).

Beside acetate and methane, no other metabolites were observed. The final optical density of the pure culture of *S. acidovorans* and of both methanogenic cocultures was nearly the same (OD = 0.3 at 580 nm) whereas it was less in sulfidogenic cocultures. The growth rate of the methanogenic cocultures on methanol was approximately equivalent to that of *S. acidovorans* grown separately (*t*_d = 22 h). However, *Methanosarcina barkeri* degraded methanol more rapidly (*t*_d = 11 h) than *S. acidovorans*.

Discussion

The intermediary production and consumption of hydrogen which has been presumed for *Methanosarcina* sp. on acetate (Lovley and Ferry 1985) as well as for *Desulfovibrio* sp. on lactate (Odom and Peck 1981) and for the homoacetogenic *Acetobacterium woodii* on fructose (Winter and Wolfe 1980) is probably also involved during the methanol degradation by *Sporomusa acidovorans* which degrades methanol as well as H₂:



($\Delta G'^{\circ}$ values obtained from Thauer et al. (1977) and given in kJ/reaction).

This hypothesis was supported by the fact that *S. acidovorans* liberated reducing equivalents in the form of H₂ when cocultured with other H₂-using anaerobes. The energy conserving reaction is due to the oxidation of hydrogen combined with the reduction of CO₂ to acetate

[Eq. (2)]. The presence of other hydrogen consuming bacteria results therefore in competition for hydrogen, produced by the methylotrophic reaction.

D. vulgaris was able to completely outcompete *S. acidovorans* for the hydrogen produced from methanol degradation. All hydrogen produced by the methylotrophic reaction was solely oxidized by the sulfidogen. The first reaction [Eq. (1)], which is endergonic under standard conditions, remains the only possible energy source for the growth of *S. acidovorans*. As explained for obligate hydrogen transferring associations, the hydrogen producing reaction [Eq. (1)] becomes exergonic when the H₂-concentration is kept at a low level (McInerney and Bryant 1980; Thauer et al. 1977). This explains the growth of *S. acidovorans* on methanol even if all the liberated hydrogen is consumed by the sulfate-reducing bacterium.

The methanogenic bacteria which have a lower affinity to hydrogen than sulfate-reducing bacteria (Kristjansson et al. 1982; Lovley et al. 1982) could not completely outcompete *S. acidovorans* for the hydrogen produced from methanol: beside methane, also acetate was produced in methanogenic cocultures on methanol. In coculture with *S. acidovorans*, *Methanospirillum hungatei* was more successful in removing hydrogen (approx. 40%) than *Methanobacterium formicicum* (approx. 20%). This may be due to different hydrogenase-affinities of these methanogens. In the described coculture, *S. acidovorans* oxidized the intermediary hydrogen more effective than both methanogenic bacteria ($\Delta G^{\circ} = -26.15$ and -33.9 kJ/mol H₂ respectively). This could be explained by the raised partial pressure of H₂ near by the membranes of the *S. acidovorans*-cells from where it is produced.

S. acidovorans had a disadvantage from the presence of other hydrogenophilic bacteria due to the decrease of its finally formed biomass. Therefore the character of the described H₂-transferring association is more competitive or parasitic than symbiotic.

Despite of its slow growth on methanol, *S. acidovorans* developed in methanol enrichments. This was possibly due to the high concentration of glycerol, one of the favorite substrates of *S. acidovorans* (Ollivier et al. 1985) in the fermenter from where the inoculum originated.

In natural anaerobic environments, the activity of hydrogenophilic methanogens or sulfidogens could reduce the production of acetate from methanol or possibly also from other homoacetogenic substrates. The reduction of CO₂ by homoacetogenic bacteria using different substrates should be tested in the presence of hydrogenophilic methanogenic or sulfidogenic bacteria.

Acknowledgements. This work was partially supported by a grant from CNRS (ATP 501021). We thank J. L. Garcia for perusing the manuscript.

References

Adamse AD, Velzeboer CTM (1982) Features of a *Clostridium* strain CV-AA1, an obligatory anaerobic bacterium producing acetic

acid from methanol. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol* 48:305–313

Cord-Ruwisch R (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides. *J Microbiol Methods* 4:33–36

Cord-Ruwisch R, Garcia JL (1985) Isolation and characterization of a benzoate degrading sporulating sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum sapomandens*. *FEMS Microbiol Lett* 29:325–330

Garcia JL, Guyot JP, Ollivier B, Trad M, Paycheng C (1982) Ecologie microbienne de la digestion anaérobie: technique de numération et d'isolement. *Cah ORSTOM, Sér Biol* 45:3–15

König H, Stetter KO (1982) Isolation and characterization of *Methanobolus tindarius*, sp. nov., a coccoid methanogen growing only on methanol and methylamines. *Zbl Bakt Mikrobiol Hyg C-Allg* 3:478–490

Kristjansson JK, Schönheit P, Thauer RK (1982) Different K_s-values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch Microbiol* 131:278–282

Lettinga G, Van Der Geest AT, Hobma S, Van Der Laan J (1979) Anaerobic treatment of methanolic wastes. *Water Res* 13:725–737

Lettinga G, De Zeeuw W, Ouborg E (1981) Anaerobic treatment of wastes containing methanol and higher alcohols. *Water Res* 15:171–182

Lovley DR, Ferry JG (1985) Production and consumption of H₂ during growth of *Methanosarcina* spp. on acetate. *Appl Environ Microbiol* 49:247–249

Lovley DR, Dwyer DF, Klug MJ (1982) Kinetic analysis of competition between sulfate-reducing bacteria and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl Environ Microbiol* 43:1373–1379

McInerney MJ, Bryant MP (1980) Review of methane fermentation fundamentals. In: Wise DL (ed) *Fuel gas production from biomass*. Chemical Rubber Co. Press, Inc., West Palm Beach, pp 20–46

Miller TL, Wolin MJ (1983) Oxidation of hydrogen and reduction of methanol to methane is the sole energy source for a methanogen isolated from human feces. *J Bacteriol* 153:1051–1055

Odom JM, Peck HD Jr (1981) Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio* sp. *FEMS Lett* 12:47–50

Ollivier B, Cord-Ruwisch R, Lombardo A, Garcia JL (1985) Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium. *Arch Microbiol* 142:307–310

Oremland RS, Marsh LM, Polcin S (1982) Methane production and simultaneous sulfate reduction in anoxic, saltmarsh sediments. *Nature* 296:143–145

Schink B, Zeikus JG (1981) Microbial methanol formation: a major end product of pectine metabolism. *Curr Microbiol* 4:387–389

Sharak-Genthner BR, Davis CL, Bryant MP (1981) Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. *Appl Environ Microbiol* 42:12–19

Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* 41:100–180

Winter JV, Wolfe RS (1980) Methane formation from fructose by syntrophic associations of *Acetobacterium woodii* and different strains of methanogens. *Arch Microbiol* 124:73–79

Received August 7, 1985; Accepted December 3, 1985

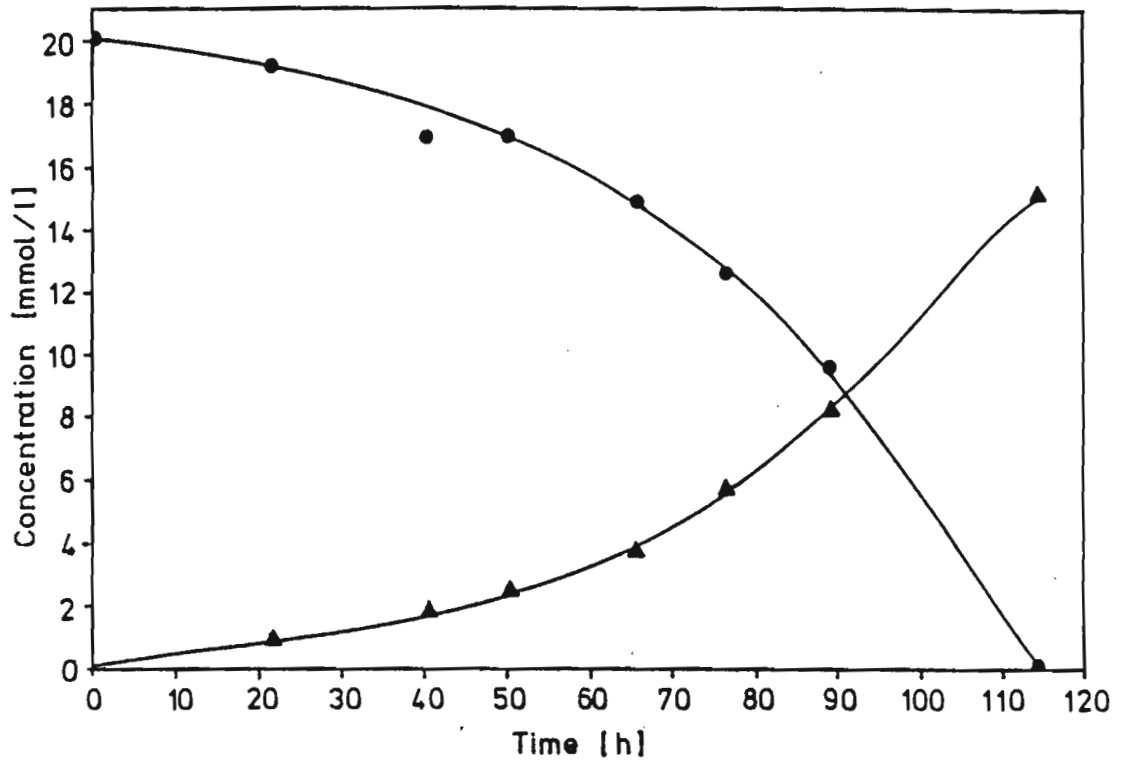


Fig. 5:
 Dégradation du méthanol par *Sporomusa acidovorans*

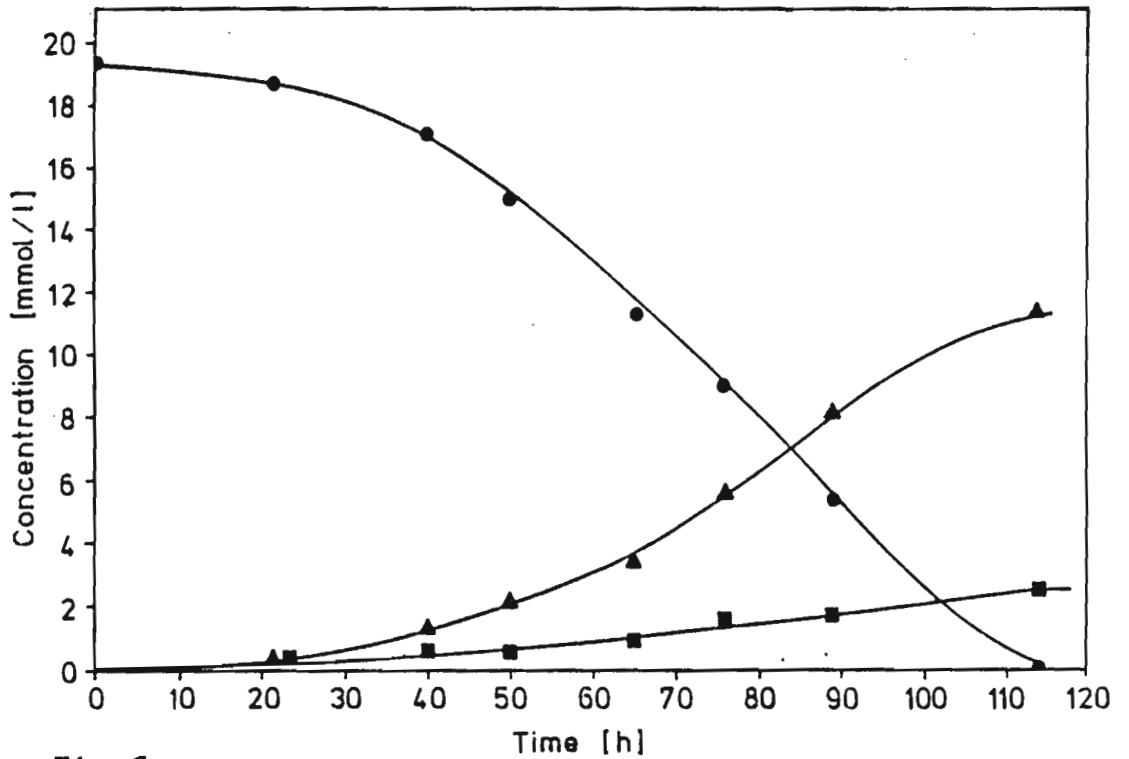


Fig. 6:
 Dégradation du méthanol par *Sporomusa acidovorans* en coculture avec *Methanobacterium formicicum*

Les résultats complémentaires de la dégradation du méthanol par *S. acidovorans* sont présentés dans les Figures 5 et 6. La présence de *Methanospirillum hungatei* ou de *Methanobacterium formicicum* n'affecte pas significativement la vitesse de dégradation du méthanol ni le rendement de la coculture; elle constitue un véritable parasitisme énergétique.

Le TIH sur méthanol entre *Sporomusa acidovorans* et les deux bactéries méthanogènes testées diffère de celui observé avec *Desulfovibrio spp.* (Tab. 4).

Tableau 4: Dégradation du méthanol par l'association de *Sporomusa acidovorans* avec une bactérie oxydant l'H₂. Différences observées en présence de sulfate ou de CO₂ comme accepteur terminal d'électrons.

	Coculture avec <i>Desulfovibrio</i>	Coculture avec bactéries méthanogènes
Stabilité de la coculture	Le Méthanol reste en partie non dégradé à la mort de la culture. Pas de croissance. Coculture non repiquable.	Méthanol complètement dégradé. Croissance durable après repiquage.
Transfert d'H₂	Formation de sulfure, pas d'acétate ==> TIH complet	Formation de CH ₄ , et d'acétate ==> TIH complet
Toxicité	Production d'H ₂ S qui peut inhiber la croissance de <i>Sporomusa</i>	Pas de formation de métabolites susceptibles d'inhiber <i>Sporomusa</i>

Associée à *Desulfovibrio* sp, *Sporomusa acidovorans* n'a pas formé de coculture durable (c'est à dire présentant une croissance après repiquage) contrairement à son association avec les bactéries méthanogènes. Ceci peut s'expliquer par l'effet toxique de l' H_2S formé au cours de la croissance de la coculture, mais aussi par le fait que la dégradation du méthanol en CO_2 et H_2 ne permet pas, à elle seule, une conservation de l'énergie et par conséquent la croissance de *S.acidovorans* et donc de la coculture entière.

Des expériences critiques (c.f. article 5) ont été réalisées pour démontrer la raison de l'instabilité de la coculture *Sporomusa acidovorans* + *Desulfovibrio* sp. sur méthanol: toxicité de l' H_2S ou absence d'un mécanisme permettant la conservation de l'énergie par le producteur d' H_2 . Elles ont donné les résultats suivants:

Les espèces de *Sporomusa* forment des cocultures durables avec *Desulfovibrio* sp. comme utilisateur d' H_2 lorsque le substrat organique est le fructose ou le lactate, malgré un TIH complet et une production d' H_2S .

Les espèces de *Sporomusa* dégradant le méthanol par TIH complet, ne forment pas de cocultures durables bien qu'il n'y ait pas production d' H_2S (Cocultures avec *Wolinella succinogenes*).

En fait, cette étude (articles 3,4,5) a montré qu'un TIH peut effectivement s'établir à partir de substrats en C_1 qui très vraisemblablement ne permettent pas la conservation de l'énergie à partir de leur oxydation en CO_2 et H_2 (Zeikus 1983, Zeikus et al. 1985, Van der Meijden et al. 1984).

Toutefois, il n'a été possible d'obtenir une coculture durable entre les bactéries dégradant le méthanol et produisant de l' H_2 et une souche consommatrice d'hydrogène, que lorsque le producteur d'hydrogène avait la possibilité de former de l'ATP, comme c'est exactement le cas avec un TIH incomplet: les équivalents réducteurs provenant de l'oxydation du méthanol sont partagés entre les deux organismes. Une partie de ces équivalents réducteurs est utilisée par le producteur d' H_2 pour ses propres besoins énergétiques. Lorsque le TIH à partir du méthanol est complet (avec *Desulfovibrio sp.* ou *W. succinogenes*), la coculture ne se développe pas et la dégradation du méthanol est arrêtée. Dans ce cas, la relation entre les souches de la coculture est plutôt de type parasitaire que symbiotique.

3 Etude du rôle possible de H_2 dans le métabolisme d'un substrat organique

3.1 Objet d'étude

La propriété qu'ont les espèces *Desulfovibrio fructosovorans* et *Sporomusa acidovorans* à transférer partiellement (ou complètement) les équivalents réducteurs provenant de la dégradation d'un substrat organique, aux bactéries anaérobies utilisant H_2 (articles 3,4,5), correspond à la théorie du "recyclage de H_2 " (Odom et Peck 1981, Peck et Odom 1984). Cependant ni leurs expériences, ni le présent travail ne démontrent de manière indiscutable l'existence d'un recyclage de H_2 .

D'autres expériences de cocultures et d'inhibition par H_2 ont été réalisées

dans ce travail, afin d'examiner le rôle de H_2 dans le métabolisme de la dégradation d'un substrat organique par les bactéries homoacétogènes, méthanogènes ou dans une certaine mesure par les BSR (Article 5).

FACULTATIVE AND PARTIAL INTERSPECIES HYDROGEN TRANSFER - COMPETITION FOR REDUCING EQUIVALENTS

R. CORD-RUWISCH

Laboratoire de Microbiologie, ORSTOM, Université de Provence, 3, Place Victor-Hugo, F-13331 Marseille

SUMMARY

Sulfate reducing bacteria of the genus *Desulfotribrio* and homoacetogenic bacteria of the genus *Sporomusa* were sensitive to changes of hydrogen concentrations during the growth on an organic substrate. Increase of hydrogen concentrations competitively inhibited the organic substrate degradation and decrease of hydrogen concentration inhibited the respiration and the reduction of the external electron acceptor. Such hydrogen sensitive strains which seem to intermediately produce and consume hydrogen ("hydrogen-cycling") were cultivated in the presence of a second hydrogen oxidizer. Both organisms competed for the hydrogen excreted by the first strain. The competence for H₂-oxidation of the strains depended not only on hydrogenase affinities but also on the free energy change of H₂-oxidation differing with the respective electron acceptors.

INTRODUCTION

Beside acetate, hydrogen is the most important intermediary product during anaerobic degradation of organic material. The competition for hydrogen plays a major role in endproduct formation in natural anaerobic environments. The interspecies hydrogen-transfer occurs in every investigated anaerobic environment as one of the general processes which allows finally the terminal oxidation of organic matter.

In interspecific hydrogen transferring cocultures, one species degrades an organic substrate and releases reducing equivalents in form of hydrogen (reduction of protons) which is oxidized by the second species. Generally the first organism profits from hydrogen removal by the second strain (Bryant et al. 1967, Bryant 1979). These bacteria are called obligate syntrophs and are depending on the presence of each other (symbiosis).

The present paper reports on facultative interspecies hydrogen transfer occurring between two bacteria which both can consume the hydrogen, produced during organic substrate degradation by one of them.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria used

The following bacteria, which are all able to oxidize organic substrate as well as hydrogen under anaerobic conditions were used throughout this study:

Homoacetogens: *Sporomusa sphaeroides* (DSM 2875), *Sporomusa acidovorans* (DSM 3132). Sulfate reducers: *Desulfotribrio vulgaris* G6 (isolated from the defined syntrophic association with *Syntrophus bushwelli* (DSM 2612TB), *Desulfotribrio* strain JJ (DSM 3604), *Desulfobulbus* spec. (isolated on propionate from anaerobic digester sludge), *Methanospirillum hungatei* (DSM 864), *Wolinella succinogenes* (DSM 1740), *Paracoccus denitrificans* (DSM strain M4).

Medium and growth conditions

The anaerobic bicarbonate-buffered medium was used as described for sulfate reducing bacteria (Widdel & Pfennig 1984), but sulfate was omitted and 1 g yeast extract per l was added. The stock

solutions of organic substrates and salts, serving as electron acceptors, were separately sterilized and added to the culture vessels when needed. Cells were cultivated in anaerobic Hungate tubes, or serum bottles when hydrogen was present in the gasphase.

Analytical methods

Alcohols and methane were determined gaschromatographically, fructose and organic acids by HPLC as previously described (Cord-Ruwisch et al. 1986) Sulfide was determined spectrophotometrically as colloidal CuS (Cord-Ruwisch 1984). Ammonium was measured potentiometrically by a special ammonium electrode, model 95-10, ORION Research Inc. Cambridge, MA 02139).

RESULTS

H₂-production and consumption during organic substrate degradation

In order to check which of the used strains was capable to produce and consume hydrogen ("hydrogen-cycling") during the growth on an organic substrate, two tests, which are normally applied to prove that hydrogen is an intermediary product in syntrophic associations, were carried out:

(i) The effect of the addition of hydrogen on the organic substrate degradation: Each strain was grown on an organic substrate in two parallel vessels. Hydrogen was added to the gasphase of one vessel after a part of the organic substrate had been degraded. The concentration of the organic substrate was monitored in both parallel essays. Both *Desulfotribrio* strains and both *Sporomusa* strains were immediately inhibited by H₂ to degrade the organic substrate. Instead they oxidized H₂. The inhibition was reversible: After replacing H₂ by N₂ the organic substrate was degraded. Lactate degradation by *Desulfobulbus* sp. was not effected by the presence of H₂. The addition of H₂ to cultures of *Par. denitrificans* and *Wal. succinogenes* slowed down or blocked (*Wal. succinogenes*) the degradation rate of formate after an adaptation time of about one generation.

Table 1: Ability of the strains tested to serve as hydrogen producing syntroph

Strain	immediate inhibition of organic substrate degradation by H ₂	with Methanospirillum as hydrogen sink	
		methane produced	growth
<i>Sporomusa acidovorans</i>	+	+	+
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	+	+	+
<i>Desulfotribrio vulgaris</i>	+	+	+
<i>Desulfotribrio strain JJ</i>	+	+	+
<i>Desulfobulbus spec.</i>	-	-	-
<i>Wolinella succinogenes</i>	+	n.d.	n.d.
<i>Paracoccus denitrificans</i>	-	-	-

n.d. = not determined (Methanospirillum uses formate)

(ii) The capability to produce hydrogen as a facultative syntroph: The used strains were inoculated into a medium, in which the final electron-acceptor was replaced by a second hydrogenophilic organism of which the electron-acceptor was present. The growth of such cocultures, compared to control essays without hydrogen removing organism, and methane formation indicated whether an interspecies H₂ transfer occurred or not (Tab.1).

The results of those two tests went together: Strains capable to produce hydrogen in coculture were inhibited by H_2 to degrade an organic substrate (Table 1): These strains (*Du. vulgaris*, *Du. strain J.J.*, *Sp. acidovorans*, *Sp. sphaeroides*) were susceptible to produce and consume H_2 as intermediary product during organic substrate degradation and have been called "hydrogen cycling" organisms (Peck & Odom 1984).

Coculture of an "hydrogen-cycling" organism with a second hydrogenophile:

Pure cultures of the homoacetogens *Sp. acidovorans* and *Sp. sphaeroides* degraded organic substrates only to acetate, using CO_2 as external electron acceptor. In coculture with *Wol. succinogenes* on nitrate as electron-acceptor or with *Desulfovibrio* species and Sulfate as electron acceptor a total transfer of reducing-equivalents was observed. Only sulfate or nitrate were reduced but not CO_2 (Table 2). The CO_2 reducing *Sporomusa* species could not outcompete sulfate-reducing or nitrate-reducing H_2 -oxidizers for the hydrogen produced during organic substrate degradation. However, if methanol was the organic substrate, it was not degraded completely (not more than 15mM) in these cocultures and the growth as determined by OD was not significant. After transferred into new medium such cocultures failed to continue methanol degradation. In the coculture of *Sp. acidovorans* with *Msp. hungatei* (Cord-Ruwisch and Ollivier 1985) and of *Sp. acidovorans* with *Du. vulgaris* on sulfur as electron acceptor, both strains reduced the electron acceptor CO_2 , resulting in the formation of acetate as well as of methane. The reducing equivalents produced during substrate oxidation were partially transferred as H_2 but also reoxidized, possibly also in the form of H_2 .

Table 2: Coculture of homoacetogens of the genus *Sporomusa* with different hydrogenophilic partners in the presence of their respective electron acceptors and of an organic substrate only degradable by the homoacetogen.

organic substrate	Strain I	Strain II	electron-accept. II	electron acceptor reduced per mole substrate oxidized	Transfer of H_2 [%]	inhibition of growth of strain I
methanol	<i>Sporomusa</i>	<i>Methanosprill.</i>	CO_2	acetate, methane	20 - 30	-
"	<i>acidovorans</i>	<i>Desulfovibrio</i>	sulfate	sulfide	100	+
"		<i>Wolinella</i>	nitrate	ammonium	100	+
fructose		<i>Desulfovibrio</i>	sulfate	sulfide	100	-
methanol	<i>Sporomusa</i>	<i>Desulfovibrio</i>	sulfur	acetate, sulfide	30 - 50	-
"	<i>sphaeroides</i>	<i>Wolinella</i>	fumarate	succinate	100	+
lactate		<i>Wolinella</i>	fumarate	succinate	100	-

*): acetate was produced less than 1mole/mole lactate and was regarded as resulting from lactate conversion to H_2 , CO_2 and acetate.

The relations of both electron acceptors reduced were not constant during the growth and varied even in parallel assays. The values given are mean values obtained from two or three measurements.

Desulfovibrio vulgaris did not transfer significant amounts of H_2 when cocultured in the presence of sulfate with other H_2 -consuming bacteria (Table 3). Small amounts of NH_4^+

produced in coculture with *Wol. succinogenes* on Nitrate may be due to the slow sulfide oxidation by *Wol. succinogenes*. However, with elemental sulfur as electron-acceptor for *Du. vulgaris* and with *Wol. succinogenes* as hydrogenophilic partner a complete H₂-transfer established: no sulfide was produced (Table 3). The coculture of *Du. vulgaris* with sulfur as electron acceptor and with the homoacetogen *Sp. acidovorans* or with *Msp. hungatei* as hydrogenophilic partner represented another example of a coculture performing partial interspecies hydrogen-transfer (Table 3). The electron acceptors of both strains were reduced.

Table 3: Coculture of *Desulfovibrio vulgaris* on lactate (20mM) in the presence of sulfate or sulfur as external electron acceptor with different hydrogenophilic partners.

electron acceptor I	strain II	electron acceptor II	% of H ₂ transferred
sulfate	<i>Msp. hungatei</i>	CO ₂	0
sulfate	<i>Sp. sphaeroides</i>	CO ₂	0
sulfate	<i>Wolinella</i>	nitrate	0-20
sulfur	<i>Msp. hungatei</i>	CO ₂	50-80
sulfur	<i>Sp. acidovorans</i>	CO ₂	60-90
sulfur	<i>Wolinella</i>	nitrate	100

In the absence of an external electron acceptor *Desulfovibrio* strain JJ degrades fructose according to the following equation (Cord-Ruwisch & Ollivier 1986)



The formation of succinate and the ability of strain JJ to use fumarate as electron-acceptor during the growth on H₂ indicated that the reoxidation of the reducing equivalents formed during fructose oxidation may be coupled to electron transport phosphorylation (fumarate → succinate).

The production and consumption of H₂ seems to be involved even during the fermentation of fructose in the absence of external electron acceptors by *Du.* strain JJ, as indicated by the fact that the addition of H₂ to a fructose-fermenting culture of *Du.* strain JJ inhibited fructose degradation.

Therefore the system reducing internal electron acceptors such as fumarate can be regarded as competing for H₂ with the systems using external hydrogen acceptors such as sulfate sulfur or hydrogen consuming partners.

The amount of H₂ oxidized by an accepting system was correlated to the free energy change of the oxidation of H₂ with the respective electron acceptor (Table 4,5). In the presence of sulfate or nitrate all reducing equivalents were finally oxidized by these electron acceptors, whereas in the presence of CO₂ or sulfur a part of the

Table 4: Effect of different external hydrogen acceptors on the reduction of internal electron acceptors (succinate formation) by *Desulfovibrio* strain JJ during the growth on fructose. (mole / mole fructose degraded).

external H ₂ -sink	succinate produced	H ₂ trapped by external sink
without	1.7	0.0
sulfur	1.0	1.0
sulfate	0.0	4.0
<i>Sporomusa</i> (CO ₂) <i>sphaeroides</i>	1.0	1.6
<i>Meth. spir.</i> (CO ₂) <i>hungatei</i>	0.3	2.8
<i>Wolinella</i> (NO ₃) <i>succinog.</i>	0.1	4.0

reducing equivalents were reoxidized by internal electron acceptors resulting in succinate formation.

Competition of two "hydrogen cycling" organisms for an organic substrate

Growing on lactate in excessive concentration the homoacetogen *Sp. sphaeroides* immediately stopped its respiration (dissimilatory CO₂-reduction to acetate) when the lactate and H₂-oxidizing *Du. vulgaris* was added to the coculture.

DISCUSSION

To artificial increase of H₂-concentration homoacetogens of the genus *Sporomusa* and sulfidogens of the genus *Desulfovibrio* reacted with hydrogen consumption and inhibition of organic substrate degradation (table 1, fig.1) and to the decrease of hydrogen concentration they reacted with H₂-production, as if to have an interest in keeping a particular H₂ partial pressure (maintenance of external hydrogen pool). Cocultures of these "H₂ cycling" bacteria with other hydrogenophilic bacteria resulted predictably in competition for hydrogen.

Thermodynamical explanation of competition for H₂ of low concentrations

Because of the extremely low concentrations of hydrogen in anoxic biotops the competition is won by organisms (e.g. sulfate reducers) able to hold the H₂ partial pressure below the level which allows H₂ oxidation by concurrent organisms (e.g. methanogens). Therefore the threshold levels of hydrogen oxidation of two competing bacteria has been seen as the deciding factor (Lowley 1985) , depending on the hydrogenase-affinities (Kristiansson et al. 1982).

Enzymes can catalyse only reactions which are thermodynamically favorable. And hydrogenases can not catalyse H₂ oxidation when the substrate concentration (H₂) is too low to yield energy. This energetic threshold concentration of H₂ (the value below that the H₂ oxidation becomes endergonic) depends on the electron acceptor of the reaction and can be calculated from the free energy changes of the respective reactions (Table 5).

Table 5: Minimal partial pressure of hydrogen, which thermodynamically allows H₂ oxidation, by the respective electron acceptor. Calculated from the equation: $\Delta G' = \Delta G'^{\circ} + 1.36 \log [C] [D] / [A] [B]$

electron acceptor	CO ₂ to Acet.	Sulfur	CO ₂ to CH ₄	SO ₄ ²⁻	fumarate	NO ₃ ⁻
$\Delta G'^{\circ}$ [kJ/mole H ₂]	-26.2	-28.0	-33.8	-38.0	-86.2	-149.9
pH ₂ for $\Delta G' = 0$ [atm.]	10 ^{-4.4}	10 ^{-4.7}	10 ^{-5.2}	10 ^{-6.3}	10 ^{-14.7}	10 ⁻

The results of these competitions were correlated to the free energy change of the H₂ oxidation with the respective electron acceptor (Tables 2,3,4,5). *Desulfovibrio* species were less successful in competition for H₂ when elemental sulfur replaced sulfate as electron acceptor (Table 3). This indicated, that with Sulfur as electron acceptor

Desulfouibrio species were limited to oxidize hydrogen, by thermodynamical reasons rather than by hydrogenase affinity (presuming that hydrogenase was the same in both cases).

Ecological aspects of the results

(i) Indirect competition for organic substrate. The competition for an organic substrate by two organisms with different substrate affinities only takes place under substrate limiting conditions. If the organic substrate is present in excess a coexistence of both organisms is to be expected until the substrate concentration gets limiting for one. However, if the organisms are intermediately producing and consuming hydrogen the competition for the organic substrate is actually a competition for low concentrations of hydrogen. Even in the presence of organic substrate in excess this "indirect competition" can take place.

(ii) Parasitism by hydrogen removal. The production of hydrogen from organic substrates and the oxidation of hydrogen are two completely different metabolic ways of energy conservation: substrate level phosphorylation and electron transport phosphorylation. In pure culture, "hydrogen cycling" bacteria use both of this energy saving mechanisms. If the hydrogen is completely removed by a hydrogen oxidizing partner (here: concurrent), substrate level phosphorylation remains the only mechanism to save energy by the first strain ("H₂-cyclers"). The known mechanism of substrate level phosphorylation during H₂-production from organic substrates such as ethanol or lactate is the acetate-kinase reaction. Hydrogen formation from methanol, however, is not known to be a possible energy saving reaction. Probably for that reason homoacetogenic bacteria failed to grow, when 100 % of hydrogen produced during methanol oxidation was removed by the hydrogeophilic concurrent (Table 2). This kind of parasitism finally is a disadvantage for both bacteria. To my knowledge this is the first case, where the addition of a hydrogen consuming bacterium, providing a more favorable electron acceptor, to a hydrogen producing organism (amelioration of thermodynamical conditions) drastically decreases the substrate degradation potential of a bacterial culture.

(iii) Possible ecological advantage of "hydrogen cycling". The theory of "hydrogen cycling" (Odom and Peck 1981), opposed by Lupton et al. (1984), originally assumes that all reducing equivalents are reoxidized via H₂. In the present study, which could not confirm this mechanism, the term "hydrogen cycling" means only, that the pool of reducing equivalents is continuously in a dynamic chemical equilibrium, catalised by hydrogenase(s), with an external hydrogen pool. However for ecological considerations the turnover of hydrogen in pure culture is of minor interest.

The maintenance of an external H₂-pool during the degradation of organic substrate may seem a complex and useless mechanism taking part in the reoxidation of reducing equivalents. What is the sense of "hydrogen cycling"? In fact, in pure culture this may represent nothing but a loss of energy and useless maintenance of hydrogenase activity.

In anaerobic environments however, the availability of fermentable organic substrate or electron acceptors such as sulfate, creates changes of hydrogen concentration, which thermodynamically favor hydrogen production or hydrogen consumption (Table 4). The mechanism of "H₂-cycling", or more precisely the maintenance of a defined external H₂ pool, serves as H₂-antenna, allowing the bacteria to react rapidly to changing hydrogen concentrations: Without major modifications of enzymatical equipment, they can switch from only H₂-production (100% H₂-transfer) to only H₂-consumption and to any intermediary position (partial reoxidation of the H₂ excreted). In a similar way "H₂-cycling" enables SRB to switch from sulfate respiration to hydrogen production as a facultative syntroph, without adaptation time (in contrast to diauxy), when sulfate becomes depleted.

In conclusion the interspecies hydrogen transfer can mean more than symbiotic association of two species, also: competition, parasitism and indirect competition for an organic substrate.

REFERENCES:

- Bryant MP, Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS (1967) *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. Arch Microbiol 39: 20-21
- Bryant MP (1979) Microbial methane production- theoretical aspects. J Animal Sci 48:193-201
- 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.
- Cord-Ruwisch R, Ollivier B (1986) Interspecific hydrogen transfer during methanol degradation between *Sporomusa acidovorans* and hydrogenophilic anaerobes. Arch Microbiol 144: 163-165
- Cord-Ruwisch R, Ollivier B, Garcia J-L (1986) Fructose degradation by *Desulfotribrio* sp. in pure culture and in coculture with *Methanospirillum hungatei* Current Microbiol. 13 (in press).
- Kristiansson JK, Schönheit P, Thauer RK (1982) Different K_s-values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. Arch Microbiol 131: 278-282
- Lowley DR (1985) Minimum threshold for hydrogen metabolism in methanogenic bacteria. Appl Environ Microbiol 49: 1530-1531
- Lupton FS, Conrad R, Zeikus JG (1984) Physiological function of hydrogen metabolism during growth of sulfidogenic bacteria on organic substrates. J Bacteriol 159: 843-849
- Odom JM, Peck HD Jr (1981) hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate reducing bacteria *Desulfotribrio* sp. FEMS Microbiol Lett 12: 47-50
- Widdel F, Pfennig N (1984) Dissimilatory sulfate- or sulfur- reducing bacteria. in: Krieg NR, Holt JG (eds) Bergy's manual of systematic bacteriology, Baltimore/London: Williams & Wilkins, pp 663-679

Acknowledgements: I thank M. Hamdi and H. Macarie for technical assistance and stimulating discussion.

3.2 Excrétion de H₂ par les bactéries en culture pure

Toutes les souches testées, à l'exception de *Paracoccus denitrificans*, ont produit des quantités non négligeables d'H₂ au cours de leur métabolisme (Tab. 5). La concentration en H₂ a diminué dans toutes les cultures après consommation du substrat. Lorsqu'il n'y avait pas d'accepteurs terminaux d'électrons, H₂ s'est accumulé dans une proportion environ 10 à 100 fois supérieure à celle obtenue en présence d'accepteurs d'électrons.

3.3 Expériences d'addition d'H₂

L'effet de l'addition d'H₂ sur la dégradation de divers substrats organiques a été étudié afin de savoir si l'H₂ excrété est lié physiologiquement au métabolisme énergétique du substrat organique (statut de produit intermédiaire) ou s'il représente une fuite minime en équivalents réducteurs (Fig. 7-12). Chez la plupart des bactéries hydrogénophiles testées, l'addition d'hydrogène (80 %) à la phase gazeuse des flacons de culture (condition de culture c.f. Fig. 13), inhibe immédiatement la dégradation du substrat organique. Seuls *Paracoccus denitrificans* et *Desulfobulbus elongatus* ont continué à dégrader leur substrat organique indépendamment de la concentration en H₂ externe. Dans toutes les cultures, l'inhibition de la dégradation du substrat organique par H₂ a été réversible et a pu redémarrer après consommation de l'H₂. L'inhibition par H₂ ne dépend pas de la nature du substrat dégradé: H₂ inhibe la dégradation du lactate, du méthanol, du glycérol et du fructose par *D. fructosovorans* et par *Sporomusa* sp..

Tab. 5.

Concentrations maximales d'H₂ excrétées au cours de la phase exponentielle de la dégradation d'un substrat organique par différentes bactéries hydrogénophiles.

Souche	Substrat	Accepteur d'électrons	H ₂ [ppm]
<i>A. woodii</i>	Fructose	CO ₂	670
<i>S. acidovorans</i>	Méthanol	CO ₂	1500
<i>S. sphaeroides</i>	Lactate	CO ₂	5000
<i>M. hungatei</i>	Formiate	CO ₂	1200
<i>Methanospirillum</i> SK 6	2-propanol	CO ₂	1000
<i>D. vulgaris</i> Hildenborough	Lactate	SO ₄ ²⁻	8000
<i>D. vulgaris</i> G6	"	SO ₄ ²⁻	1300
<i>D. desulfuricans</i> Essex	"	SO ₄ ²⁻	230
"	"	sans	2200
"	Fumarate	Fumarate	6
<i>Desulfovibrio</i> strain JJ	Fructose	SO ₄ ²⁻	160
"	"	sans	7600
"	Fumarate	Fumarate	3
"	Méthanol	SO ₄ ²⁻	24
<i>D. elongatus</i>	Lactate	SO ₄ ²⁻	40
"	"	sans	110
<i>W. succinogenes</i>	Formiate	Fumarate	5
"	"	sans	3300
<i>P. denitrificans</i>	Formiate	Nitrate	< 1
"	"	sans	4

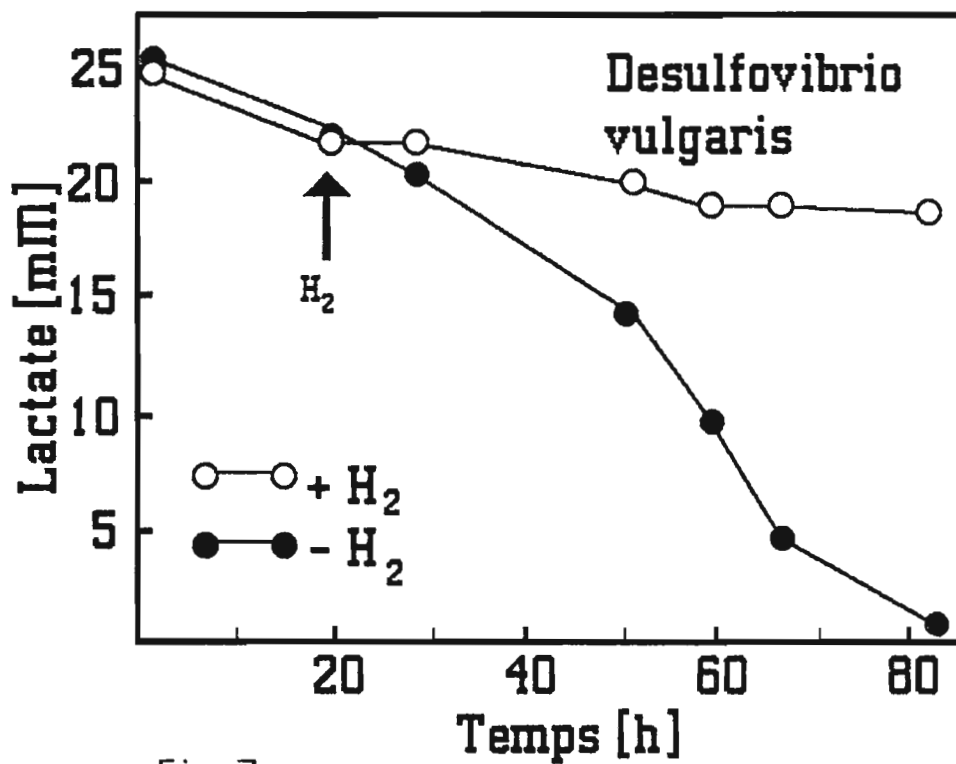


Fig. 7
Effet de l'hydrogène sur la dégradation du lactate par *Desulfovibrio vulgaris* G6.

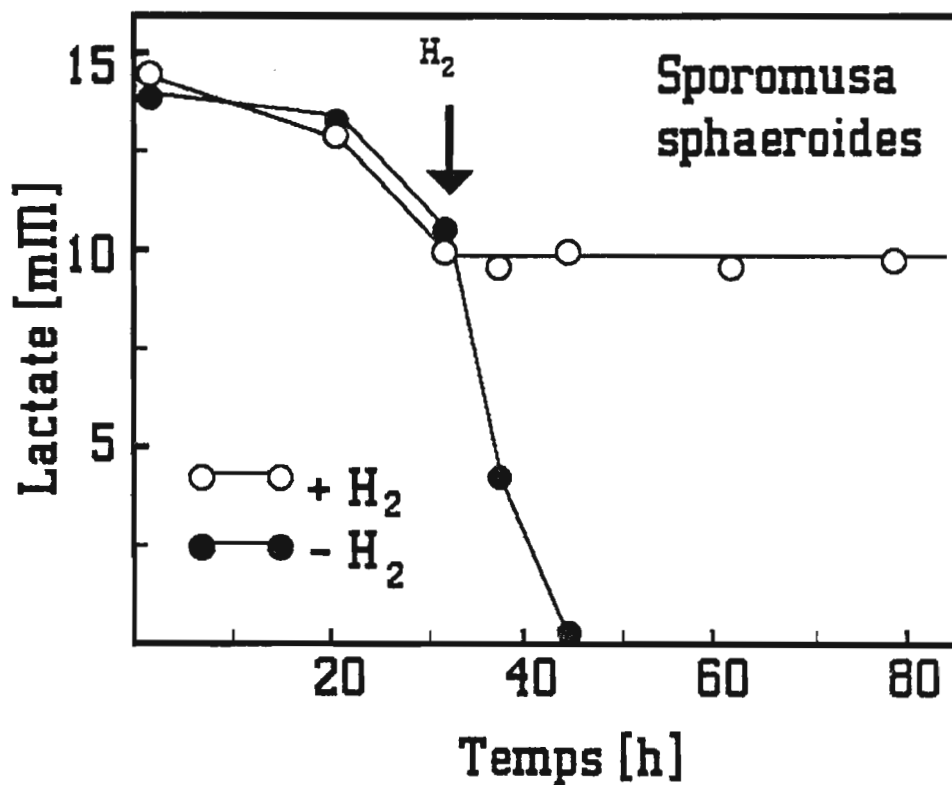


Fig. 8
Effet de l'hydrogène sur la dégradation du lactate par *Sporomusa sphaeroides*.

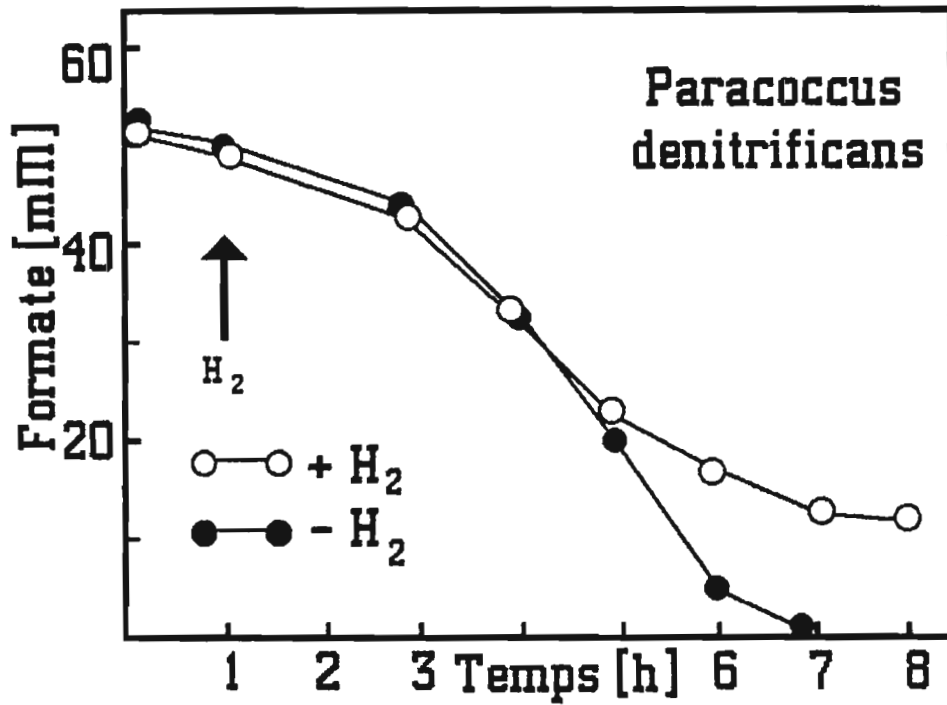


Fig. 9
Effet de l'hydrogène sur la dégradation du formate par *Paracoccus denitrificans*.

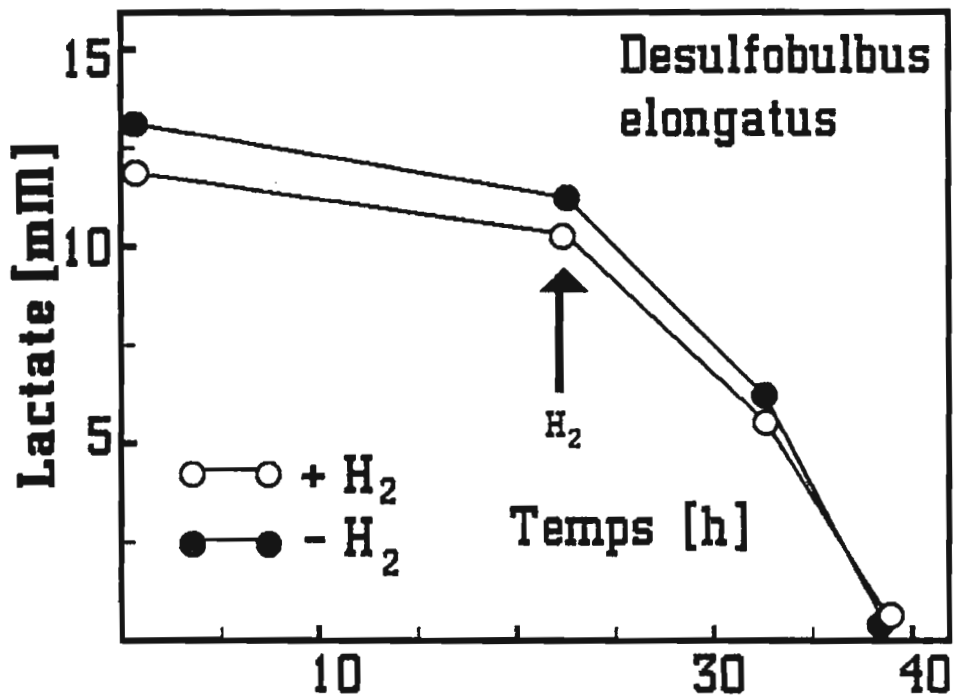


Fig. 10
Effet de l'hydrogène sur la dégradation du lactate par *Desulfobulbus elongatus*.

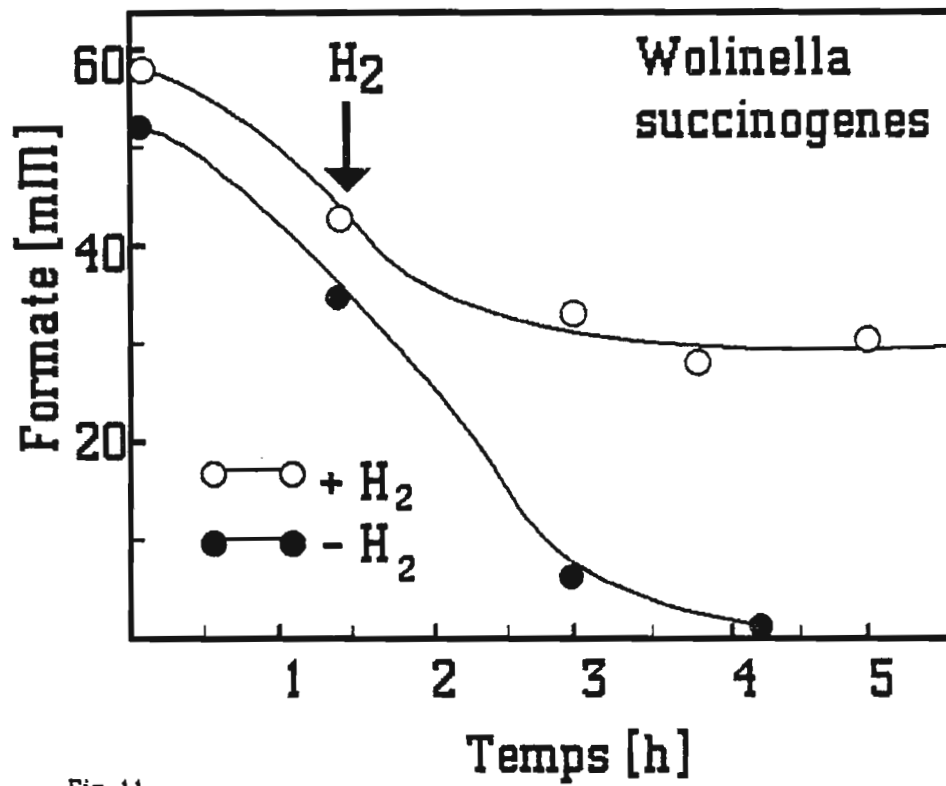


Fig. 11

Effet d'hydrogene sur la degradation du formate par *Wolinella succinogenes*.

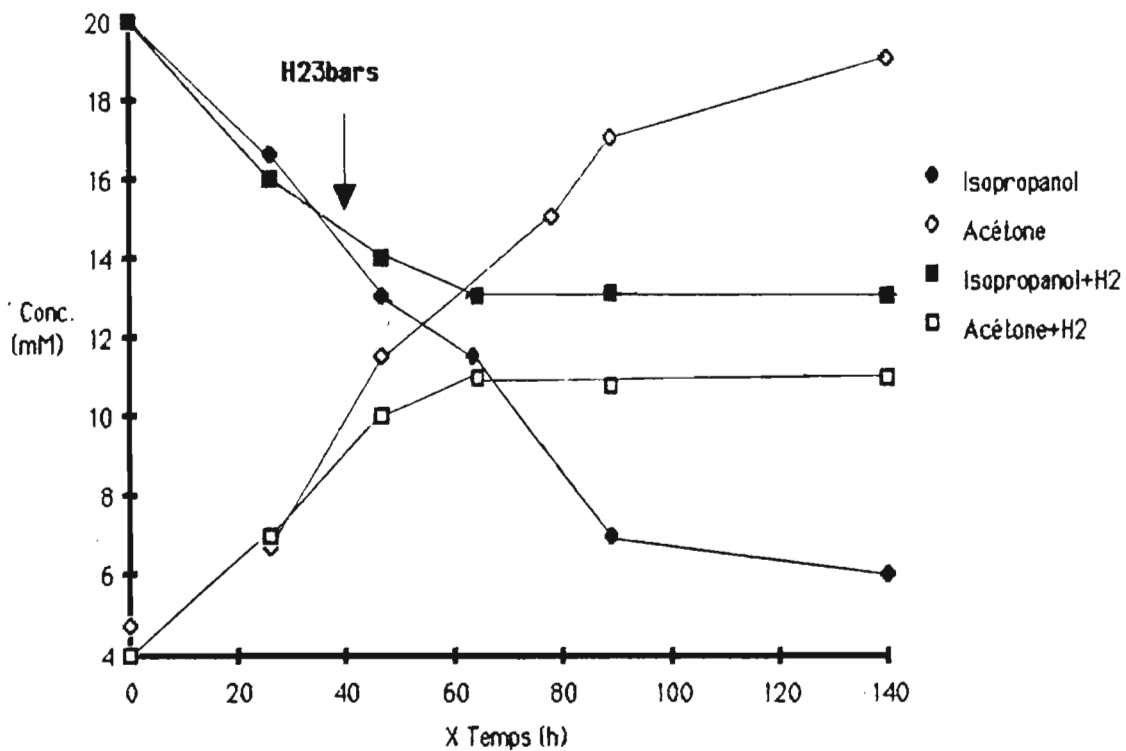


Fig. 12 Cinétique de la dégradation de l'isopropanol par *Methanospirillum SK6*, sous N_2 / CO_2 (80 / 20) 1 bar et sous N_2 / CO_2 (80 / 20) 1 bar suivi par H_2 / CO_2 (80 / 20) 3 bars. Atmosphère = 66 % du volume total ; [isopropanol] = 20 mM.

Ces résultats démontrent clairement que l'addition d' H_2 inhibe de façon significative la dégradation d'un substrat organique par les représentants classiques du groupe de *Desulfovibrio* testés ainsi que par les bactéries homoacétogènes et les bactéries méthanogènes testées. Au contraire, *Desulfobulbus elongatus*, qui libère également de l' H_2 pendant sa croissance sur lactate, n'est pourtant pas inhibé par H_2 (Fig. 10). Cela est confirmé par le fait que *Desulfobulbus elongatus* ne produit pas suffisamment d' H_2 pour arriver à constituer une coculture avec une bactérie méthanogène oxydant l' H_2 sur éthanol, propionate (Samain et al. 1984, Guyot et al 1985) ou lactate (résultats actuels). Ces observations indiquent que, contrairement aux espèces de *Desulfobulbus* dont l'activité de l'hydrogénase peut être régulée (Samain et al. 1986), dans les espèces de *Desulfovibrio* le flux d'électrons est lié à la concentration d' H_2 externe, cela probablement grâce à des hydrogénases efficaces, productrices et consommatrices d' H_2 . Il semble que l'hydrogène excrété par les espèces de *Desulfobulbus* soit le produit d'une lente réaction secondaire qui ne régénère pas assez rapidement H_2 , pour entretenir un TIH efficace avec *Methanospirillum hungatei*.

Deux autres observations confirment que le métabolisme de H_2 est différent entre les genres de *Desulfovibrio* et *Desulfobulbus*. Contrairement aux espèces de *Desulfobulbus*, les espèces de *Desulfovibrio* hydrogénéophiles semblent métaboliser activement l' H_2 en tant que produit intermédiaire, au cours de la dégradation de substrats organiques.

1. Cultivé sur lactate ou sur de l'hydrogène élémentaire *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough a une activité hydrogénasique importante et du

même ordre de grandeur (Pankhanla et al. 1987) contrairement à *Desulfobulbus elongatus* (Samain et al. 1984, Samain et al. 1986).

2. les espèces de *Desulfovibrio* cultivées sur lactate dégradent immédiatement H_2 tandis que *Desulfobulbus elongatus* présente une phase de latence de plusieurs jours lorsqu'on le repique d'un milieu lactate sur un milieu hydrogène (Samain, communication personnelle).

Dans l'ensemble, ces observations vont dans le sens de l'hypothèse du recyclage de l'hydrogène d' Odom et Peck (1981). Cependant l'état actuel des recherches ne nous permet pas de conclure de façon absolue que l'hydrogène soit un produit intermédiaire obligatoire de la dégradation des substrats organiques par les espèces de *Desulfovibrio* et les bactéries homoacétogènes. Ceci n'a d'ailleurs pas un grand intérêt écologique (voir ci dessous).

Très récemment (Mars 1987) Pankhanla et al. ont montré que l'addition d' H_2 n'inhibait pas la dégradation du lactate par *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Après Lupton et al (1984), c'est le deuxième rapport qui indique le contraire de nos propres résultats. Pour cette raison, nous avons également étudié l'effet de H_2 sur le métabolisme de cette souche (Fig.13).

Après avoir testé l'effet de l'augmentation de la concentration d' H_2 sur le métabolisme des souches hydrogénophiles utilisées, nous avons étudié celui du retrait de H_2 (concentration d' H_2 diminuée par une seconde bactérie consommatrice d' H_2) (Tab. 1 de l'article 5). Toutes les bactéries homoacétogènes testées (*Sporomusa acidovorans*, *Sporomusa sphaéroïdes*,

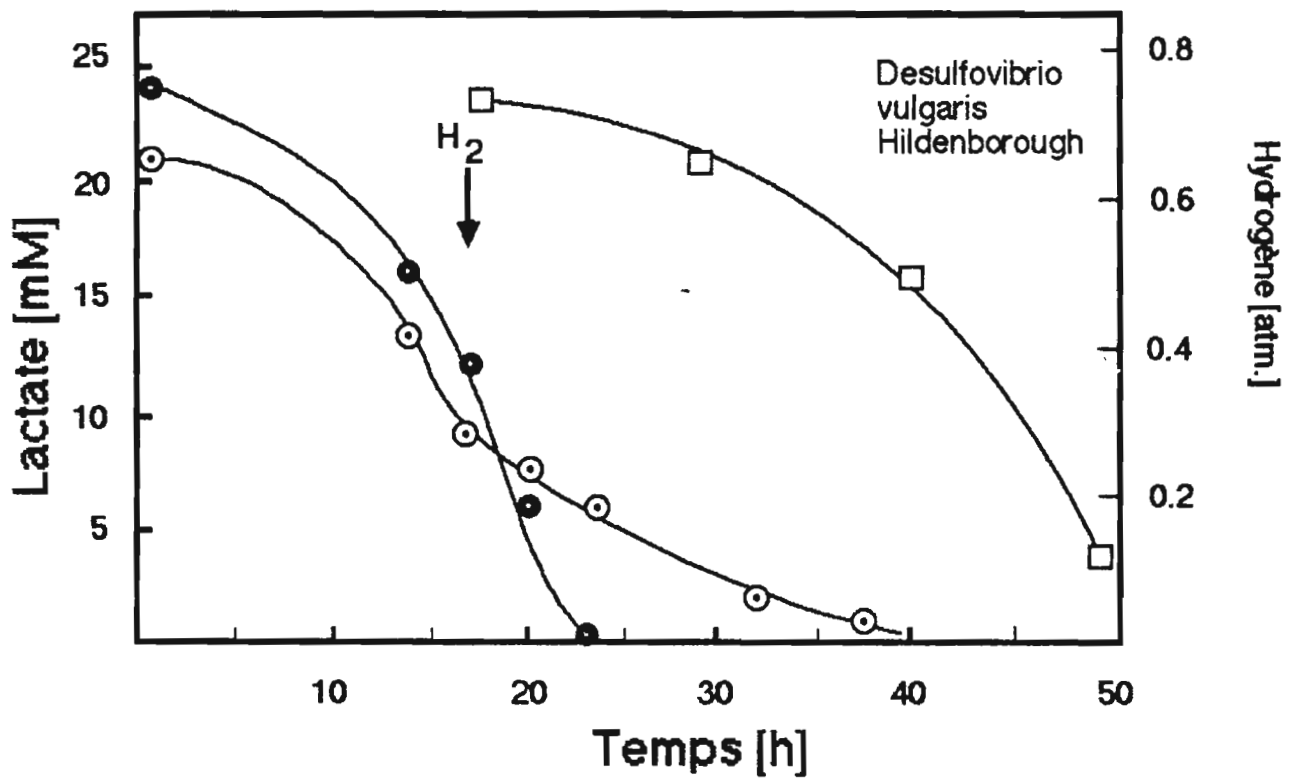


Fig.13

Effet de l'hydrogène sur la dégradation du lactate par *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

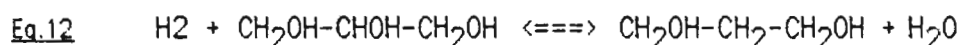
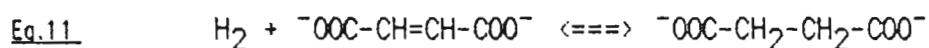
- lactate sans hydrogène
- lactate plus hydrogène
- hydrogène

Condition de culture: sulfate 40 mM, rapport phase gazeuse / phase liquide = 1, température = 37°C, agitation magnétique (700 U/min).

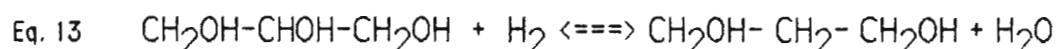
Acetobacterium woodii) ainsi que les espèces de *Desulfovibrio* classiques libèrent tous leurs équivalents réducteurs sous forme d' H_2 élémentaire si celui-ci est consommé par une deuxième souche (par exemple *Methanospirillum hungatei*). Toutes les souches qui ont été inhibées par l'augmentation de la pression partielle d' H_2 , et seulement elles, ont été capables d'effectuer un TIH en présence de *Methanospirillum hungatei*, comme seul piège à hydrogène.

3.4 Effet de H_2 sur la fermentation de substrats organiques par les bactéries anaérobies hydrogénophiles.

La souche *D. fructosovorans* dégrade le fructose mais également le fumarate ou le glycérol, avec production d' H_2 en l'absence de sulfate. (En l'absence de sulfate, *D. fructosovorans* dismute le glycérol en 3 OH-propionate et probablement 1,3-propanediol comme la souche décrite par Nanninga et Gottschal (1986)). Nous avons testé l'effet de H_2 sur la fermentation du fructose et sur la dismutation du glycérol et du fumarate afin de savoir si la production et la consommation de H_2 jouaient un rôle même au cours de ce métabolisme fermentatif. (Le terme de fermentation peut induire en erreur dans la mesure où l'on soupçonne que l'énergie soit conservée par phosphorylation oxydative (par exemple la réduction du fumarate en succinate). La présence d' H_2 arrête complètement l'oxydation du fructose, du fumarate et du glycérol. Les cultures sur H_2 / fructose ne montrent pas d'activité métabolique mesurable, alors que les cultures sur H_2 / fumarate et sur H_2 / glycérol réduisent les substrats organiques en succinate et propanediol (traces) respectivement:



Les cultures sur H_2 / fumarate se développent en produisant uniquement du succinate, même après transfert sur milieu neuf (Fig. 14, 15), tandis que dans les cultures sur H_2 / glycérol, on n'observe pas du tout de croissance; la réduction du glycérol en propanediol n'est donc pas liée à une phosphorylation (pas de respiration du glycérol alors qu'il y a respiration du fumarate). Cependant, selon la théorie du recyclage de H_2 d'Odom et Peck (1981) un gradient de protons (et, comme ici, en présence d'une ATP-ase donc un gain d'ATP) devrait également se réaliser en l'absence d'un transport membranaire des électrons (Fig. 4). C'est-à-dire, que la réaction



pourrait conduire à un gradient membranaire de protons si l'hydrogène était oxydé par une hydrogénase périplasmique et si un transfert d'électrons mais pas de protons vers le cytoplasme se réalisait. L'absence de croissance de la bactérie catalysant ce réaction (eq.13) constitue donc un argument contre l'hypothèse du recyclage de H_2 .

l'addition d' H_2 dans les cultures de *D. fructosovorans* fermentant le fructose stoppe toute activité métabolique mesurable. Ceci peut

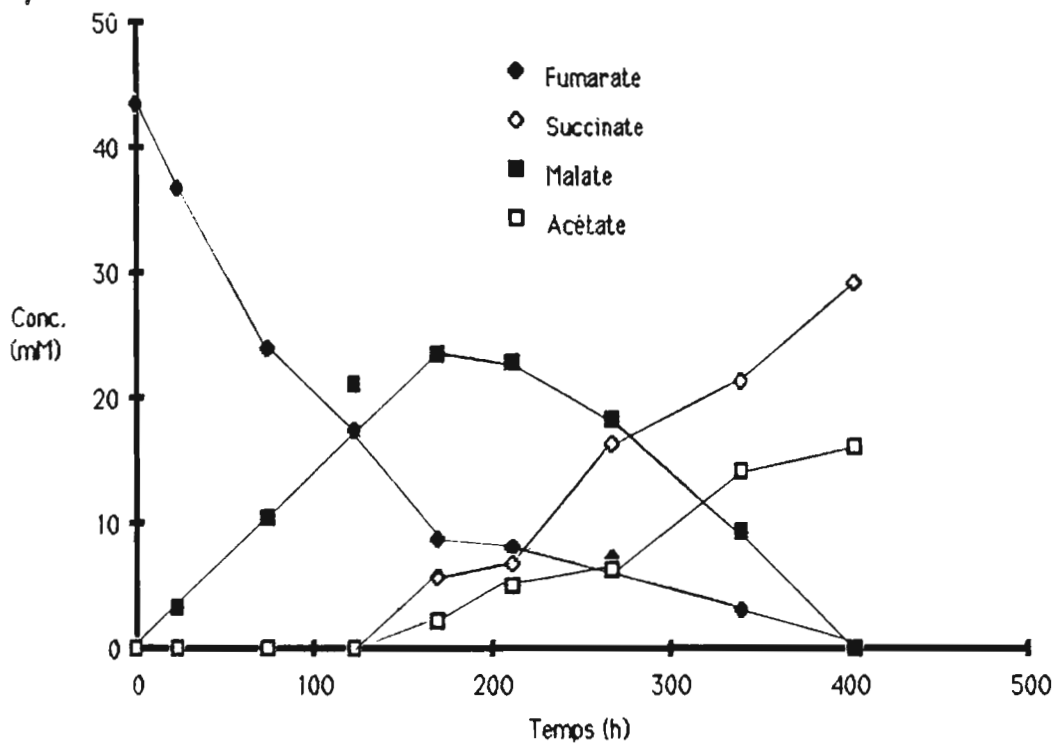


Fig. 14 Cinétique de la dégradation du fumarate sans sulfate sous N₂ / CO₂ (80 / 20) 1 bar par *Desulfovibrio fructosovorans*. Atmosphère = 66 % du volume total ; [fumarate] = 45 mM .

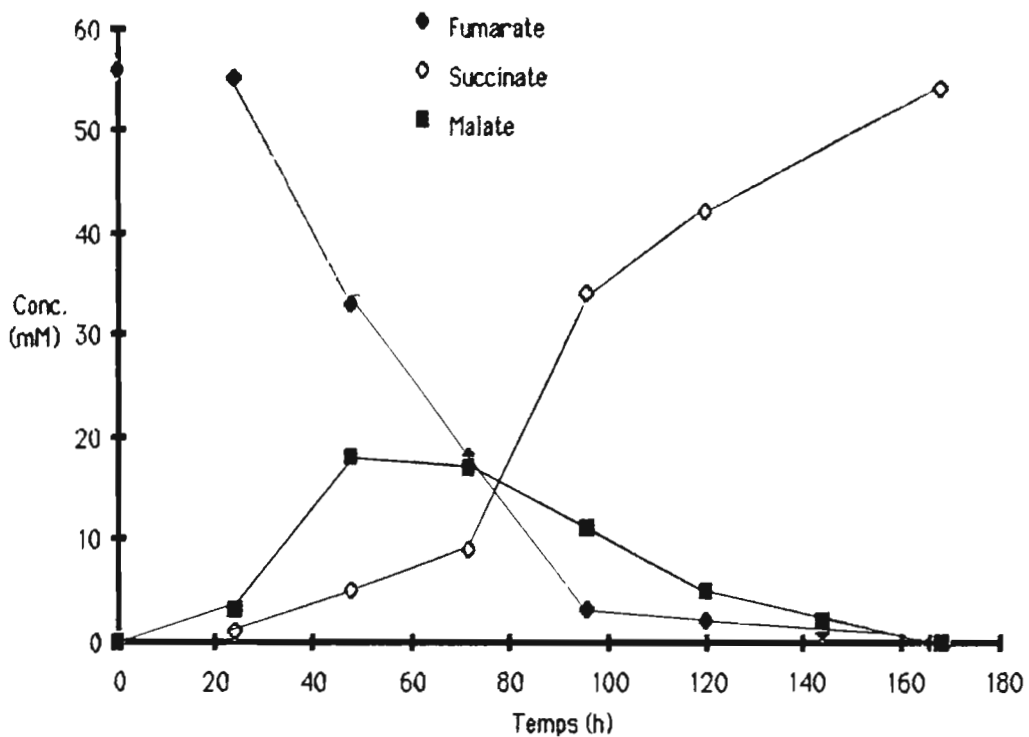


Fig. 15 Cinétique de la dégradation du fumarate sans sulfate sous H₂ / CO₂ (80 / 20) 3 bars par *Desulfovibrio fructosovorans*. Atmosphère = 66 % du volume total ; [fumarate] = 55 mM .

s'expliquer de la façon suivante: l'hydrogène réduit les transporteurs d'électrons; ces transporteurs d'électrons une fois réduits, ne permettent plus l'oxydation du fructose et donc la formation d'accepteurs d'électrons internes tels que l'oxaloacétate ou le fumarate. Ce sont ces derniers qui permettent la réoxydation des transporteurs d'électrons et l'oxydation de l'hydrogène. L'addition de fumarate débloque ces cultures et aboutit à l'enlèvement de H_2 entraînant par la suite la réduction du fumarate et la fermentation du fructose (Fig. 16).

Au cours du processus de dismutation, un composé sert en même temps de donneur et d'accepteur d'électrons. H_2 inhibe la dismutation du glycérol et du fumarate au niveau de l'oxydation, probablement à cause de la réduction des transporteurs d'électrons. Cependant H_2 accélère la réduction de ces substrats.

Cela prouve que même en l'absence de sulfate, la dégradation des substrats organiques est liée au pool d' H_2 externe. Il n'est pas impossible que *D.fructosovorans* produise et consomme également de l' H_2 au cours de la fermentation de substrats organiques tels que le fructose et le glycérol et pendant la dismutation du fumarate. Il faudrait étudier la signification du métabolisme de H_2 au cours de la fermentation par d'autres bactéries hydrogénase-positives.

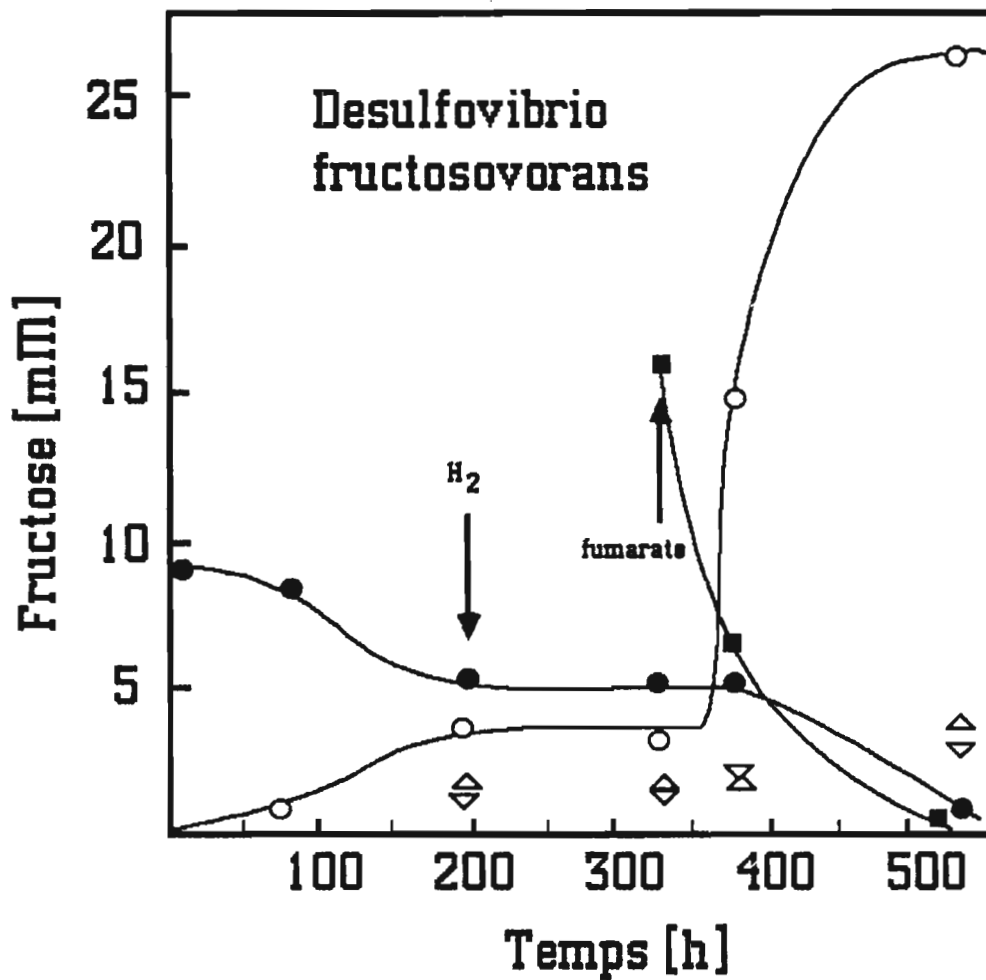


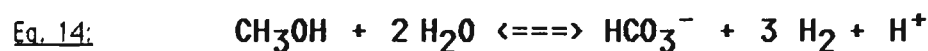
Fig. 16
Effet de l'hydrogène (0.8 atm.) sur la fermentation du fructose par *Desulfovibrio fructosovorans*. Rapport phase liquide/phase gazeuse = 4/1. Culture non agitée.

- Fructose
- Succinate
- △ Acétate
- ▽ Ethanol
- Fumarate

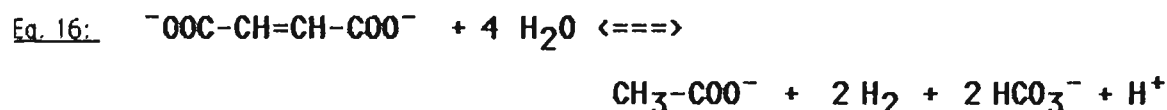
3.5 Rôle possible du métabolisme de H₂ au cours des dismutations et fermentations

La dégradation du méthanol par *Methanosarcina* spp. représente une dismutation similaire à celle du fumarate par *Desulfovibrio fructosovorans*. Les deux réactions de dismutation peuvent donc s'écrire suivant deux réactions, une oxydation et une réduction:

dismutation du méthanol



dismutation du fumarate



L'effet de H₂ sur la dismutation du méthanol et du fumarate (catalysée respectivement par *Methanosarcina* sp. ou *Desulfovibrio fructosovorans*) est identique: inhibition de la réaction d'oxydation (Eq. 14, 16) et stimulation de la réaction de réduction (Eq. 15, 17). Cela conduit à l'oxydation de H₂ couplée à la réduction du méthanol (Müller et al. 1986) ou du fumarate (Fig. 15). La [H₂] apparaît donc être en équilibre dynamique avec des transporteurs d'électrons (Fig. 17). De plus, en supposant que l'hypothèse du recyclage de H₂ d'Odom et Peck (1981) est également valable pour les espèces *Methanosarcina*, il est possible

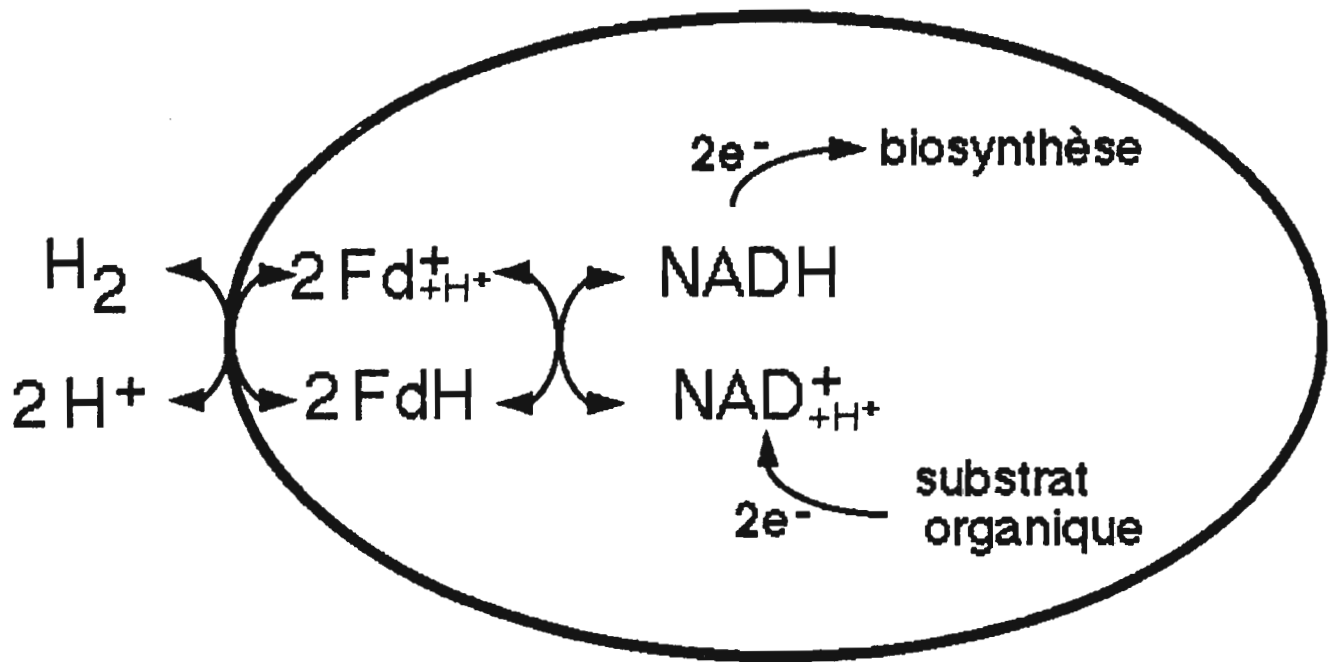


Fig. 17
 Equilibre d'oxydo-réduction entre la concentration d'hydrogène extérieur et les transporteurs d'électrons chez une bactérie syntrophique ou chez une bactérie hydrogenotrophe.

d'imaginer un transfert d' H_2 entre les cellules de *Methanosarcina* qui forment généralement des amas. La création d'un gradient de protons (Fig. 18) entre les cellules de *Methanosarcina* serait le résultat de ce transfert d' H_2 et pourrait donc aboutir à un gain plus important d'ATP (ATP-ase). La formation d'aggrégats représenterait donc dans ce cas, un avantage énergétique (Conrad et al. 1985) car cela minimise la distance entre les cellules. Ce modèle théorique du transfert d' H_2 entre les cellules d'une seule espèce ("transfert intraspécifique d'hydrogène") représente un modèle intermédiaire entre le TIH et le recyclage d' H_2 .

En supposant que la production et la consommation d' H_2 participent à la création d'un gradient de protons (Fig. 4), seules les bactéries contenant une ATP-ase pourraient ainsi profiter de ce métabolisme. Par conséquent, c'est plutôt chez les bactéries qui respirent que chez les bactéries fermentatives qu'on pourrait s'attendre à un recyclage d' H_2 . Cependant, une consommation d' H_2 a également été observée durant le processus de fermentation bactérienne:

- *Clostridium acetobutylicum* consomme de l' H_2 pour réduire le butyrate en butanol (Jewell et al. 1986, Heyndrickx et al 1987, Brosseau et al. 1986)
- *Desulfobulbus propionicus* consomme de l' H_2 pour réduire l'acétate en l'absence de sulfate (Laanbroek et al. 1982)

Ce sont surtout les Clostridies hydrogénase positives (comme *Clostridium kluveri*, ou d'autres bactéries réalisant la réaction de Stickland:

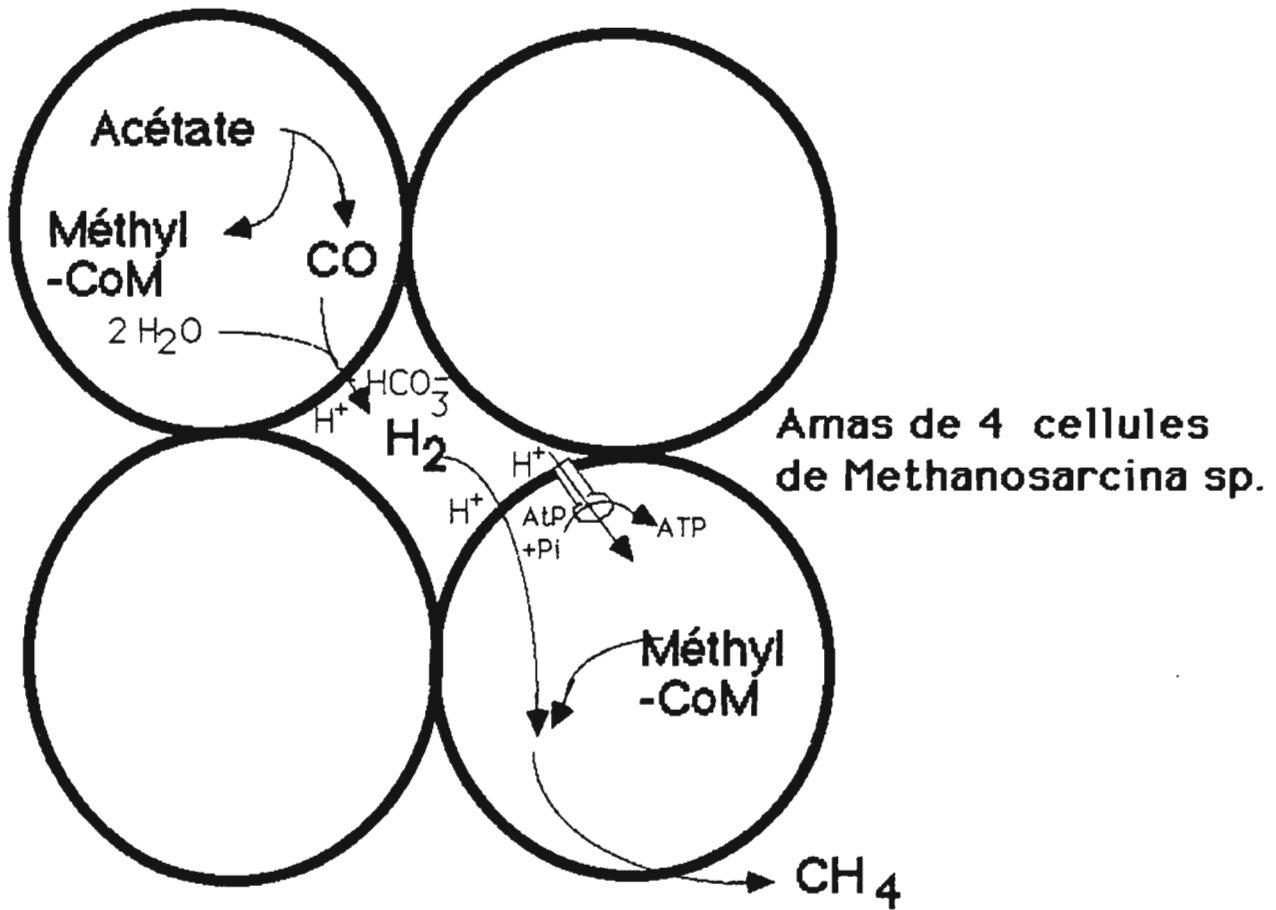
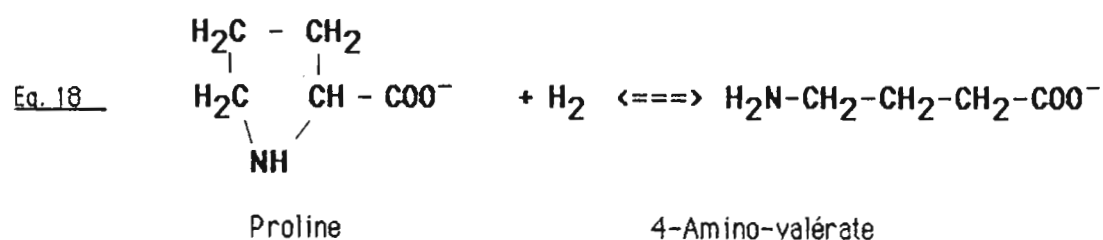


Fig.18:
Possibilité théorique de création d'un gradient de protons par production et consommation de l'hydrogène (selon l'hypothèse du recyclage d'hydrogène d'Odom et Peck) au cours de la dégradation de l'acétate par *Methanosarcina* species.

utilisation d'un acide aminé comme donneur d'électrons et d'un autre acide aminé comme accepteur d'électrons) qui sont susceptibles d'en produire et consommer H₂.

Si H₂ est généralement capable de réduire le NAD(P)⁺ dans les cellules contenant une hydrogénase couplée à un NAD(P)H, comme cela a été décrit pour *Clostridium kluyveri* (Simon et al. 1985) ou pour *Clostridium butyricum* (Matsunaga et al 1985), et si l'hydrogénase est périplasmique il ne faut qu'un accepteur d'électrons pour permettre la création d'un gradient membranaire de protons (Fig. 4). L'oxydation de H₂ au cours d'une fermentation pourrait donc conduire à la formation d'ATP sans l'utilisation d'une chaîne de transport d'électrons. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail la consommation d'H₂ par les bactéries fermentatives.

L'existence d'une ATP-ase chez certaines Clostridies ne peut pas être exclue car la réduction de la proline par *C. sporogenes* est couplée à une translocation orientée de protons (= souche probablement ATP-ase positive) (Lovitt et al 1986). De plus *C. sporogenes* peut jouer le rôle d'une syntrophe (= souche hydrogénase positive) en présence de bactéries hydrogénophiles (Wildenauer et Winter 1986). Théoriquement, *Clostridium sporogenes* devrait donc être capable de croître en catalysant la réaction suivante:



Il est à remarquer ici que, d'un point de vue mécanistique, les deux modèles proposés pour expliquer la production et la consommation d' H_2 au cours du métabolisme de la plupart des bactéries hydrogénophiles testées (Fig. 3, 4) (Lupton et al. 1984, Odom et Peck 1981), ne s'excluent pas mutuellement. Une combinaison des deux modèles serait une solution permettant la formation d'une force proton-motrice supérieure à celle possible pour chacun des deux modèles considérés isolément (Fig. 19). Le recyclage de H_2 ne représenterait ici pas le seul mécanisme formant un gradient de protons, mais un mécanisme additionnel.

3.6 Compétition : rôle écologique de la maintenance d'une certaine concentration d' H_2

La bactérie homoacétogène *Sporomusa acidovorans* et la BSR *Desulfovibrio fructosovorans* sont toutes deux capables d'oxyder le méthanol en utilisant respectivement le CO_2 ou le SO_4^{--} comme accepteur d'électrons. En présence d'une concentration excessive en méthanol (40mM), ces deux souches ne produisent pas d'acétate en coculture, mais du sulfure et vraisemblablement du CO_2 . *D. fructosovorans* maintient, pendant sa croissance sur méthanol, des valeurs de la $[H_2]$ inférieures à celles mesurées dans la culture de *S. acidovorans* (Tab. 5). Ceci permet d'expliquer l'inhibition de la réduction du CO_2 en acétate dans la coculture en terme de TIH. (Dans une culture pure de *S. acidovorans*, la présence unique du sulfate n'a pas inhibée la dégradation du méthanol).

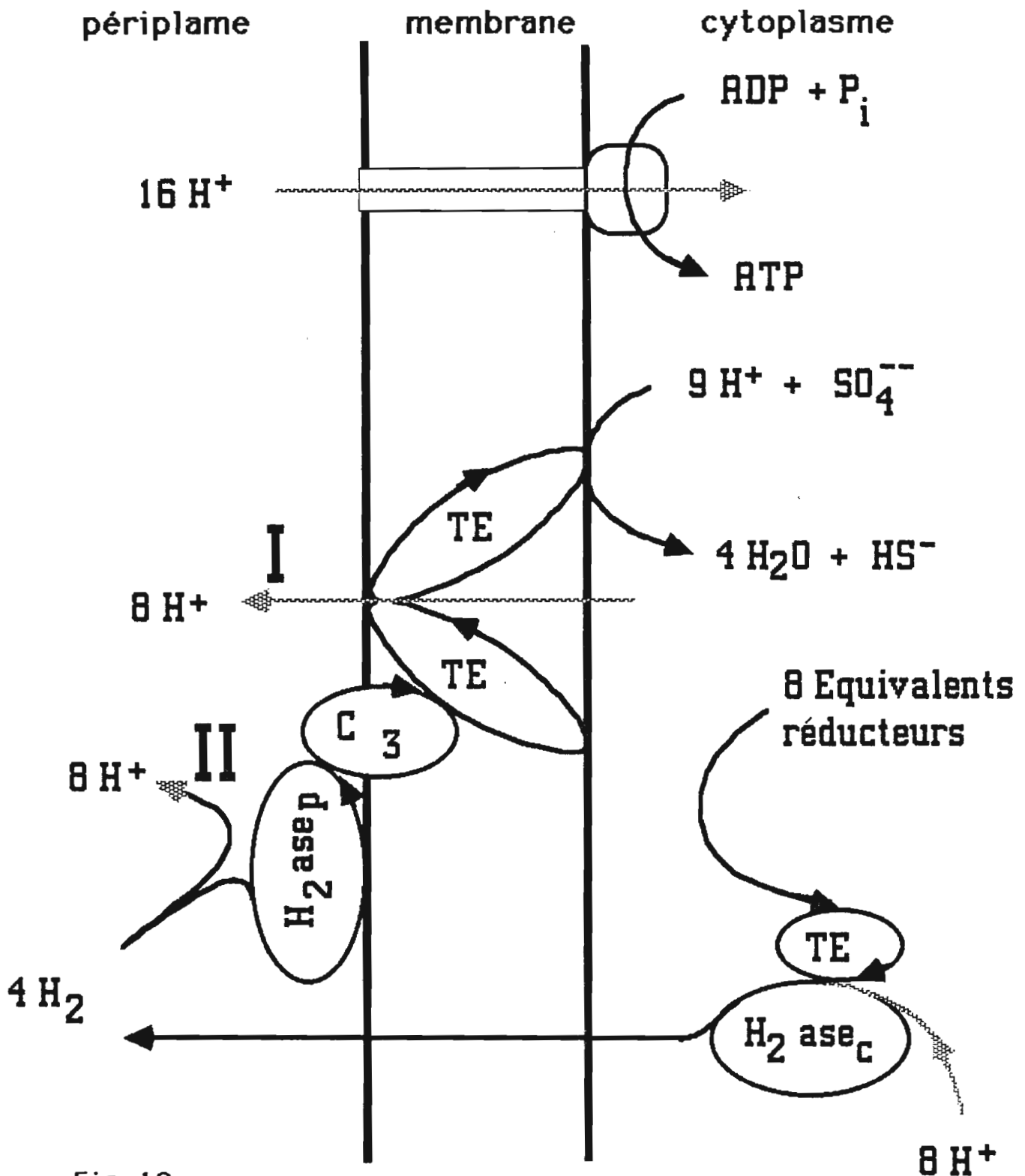


Fig. 19

Création d'un gradient de protons:

I. au cours du transport membranaire des électrons (respiration)

II. par le mécanisme de recyclage de l'hydrogène pendant l'oxydation des équivalents réducteurs par *Desulfovibrio sp.*

TE = Transporteur d'électrons, $\text{H}_2 \text{ ase}_p$ = Hydrogénase périplasmique
 $\text{H}_2 \text{ ase}_c$ = Hydrogénase cytoplasmique, c_3 = Cytochrome c_3

Il se pourrait également que, dans la nature, les bactéries qui maintiennent des pressions partielles externes d' H_2 à des valeurs différentes, aient une influence mutuelle sur leur métabolisme pour deux raisons:

- compétition vis à vis de l' H_2 excrété
- inhibition de la dégradation du substrat par d'autres bactéries par production d'hydrogène. (Fig 17). Une illustration classique de cette inhibition est représentée par *Desulfovibrio* sp. qui inhibe la dégradation de l'acétate par *Methanosarcina barkeri* en produisant H_2 à partir du lactate (McInnerney et Bryant 1981). On peut expliquer par ce même mécanisme, l'effet inhibiteur du formiate sur la méthanogénèse à partir de l'acétate, observé dans une culture mixte d'espèces de *Cellulomonas*, *Desulfovibrio* et *Methanosarcina* (Guyot 1986).

Même lorsque le substrat organique est identique pour les deux bactéries de la coculture, il y a possibilité d'interactions entre elles, entraînant ainsi une compétition indirecte pour le substrat par l'intermédiaire du pool d' H_2 commun, comme nous l'avons déjà vu pour le méthanol.

On peut supposer que, dans les environnements naturels exempts d' O_2 ces bactéries sensibles à l' H_2 sont toutes reliées à un pool d' H_2 commun (Fig. 20). Les capacités métaboliques de ces bactéries (disponibilité des accepteurs et des donneurs d'électrons) déterminent leur participation au turnover du pool commun en terme de production et de consommation d' H_2 . Il se peut également que la taille du pool d' H_2 commun détermine la direction du flux d' H_2 : des concentrations élevées d' H_2 entraînent une consommation de l' H_2 par toutes les bactéries hydrogénophiles. Des

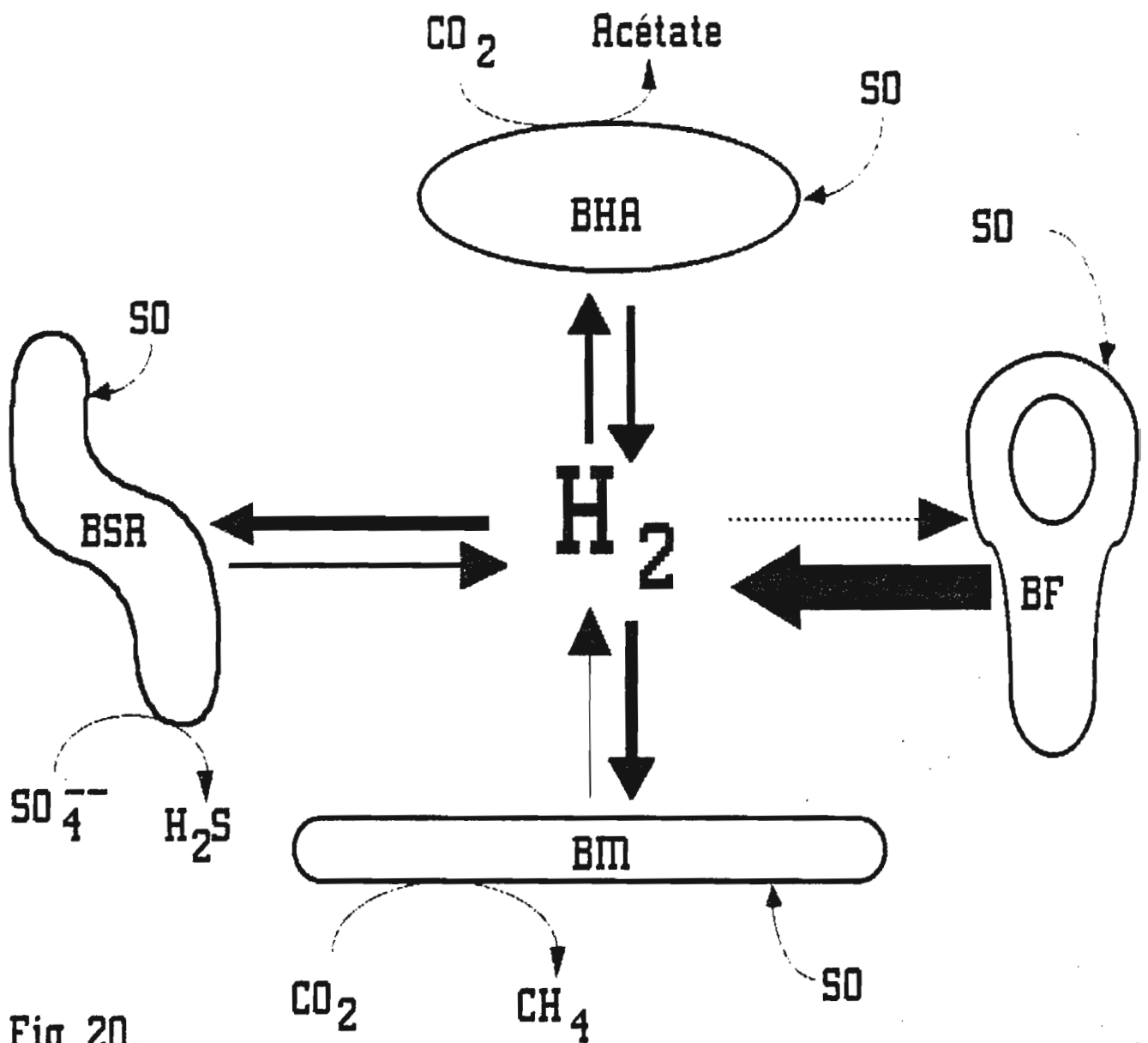


Fig. 20.

Schéma simplifié montrant la participation de plusieurs bactéries anaérobies dégradant un substrat organique (SO), à un "pool" commun de l'hydrogène. Les variations de la pression partielle, dues à la disponibilité des sources d'énergie, peuvent déplacer les directions du flux d'hydrogène et peuvent transformer une bactéries consommatrice facultative d'hydrogène en productrices d'hydrogène. L'épaisseur des flèches symbolise l'activité principale de consommation ou production d'hydrogène.

- BSR = Bactéries sulfato-réductrices
- BM = Bactéries méthanogènes
- BHA = Bactéries homo-acétogènes
- BF = Bactéries fermentatives

concentrations faibles d' H_2 ont pour conséquence une production d' H_2 par certaines bactéries (qui maintiennent en culture pure des concentrations d' H_2 plus élevées, comme les bactéries homoacétogènes) alors que d'autres bactéries hydrogénophiles (qui maintiennent des concentrations très faibles, comme les BSR) continuent à l'oxyder. Si deux bactéries différentes, qui maintiennent des valeurs de $[H_2]$ différentes pendant la dégradation d'un substrat organique (ou si l'on veut parler de façon imagée : qui sont entourées par des nuages d'hydrogène diffus de différentes tailles) arrivent au contact l'une de l'autre, le flux d' H_2 suivra le gradient ainsi créé (gradient allant du gros nuage au petit nuage).

L'augmentation des concentration d' H_2 conduit à l'accumulation de produits de fermentation réduits et à une baisse de la proportion d'acétate selon trois mécanismes (Fig. 21):

1. en favorisant une production accrue de produits de fermentation réduits et une diminution de la production d'acétate et d' H_2 (Chung 1976, Chen Min et Wolin 1977, Ianotti et al. 1973, Schleifinger et al. 1975, Winter 1980, Baushop et Mountfort 1981, Stams et Hansen 1984, voir également Introduction 3.4-3.7).
2. en inhibant la dégradation syntrophique des produits de fermentation (McInnerney et al. 1979, 1981, Kaspar et Wuhrmann 1978, McInnerney et Bryant 1981, Bryant et al 1967, Eichler et Schink 1984, Sleat et Robinson 1983)
3. en inhibant la dégradation des produits de fermentation tels que les alcools ou le lactate, par des bactéries homoacétogènes et sulfurigènes (résultats actuels).

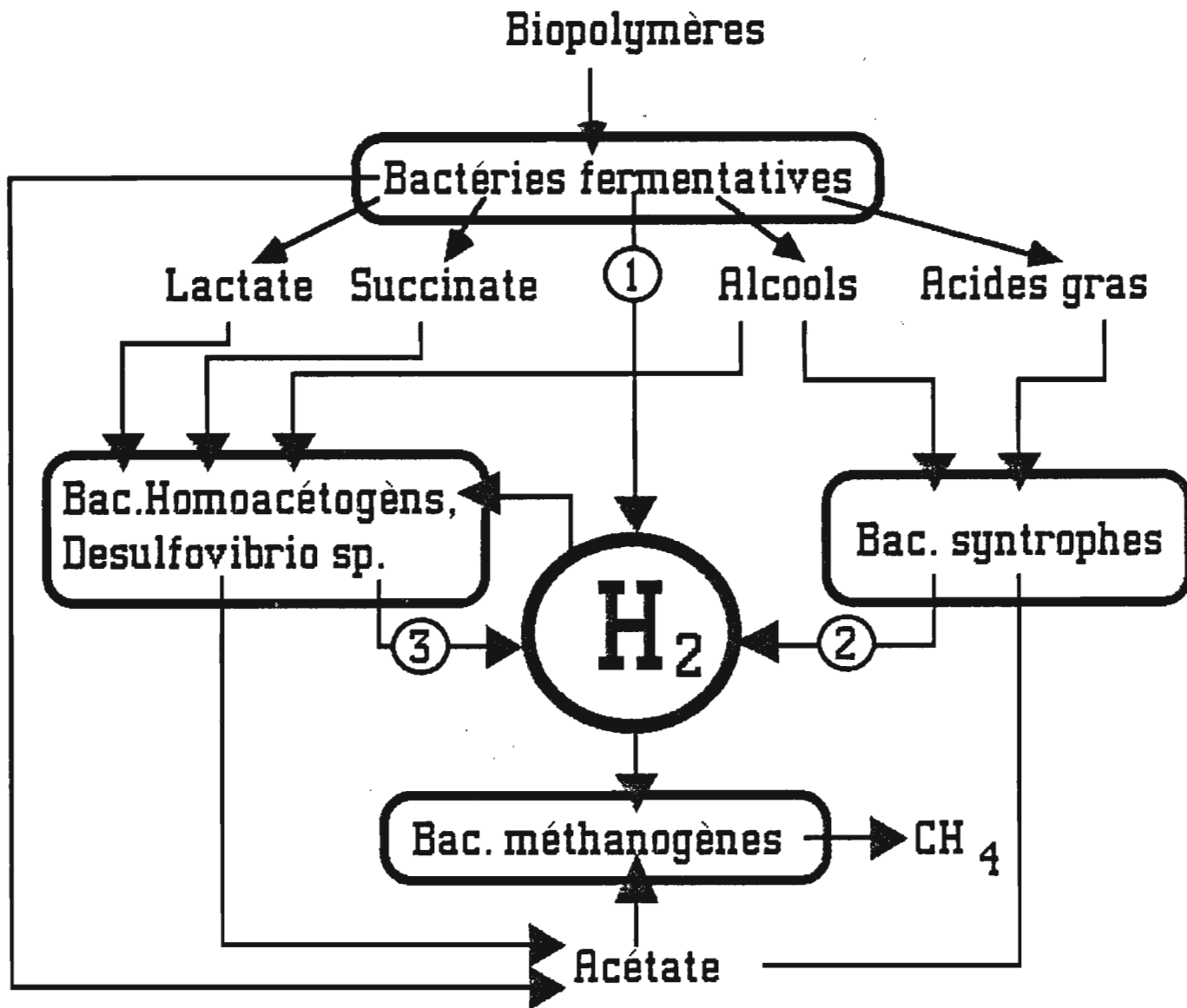


Fig. 21

Schéma simplifié du flux d'électrons dans les environnements anaérobies et du turnover de l'hydrogène

Les trois sites où une concentration élevée d'hydrogène peut conduire à l'accumulation des produits de fermentation réduits, sont les suivants:

- (1) Déplacement du métabolisme des bactéries fermentatives de la production d'acetate et d'hydrogène vers la production d'alcools et acides gras.
- (2) Inhibition de l'activité métabolique des bactéries syntrophiques (BPOH).
- (3) Inhibition de la dégradation des substrats organiques par les bactéries homoacétogènes, sulfato-réductrices et méthanogènes.

4 Influence possible de la variation d'énergie libre sur la vitesse des réactions chimiques catalysées par les bactéries: relation entre la thermodynamique et la cinétique

4.1 Effet des accepteurs d'électrons terminaux sur l'efficacité de l'oxydation de H₂

Il semble d'après l'article 5 que, dans les cocultures de deux bactéries hydrogénophiles, c'est l'organisme qui utilise l'accepteur d'électrons thermodynamiquement le plus favorable qui oxyde le plus efficacement l'hydrogène. L'article 6 reprend ce problème et démontre avec plus de détails le rôle de la thermodynamique dans la dégradation effective des traces d'H₂.

**The Capacity of Hydrogenotrophic Anaerobic Bacteria
to Compete for Traces of Hydrogen
Depends on the Redox Potential
of the Terminal Electron Acceptor**

Ralf Cord-Ruwisch¹, Hans-Jürgen Seitz², and Ralf Conrad²

1 Laboratoire de Microbiologie, ORSTOM, Université de Provence, 3 Place Victor-Hugo, F-13331 Marseille Cedex 3, France

2 Fakultät für Biologie, Universität Konstanz, Postfach 5560, D-7750 Konstanz, Federal Republic of Germany

Summary

The effect of different electron acceptors on substrate degradation was studied in pure and mixed cultures of various hydrogenotrophic homoacetogenic, methanogenic, sulfate-reducing, fumarate-reducing and nitrate-ammonifying bacteria. Two different species of these bacteria which during organic substrate degradation produce and consume hydrogen, were cocultured on a substrate which was utilized only by one of them. Hydrogen, which was excreted as intermediate by the first strain (and reoxidized in pure culture), could, depending on the hydrogen acceptor present, also be used by the second organism, resulting in interspecies hydrogen-transfer. The efficiency of H₂-transfer was similar when methanol, lactate or fructose were used as organic substrate, although the free energy changes of fermentative H₂-formation of these substrates are considerably different. In coculture experiments nitrate or fumarate > sulfate > CO₂/CH₄ > sulfur or CO₂/acetate were the preferred electron acceptors and an increasing percentage of H₂ was transferred to that bacterium which was able to utilize the preferred electron acceptor.

In pure culture the threshold values for hydrogen oxidation decreased in the same order from ≤ 1100 ppm for homoacetogenic bacteria to about 0.03 ppm for nitrate or fumarate reducing bacteria. The determined H₂-threshold values as well as the percentage of H₂ transfer in cocultures were related to the Gibbs free energy change of the respective hydrogen oxidizing reaction.

Introduction

Hydrogen is a key intermediate during degradation of organic matter in anaerobic biotic environments (● Hungate 1967, Zehnder 1978, Bryant 1979, Wolin 1982). H_2 is consumed by methanogenic, sulfate-reducing, and homoacetogenic bacteria. Members of these bacterial groups are able to grow chemolithotrophically with H_2 as sole energy source. Thereby they compete for H_2 that has been excreted by fermentative bacteria. Since H_2 concentrations are usually extremely low in anaerobic environments (● Strayer & Tiedje 1978, Robinson et al 1981, Lovley et al 1982, Conrad et al. 1985, 1986, Novelli & Scranton 1987) microorganisms are outcompeted for H_2 by others which more effectively utilize traces of H_2 . Competition for H_2 between sulfate-reducing and methanogenic bacteria has been thoroughly investigated in the past. It has been shown that sulfate reducing bacteria are able to outcompete the CO_2 reducing methanogenic bacteria for hydrogen because of their higher affinity and higher growth yield (● Winfrey & Zeikus 1977, Abram & Nedwell 1978 a, b, Kristianssen et al. 1982, Lovley et al. 1982, Lovley & Klug 1983, Lupton & Zeikus 1984, Robinson & Tiedje 1984, Robinson & Tiedje 1984). However, the question remained by what sulfate-reducing bacteria are enabled to exhibit higher affinities for H_2 than methanogenic bacteria (● Kristianssen et al. 1982). Recently the threshold concentration for H_2 has been discussed as a more important factor for successful competition (● Lovley 1986, Ward & Winfrey 1986). According to this model, the successful organism keeps the H_2 partial pressure below the level that is

necessary to allow H_2 oxidation by competitors. Sulfate-reducing bacteria should therefore have lower H_2 threshold levels than methanogenic bacteria. In fact, it has been demonstrated that thresholds of hydrogen oxidation were about one order of magnitude lower in sediments which contained sulfate besides bicarbonate as electron acceptor (Lovley et al. 1982).

However presently it is unknown which factors affect the magnitude of H_2 threshold concentrations in pure or defined mixed cultures. Beside the catalytic properties of the hydrogenases which catalyze hydrogen oxidation, the Gibbs free energy change of the total reaction, including reduction of the terminal electron acceptors may also be of importance.

Hydrogenotrophic anaerobes, such as chemolithotrophic homoacetogens and sulfate reducers do not only consume H_2 but also produce H_2 (● Hatchikian et al. 1976, Tsuji & Yagi 1980, Traoré et al. 1981, Cord-Ruwisch et al. 1987) when metabolizing organic substrates. Methanogens produce H_2 when growing on CO (● O'Brien et al. 1984) or formate (● Tzeng et al. 1975) and just recently it has been demonstrated that H_2 is even produced during acetate cleavage by *Methanosarcina barkeri* (● Lovely & Ferry 1984, Phelps et al. 1985, Krzycki et al. 1987, Boone et al. 1987) and during homoacetogenesis on methanol (● Cord-Ruwisch & Ollivier 1986, Heijthuisen & Hansen 1986). By testing different representatives of homoacetogenic, sulfidogenic, and methanogenic bacteria (● Cord-Ruwisch 1986, Cord-Ruwisch et al. 1987) we have recently shown that H_2 is in

general a minor but significant product during metabolism of various organic substrates. This indicates that facultatively hydrogenotrophic anaerobes maintain a certain H_2 partial pressure during metabolism. Maintenance of a certain H_2 partial pressure, however, would allow the utilization of this H_2 by other bacteria provided they exhibit a H_2 threshold below that level.

Here we show that the threshold concentration of hydrogen is predominantly dependent on the redox potential of the terminal electron acceptor, and that H_2 is transferred from one facultatively hydrogenophilic bacterium to another one, if the latter is able to more effectively utilize the traces of H_2 due to the thermodynamically more favorable electron acceptor.

Materials and Methods

Bacteria. The following bacterial strains were obtained from the German Collection of Microorganisms (DSM): *Desulfovibrio fructosovorans* strain JJ (DSM 3604), *Desulfovibrio desulfuricans* strain ESSEX (DSM 642), *Desulfovibrio vulgaris* strain G6 (as isolated from the defined syntrophic association with *Syntrophus bushwellii*, DSM 2612TB), *Methanobrevibacter arboriphilus* (DSM 744), *Methanobrevibacter smithii* (DSM 861), *Methanococcus vanniellii* (DSM 1224), *Methanobacterium formicicum* (DSM 1535), *Methanospirillum hungatei* (DSM 864), *Sporomusa acidovorans* (DSM 3132), *Sporomusa sphaeroides* (DSM 2875), *Wolinella succinogenes* (DSM 1740); and *Desulfobulbus elongatus* and *Methanospirillum* SK 6 were kindly donated by Dr. Samain, INRA, Lille, France and Dr. F. Widdel University of Urbana, Illinois, USA, respectively. *Desulfovibrio vulgaris* strain Hildenborough was obtained from Dr. C. Hatchikian, CNRS-Marseille, France. *Acetobacterium carbinolicum* and *Acetobacterium woodii* strain NZ Va 16 were kindly provided by B. Eichler and R. Bache, University of Konstanz, F.R.G., respectively. *Sporomusa termitida* isolated from termite hindguts, was kindly donated by Dr. Breznak, Michigan State University, E-Lansing, USA.

Medium and growth conditions. The anaerobic, bicarbonate buffered, sulfide-reduced freshwater medium, as described for fatty acid degrading sulfate-reducing bacteria (●Widdel and Pfennig 1984) was modified by

adding 1 to 3 mM acetate (as carbon source) and by omitting sulfate. For coculture experiments and for pure cultures with *Acetobacterium woodii*, *Wolinella succinogenes* and *Sporomusa* species 0.05% yeast extract was added. Electron donors and acceptors were added from sterile anaerobic stock solutions. If not otherwise stated, their final concentrations were (in mmol/l): fructose 10; lactate 20; methanol 20; formate 40; sulfate 20; nitrate 10; fumarate 60; acetate 5; sulfite 10; thiosulfate 20; sulfur as powder in excess. All chemicals used were of reagent quality.

Threshold experiments. H₂-thresholds were determined in cultures grown heterotrophically on organic electron donors or chemolithotrophically on H₂. In heterotrophically grown cultures H₂ was produced and consumed during organic substrate degradation until a nearly constant H₂ concentration, i.e. the threshold, was reached after depletion of the organic substrate. In H₂-grown cultures, the gas phase was replaced by H₂-free N₂/CO₂ (80/20) and pressurized with N₂ to 1 bar overpressure. A limiting amount of H₂ (giving about 10,000 ppm) was added and the oxidation of H₂ was followed until threshold was reached. The H₂-threshold measurements were carried out at 28-34 °C using 120 ml serum bottles with 80 % gas phase of H₂- and O₂- free N₂/CO₂ (80/20) mixtures. Throughout the experiments the cultures were rapidly stirred or shaken to ensure equilibrium of gas concentrations between the liquid phase and the gas phase. Hydrogen partial pressures were determined by analyzing gas samples taken from the headspace and correcting for the headspace pressure measured with a needle manometer.

Analytical methods. Methane and alcohols were determined by gas chromatography as described by Cord-Ruwisch et al. (●1986). Sulfide was determined spectrophotometrically as colloidal CuS (●Cord-Ruwisch 1985). Organic acids and fructose were analyzed by HPLC (●Cord-Ruwisch et al. 1986). Hydrogen was measured with a H₂ analyzer based on the HgO-Hg conversion technique (●Seiler, 1978; Seiler et al, 1980), and with the commercial H₂ analyzer (RGD2 & RGA2) of Trace Analytical, Stanford, California, USA. The detection limit for H₂ was 0.01ppm.

Competition experiments. All coculture experiments were carried out at 34°C with 10% freshly grown inoculum taken during the exponential growth phase of the respective pure cultures. Bacteria were grown on methanol lactate or fructose with or without a second bacterial strain which was unable to utilize the organic substrate but was able to use H₂ as electron donor which was eventually excreted by the first strain. The second bacterial strain was able to utilize electron acceptors which were added but could not be used by the first strain. The H₂-producing and H₂ consuming reactions studied are summarized together with the standard Gibbs free energies per mole of H₂ formed or utilized and the redox potentials under standard conditions and pH 7 (Table 1). The fermentation balances of the cocultures were determined after the organic substrate was utilized by measuring the degradation products (acetate, ethanol) and the reduced electron acceptors. The stoichiometry of the H₂-producing reactions listed in table 1 allowed to calculate the amount of reducing equivalents transferred (presumably as H₂) from one strain to the other.

Table 1: Overview of reactions studied and of their Gibbs free energies and redox potentials under Standard Conditions.

Reactions	ΔG° [kJ/mol H ₂]	E ^o [mv]
H ₂ -producing reactions:		
C ₆ H ₁₂ O ₆ + 4 H ₂ O	-----> 2CH ₃ -COO ⁻ + 2 CHCO ₃ ⁻ + 4 H ⁺ + 4 H ₂	- 51.5 - 681
CH ₃ OH + 2 H ₂ O	-----> HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 3 H ₂	+ 7.7 - 374
CH ₃ -CHOH-COO ⁻ + 2 H ₂ O	-----> CH ₃ -COO ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂	- 2.0 - 242
H ₂ -consuming reactions:		
4 H ₂ + 2 HCO ₃ ⁻ + H ⁺	-----> CH ₃ -COO ⁻ + 4 H ₂ O	- 26.1 - 279
H ₂ + S ⁰	-----> HS ⁻ + H ⁺	- 27.8 - 270
4 H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺	-----> CH ₄ + 3 H ₂ O	- 33.9 - 238
4 H ₂ + SO ₄ ²⁻ + H ⁺	-----> 4 H ₂ O + HS ⁻	- 38.0 - 217
4 H ₂ + S ₂ O ₃ ²⁻	-----> 2 HS ⁻ + 3 H ₂ O	- 43.5 - 189
3 H ₂ + SO ₃ ²⁻	-----> HS ⁻ + 3 H ₂ O	- 57.2 - 118
H ₂ + Caffeate	-----> Hydrocaffeate	- 85.5 a) + 29
H ₂ + Fumarate	-----> Succinate	- 86.2 + 32
4 H ₂ + NO ₃ ⁻ + 2 H ⁺	-----> NH ₄ ⁺ + 3 H ₂ O	-149.9 + 363

values calculated from Thauer et al (1977). E^o of the couples accepting electrons from H₂ was calculated relative to the redox potential of H₂ (- 414 mV).

a) estimated from Grbic'-Galic' (1985)

Results

Coculture experiments. In pure culture, the homoacetogenic bacterium *Sporomusa acidovorans* produces 0.75 mole acetate from oxidation of 1 mole of methanol by using CO₂ as electron acceptor (●Cord-Ruwisch & Ollivier 1986). However, when cocultured with hydrogen consuming anaerobes, *S. acidovorans* reduced much less CO₂ to acetate and instead allowed growth of the hydrogenotrophes present, by transfer of reducing equivalents (Table 2).

This transfer occurred with more than 90% efficiency when *S. acidovorans* was cocultured with fumarate, sulfate or nitrate-reducing H₂ oxidizers (Table 2). In this case *S. acidovorans* oxidized methanol, presumably to CO₂, but did not form acetate, while the cocultured bacterium reduced sulfate to sulfide (*Desulfovibrio* sp.), nitrate to ammonium (*Wolinella succinogenes*), or fumarate to succinate (*W. succinogenes*) in almost stoichiometric amounts. Since the co-cultured hydrogenotrophic bacteria were unable to oxidize methanol they apparently were able to "pull" reducing equivalents presumably as H₂, from the methanol-degrading *Sporomusa*. The same observation was made when fructose served as electron donor or with *Sporomusa sphaeroides*, degrading lactate, in the presence of the mentioned hydrogenotrophs. CO₂-reducing methanogens or sulfur reducing *Desulfovibrio* only "pulled" 8 to 40 % of the total reducing equivalents produced as H₂ by the *Sporomusa* species. Similar results were obtained when *Acetobacterium woodii* served as H₂ producing bacterium.

Tab. 2: The effect of different hydrogen consuming bacteria on CO₂ reduction to acetate by *Sporomusa* species degrading methanol, fructose or lactate.

Organic substrate	Strain I	Strain II	electron-accept. II	Electron accept. II reduced per mole substrate oxidized	Acetate produced from CO ₂ -reduction	Transfer of H ₂ [%] to strain II
Methanol	<i>Sporomusa acidovorans</i>	<i>Methanosprill.</i>	CO ₂	0.27 Methane	0.41	38 - 55
"		<i>Desulfovibrio</i>	sulfate	0.68 Sulfide	0.00	92 - 100
"		<i>Wolinella</i>	nitrate	0.73 Ammonium	0.00	97 - 100
Fructose		<i>Desulfovibrio</i>	sulfate	0.94 Sulfide	0.00*	94 - 100
Methanol	<i>Sporomusa sphaeroides</i>	<i>Desulfovibrio</i>	sulfur	0.24 Sulfide	0.57	8 - 24
"		<i>Wolinella</i>	fumarate	2.75 Succinate	0.00	92 - 100
Lactate		<i>Wolinella</i>	fumarate	1.73 Succinate	0.00**	86 - 100

All values given in mole per mole substrates degraded. Transfer of hydrogen was calculated from the relative amount of electron acceptor II reduced as well as from the deficit of acetate produced from CO₂.

* 1.88 mole acetate produced / mole fructose were considered to originate from fructose.
 ** 0.95 mole acetate produced / mole lactate were considered to originate from lactate.

Table 3: The effect of different hydrogen consuming bacteria on sulfide production by *Desulfovibrio vulgaris* strain G6 during lactate degradation.

electron acceptor I	strain II	electron acceptor II	electron acceptors reduced strain I (sulfide)	electron acceptors reduced strain II	H ₂ transferred [%] to strain II
sulfate	<i>Methanospirillum</i>	CO ₂	0.47	0.0	0
sulfate	<i>Sporomusa sph.</i>	CO ₂	0.51	0.0	0
sulfate	<i>Wolinella</i>	Nitrate	0.35	0.12 Ammonia	24 - 30
sulfur	<i>Methanospirillum</i>	CO ₂	0.73	0.30 Methane	60 - 64
sulfur	<i>Sporomusa acidov.</i>	CO ₂	0.34	0.37 Acetate*	74 - 83
sulfur	<i>Wolinella</i>	nitrate	0.0	0.46 Ammonia	92 - 100

Values given in mole per mole lactate degraded.

*) Corrected by considering of 1mole acetate produced per mole of lactate.

Table 4: Effect of different external hydrogen acceptors on the reduction of internal electron acceptors (ethanol -- and succinate production) by *Desulfovibrio fructosovorans* during the growth on fructose. Values mole per mole fructose degraded.

external H ₂ -sink		acetate	ethanol	succinate	external hydrogen acceptor reduced	H ₂ transfer to external H ₂ sink
without		0.4	0.3	0.8	-	0.0
sulfur		1.1	0.2	1.0	1.0 H ₂ S	1.0
sulfate		1.9	0.0	0.0	1.0 H ₂ S	4.0
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	(CO ₂)	2.4	0.1	1.0	0.4 acetate	1.6
<i>Methanospirillum hungatei</i>	(CO ₂)	1.2	0.0	0.3	0.7 CH ₄	2.8
<i>Wolinella succinogenes</i>	(NO ₃)	1.7	0.0	0.1	1.2 NH ₄ ⁺	4.0

Growing on lactate plus sulfate, *Desulfovibrio vulgaris* allowed 24 - 30 % transfer of reducing equivalents (as H₂) to *Wolinella* reducing NO₃⁻ which is the energetically more favourable electron acceptor than sulfate. However no H₂ was transferred to *M. hungatei* or *S. sphaeroides* using an electron acceptor which is energetically less favourable than sulfate. (Table 3). When replacing sulfate by elemental sulfur, which is the energetically less favourable electron acceptor *Desulfovibrio vulgaris* no longer produced sulfide but transferred all reducing equivalents to *W. succinogenes* (Table 3). Cocultures of sulfur-reducing *D. vulgaris* with CO₂ reducing *S. acidovorans* or *M. hungatei* resulted in reduction of both electron acceptors (Table 3).

In the absence of external electron acceptors *Desulfovibrio fructosovorans* strain JJ ferments 2 mole fructose to 1 mole succinate, 1 mole acetate, and 1 mole ethanol (●Cord-Ruwisch et al. 1986). Only traces of hydrogen (7600 ppm) were produced during this fermentation. In the presence of sulfur or sulfate *D. fructosovorans* also used these external electron acceptors and produced sulfide instead of ethanol or succinate. External electron acceptors such as sulfate or sulfur apparently were competing for reducing equivalents with the internal electron acceptors such as acetaldehyde or fumarate. The same shift of electron flow away from the formation of the fermentation products ethanol and succinate was observed when the activity of hydrogen consuming bacteria allowed the use of protons as external electron sink by coupling the oxidation of fructose via interspecies H₂ transfer to CO₂ or NO₃⁻ reduction (Table 4).

The amount of H_2 transferred to the accepting system was correlated to the free energy change of the oxidation of H_2 with the electron acceptor used. Virtually all reducing equivalents of fructose were used to reduce sulfate or nitrate if present as external electron acceptor, whereas only part of the electrons were used to reduce CO_2 or sulfur as external H_2 sink. In the latter case, internal electron acceptors generated during fermentation of fructose apparently were preferred and succinate and ethanol were excreted as reduced products of fructose oxidation.

Pure culture experiments.

The results of the coculture experiments suggested that the efficiency of competition between the strains depended on their capacity to oxidize low concentrations of hydrogen. Therefore, the threshold values of hydrogen oxidation were measured in pure cultures of the individual strains used for the coculture experiments and compared to the threshold values of other strains of homoacetogenic methanogenic and sulfate-reducing bacteria. Fig. 1 shows the H_2 partial pressures of H_2 in cultures of *Desulfovibrio desulfuricans* growing on lactate with different electron acceptors. H_2 was intermediately formed during lactate degradation similar as shown by previous experiments (●Hatschikian et al 1976, Tsuji & Yagi 1980, Traoré et al. 1981, Lupton et al. 1984) but was degraded until a certain threshold value was reached. These threshold H_2 -mixing ratios were about 5 -25 ppm when sulfate, thiosulfate, sulfite or sulfur served as the only electron acceptor (Fig. 1). With nitrate however, which is an energetically much more favourable electron acceptor than sulfate (see Table 1), hydrogen was oxidized down to mixing ratios 100 fold lower (0.02 - 0.03

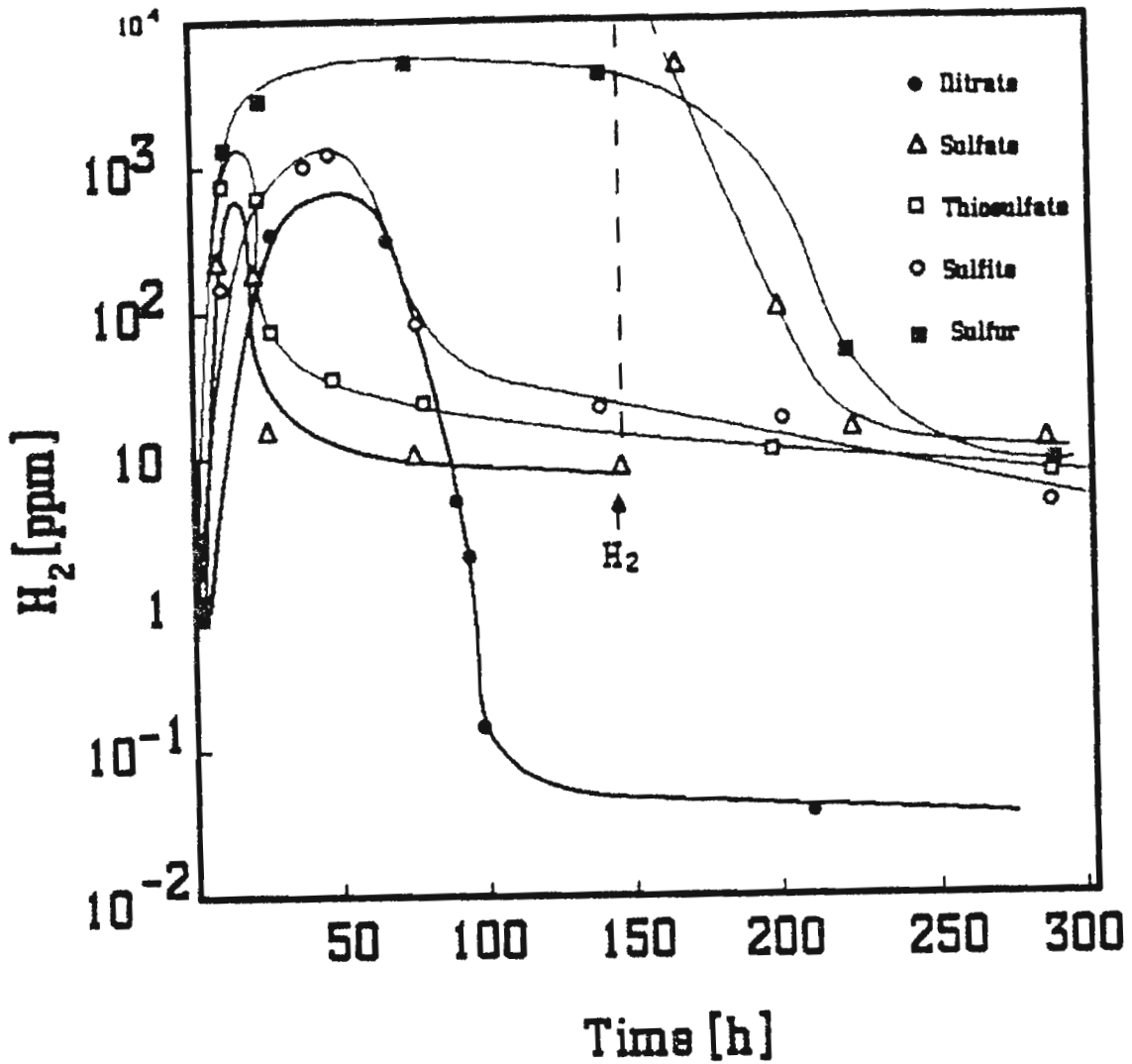


Fig. 1: Time course of hydrogen production and consumption during and after lactate degradation by *Desulfovibrio desulfuricans* Essex with different external electron acceptors. Concentrations are given in Materials and Methods section.

ppm, Fig.1).

Fig. 2 shows similar experiments with *A. woodii* growing on hydrogen as electron donor and with or without caffeine as additional electron acceptor (●Bache & Pfennig 1981, Tschsch & Pfennig 1984). The final H₂ threshold was much lower with caffeine than with CO₂ as electron acceptor, again indicating that the energetically more favourable electron acceptor allows the utilization of lower H₂ concentrations. Similar H₂ threshold concentrations were reached, however, with *W. succinogenes* and *Desulfovibrio desulfuricans* which both are able to oxidize H₂ by the reduction of fumarate to succinate or nitrate to ammonia (Table 5).

Table 5 summarizes the H₂-thresholds that were measured for the individual H₂-oxidizing reactions by using various strains of bacteria. The results indicate that there is a systematic trend from relatively high (ca. 1000 ppm H₂) to very low (ca. 0.03 ppm H₂) threshold concentrations with increasing Gibbs free energy changes of the H₂-consuming reaction.

The effect of fumarate or nitrate addition to a culture of *Desulfovibrio fructosovorans* strain JJ growing on saturating concentrations of H₂ (3 bar of H₂/CO₂ (80/20) in the gas phase) and sulfate is shown in Fig 3. Fumarate did not inhibit the utilization of sulfate, but was additionally used as electron acceptor. This was different, however, when H₂-concentrations were in a low range e.g. during dismutation of fumarate (6 ppm !). Under these conditions (40mM fumarate + 20mM sulfate), when both electron acceptors were present, fumarate but not sulfate was

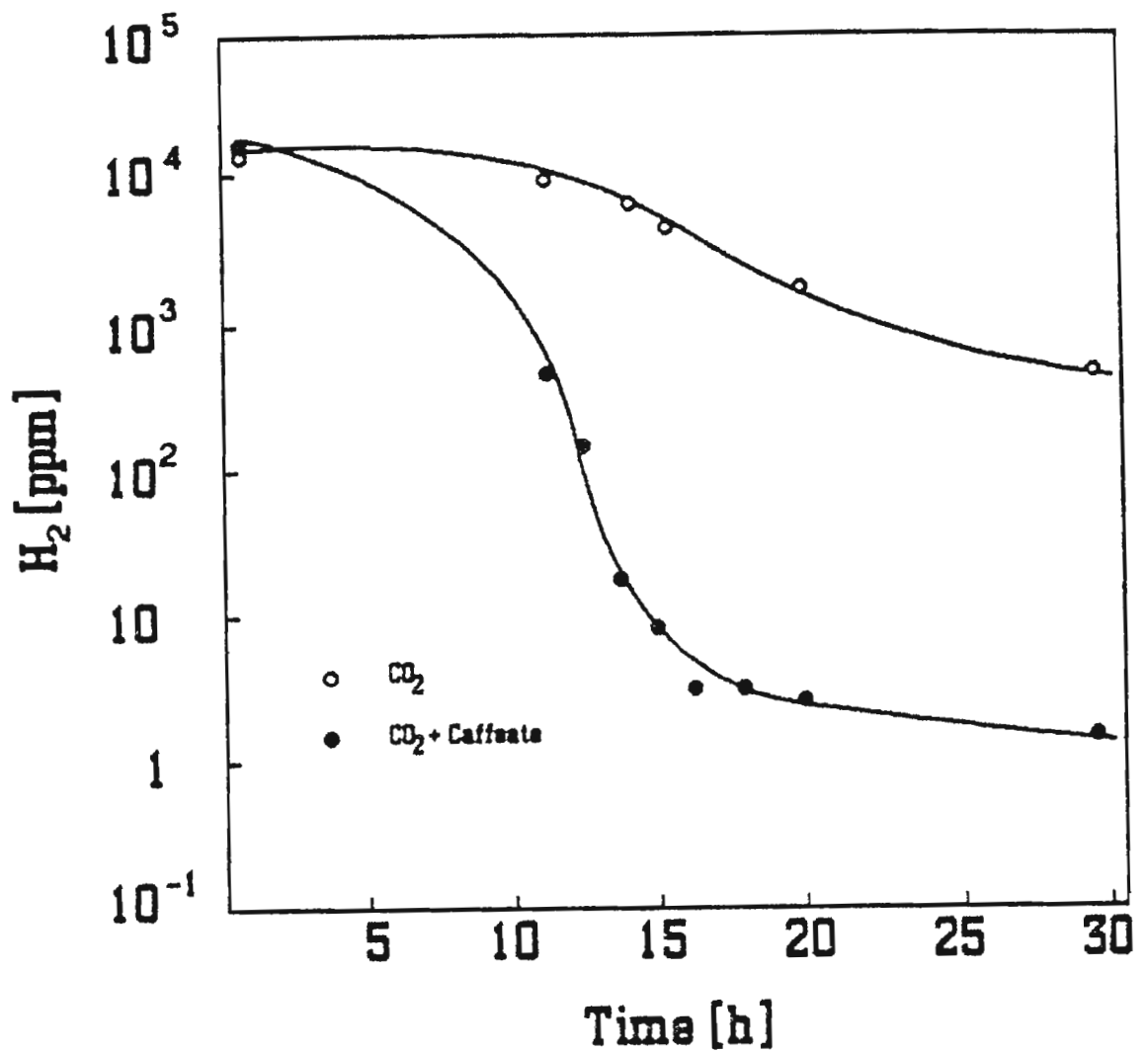


Fig. 2: Time course of hydrogen oxidation by *Acetobacterium woodii* with CO₂ and CO₂ + Caffeate as terminal electron acceptor. Two cultures were grown on H₂ plus CO₂ and on H₂, CO₂ + Caffeate [5mM], respectively. After the end of growth H₂ [ca. 10,000 ppm] was added to both cultures and caffeate [1mM] to one of them.

Table 5: Effect of electron acceptor on the threshold of H₂ in different hydrogenophilic bacteria growing on organic substrates or H₂. Values given are means of at least duplicate experiments. Reproducibility was about ± 50 %.

Electron acceptor oxidized / reduced	Microorganism	Substrate	H ₂ [ppm]
CO ₂ / acetate	<i>Sporomusa acidovorans</i>	Methanol	430
	<i>Sporomusa termitida</i>	H ₂	830
	<i>Acetobacterium woodii</i>	H ₂	520
	<i>Acetobacterium carbinolicum</i>	H ₂	950
Sulfur / Sulfide	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i> JJ	Lactate	24
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Essex	Lactate	10
	<i>Wolinella succinogenes</i>	H ₂	5
CO ₂ / CH ₄	<i>Methanospirillum hungatei</i>	Formate	25
	"	H ₂	30
	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	H ₂	100
	" <i>arboriphilus</i>	H ₂	90
	<i>Methanobacterium formicum</i>	H ₂	28
	<i>Methanococcus vannielii</i>	H ₂	75
Sulfate / Sulfide	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i> JJ	Lactate	12
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	Lactate	19
	" <i>vulgaris</i> 66	Lactate	16
	" <i>desulfuricans</i> Essex	Lactate	8
	" <i>desulfuricans</i> Essex	H ₂	9
	<i>Desulfobulbus elongatus</i>	Lactate	13
Sulfite / Sulfide	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Essex	Lactate	6
Thiosulfate / Sulfide	" <i>desulfuricans</i> Essex	Lactate	7
Caffeate / Hydrocaffeate	<i>Acetobacterium woodii</i>	H ₂	3
Fumarate / Succinate	<i>Wolinella succinogenes</i>	H ₂	0.02
	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i> JJ	Fumarate	0.9*
Nitrate / Ammonia	" <i>desulfuricans</i>	Lactate	0.03
	" <i>desulfuricans</i>	H ₂	0.03
	<i>Wolinella succinogenes</i>	H ₂	0.02

* *D. fructosovorans* disproportionates fumarate to acetate and succinate, so that fumarate as electron acceptor may become limiting at the end of growth rather than H₂.

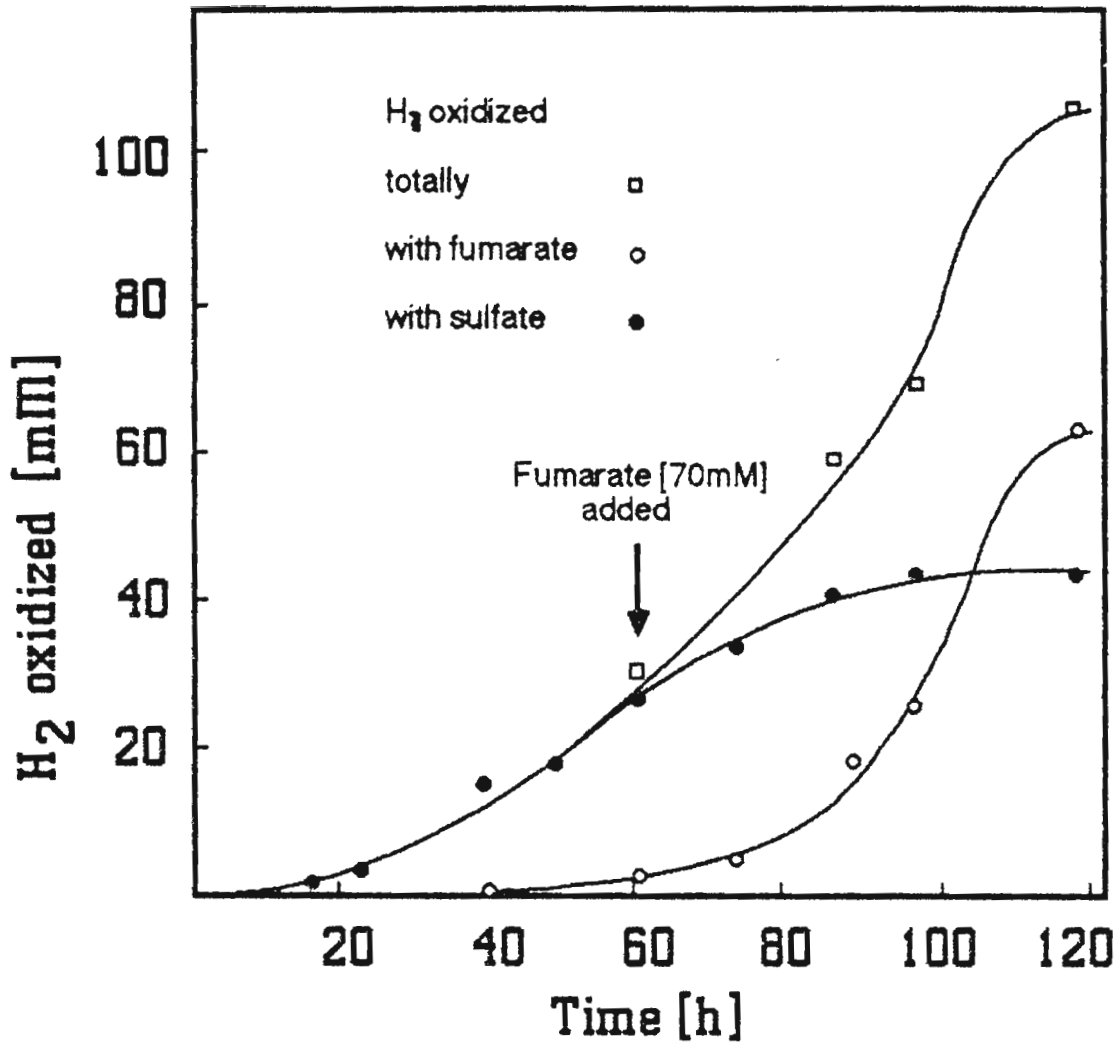


Fig. 3: Effect of fumarate [70mM] addition (marked by arrow) to a culture of *Desulfovibrio fructosovorans* growing on H₂ plus sulfate.

reduced during fumarate oxidation to acetate.

Similar results were observed with *Desulfovibrio vulgaris* strain Essex which prefers nitrate to sulfate as electron acceptor when growing under H₂ limiting conditions. (Seitz & Cypionka 1986). Under saturating conditions of H₂ (see above), however, the addition of nitrate to a sulfate reducing culture did not significantly influence the metabolism of *D. desulfuricans*.

Discussion

Our results show that two bacterial species could compete in coculture for an organic substrate although one of them was unable to utilize the substrate in pure culture. This is most probably due to the fact that small amounts of H_2 are produced during the degradation of the substrate by the first species and that both species compete for the excreted H_2 . This results in an interspecies H_2 transfer as soon as the second bacterium has a similar or higher H_2 utilizing efficiency than the first one. The efficiency of transfer of reducing equivalents was paralleled by the efficiency to utilize H_2 down to low threshold concentrations and depended on the energetics of the H_2 -utilizing reaction. Hence, electron acceptors with increasing redox potentials resulted in decreasing H_2 thresholds and increasing H_2 transfer to those bacterial species which were able to utilize the energetically more favourable electron acceptor. This interspecies communication via H_2 appears to be independent on the H_2 producing reaction, as similar results were obtained with methanol, lactate and fructose as organic substrates. These substrates are distinguished by the Gibbs free energy and thus by the ease of H_2 liberation during substrate degradation.

It is known from the literature that the degradation of a substrate can be accomplished in syntrophy by one bacterium oxidizing the substrate by reducing protons and the other bacterium oxidizing H_2 by reducing a suitable electron acceptor (McInerney & Bryant 1980, Wolin 1982, Mah 1982, Schink 1987). Recently it has been shown that methanol utilizing

homoacetogens completely transferred the reducing equivalents generated during substrate oxidation to H_2 -utilizing sulfate reducers (●Cord-Ruwisch & Ollivier 1986, Heijthuisen & Hansen 1986). The interspecies H_2 -transfer took place although the homoacetogen was not able to conserve energy for growth during oxidation of methanol. Interspecies H_2 -transfer was even observed in cocultures of sulfate-reducing *Desulfovibrio* with the acetate utilizing *Methanosarcina* as H_2 donor (●Phelps et al. 1985). *Methanosarcina* apparently produced less CH_4 from the methyl group of acetate when an H_2 -accepting bacterium was present that was able to "pull" reducing equivalents by energetically favourable H_2 -uptake reaction. In this case the two electron acceptors in competition for reducing equivalents were apparently the methyl group of acetate and sulfate (via proton reduction to H_2). Our results are in line with these observations, indicating that reducing equivalents are utilized by those metabolic reactions which allow the higher yield of energy.

Our results further indicate that H_2 -transfer may be brought about by reaching a lower H_2 -threshold concentration when the H_2 -utilizing reaction is thermodynamically more efficient. This supports our view (●Cord-Ruwisch et al. 1987) that facultatively hydrogenotrophic bacteria communicate by means of a particular range of H_2 concentration (● H_2 -buffer) that is maintained within the ecosystem as long as the availability of electron donors and acceptors is maintained, i.e., the thermodynamic conditions of H_2 utilization are constant.

The thermodynamic conditions do not only depend on the nature of the

redox couple but also on the concentrations of the electron donor H_2 and of the different electron acceptors. Hence, the low solubility of elemental S^0 as electron acceptor may explain why sulfur-reducing bacteria competed less efficiently with homoacetogenic and methanogenic bacteria for reducing equivalents, so that the latter species were able to pull 60-80 % of the reducing equivalents from sulfur-reducing but not from sulfate-reducing *Desulfovibrio*. Similarly, the fermentative disproportionation of fructose by *Desulfovibrio fructosovorans* was partially replaced by reduction of external sulfur or sulfate, or by transfer to H_2 -utilizing homoacetogens and methanogens, although the reduction of intracellularly generated fumarate to succinate should be energetically more favorable. The intracellular fumarate concentrations were most probably too low to compete for reducing equivalents with the high concentrations of external electron acceptors. This is in accordance with the observation that fumarate was used in addition to sulfate as electron acceptor when the electron donor H_2 was saturating, but were used instead of sulfate, when H_2 concentrations were low.

Nitrate is used as electron acceptor for respiratory nitrate ammonification by *Wolinella succinogenes* (●Bokranz et al. 1983) and *Desulfovibrio desulfuricans* (●Seitz & Cypionka 1986). Both bacteria showed the highest efficiency to use low concentrations of H_2 and to pull reducing equivalents from other facultative hydrogenotrophic bacteria in the presence of an organic electron donor. Even sulfate reduction was partially outcompeted by nitrate ammonification. It has earlier been shown that sulfate reduction in sediments may be inhibited upon addition

of nitrate. This effect has been explained by the toxicity of eventually produced intermediates (nitrite) (●Hukelikian 1943, Jenneman et al. 1986). However, the inhibitory effect of nitrate may as well be explained by successful competition for H_2 as important intermediate of organic matter degradation similar as the inhibitory effect of sulfate on methane production was explained (●Winfrey & Zeikus 1977, Abram & Nedwell 1978a Kristianssen et al. 1982).

Our results confirm the general validity of the concept that H_2 -consuming reactions with better energetics dominate in mixed cultures and presumably also in the environment. Our results further indicate that the level of the H_2 threshold concentration apparently is not limited by the first step, the oxidation of H_2 catalized by hydrogenases but by the redox potential of the terminal electron acceptor. Whereas H_2 -threshold concentrations were markedly different for different electron acceptors, they appear rather similar for the same electron acceptor even if different bacterial strains with different hydrogenases and other enzyme activities were tested.

It is unknown, whether the terminal electron acceptor may affect the kinetic properties (K_m , μ_{max}) of the H_2 consumption reaction. It has been calculated that the rate of organic substrate degradation in H_2 -syntrophic cocultures is dependent on the efficiency of the H_2 consumer to use low concentrations of H_2 (●Powell 1984, 1985, Archer & Powell 1985). In light of these calculations our observations suggest that the terminal electron acceptor may be the limiting factor for the rate of substrate

degradation. This is in accordance with the observation that syntrophic cocultures grow more rapidly with sulfate reducers than with methanogens as H₂ scavengers (Boone & Bryant 1980, Mountfort & Bryant 1982, McInerney et al. 1981). The relation of rates of substrate degradation to the presence of different electron acceptors and for different H₂ scavenging bacteria is presently studied in our laboratory.

References

- Abram JW, Nedwell DB (1978 a) Inhibition of methanogenesis by sulfate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. Arch Microbiol 117: 89-92
- Abram JW, Nedwell DB (1978 b) Hydrogen as a substrate for methanogenesis and sulfate reduction in anaerobic saltmarsh sediment. Arch Microbiol 117: 93-97
-
- Archer DB, Powell GE (1985) Dependence of the specific growth rate of methanogenic mutualistic cocultures on the methanogen. Arch Microbiol 141: 133-137
- Bache R, Pfennig N (1981) Selective Isolation *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. Arch Microbiol 130: 255-261
- Bokranz M, Katz J, Schröder J, Robertson AM, Kröger A (1983) Energy metabolism and biosynthesis of *Vibrio succinogenes* growing with nitrate or nitrite as terminal electrons acceptor. Arch Microbiol 135: 36-4
- Boone DR, Menaia JAGF, Mah RA (1987) Effects of hydrogen pressure during growth and effects of pregrowth with hydrogen on acetate degradation by *Methanosarcina* species. Appl Environ Microbiol 53: 83-87
- Boone DR, Bryant MP (1980) Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. Nov., from methanogenic ecosystems. Appl Environ Microbiol 40: 626-632.
- Bryant MP, Campbell LL, Rddy CA, Crabill MR (1977) Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with hydrogen utilizing methanogenic bacteria. Appl Environ Microbiol 33: 1162-1169

- Bryant MP (1979) Microbial methane production- theoretical aspects. *J Animal Sci* 48:193-201
- Conrad R, Phelps TJ Zeikus JG (1985) Gas metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. *Appl Environ Microbiol* 50: 595-601
- Conrad R, Schink B, Phelps TJ (1986) Thermodynamics of H₂-consuming and H₂-producing metabolic reactions in diverse methanogenic environments under in situ conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 38: 353-360
- 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.
- Cord-Ruwisch R, Olivier B (1986) Interspecific hydrogen transfer during methanol degradation between *Sporomusa acidovorans* and hydrogenophilic anaerobes. *Arch Microbiol* 144: 163-165
- Cord-Ruwisch R, Ollivier B, Garcia J-L (1986) Fructose degradation by *Desulfovibrio* sp. in pure culture and in coculture with *Methanospirillum hungatei*. *Current Microbiol.* 13: 285-289.
- Cord-Ruwisch R (1986) Facultative and partial interspecies hydrogen transfer- competition for reducing equivalents. In: Dubourguier et al. (eds.) *Biology of anaerobic bacteria*, Elsevier, Amsterdam
- Cord-Ruwisch R, Rousset M, Conrad R (1987) Maintenance of an external H₂-pool during organic substrate degradation by facultatively hydrogenophilic homoacetogens, methanogens and sulfidogens. Manuscript in preparation
- Grbic-Galic D (1985) Fermentative and oxidative transformation of ferulate by fermentatively anaerobic bacteria isolated from sewage sludge. *Appl Environ Microbiol* 50: 1052-1057

- Hatchikian EC, Chaigneau M, LeGall (1976): Analysis of gas production by growing cultures of three species of sulfate-reducing bacteria. In Schlegel HG, Gottschalk G, Pfennig N (eds.): "Microbial production and utilization of gases." Göttingen: Erich Goltze, pp 109-118.
- Heijthuisen JHFG, Hansen TA (1986) Interspecies hydrogen transfer in co-cultures of methanol utilizing acidogens and sulfate-reducing or methanogenic bacteria. FEMS Microbiol Ecol 38: 57-62
- Hukelikian H (1943) Effects of the addition of sodium nitrate on sewage hydrogen sulfide production and BOD Reduction. Sewage Works J 15: 255-259
-
- Hungate RE (1967) Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. Arch Mikrobiol 59: 158-164
- Jenneman GE, McInerney, Knapp RM (1986) Effect of nitrate on biogenic sulfide production. Appl Environ Microbiol 51: 1205-1211
- Kristiansson JK, Schönheit P, Thauer RK (1982) Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. Arch Microbiol 131: 278-282
- Krzycki JA, Morgan JB, Conrad R, Zeikus JG (1987) Hydrogen metabolism during methanogenesis from acetate by *Methanosarcina barkeri*. FEMS Microbiol Lett 40: 1193-1198
- Lovley DR, Dwyer DF, Klug MJ (1982) Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. Appl Environ Microbiol 43: 1373-1379
- Lovley DR, Ferry JG (1985) Production and consumption of H_2 during growth of *Methanosarcina* spp. on acetate. Appl Environ Microbiol 49: 247-249

- Lovley DR, Klug MJ (1983) Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Appl Environ Microbiol* 45: 187-192
- Lovley DR (1985) Minimum threshold for hydrogen metabolism in methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 49: 1530-1531
- Lupton FS, Zeikus JG (1984) Physiological basis for sulfate-dependent hydrogen competition between sulfidogens and methanogens. *Current Microbiol* 11: 7-12
- Lupton FS, Conrad R, Zeikus JG (1984) Physiological function of hydrogen metabolism during growth of sulfidogenic bacteria on organic substrates. *J Bact* 159: 843-849
- Mah RA (1982) Methanogenesis and methanogenic partnerships. *Phil Trans R Soc Lond B* 297: 599-616
- McInerney MJ, Bryant MP (1981) Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of H₂ on acetate degradation. *Appl Environ Microbiol* 41:346-354
- McInerney MJ, Bryant MP (1980) Review of methane fermentation fundamentals. In: Wise DL (ed) *Fuel gas production from biomass*. Chemical Rubber Co. Press, Inc., West Palm Beach, pp 20-46
- McInerney MJ, Bryant MP, Hespell RB, Costerton JW (1981) *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 41: 1029-1039
- Mountfort DO, Bryant MP (1982) Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate degrading bacterium from sewage sludge. *Arch Microbiol* 133: 249-256
- Novelli PC, Scranton MI, Michener RH (1987) Hydrogen distributions in marine sediments. *Limnol Oceanogr*, in press.

- O'Brien JM, Wolkin RH, Moench TT, Morgan JB, Zeikus JG (1984) Association of hydrogen metabolism with unitrophic or mixotrophic growth of *Methanosarcina barkeri* on carbon monoxide. *J Bact* 158: 373-375
- Powell GE (1985) Stable Coexistence of syntrophic associations in continuous culture. *J Chem Tech Biotechnol* 35B: 46-50
- Powell GE (1984) Equalisation of specific growth rates for syntrophic associations in batch culture. *J Chem Tech Biotechnol* 34B: 97-100
- Phelps TJ, Conrad R, Zeikus JG (1985) Sulfate-dependent interspecies H₂ transfer between *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio vulgaris* during coculture metabolism of acetate or methanol. *Appl Environ Microbiol* 50: 589-594
- Robinson JA, Tiedje JM (1984) Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H₂ under resting and growing conditions. *Arch Microbiol* 137: 26-32
- Robinson JA, Strayer RF, Tiedje JM (1981) Method for measuring dissolved hydrogen in anaerobic ecosystems: application to the rumen. *Appl Environ Microbiol* 41: 545-548
- Schink B (1987) Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects. In: Zehnder AJB (ed) *Environmental Microbiology of Anaerobes*. Wiley, New York, in press
- Seiler W (1978) The influence of the biosphere on the atmospheric CO and H₂ cycles. In: Krumbein WE (ed) *Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology*, vol 3. Ann Arbor Science Publ, Ann Arbor, MI, pp. 773-810
- Seiler W, Glehl H, Roggendorf P (1980) Detection of carbon monoxide and hydrogen by conversion of mercury oxide to mercury vapor. *Atmos Technol* 12: 40-45

- Seltz H-J, Cyplonka H (1986) Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* with hydrogen coupled to ammonification of nitrate or nitrite. Arch Microbiol 146: 63-67
- Strayer RF, Tiedje JM (1978) Kinetic parameters of the conversion of methane precursors to methane in hypereutrophic lake sediment. Appl Environ Microbiol 36: 330-340
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol Rev 41: 100-180
- Traoré SA, Fardeau M-L, Hatchikian CF, Le Gall J, Belaich J-P (1983 a) Energetics of growth of a defined mixed culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: interspecies hydrogen transfer in batch and continuous cultures. Appl Environ Microbiol 46: 1152-1156
- Traoré SA, Gaudin C, Hatschikian CE, Le Gall J, Belaich J-P (1983 b) Energetics of growth of a defined mixed culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: Maintenance Energy coefficient of the sulfate-reducing organism in the absence and presence of its partner. J Bacteriol 155: 1260-1264
- Traoré SA, Hatschikian EC, Belaich JP, LeGall J (1981): Microcalorimetric studies of the growth of sulfate-reducing bacteria. Energetics of *D. vulgaris* growth. J Bacteriol 45:191-199.
- Tschech A, Pfennig N (1984) Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. Arch Microbiol 137: 163-167
- Tsuji K, Yagi T (1980) Significance of hydrogen burst from growing cultures of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki and the role of hydrogenase and cytochrome c_3^- in energy producing system. Arch Mikrobiol 125: 35-42
- Tseng SF, Bryant MP, Wolfe RS (1975) Factor 420-dependent pyridine nucleotide-linked formate metabolism of *Methanobacterium ruminantium*. J Bact 121: 192-196

- Ward DM, Winfrey MR (1986) Interactions between methanogenic and sulfate-reducing bacteria in sediments. *Adv Aquat Microbiol* 3: 141-179
- Widdel F, Pfennig N (1984) Dissimilatory sulfate- or sulfur- reducing bacteria. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Baltimore/London: Williams & Wilkins, pp 663-679
- Winfrey MR, Zeikus JG (1977) Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol* 33: 275-281
- Wolin MJ (1982) Hydrogen transfer in microbial communities. In: (Bull AT, Slater JH, (eds) *Microbial Interactions and Communities*. Acad Press, London, pp. 475-543
- Zehnder AJB (1978) Ecology of methane formation. *Water pollution Microbiol* 2: 349-376

4.2 Effet de l'accepteur terminal d'électrons sur le taux de croissance d'une syntrophie

L'article 6 a montré que la variation d'énergie libre de la réaction d'oxydation de l' H_2 est responsable de la capacité d'une bactérie à oxyder les traces d' H_2 jusqu'à un certain seuil. Pour situer la valeur du seuil de la dégradation d' H_2 par rapport aux paramètres cinétiques (v_{max} , k_m), une modification du diagramme classique de Michaelis-Menten est nécessaire (Fig. 22)

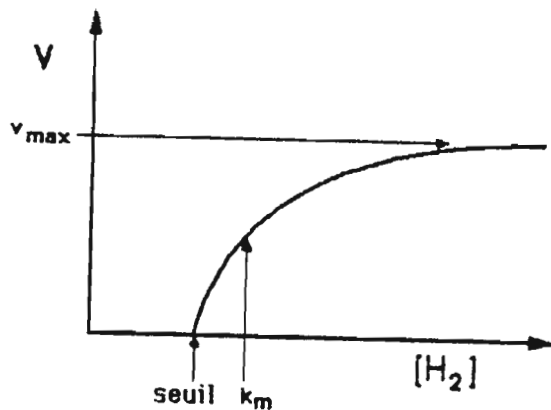


Fig.22
Situation du seuil de dégradation de l'hydrogène
par rapport aux paramètres classiques de cinétique.

C'est surtout la vitesse de dégradation de l' H_2 en faible concentration qui est déterminante pour les processus de dégradation de la matière organique et de corrosion du fer (cf. ci-dessous). Or cette notion de vitesse ne relève plus de la thermodynamique mais de la cinétique. Cependant, il est intéressant de savoir si la variation d'énergie libre d'une réaction au

cours de laquelle H_2 intervient comme un intermédiaire, peut influencer la vitesse de cette réaction.

La vitesse de dégradation d'un substrat organique par une coculture réalisant un TIH obligatoire est en général proportionnelle au taux de croissance de cette coculture. En outre, le taux de croissance des deux partenaires d'une syntrophie à l'équilibre sont forcément identiques (Powell 1984). Si l'on considère qu'en culture pure, les taux de croissance théoriques du donneur et de l'accepteur d' H_2 dépendent de la concentration en H_2 (Fig. 23 et 24),

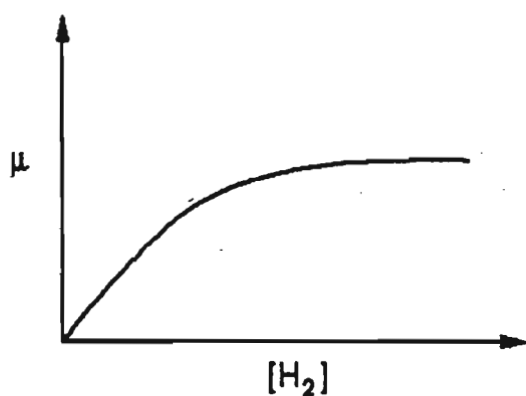


Fig. 23
Effet théorique de la concentration de l'hydrogène sur le taux de croissance d'une bactérie oxydant l'hydrogène.

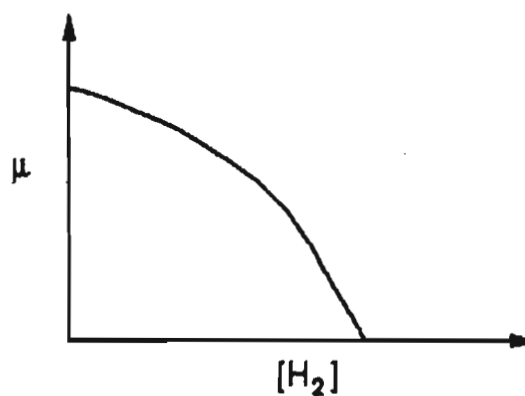


Fig. 24
Effet théorique de la concentration de l'hydrogène sur le taux de croissance d'une bactérie produisant de l'hydrogène. (Selon Archer et Powell 1985)

on peut également calculer le taux de croissance de la coculture réunissant ces deux organismes et réalisant le TIH (Powell 1984, Archer et Powell 1985). Les résultats de ce calcul sont schématisés sur la Figure 25. Cette figure montre que la vitesse de dégradation d'un substrat organique, au cours de laquelle H_2 est produit obligatoirement à partir du NADH (syntrophie), dépend de la concentration ambiante d' H_2 . Pour cette

raison, le taux de croissance d'une syntrophie est donc fonction de la concentration en H_2 effectivement mesurable dans la culture et c'est le consommateur d' H_2 le plus apte à utiliser de faibles pressions partielles d' H_2 qui déterminera la vitesse de croissance de la syntrophie (Powell 1984,1985, Archer et Powell 1985).

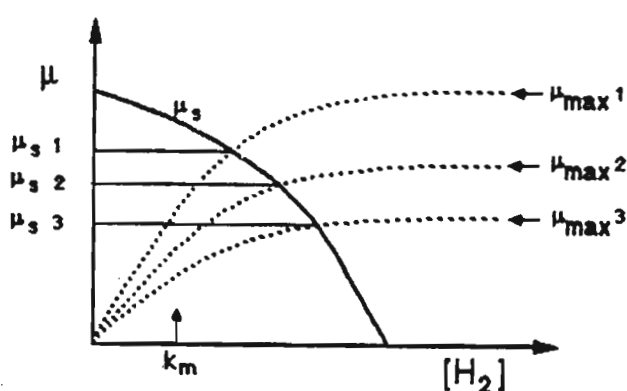


Fig. 25
Taux de croissance μ_s théorique (d'après Archer et Powell 1985) d'une coculture syntrophique en fonction de la concentration d'hydrogène. Exemple de 3 bactéries consommatrices d'hydrogène qui ont un k_m similaire mais un v_{max} différent.

Pour vérifier si les bactéries hydrogénophiles utilisant un accepteur d'électrons énergétiquement favorable sont également capables en coculture, de maintenir de faibles concentrations en H_2 et de ce fait d'accélérer le taux de croissance de la coculture, nous avons couplé une bactérie syntrophique avec des bactéries consommatrices d' H_2 utilisant différents accepteurs d'électrons.

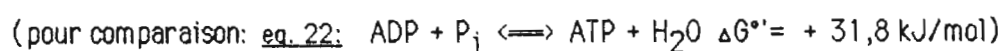
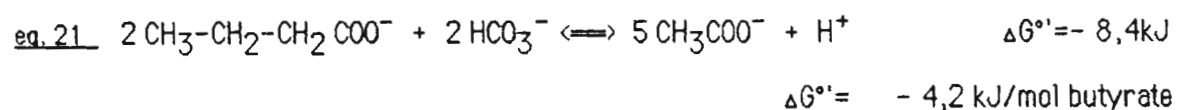
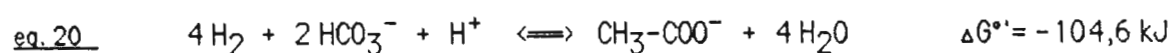
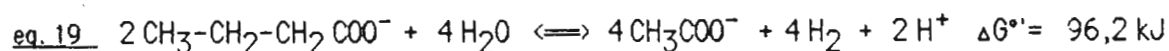
En utilisant *Clostridium bryantii* comme donneur d' H_2 , une croissance a été observée uniquement dans le cas d'une coculture avec une bactérie méthanogène ou avec une bactérie sulfato-réductrice (Tab.6). C'est probablement pour des raisons thermodynamiques que la coculture de

Tab. 6.

Coculture sur butyrate (10mM) de *Clostridium bryantii* et de bactéries consommatrices d'hydrogène utilisant différents accepteurs d'électrons.

bactérie oxydant l'H ₂	accepteur d'électrons	temps de génération [h]
<i>Acetobacterium woodii</i>	CO ₂ / acétate	0
<i>Methanospirillum hungatei</i>	CO ₂ / CH ₄	125
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> G6	SO ₄ ²⁻	86
<i>Wolinella succinogenes</i>	fumarate	0
"	Nitrate	0

Clostridium bryantii / *Acetobacterium woodii* n'a pas démarré.



Par contre, il est plus difficile d'expliquer pourquoi *Clostridium bryantii*, ne s'est pas développé en présence de bactéries consommatrices d' H_2 réduisant le nitrate ou le fumarate. La concentration en H_2 dans le milieu est très faible dans ces deux cas (Tab. 6). Par conséquent, il est possible qu'il n'y ait pas eu maintien d'une concentration suffisante en NAD(P)H réduit (Fig. 17) nécessaire à l'assimilation (par ex. glyconéogénèse) et donc à la croissance de *Clostridium bryantii*.

Les résultats obtenus avec *Acidominobacter hydrogeniformans*, en tant que donneur d' H_2 (Tab.7) correspondent à la théorie d'Archer et Powell (1985) et sont également en accord avec les résultats présentés dans l'article 6 : dans les cocultures, le potentiel de l'accepteur terminal d'électrons testé, détermine la concentration en H_2 résiduelle mesurable et donc la vitesse globale de croissance de la coculture. En s'inspirant du schéma théorique d'Archer et Powell (1985), il est donc possible de représenter, de manière empirique, sous forme de diagramme, le taux de croissance de la coculture

Tab. 7.

Acidaminobacter hydrogenoformans dégradant l'alanine (20mM) en coculture avec différentes souches acceptrices d'H₂.

Souche consom- -matrice d'H ₂	accepteur terminal d'e ⁻	taux de croissance* [h ⁻¹]	concentration ** d'H ₂ [ppm]
sans	H ⁺	0.0	18 000
A. woodii	CO ₂	0.016	3 000
M.hungatei	CO ₂	0.021	500
D.fructosovorans	SO ₄ ²⁻	0.018	n.d.
D.desulfuricans	SO ₄ ²⁻	0.024	180
D.desulfuricans	NO ₃ ⁻	0.036	12

n.d.= non déterminé

* La croissance de la coculture est faible (Densité optique maximale autour de 0,12). Cependant la tendance générale des taux de croissance à augmenter en fonction du potentiel des accepteurs d'électrons, est reproductible.

**Les valeurs représentent la moyenne de la [H₂] mesurée quand la coculture était en équilibre (phase exponentielle de croissance).

en fonction de la concentration en H_2 détectable dans le milieu (Fig. 26 et 27).

En fonction de ces résultats et des valeurs de seuil d' H_2 mises en évidence dans l'article 6, il semble nécessaire de modifier le schéma théorique (Fig. 25) proposé par Archer et Powell (1985). En effet, c'est le seuil d'oxydation de l' H_2 et non la vitesse maximale de sa dégradation qui semble déterminer le taux de croissance d'une culture syntrophique (Fig. 28).

Conclusion : Ces expériences de coculture, en liaison avec les résultats obtenus dans l'article 6, ont montré que la variation d'énergie libre d'une réaction peut également déterminer indirectement (via le seuil de concentration en H_2) la vitesse de cette réaction. Comme la $[H_2]$ paraît être en équilibre avec les transporteurs d'électrons (Fig.17) le seuil de la $[H_2]$ oxydable correspond à un certain rapport de transporteurs d'électrons réduits/ transporteurs oxydés. Le seuil de $[H_2]$ pourrait donc être considéré comme un seuil de ce rapport.

4.3 Influence du nombre de bactéries oxydant H_2 sur le taux de croissance d'une bactérie syntrophique

Plus une réaction est thermodynamiquement favorable, plus elle peut théoriquement permettre un gain d'ATP et donc une production de biomasse importante. Cette équivalence permet d'envisager l'obtention d'une biomasse en cellules hydrogénéphiles d'autant plus importante que

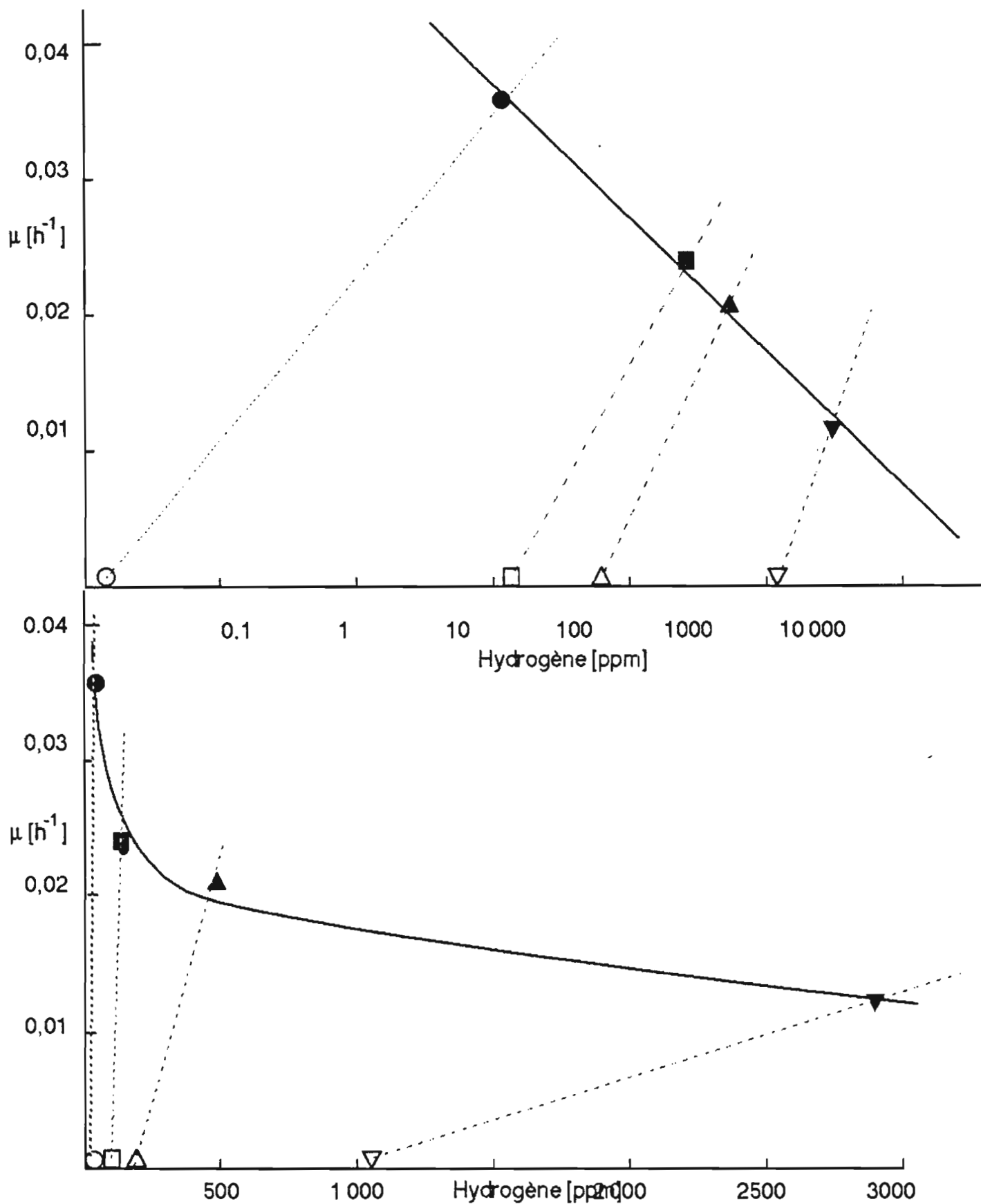


Fig. 26 (haut) et 27 (bas)

Dépendance du taux de croissance de la bactériesyntrophe *Acidaminobacter hydrogenoformans* sur alanine [20mM] en fonction de la concentration de l'hydrogène maintenue à un certain niveau par l'activité de plusieurs bactéries hydrogénéophiles: O = *Desulfovibrio desulfuricans* Essex avec nitrate, □ = *D. desulfuricans* Essex avec sulfate, Δ = *Methanospirillum hungatei*, ▽ = *Acetobacterium woodii*

Symboles fermés = Concentration d'hydrogène pendant la croissance

Symboles ouverts = Concentration d'hydrogène limite (seuil) pour l'accepteur d'hydrogène

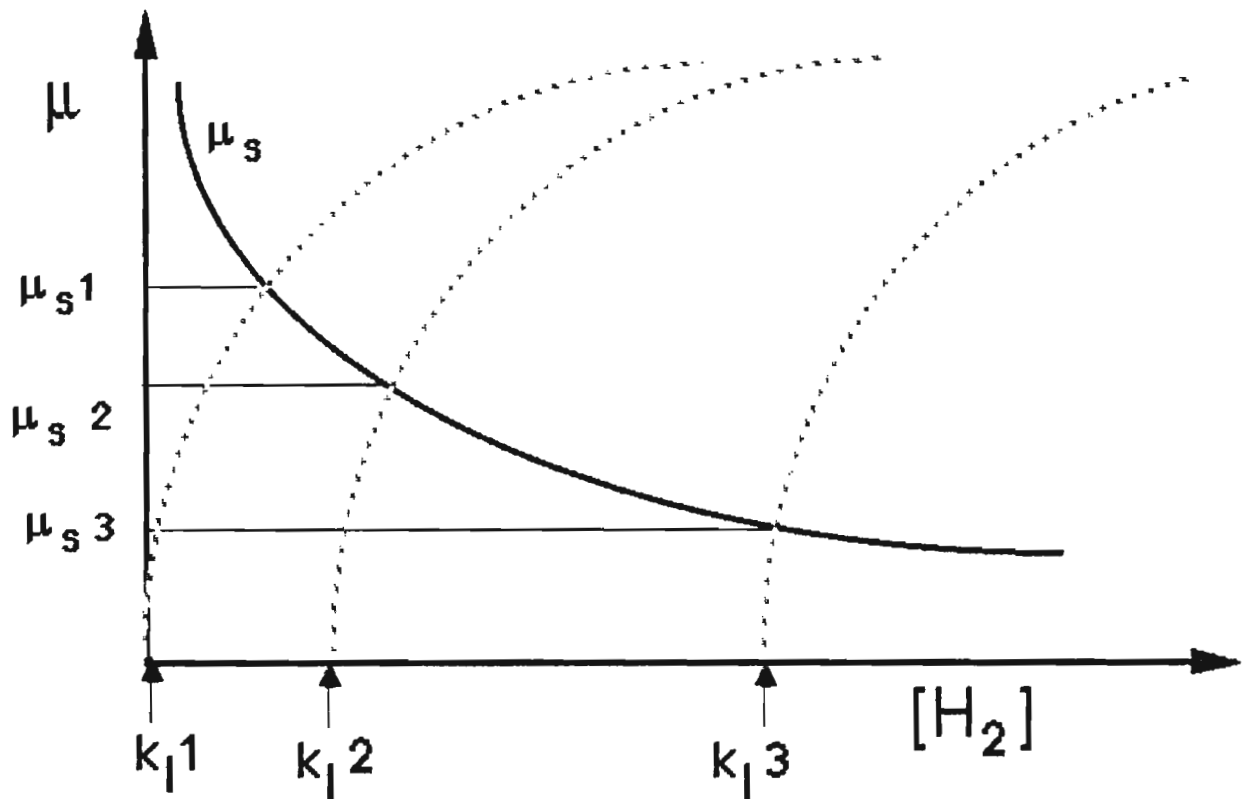


Fig. 28

Taux de croissance μ_s d'une coculture syntrophique en fonction de la concentration de l'hydrogène. Exemple de 3 bactéries consommatrices d'hydrogène qui ont un v_{max} similiaire mais un $k_I =$ Konstante (thermodynamique) de la concentration limite (seuil) different.

l'accepteur d'électrons utilisé par la souche est thermodynamiquement favorable. En fait l'utilisation d'un accepteur d'électrons constitué d'un couple thermodynamiquement favorable, peut augmenter la biomasse d'une bactérie oxydant l' H_2 (Tschech et Pfennig 1984, Seitz et Cypionka 1986). Or, la biomasse bactérienne est directement liée à la concentration en enzymes et donc en ce qui nous concerne ici, en enzymes catalysant l'oxydation de l' H_2 . Par conséquent en augmentant la densité de la bactérie acceptrice d' H_2 , il est théoriquement possible d'accroître la vitesse d'oxydation de l' H_2 et donc le taux de croissance de la culture syntrophique. Afin de vérifier cette relation, nous avons suivi, en l'absence de sulfate, la dégradation du lactate par *D. fructosovorans* en coculture avec *Methanospirillum* en faisant varier la concentration en cellules hydrogénéophiles présentes au départ (Tab. 8). Les résultats prouvent que, dans une syntrophie, le nombre de cellules hydrogénéophiles présentes dans la culture influe effectivement sur la concentration en H_2 détectable dans le milieu et, également, selon l'idée d'Archer et Powell, sur le taux de croissance de la bactérie syntrophique.

Conclusion: la variation d'énergie libre fournie par la réaction d'oxydation de l' H_2 influe sur le taux de croissance d'une coculture bactérienne réalisant un TIH. Ceci est dû à la capacité de la bactérie hydrogénéophile à maintenir des pressions partielles en H_2 à un niveau très bas. Cette capacité dépend de son seuil d'utilisation limite de l' H_2 et à un degré moindre, de son rendement de croissance par mole d' H_2 oxydée.

4.4 Relation théorique entre la variation d'énergie libre et la vitesse d'une réaction

D'une manière générale, on pourrait croire que les réactions très exergoniques se déroulent plus vite que les réactions faiblement exergoniques, ce qui n'est cependant pas toujours le cas. En effet, la variation d'énergie libre d'une réaction (ΔG°), indique si cette réaction est thermodynamiquement possible ou non, mais ne fournit aucun renseignement quant à la vitesse de cette réaction. La vitesse d'une réaction chimique est surtout un problème mécanistique et dépend plutôt de l'énergie d'activation (ΔG^{\ddagger} , Fig. 29) de la réaction.

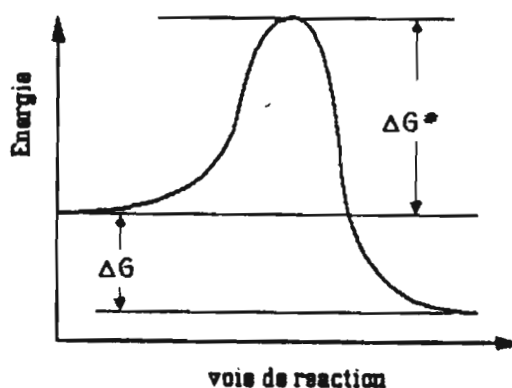


Fig.29
Niveau d'énergie en fonction de la voie
de réaction
 ΔG^{\ddagger} = Energie d'activation
 ΔG = Energie

Plus l'énergie d'activation d'une réaction exergonique est négligeable (comme par exemple dans le cas d'une catalyse maximale), plus la réaction se déroule rapidement. Une telle réaction se décompose en deux réactions partielles ayant chacune sa propre vitesse : La vitesse de la réaction initiale (v_{\rightarrow}) et de la réaction inverse (v_{\leftarrow}):

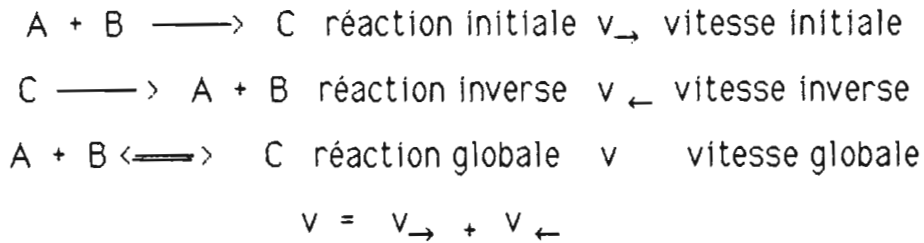
Tab. 8

Effet de l'ajout de *Methanospirillum hungatei* sur la vitesse de la dégradation du lactate [20mM]

Culture de <i>M. hungatei</i> [ml/ l] rajoutée à l'inoculum de <i>D. fructosovorans</i> / <i>M. hungatei</i>	rapport du nombre de cellules <i>M.hung./</i> <i>D.fructos.</i> [%] ¹	Hydrogène présent dans la coculture [ppm]	μ^2 [h ⁻¹]
0	10	670	0,014
250	13	530	0,016
380	16	390	0,019
500	19	370	0,029
630	25	250	0,037

1) Estimé à partir du nombre de cellules de la culture de *Methanospirillum hungatei* (9×10^7 cellules/ml) et de la coculture (3×10^8 et 3×10^7 cellules/ml, *D. fructosovorans* et *M. hungatei*, respectivement)

2) μ est calculé à partir de la vitesse de dégradation du lactate et représente le taux de croissance de *D. fructosovorans* mais pas le taux de croissance de la coculture, car *M. hungatei* ne se multiplie probablement pas.



Les vitesses de chacune des réactions partielles, dépendent de la concentration en réactifs. La vitesse de la réaction globale dépend donc des concentrations en réactifs et en produits. En conséquence, la vitesse d'une réaction de type $A + B \rightleftharpoons C$ diminue progressivement jusqu'à ce que la vitesse de la réaction initiale devienne égale à la vitesse de la réaction inverse. La réaction est alors en équilibre dynamique et la variation d'énergie libre est égale à 0. La progression classique d'une telle réaction est présentée sur la figure 30 et est similaire à celle obtenue avec une culture bactérienne dégradant l' H_2 (Fig. 31).

Au cours de la réaction, les concentrations en réactifs et en produits sont à chaque instant, fonction de :

1. la valeur $\Delta G'$ de la réaction: eq. 23 $\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + 2,3 RT \log \frac{[C]}{[A][B]}$

2. la vitesse de la réaction: $v = v_{\rightarrow} + v_{\leftarrow}$

eq. 24 $v_{\rightarrow} = - \frac{d[A]}{dt} = k_1 [A][B]$ eq. 25 $v_{\leftarrow} = - \frac{d[C]}{dt} = k_2 [C]$

eq. 26 $v = k_1 [A][B] + k_2 [C]$

La vitesse de la réaction dépend donc à chaque instant, de la variation d'énergie libre de la réaction :

eq. 27

$$\Delta G^{**} = f(v)$$

$$\text{si: } v=0 \text{ donc } -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[C]}{dt} \quad \text{alors } G^{**} = 0$$

Si l'on suppose que la catalyse de la réaction d'oxydation de H_2 est presque maximale (en fait on ne connaît pas de catalyseur chimique de l'oxydation anaérobie de H_2 dans l'eau, aussi efficace que les bactéries qui réduisent le CO_2 , le SO_4^{--} ou le NO_3^-), on peut alors considérer que la concentration en H_2 non oxydé dépend de la concentration d'équilibre de la réaction ($\Delta G^{**} = 0$, et $v_{\rightarrow} = v_{\leftarrow}$). D'autre part, lorsque les concentrations en réactifs et en produits ne varient plus, même en présence d'un catalyseur efficace, cela indique que la réaction inverse intervient. En pratique, une catalyse maximale est improbable. De plus les réactions cataboliques (dissimilation) sont également liées, via les transporteurs d'électrons, aux réserves d'énergie (représentant un tampon d'équivalents réducteurs) et aux réactions anaboliques (assimilation). De ce fait, nous nous attendons seulement à une relation approximative entre la concentration d'équilibre et la concentration limite (seuil) de $d'H_2$ dans les cultures bactériennes. (comparer Fig. 1 avec Tab. 5 de l'article 6).

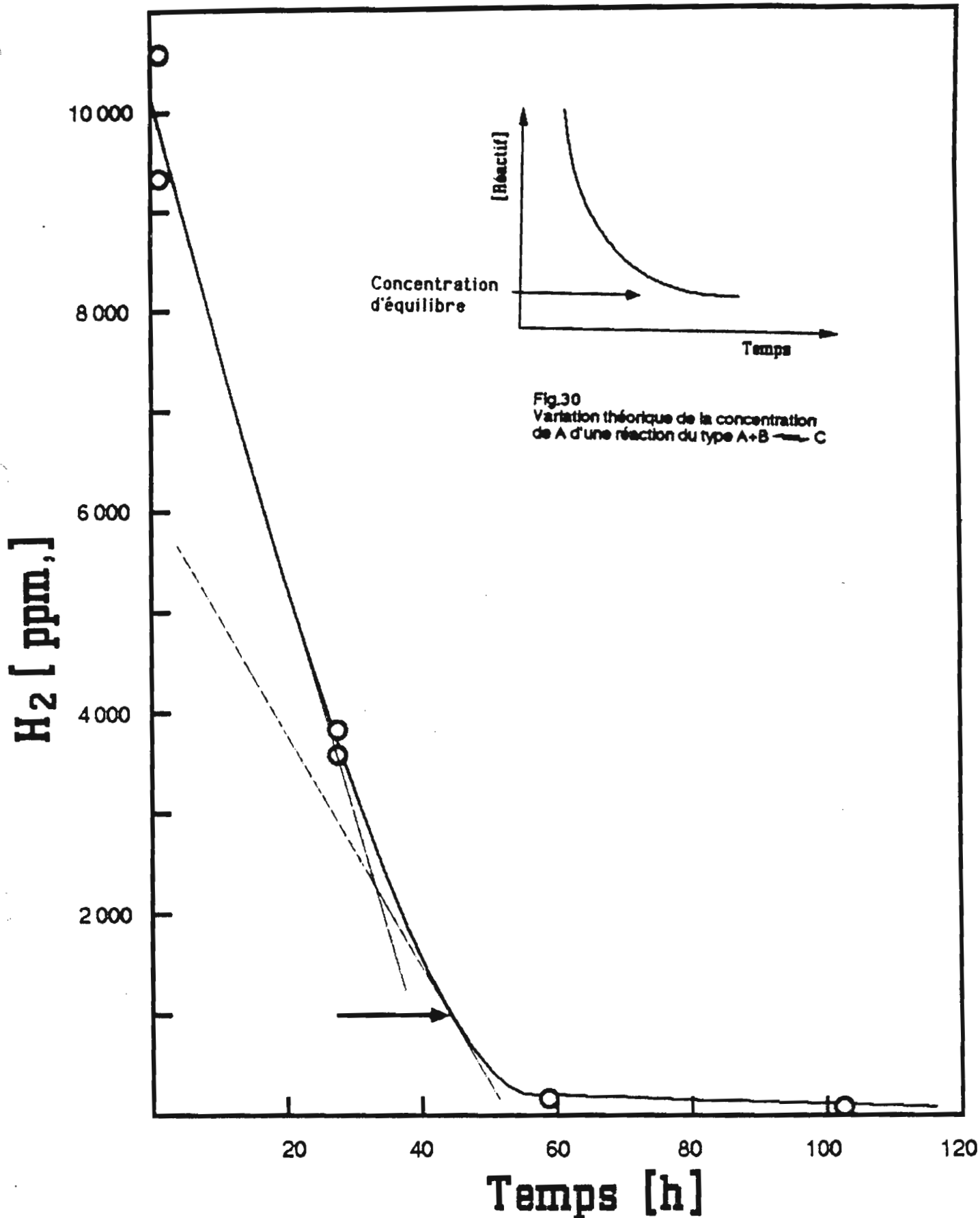


Fig.30
Variation théorique de la concentration
de A d'une réaction du type $A+B \rightleftharpoons C$

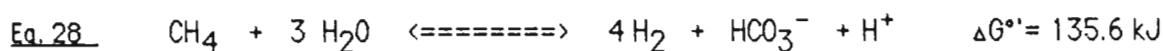
Fig. 31
Dégradation de l'hydrogène dissous par *Desulfovibrio desulfuricans* ESSEX avec sulfate dans un essai sans phase gazeuse (seringue en verre de 50 ml). Pour la mesure de l'hydrogène, 2 ml de laculture ont été prélevés et agités avec 2ml de N_2/CO_2 . L'hydrogène extrait de cette manière dans la phase gazeuse a été mesuré par chromatographie(c.f. article 6).

La valeur k_m peut être estimée à partir de la pente de la vitesse semi-maximale

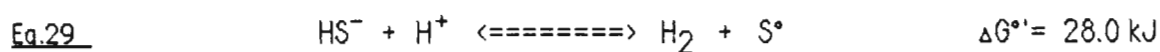
4.5 Influence possible des réactions inverses

4.5.1 Oxydation anaérobie du sulfure

Selon les réflexions ci-dessus, on peut supposer que l'oxydation de H_2 ralentit et puis s'arrête (seuil de $[H_2]$) à cause de la vitesse de la réaction inverse qui se rapproche de celle de la réaction initiale. Par exemple:



(devient exergonique à partir de 1 ppm H_2)



(devient exergonique à partir de 10 ppm H_2)

Dans le cas où la réaction est en équilibre dynamique, l'enlèvement d'un des réactifs permettrait théoriquement de déplacer la réaction vers la production de ce réactif. Les questions suivantes nous ont semblé intéressantes:

- 1 Certains composés organiques ou inorganiques réduits produisent-ils des $[H_2]$ mesurables ou biodégradables ?
- 2 La consommation de H_2 dans le cas où celle-ci est en équilibre avec un réducteur, peut-elle conduire à l'oxydation de ce réducteur ?

Pour répondre à la première question, la concentration en H_2 a été suivie après dissolution de plusieurs composés réduits dans de l'eau anoxique. (Tab. 10). Dans ce tableau la concentration en H_2 produite à partir de l' H_2S

Tab.10

Réduction des proton de l'eau par différents composés réduits.

Réducteur	H ₂ produit après 2jours [ppm]
Na ₂ S	170,0
TiCl ₃	9,5
VCl ₃	3,5
FeCl ₂	2,9
MnSO ₄	2,9
NaCl *	1,1
SnCl ₂	0,9

*Temoin

0,01 g de sel de chaque produit ont été mis dans des tubes de Hungate degazés avec N₂ (contenant à peu près 1 ppm de H₂). Ensuite 10 ml d'eau stérile anoxique ont été rajoutés. La phase gazeuse était d'environ à peu près 15ml.

est surprenante; elle est supposée avoir une signification écologique. Cependant il a été démontré après l'enlèvement de H_2 produit par la dissolution de Na_2S dans l'eau, que la valeur précédente obtenue pour l' H_2 n'a pas été reproduite (Fig. 32).

Afin de voir si l' H_2S dissout peut être généralement oxydé par les bactéries capables d'oxyder les traces d' H_2 inférieures à celles produites par l' H_2S , nous avons incubé ces bactéries en présence de sulfure comme source d'énergie (Tab. 11). Toutes les bactéries qui sont capables de diminuer la concentration en H_2 jusqu'à des valeurs inférieures à 1 ppm (article 6) sont aussi capables d'oxyder le sulfure (probablement en soufre). Cependant si la réduction du nitrate peut conduire à la formation de nitrite, un intermédiaire non stable et plus oxydé que le sulfure, il peut y avoir une oxydation du sulfure en S^0 par le nitrite. De toute façon en utilisant le test qualitatif de dosage du nitrite par le réactif de Griess-Illiosvay, nous n'avons pas détecté de production de nitrite chez les souches nitrato-réductrices de *Wolinella succinogenes* et *Desulfovibrio desulfuricans* Essex. Cependant la dégradation du sulfure par *Wolinella succinogenes* avec le fumarate comme accepteur d'électrons, ne peut s'expliquer que par une oxydation catalysée par l'activité de cette souche. Ce genre de métabolisme vient d'être également décrit (Macy et al 1986) pendant que, nous effectuons nos expériences. En raison de l'absence de données concernant les enzymes de l'oxydation du sulfure chez *Wolinella succinogenes* on ne peut pas à l'heure actuelle, exclure l'intervention de l' H_2 dans la dégradation anaérobie du sulfure. D'autres bactéries hydrogénophiles sont capables d'oxyder des composés soufrés réduits (Alfredsen et al. 1986, Bonjour et Aragno 1986, Zillig et al. 1987) et sont

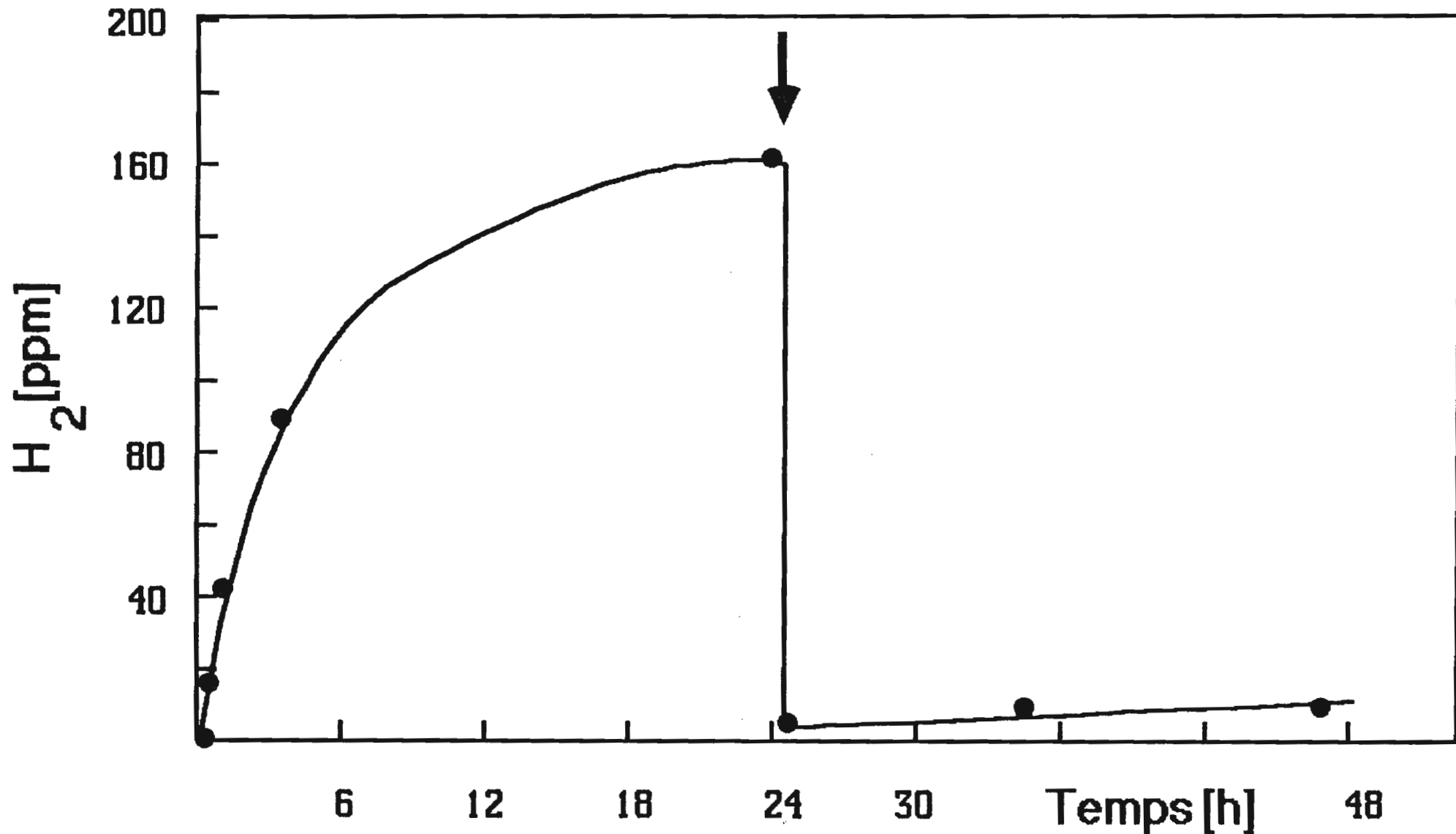


Fig. 32. Production chimique d'hydrogène après dissolution du $Na_2S \times 9 H_2O$. dans l'eau anoxique. ↓ = renouvellement de la phase gazeuse.

Tableau 11

Oxydation du sulfure présent comme seule source d'électrons (10mM) et comme cosubstrat (3mM) par les cultures bactériennes consommatrices d'H₂.

Souche	Accepteur d'électrons	Sulfure restant		
		comme seule source d'énergie		en addition avec un substrat organique
M. hungatei	CO ₂	10.3	2.6	Formiate 40
D.fructosovorans	Fumarate	10.0	2.8	Fumarate 20
D.desulfuricans	Fumarate	9.6	3.3	Fumarate 20
D.desulfuricans	Nitrate	9.9	0.0	Lactate 10
W. succinogenes	Fumarate	9.5	0.0	Formiate 20
W.succinogenes	Nitrate	10.2	0.0	Formiate 20
P. denitrificans	Nitrate	8.8	0.0	Acétate 5

Toutes les valeurs sont données en mM.

Le temps d'incubation a été de 20 jours, l'inoculum de 10%.

également susceptibles d'utiliser leur capacité à oxyder H_2 pendant l'oxydation de ces composés.

4.5.2 Essai de démonstration de la dégradation anaérobie du méthane.

Le méthane, très apolaire, est un composé relativement inerte dans l'eau. Cependant il a été récemment démontré que le méthane est apparemment dégradé, même dans les environnements anaérobies (Iversen et Jørgensen, 1985), au profit de la sulfatoréduction. Les seules bactéries anaérobies connues possédant les enzymes qui catalisent les réactions où le méthane intervient en tant que principal réactif, sont les bactéries méthanogènes elles-mêmes. Une oxydation nette du méthane par ces bactéries serait thermodynamiquement possible dans les biotopes où la $[H_2]$ est très faible (Tab. 12, Fig. 1). Si le seuil de dégradation de H_2 par les bactéries méthanogènes résulte de la réaction inverse non négligeable ($CH_4 + 2 H_2O \rightarrow 4 H_2 + CO_2$), l'enlèvement efficace de H_2 pourrait conduire de nouveau à une production de traces d' H_2 , et donc à un TIH à partir du CH_4 comme source d'électrons. Le tableau 13 et la figure 23 présentent les résultats obtenus avec les expériences respectives.

Des expériences plus détaillées (dépendance de la production de H_2 par *Methanospirillum hungatei*) ont confirmé qu'il n'y avait pas de relation entre la $[H_2]$ produite et la $[CH_4]$ présente. Même en l'absence de CH_4 , des traces de H_2 ont été produites par les cellules (resting cells) de *M. hungatei*. De plus, les cocultures de *M. hungatei* avec *W. succinogenes* avec

Tab. 12

Possibilité énergétique de la production d'H₂ par quelques réducteurs d'intérêt biologique.

Réaction productrice d' H ₂		ΔG' [kJ/mol H ₂] ¹⁾	H ₂ [atm.] ²⁾
SO ₃ ²⁻ + H ₂ O	<=> SO ₄ ²⁻ + H ₂	-20.9	10 ⁻²
HS ⁻ + SO ₃ ²⁻ + H ⁺	<=> S ₂ O ₃ ²⁻ + H ₂	+ 1.1	1
CH ₄ + 3 H ₂ O	<=> 4 H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺	+33.9	10 ⁻⁵
HS ⁻ + H ⁺	<=> H ₂ + S	+28.0	10 ⁻⁵
2 NH ₄ ⁺	<=> 3H ₂ + N ₂ + 2H ⁺	+26.7	10 ⁻⁶
S + 4 H ₂ O	<=> SO ₄ ²⁻ + 3 H ₂ + 2 H ⁺	+41.4	10 ⁻⁷
S + 3H ₂ O	<=> S ₂ O ₃ ²⁻ + 2H ₂ + 2 H ⁺	+59.2	10 ⁻¹⁰
Fe ²⁺ + 2 H ⁺	<=> Fe ³⁺ + H ₂	+74.3	10 ⁻¹²

1) calculé pour [HCO₃⁻] = 10 mM, des autres composés = 0.1 mM.

2) production d'H₂ théoriquement possible. Concentration d'équilibre pour ΔG' = 0.

Tab.13

Production d'H₂ par *Methanospirillum hungatei*, cultivé sur H₂/CO₂ (80/20) après remplacement de la phase gazeuse par N₂/CO₂ et (ou) CH₄.

Méthane introduit [%]	H ₂ [ppm] produit après		
	0h	8h	56h
0	2.7	6.8	17.5
10	n.d.	1.1	2.1
100	0.8	1.9	2.6
100*	n.d.	0.7	0.9

* Temoin = culture pasteurisée

50ml d'une culture de *M. hungatei* en phase exponentielle (D.O.=0.3) cultivé sur H₂/CO₂ ont été répartis dans 4 flacons sérum de ≈150ml puis agités et degazé rigoureusement pour enlever de l'H₂ dissous. Le méthane a été rajouté après le dégazage.

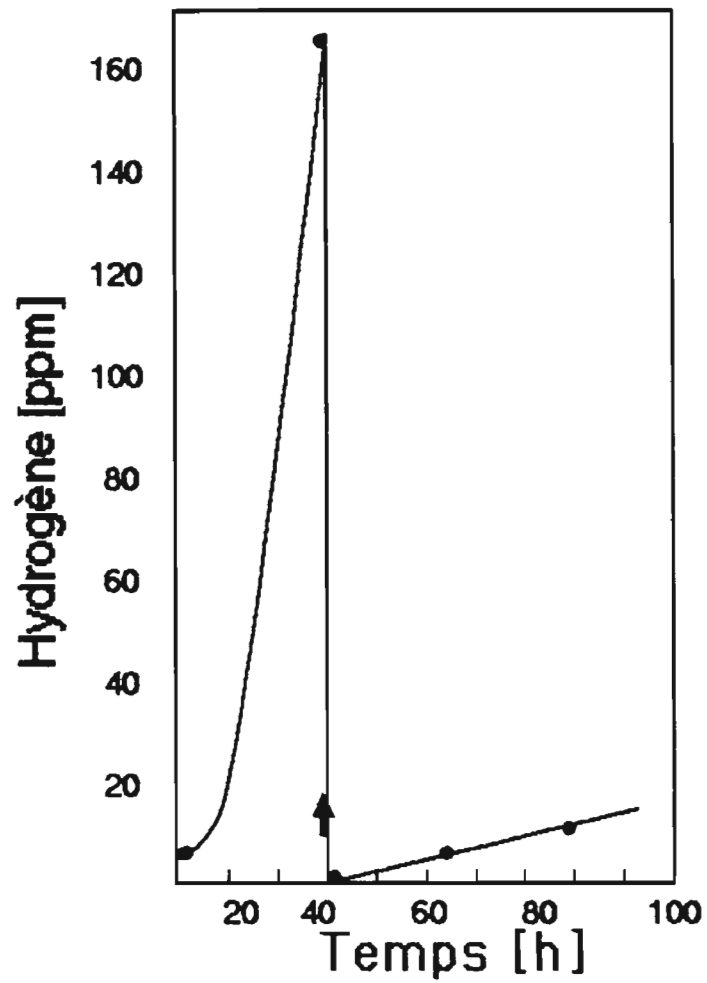


Fig 33 . Production d'hydrogène par *Methanospirillum hungatei* après addition du méthane [100 %] comme seul donneur externe d'électrons.

↑ = enlèvement de l'hydrogène par renouvellement de la phase gazeuse avec méthane pur.

CH₄ comme donneur d'électrons et NO₃⁻ comme accepteur d'électrons, n'ont pas présenté de métabolisme significatif (Tab. 14). La production de traces d'H₂ par *M. hungatei* en l'absence de substrat, dépendait probablement de réserves d'énergie qui ont permis la maintenance des transporteurs réduits en équilibre avec la concentration d'H₂ externe.

Tab. 14

Coculture de *Methanospirillum hungatei* et *Desulfovibrio desulfuricans* souche ESSEX avec méthane comme donneur d'électrons et nitrate comme accepteur d'électrons.

Méthane [mM]/ Ammonium [mM] apres incubation de

Essai	0 h	2 h	7 h	150 h
1	0.8 /4.7	0.6	0.7/4.9	0.7
2	5.4	4.8	4.0	4.0/4.9
3	10.3	9.7	9.2	8.6/4.8
4	17.5/4.7	14.3	13.1/4.8	11.8/4.8

La culture a été précultivée sur 20 mM lactate sans nitrate. Après que la D.O. ait atteint une valeur stable (9 jours), 10 mM nitrate et méthane ont été rajoutés.

- ligne 1 = Temoins sans méthane
ligne 2 = addition de méthane biologique provenant d'une culture de *M. hungatei*
ligne 3,4 = addition de méthane pur

5 Corrosion bactérienne du fer

5.1 Rôle des bactéries sulfato-réductrices dans la corrosion anaérobie du fer

Le transfert, sous forme d'hydrogène, des équivalents réducteurs, que nous avons évoqué jusqu'à maintenant, est souhaitable car il permet la dégradation anaérobie de la biomasse morte et joue un rôle écologique important dans la production de biogaz et le processus de digestion. Selon la théorie de von Wolzogen Kühr et van der Vlugt (1934), le fer élémentaire est également une source potentielle d' H_2 pour les BSR hydrogénophiles. Ce type de transfert d' H_2 , à l'inverse du précédent, est peu souhaitable économiquement car il conduit à l'oxydation (corrosion) du fer. L'article 7 présente le rôle économique joué par les BSR dans la production de pétrole avec une mention particulière concernant leur activité dans les processus de corrosion anaérobie. L'article 8 montre indirectement que ce transfert d'hydrogène, qui intervient au cours de l'oxydation du fer, aboutit à la réduction bactérienne du sulfate.

Sulfate-Reducing Bacteria and Their Activities in Oil Production

R. Cord-Ruwisch,* U. of Konstanz
W. Kleinitz, Preussag AG, Erdöl and Erdgas
F. Widdel,** U. of Konstanz

Summary. This paper presents an overview of the microbiology of sulfate-reducing bacteria (SRB) and their detrimental effects in oil technology and summarizes a study on SRB in an oil field.

SRB are a group of specialized microorganisms that occur in aqueous environments in the absence of oxygen. The main nutrients for SRB are simple organic acids and molecular hydrogen (H_2) from decomposing natural organic matter. The nutrients are oxidized, with sulfate being reduced to sulfide (hydrogen sulfide, H_2S). The formed H_2S is the principal agent in the disastrous effects caused by SRB. It contaminates gas and stored oil, precipitates ferrous sulfide that plugs injection wells, and promotes corrosion of iron and steel in the absence of oxygen (anaerobic corrosion). Another principal mechanism by which SRB are involved in corrosion is their ability to depolarize iron surfaces by consumption of cathodically formed hydrogen. The postulated mechanisms in anaerobic corrosion are briefly explained. As an example for a microbiological study of SRB in oil technology, examination of an oil treater in a field in northern Germany is presented. On the basis of measured growth characteristics of the SRB, possibilities for controlling their activity are discussed.

Introduction

Biological sulfate reduction by SRB is the only known process by which, in aquatic environments of moderate temperatures (0 to 75°C [32 to 167°F]), H_2S is formed from sulfate. In sediments of ponds, lakes, and marine environments, SRB are usually part of the indigenous community of microorganisms and are rather inconspicuous in nonpolluted waters. In oilfield water systems, however, SRB cause serious problems: (1) corrosion of iron in the absence of air (anaerobic corrosion), (2) precipitation of amorphous ferrous sulfide that, by plugging, diminishes the injectivity of water injection wells, (3) contamination of fuel gas with H_2S , and (4) contamination of stored fuel oil with H_2S . Furthermore, H_2S is extremely toxic if inhaled; it easily escapes from contaminated waters and may accumulate under poorly ventilated conditions. It is usually recognized by its distinctive, unpleasant odor, but high concentrations anesthetize the sense of smell.

The objective of this paper is to present an overview of the biological features of SRB and of their activities in oil technology with emphasis on anaerobic corrosion. We also include results from our studies on SRB in an oil field in northern Germany.

Microbiology of SRB

SRB are an assemblage of specialized bacteria that thrive in the absence of oxygen and obtain energy for growth by oxidation of organic nutrients, with sulfate being reduced to H_2S .^{1,2} The biological significance of this form of life is best understood within the overall natural decomposition process carried out by living organisms.

Processes in Biological Decomposition. The natural decomposition of organic material in our biosphere through a food chain of oxygen-breathing (respiring) organisms—namely, animals, fungi, and bacteria—is a well-known process. Biochemically, respiration is a transport of reducing power (hydrogen, "electrons") from the organic nutrients (organic substrates, electron donors) being oxidized to oxygen (electron acceptor) being reduced (Fig. 1a). Respiration liberates the energy that has been originally conserved in the organic matter during photosynthesis by green plants and cyanobacteria (blue-green algae). In the oxygen-breathing organisms, the liberated energy is used for maintenance of their living structures and for growth—i.e., a net synthesis of their own cell material from the nutrients. Thus every organic substrate of a respiring organism is partly decomposed for obtaining energy and partly converted into new cell material. These functionally distinctive reactions in living organisms are designated catabolism or dissimulation (energy metabolism) and anabolism or assimilation (cell synthesis), respectively. An amount of biomass initially synthesized by photosynthesis is diminished more and more by passing through the food chain because of respiratory losses. The final result is a reoxidation (mineralization) of the chemically complex biomass to CO_2 , H_2O , and other minerals (Fig. 1a). These inorganic end products are used by green plants and cyanobacteria for photosynthesis of new organic substances (the natural cycle of matter).

The total reoxidation of biomass is possible only if the conditions are aerobic—i.e., if sufficient oxygen is present. If biomass gets into stagnant or rather closed water systems where the gas exchange with the atmosphere is limited, dissolved oxygen may be completely consumed. Despite the absence of oxygen in such waters, the organ-

*Now at the U. de Provence

**Now at the U. of Illinois

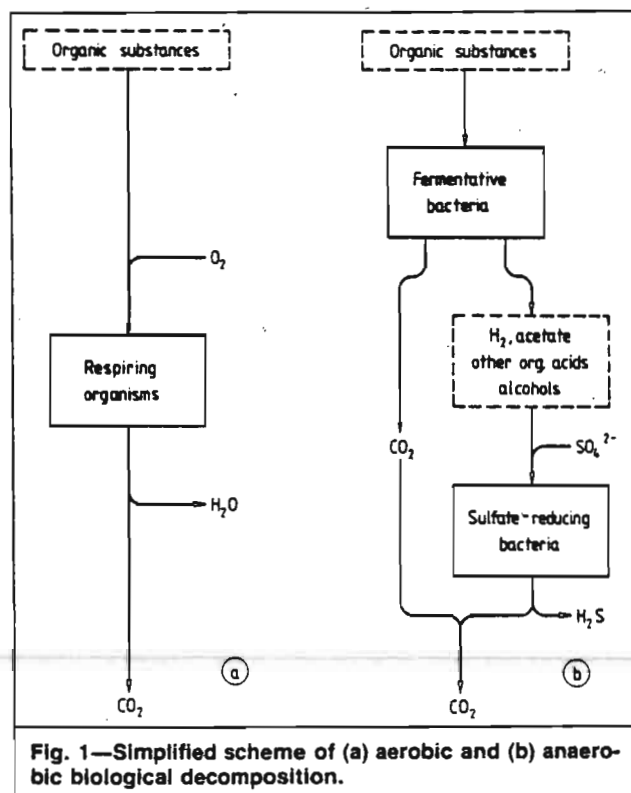


Fig. 1—Simplified scheme of (a) aerobic and (b) anaerobic biological decomposition.

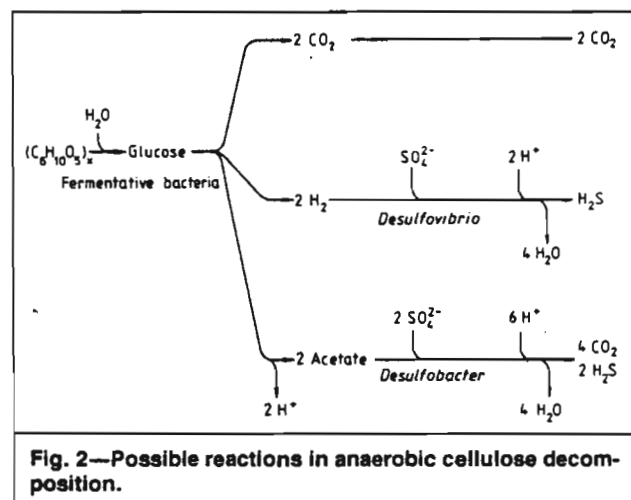


Fig. 2—Possible reactions in anaerobic cellulose decomposition.

ic matter undergoes further biological decomposition by a complex population of so-called fermentative bacteria. The conditions in the absence of oxygen and the bacteria living under these conditions are generally designated as anaerobic. Most fermentative bacteria are even obligately anaerobic and become inactive in air. Because no external electron acceptor (oxidant), such as oxygen, is used by fermentative bacteria, the overall oxidation state of the degraded matter cannot change. The degradation reactions by which most fermentative bacteria gain energy are disproportionations of the organic matter; a part of this is converted to CO_2 ; another part is necessarily converted to reduced products, such as fatty acids, H_2 , and alcohols (Fig. 1b). In many natural anaerobic environments, the quantitatively most important fermentation products formed with CO_2 are H_2 , acetate, propionate, and butyrate.³

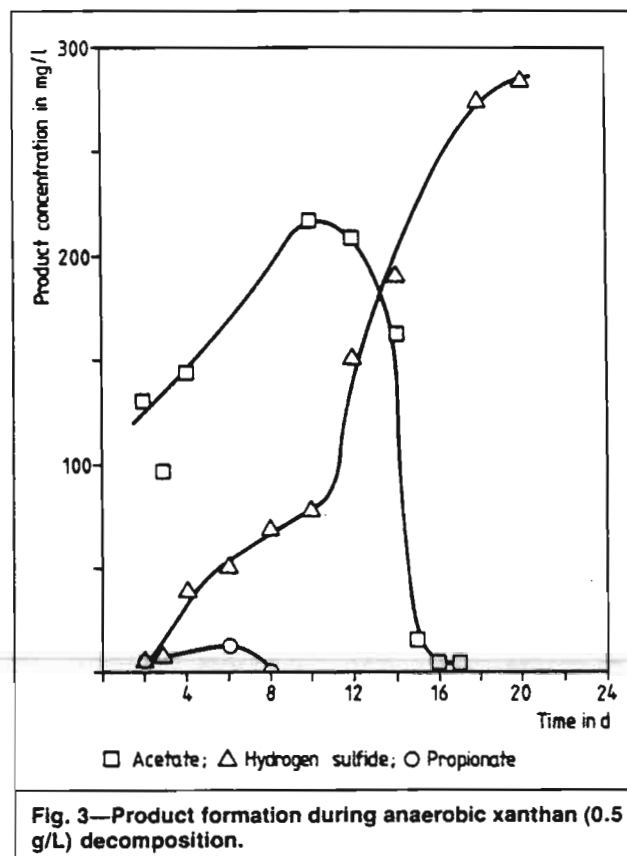


Fig. 3—Product formation during anaerobic xanthan (0.5 g/L) decomposition.

If sulfate is present under anaerobic conditions, the fermentation products are used further by SRB (Fig. 1b). Because these bacteria use an inorganic oxidized compound—sulfate—as electron acceptor in their energy metabolism, a net oxidation of the organic substrates is effected without free oxygen; the reducing power from the decomposed organic matter appears as H_2S . SRB are obligate anaerobes and become inactive in air, like most fermentative bacteria. With respect to the organic compounds used, SRB are more restricted than fermentative bacteria. Several fermentative bacteria decompose chemically complex compounds, e.g., such polymers as cellulose or proteins. SRB were never observed to use a polymer directly. Typical nutrients for SRB are simple compounds of low molecular weight, such as the indicated fermentation products. Therefore, SRB in nature depend on fermentative bacteria that cleave and ferment the complex organic matter (cellulose, starch, and other biopolymers) to low-molecular-weight compounds (Fig. 1b).

Fig. 2 is an example for detailed bacterial processes by which cellulose may be degraded completely under anaerobic conditions. Through fermentative bacteria and SRB (*Desulfovibrio* or *Desulfobacter*), each molecular cellulose unit (glucose) enables the production of three molecules of H_2S ; thus 1,000 g cellulose would yield 630 g H_2S , provided sulfate is not limiting. If sulfate is limiting or absent under anaerobic conditions, the fermentation products are used by methane-forming bacteria that cooperate with some other, special anaerobic bacteria, and the degradable biomass is finally converted to methane (CH_4 or "biogas") and CO_2 .⁴

An anaerobic degradation experiment with a biotechnologically produced polymer, xanthan, is shown in Fig.



Fig. 4—*Desulfovibrio vulgaris* (viable cells, phase-contrast micrograph, bar = 10 μm).

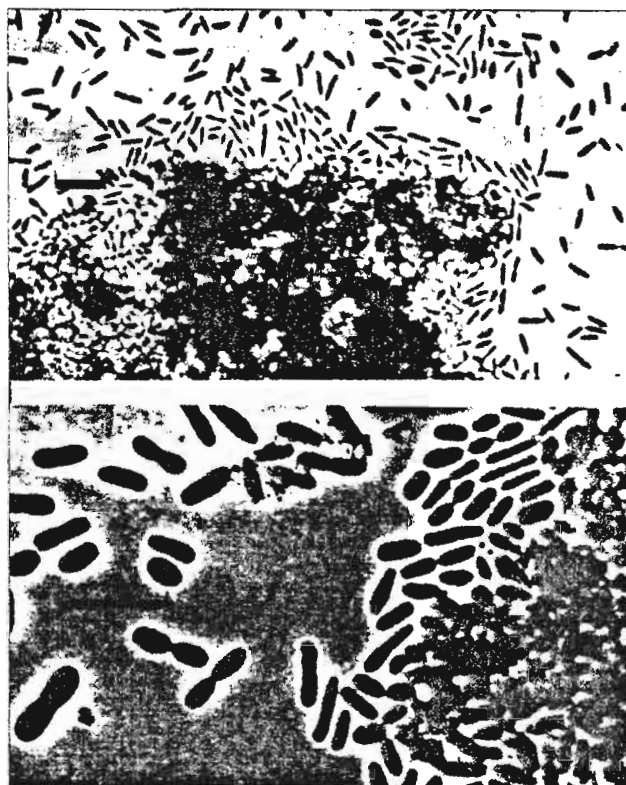


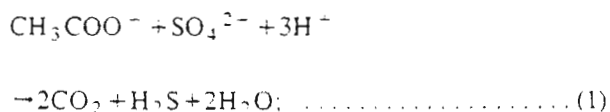
Fig. 5—A *Desulfobacter* species (viable cells at different magnifications, phase-contrast micrographs, bar = 10 μm).

3. Deaerated seawater (containing 2.7 g $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$) with 0.50 g xanthan (dry weight)/L was inoculated with some marine sediment as a source of anaerobic bacteria. By consecutive transfer into new oxygen-free seawater with the polymer, a xanthan-degrading mixed culture of fermentative bacteria and SRB was selected. The concentration of formaldehyde (0.05%) present as a biocide in the used xanthan was insufficient to inhibit these bacteria. After inoculation, fermentation of xanthan to acetate and propionate started first. Somewhat later, these products were used by SRB that formed H_2S . The viscosity caused by xanthan disappeared. In controls without xanthan, neither fatty acids nor H_2S was formed.

Apart from the sulfate reduction by SRB, the normal decay of biomass yields H_2S by liberation from proteins (desulfuration). The content of bound sulfur in living and dead organisms, however, is only about 1% (weight per dry weight). Therefore, decomposition of 1,000 g (dry weight) biomass in the absence of sulfate would yield not more than about 10 g H_2S from the proteins.

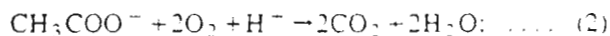
Thermodynamically, fermentation or sulfate reduction yields less energy than respiration with oxygen. This can be demonstrated, e.g., with acetate as electron donor, by calculation of the free-energy change ($\Delta G^{\circ'} = \Delta G^{\circ}$ at pH 7) that is a measure of the available energy.

Sulfate reduction:



$$\Delta G^{\circ'} = -41 \text{ kJ/mol acetate.}$$

Respiration:

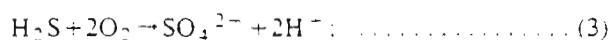


$$\Delta G^{\circ'} = -837 \text{ kJ/mol acetate.}$$

The different free-energy changes are approximately reflected by the cell mass synthesized per amount of a utilized substrate. Aerobic bacteria can convert 50% or more of the total substrate to cell material because they obtain much energy from respiration (Eq. 2). Fermentative bacteria or SRB convert only about 10% of the total substrate to cell material; the bulk of the substrate has to be decomposed for providing energy (in SRB, e.g., according to Eq. 1). In short, anaerobic bacteria, including SRB, make themselves conspicuous by the degradation products rather than by formed cell mass.

A consequence of the relatively low free-energy change of anaerobic reactions is that fermentation products and H_2S still carry a significant part of the energy that was conserved in the original biomass. If the bacterial products from the anaerobic environment contact air, they are energetically exploited by specialized aerobic bacteria. Among these, the H_2S -oxidizing bacteria, mainly *Thiobacillus* species, are ecologically and economically important.⁵ They reoxidize H_2S to sulfate, and the environment may become acidic.

Sulfide oxidation:



$$\Delta G^{\circ'} = -796 \text{ kJ/mol sulfide.}$$

TABLE 1—CHARACTERISTICS OF REPRESENTATIVE SRB

	Cell Form	Approximate Optimum Temperature for Growth (°C)	Compounds Oxidized				
			H ₂	Acetate	Fatty Acids	Lactate	Others
Incomplete oxidation							
<i>Desulfovibrio</i>							
<i>desulfuricans</i>	Curved	30	+	-	-	+	Ethanol
<i>vulgaris</i>	Curved	30	+	-	-	+	Ethanol
<i>gigas</i>	Curved	30	+	-	-	+	Ethanol
<i>saxilegens</i>	Curved	30	+	-	-	+	Ethanol
<i>sapovorans</i>	Curved	30	-	-	C ₄ through C ₁₆	+	
<i>thermophilus</i>	Rod-shaped	70	+	-	-	+	
<i>Desulfotomaculum</i>							
<i>orientis</i>	Rod-shaped	30 to 35	+	-	-	+	Methanol
<i>ruminis</i>	Rod-shaped	37	+	-	-	+	
<i>nigrificans</i>	Rod-shaped	55	+	-	-	+	
<i>Desulfobulbus</i>							
<i>propionicus</i>	Oval	30 to 38	+	-	C ₃	+	Ethanol
Complete oxidation							
<i>Desulfobacter</i>							
<i>postgatei</i>	Oval	30	-	+	-	-	
<i>Desulfovibrio</i>							
<i>baarsii</i>	Curved	30 to 38	-	(+)	C ₃ through C ₁₈	-	
<i>Desulfotomaculum</i>							
<i>acetoxidans</i>	Rod-shaped	35	-	+	C ₄ , C ₅	-	Ethanol
<i>Desulfococcus</i>							
<i>multivorans</i>	Spherical	35	-	(+)	C ₃ through C ₁₄	+	Ethanol, benzoate
<i>niacini</i>	Spherical	30	+	(+)	C ₃ through C ₁₄	-	Ethanol, nicotinate, glutarate
<i>Desulfosarcina</i>							
<i>variabilis</i>	Cell packets	30	+	(+)	C ₃ through C ₁₄	+	Ethanol, benzoate
<i>Desulfobacterium</i>							
<i>phenolicum</i>	Oval	30	-	(+)	C ₄	-	Phenol, <i>p</i> -cresol, benzoate, glutarate
<i>Desulfonema</i>							
<i>limicola</i>	Filamentous	30	+	(+)	C ₃ through C ₁₂	+	Succinate

Symbols: + = utilized; (+) = slowly utilized; - = not utilized.

Types of SRB and Their Substrates. SRB are not homogeneous.^{1,2} Properties of representatives that have been studied in detail are listed in Table 1. It is very likely that many more types of SRB occur in nature.

The cell forms of SRB most commonly found by light microscopy are curved and oval to rod-shaped; their diameters usually range from 0.5 to 2 μm , their lengths from 1 to 5 μm . Many SRB are actively motile by flagella. Other forms are spheres and long multicellular filaments. Several types of SRB tend to grow in clumps or cell aggregates and stick to surfaces.

Nutritionally, SRB may be divided into two major groups. Species of the first group carry out an incomplete oxidation of organic substrates with acetate as an end product. Species of the second group oxidize organic substrates, including acetate, completely to CO₂.

Most incompletely oxidizing SRB may grow rather fast under optimum conditions and reach doubling times of about 3 hours. The best-studied representatives are *Desulfovibrio* species (Fig. 4) that can be easily isolated from nearly every aquatic sediment.¹ For most, lactate is an excellent substrate that is oxidized to acetate and CO₂. Many *Desulfovibrio* species also grow well with H₂ as electron donor; the equation is obvious from Fig. 2.⁶ If *Desulfovibrio* species grow with H₂ and sulfate as energy source, they require acetate and CO₂ as carbon sources for cell synthesis.⁶ *Desulfovibrio sapovorans* and some similar, as yet unnamed SRB oxidize long-chain fat-

ty acids to acetate.⁷ *Desulfobulbus* species oxidize propionate to acetate. Most of the known spore-forming *Desulfotomaculum* species resemble nutritionally the commonly found *Desulfovibrio* species.

The completely oxidizing SRB grow relatively slowly, with optimum doubling times seldom shorter than 15 hours. The nutritionally specialized *Desulfobacter* species (Fig. 5) prefer acetate as substrate (Eq. 1), the quantitatively most important organic fermentation product; higher fatty acids are not used. Other completely oxidizing SRB (e.g., *Desulfococcus* species and *Desulfosarcina variabilis*) are nutritionally more versatile; they may oxidize propionate, higher fatty acids, dicarboxylic acids, lactate, alcohols, and even aromatic organic acids. Some of the completely oxidizing SRB can use H₂ as electron donor and synthesize cell material from CO₂ as the sole carbon source.

In nature, the completely oxidizing SRB, especially *Desulfobacter* species, may cooperate with incompletely oxidizing types by using the acetate excreted by the latter.

SRB Distribution in Nature and Their Growth Conditions. Development of SRB in nature can be expected whenever decomposable organic matter gets into sulfate-containing waters where O₂ is limited. Typical habitats are aquatic sediments where settled organic particles accumulate. Significant activities of SRB are measured in salt-marsh or marine sediments because of the high sul-

TABLE 2—PROPOSED REACTIONS IN IRON DEPolarIZATION BY SRB

Anodic reaction	$4\text{Fe} \rightarrow 4\text{Fe}^{2+} + 8\text{e}^-$
Water dissociation	$8\text{H}_2\text{O} \rightarrow 8\text{H}^+ + 8\text{OH}^-$
Cathodic reaction	$8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow 8\text{H} \rightarrow 4\text{H}_2$
Hydrogen oxidation	$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{OH}^-$
Precipitation	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS} + 2\text{H}^+$
Total reaction	$4\text{Fe} + \text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeS} + 3\text{Fe}(\text{OH})_2 + 2\text{OH}^-$

fate concentration of seawater (28 mmol=2.7 g SO_4^{2-} /L).⁸ H_2S production is often visible by blackening of the sediment, which is a result of the formation of ferrous sulfide (FeS) from iron minerals.

Despite the inhibitory effect of oxygen on SRB, these bacteria are sometimes active in aerobic aquatic sediments, where SRB thrive in anaerobic microniches. Formation and maintenance of such microniches is explained by two factors. First, the respiration of aerobic bacteria scavenges oxygen and favors growth conditions for SRB. Second, H_2S produced by SRB is a reductant that reacts with oxygen at normal temperature: thus, if once established, colonies of SRB can protect themselves against oxygen.⁹ If organic matter increases, the anaerobic microniches can soon expand in a self-stimulating process.

In a homogeneously aerated environment, SRB become inactive. Nevertheless, they can survive many hours or days in aerated water.^{9,10} If under anaerobic conditions again, such SRB recover their activity. SRB of the genus *Desulfotomaculum* form spores like the anaerobic fermentative *Clostridium* species. The spores are resistant not only to oxygen but also to heat (80°C [176°F]) or desiccation and are therefore present even in dry soils. The spores germinate under favorable growth conditions.

SRB prefer neutral pH for growth. In the laboratory, activity is observed within a pH range of about 5.5 to 8.5. Nevertheless, SRB have been observed in more acidic waters.¹¹ In environments with an unfavorable pH, SRB probably occur in microniches of more neutral conditions. The metabolic products of SRB represent buffers—namely, the $\text{HS}^-/\text{H}_2\text{S}$ and the $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ systems—that may protect against extreme pH values.

The optimum temperature for most known SRB is about 20 to 40°C [68 to 104°F]. In natural aquatic sediments, low activities of sulfate reduction can still be measured close to 0°C [32°F]. Relatively few types of SRB have been described so far that prefer high temperatures (thermophilic SRB). *Desulfotomaculum nigrificans* may grow at temperatures up to 65 to 70°C [149 to 158°F], *Desulfovibrio thermophilus* and the similar *Thermodesulfobacterium commune* up to 80 to 85°C [176 to 185°F].¹ High pressures may increase or diminish the temperature tolerance of SRB.^{12,13}

SRB show various reactions with respect to salt concentrations.^{1,2,12} Freshwater species may be inhibited by more than 20 to 30 g NaCl/L. In contrast, many marine species are moderately halophilic: i.e., they do not develop in freshwater environments but require 10 to 30 g NaCl/L, and sometimes magnesium salts for optimum growth.² Halotolerant SRB grow in both freshwater and seawater environments. Activity of most SRB declines drastically if the NaCl concentration exceeds 50 to 100 g/L.^{1,12} In natural saline habitats (salt lakes and brines), activity of SRB is sometimes found near salt saturation.¹²

However, there are no reports on extremely halophilic SRB that really require such high salt concentrations for optimum growth. Apparently, a few SRB can tolerate rather high salt concentrations and live, though with diminished activity, near salt saturation far beyond the optimum.

Economic Activities of SRB

Considering the growth conditions of SRB, it is not surprising that these bacteria may find a suitable environment in oilfield water systems if degradable organic compounds and sulfate are present. Of course, activity can be expected only if the temperature is not significantly higher than 80°C [176°F] and if the water is not too acidic. The manifold problems caused by SRB have been reviewed in Ref. 1.

Principles of Metal Corrosion by SRB. Several mechanisms have been proposed by which different microorganisms corrode metals, and the subject has been reviewed in detail.^{1,14-17} Two major biologically mediated processes by which metals corrode may be visualized. First, microorganisms may favor or initiate anodic, oxidative processes on a metal surface by direct contact. Second, excreted metabolic products may be chemically aggressive and may dissolve the metal. Both types of processes play a role in corrosion by SRB.

A principal mechanism by which SRB corrode iron is proposed by the cathodic depolarization theory first postulated in 1934 by von Wolzogen Kühr and van der Vliet.¹⁸ The detailed reactions are listed in Table 2. Metal becomes polarized in water by loss of positive metal ions (anodic reaction). The electrons left in the metal reduce protons from dissociation of water to atomic hydrogen (cathodic reaction). Atomic or molecular hydrogen remains on the metal surface where a dynamic equilibrium is established. SRB are supposed to remove H_2 permanently from the metal surface by oxidation with sulfate as electron acceptor (cathodic depolarization). The result is a net oxidation of the metal. Some of the metal ions react with sulfide to form FeS; others form ferrous hydroxide.

All species of SRB that are able to use H_2 (Table 1) are potentially corrosive by acting as depolarizers. *Desulfovibrio vulgaris* and SRB in marine environments were shown to have a high affinity to H_2 , which can be removed down to an extremely low concentration, around 10^{-9} mol/L.^{19,20} The uptake of H_2 by the cells of the SRB is always mediated by the enzyme hydrogenase.

The ability of SRB to use hydrogen from steel surfaces has been demonstrated experimentally. By application of an electromotive force to a steel and a platinum electrode in a mineral solution, Hardy²¹ demonstrated an increase of the current density and a production of sulfide from

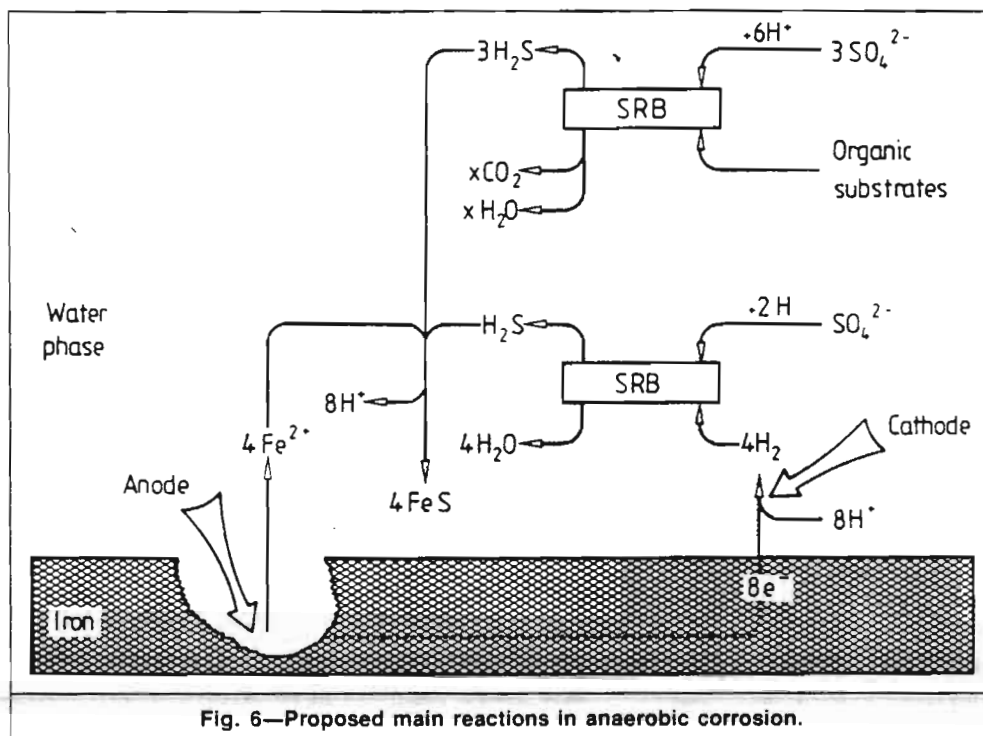


Fig. 6—Proposed main reactions in anaerobic corrosion.

sulfate when cells of hydrogenase-positive SRB (i.e., SRB able to utilize hydrogen) were added. In corrosion experiments in our own laboratory, we incubated steel wool in media of different types of SRB.²² The quantification of formed sulfide revealed that in the presence of hydrogenase-positive *Desulfovibrio* species, the steel wool provided H_2 for sulfate reduction, indicating that corrosion occurred. In the 2-week short-term experiments, however, the utilization of hydrogen from the steel surface was observed only when organic compounds (e.g., lactate) were also present as additional substrates for sulfate reduction. In cultures of the hydrogenase-negative *Desulfovibrio sapovorans* (Table 1), the steel wool was not corroded. These results not only confirm the cathodic depolarization theory, but also demonstrate the significance of organic substrates for SRB in anaerobic corrosion. The stimulation of the corrosion by the additional organic substrates may be explained by two probably cumulative effects. First, the organic substrates stimulate the activity of the SRB and, as a consequence, also their hydrogen uptake. Second, as Postgate¹ men-

tioned, the additionally formed sulfide reacts with the remaining ferrous ions or hydroxide from the anodic process (Table 2) and leads to FeS as the entire corrosion product. Thermodynamically, FeS precipitation is an effective removal of ferrous iron from the anodic reaction and therefore should promote the oxidative destruction of the metal. Because the additional sulfide may be formed not only by the hydrogenase-positive, depolarizing SRB but also by hydrogenase-negative SRB, the latter are expected to contribute to corrosion.

The detailed mechanisms with their spatial separations in anaerobic corrosion are not yet fully understood. A depolarization reaction occurring merely on the iron surface was regarded as insufficient to account for the striking corrosion phenomena under anaerobic conditions. Instead, the precipitated FeS was assumed to be the main site of depolarization by acting as a cathode, like a noble metal in contact with iron.²³ Hence, the SRB remove the cathodically formed H_2 from the FeS attached to the metal. This view and our laboratory observations led to the corrosion model proposed in Fig. 6.



Fig. 7—Pits in anaerobically corroded iron (scanning electron micrograph, bar = 100 μm).



Fig. 8—Anaerobically corroded iron surface (scanning electron micrograph, bar = 10 μm).

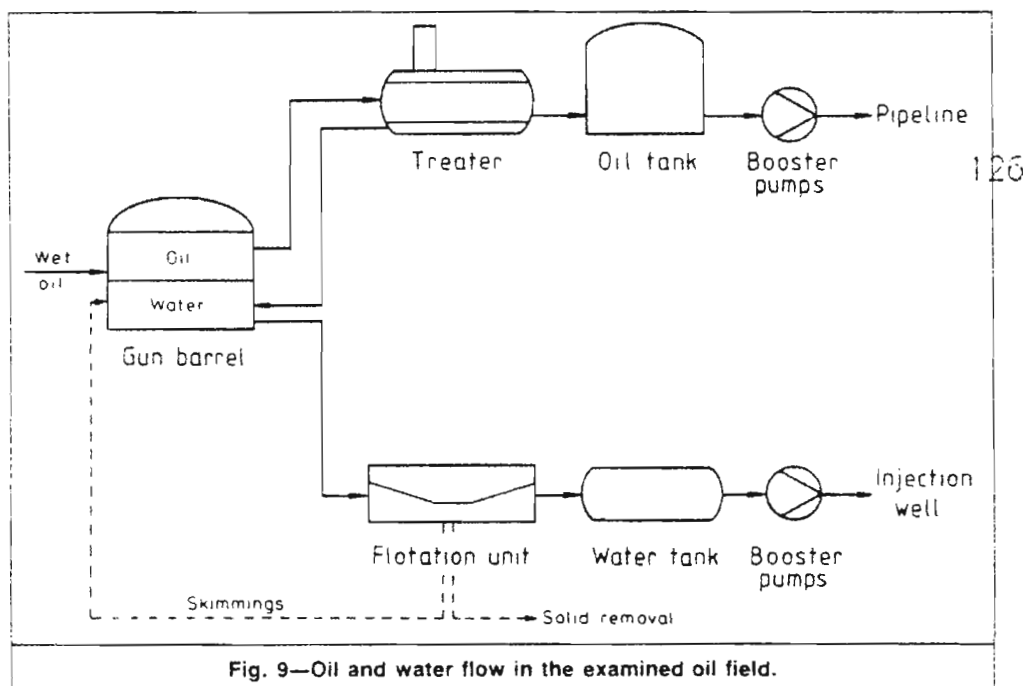


Fig. 9—Oil and water flow in the examined oil field.

In a quite different corrosion theory, the depolarization resulting from H_2 removal by SRB was questioned.²⁴ Instead, the depolarization was ascribed to the cathodic activity of H_2S itself, which receives electrons from the metal and yields H_2 . According to this assumption, SRB act only indirectly on iron by their reactive end product, sulfide. Other studies on anaerobic corrosion furnished evidence for the involvement of a phosphorus compound as an additional reactive agent.²⁵

A corrosion mechanism with indirect involvement of SRB may also occur in environments with intermittent anaerobic/aerobic conditions. Produced sulfide reacts with O_2 and yields elemental sulfur, which, with excess sulfide (especially at $pH > 7$), forms polysulfides. Both sulfur and polysulfides are highly corrosive.²⁶

The different corrosion mechanisms proposed indicate the complexity of the whole process. On the basis of our observations, we prefer the explanation by the classic depolarization mechanism and the reaction of sulfide with ferrous ion as the two fundamental chemical processes in anaerobic corrosion. Nevertheless, other reactions may contribute to different extents to the destruction of iron, depending on the environmental conditions. Actually, the corrosion process usually takes place in a chemically and physically very inhomogeneous microenvironment. As Hamilton¹⁷ explained, SRB and many other types of bacteria often occur in a polymeric layer (biofilm) that forms on the metal surface. Within such layers, various gradients of substrates, products, or even O_2 from the air are established. The inhomogeneity of the corrosive environment is also indicated by the pitting, rather than an even corrosion, of the iron or steel. The anodic destruction tends to continue in the same area where the process has started. The establishment of the corroding areas may be initiated by irregularities in the metal surface structure and by special sites in the aqueous surroundings that favor an anodic process. Fig. 7 shows a distinctively marked hole in steel that has been incubated for 10 months in a *Desulfovibrio* culture. The higher magnification (Fig. 8) exhibits a fissured structure of the corroded area.

Refs. 1 and 14 summarize the possibilities for controlling anaerobic corrosion. If practical, use of inert, non-corrosive material appears to be the best solution. Cathodic protection of iron by sacrificial anodes or application of an electromotive force, first used for inhibiting non-biological corrosion, has also been successful against corrosion by SRB.¹⁴ Although it protects the iron, this method does not inhibit SRB activity. On the contrary, the increased negative potential imposed on the iron provides further H_2 as electron donor for SRB. Generally, soil and water that are poor in biologically degradable organic matter are expected to be less corrosive than organic-rich surroundings of the metal.

Examination of SRB from an Oil Field in Northern Germany. The details of a microbiological study on SRB in an oil field in northern Germany near Hamburg have been reported elsewhere.²⁷ In this oil field, an increase of H_2S was observed during several years of operation. Serious corrosion effects have not been observed so far; however, formation of H_2S in the water led to plugging of the injection wells by FeS flocs. The whole flow diagram is shown in Fig. 9. Analyses of samples taken from the aqueous phase at different points revealed that the crude oil processing unit (treater) was the main source of sulfide. The operating temperature of the treater measured in the oil phase was 60 to 70°C [140 to 158°F]. The temperature in the water phase was between 30 and 45°C [86 and 113°F], depending on the crude oil throughput and on the distance from the inlet.

Water samples for studying SRB were taken near the bottom of the treater. The samples contained a sediment consisting of FeS, other precipitates, and oil particles. Microscopic examination revealed the presence of mainly oval bacterial cells, most of which were attached to the particles.

For counting cells of different SRB in the treater, a fresh sample with flocs was homogenized under an atmosphere of N_2 and diluted stepwise in test tubes with anaerobic agar media containing bicarbonate buffer, mineral salts,

TABLE 3—COUNTING AND DETERMINATION OF SRB FROM AN OIL TREATER

Substrate for Counting	Cells of SRB per mL	Cell Morphology	Substrates Oxidized						Type of SRB
			H ₂	Acetate	Butyrate, Caproate	Lactate	Ethanol	Benzoate	
Acetate	6.3 × 10 ⁶	Oval	-	+	-	-	(+)	-	<i>Desulfobacter</i> species
Butyrate + caproate	270	Oval or curved	-	-	+	-	-	-	Similar to <i>Desulfovibrio sapovorans</i>
Lactate	1.4 × 10 ⁵	Curved	+	-	-	+	+	-	<i>Desulfovibrio</i> species
Benzoate	1.1 × 10 ⁶	Rod-shaped	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	Unknown

Symbols: + = utilized; (+) = slowly utilized; - = not utilized.

trace elements, vitamins, sulfate, and an organic substrate; the organic substrates were acetate, lactate, benzoate, or a fatty acid mixture of butyrate and caproate.² After 2 to 4 weeks of incubation at 30°C [86°F], the SRB in the solidified agar had grown into colonies that were counted; for further studies and identification, the SRB colonies were isolated in pure culture in liquid media. The results are shown in Table 3. Acetate-oxidizing SRB of the *Desulfobacter* type were dominant, followed by yet unknown benzoate-utilizing rod-shaped SRB and lactate-utilizing *Desulfovibrio* species. SRB oxidizing butyrate and higher fatty acids occurred at relatively low numbers. Fig. 5 shows *Desulfobacter* cells, many of which are sticking to each other or to FeS particles added to the growth medium.

The pure cultures of SRB obtained at a temperature of 30°C [86°F] exhibited optimum growth at 30 to 36°C [86 to 97°F]; at temperatures higher than 44°C [111°F], these SRB died. If, however, the initial incubation temperature was elevated to 45°C [113°F], additional types of SRB developed and were isolated with H₂, acetate, or lactate; these SRB were active at 40 to 50°C [104 to 122°F]. One H₂-utilizing strain was thermophilic and grew between 45 and 65°C [113 and 149°F].

Growth of SRB isolated from the treater water was tested at different salt concentrations. Although the salt concentration of the treater water was about 100 g/L (mainly NaCl), the pure cultures of the SRB exhibited optimum growth with 10 to 50 g NaCl/L. With one exception, the obtained SRB were retarded at higher NaCl concentrations and inhibited above 150 g NaCl/L. The only exception was a rather slowly growing, rod-shaped type of SRB with an optimum temperature of 45 to 52°C [113 to 126°F]. This type was not retarded by NaCl concentrations up to 200 g/L and still developed slowly with 270 g/L. Lactate, fatty acids, and ethanol were used, but not H₂.

Examination of the treater shows that oilfield waters may harbor various types of SRB. We can conclude from the determined numbers of SRB cells and their nutritional capacities (Table 3) that acetate and benzoate were nutrients of potential significance in the treater. The source of these compounds is still unknown. One possibility is that acetate and benzoate are compounds of the crude oil and are enriched in the polar organic precipitates (asphaltic and resin-like crude oil components); these accumulated especially in the treater at the oil/water interface and on the bottom. Oilfield chemicals could not have contribut-

ed significantly to degradable substances; only 50 ppm of a nonionic surfactant was applied as an oil-soluble demulsifier to favor the separation of oil/water emulsion.

The acetate-oxidizing SRB that were dominant in the oil treater did not grow with lactate. Therefore, the counting techniques with lactate that are routinely applied in oil fields may significantly underestimate the real number of SRB. Further underestimation of cell numbers results from the tendency of many SRB to grow in dense clumps and to attach to particles and other surfaces (Figs. 4 and 5).

Experiments with different salt concentrations showed that no extremely halophilic SRB existed in the oil field. The detected types of SRB preferred moderate salt concentrations. In the water of the examined oil field, these SRB have to grow beyond their salt optimum at relatively high salt concentrations that apparently diminish the activity.

Some General Comments on SRB Control in Oilfield Waters

It appears unlikely that ancient SRB in the oil-bearing strata have endured geological periods. We must therefore assume that SRB are imported with surface waters or ground waters. The gradual increase of sulfide production after the beginning of operations in oil fields may reflect the multiplication and spreading of the SRB.

Sterile operation in oil fields to avoid contamination ("infection") with SRB is nearly impossible. Several biocides are known to inhibit SRB.^{1,13} Application of biocides in large waterflooding projects presents problems because of the costs. Also, the environmental problems have to be considered. Inhibitory concentrations of biocides determined in laboratory studies may be insufficient in the field where strains other than those detected in the laboratory are present and where several SRB occur in protected niches. It is also possible, however, that high pressures or temperatures in oil wells increase the effectiveness of biocides.¹³ Biocides may also become inactive—e.g., by adsorption to minerals or by reaction of aldehyde groups with sulfide.

The possibilities for controlling SRB in other ways than by application of biocides must not be forgotten. A more causative limitation of sulfate reduction in oil fields is the control of the biological factors that govern SRB. Such factors are the availability of organic electron donors and sulfate or the salt concentrations.

Some substrates for SRB might be organic low-molecular-weight compounds from the oil (e.g., acids) that diffuse from the precipitated polar fraction into the water phase. Removal of precipitates that harbor SRB in their interstitial water would help diminish H_2S production. Reports on a utilization by SRB of saturated hydrocarbons, the main oil constituents, are controversial.¹ No recent microbiological studies clearly demonstrate a degradation of saturated hydrocarbons under exclusively anaerobic conditions. Under intermittent aerobic/anaerobic conditions, the possibility exists that aerobic hydrocarbon-oxidizing bacteria release some intermediates (such as fatty acids) that can be oxidized by SRB.²⁸ Such conditions are likely in fields where oil/water emulsions are not protected against air. However, further investigation is necessary to estimate the significance of an aerobic, incomplete hydrocarbon oxidation.

Sulfate reduction in oilfield waters may also be caused by added chemicals. Every type of biologically decomposable organic matter in anaerobic waters is a potential source of substrates for reduction of sulfate to H_2S . A commonly used solvent for oilfield chemicals is methanol. It is true that the majority of known SRB do not use methanol directly (Table 1); however, methanol plus CO_2 can be converted to acetate by specialized anaerobes²⁹; acetate is a substrate for many SRB. Further examples of degradable substances applied in oil fields are citric acid used as a complexing agent and xanthan applied in EOR projects. Citric acid and xanthan are not used directly by SRB but are easily fermented to suitable substrates for sulfate reduction. Even chemically synthesized substances have to be considered as precursors for sulfate reduction. Polyethyleneglycol, the hydrophilic part in molecules of nonionic tensides (surfactants), was shown to be fermented by anaerobic bacteria to acetate plus ethanol³⁰; both products are excellent substrates for SRB. Control of SRB would require keeping the addition of degradable organic substances as minute as possible.

A natural limitation of the activity of SRB is given if the primary oilfield waters contain high NaCl concentrations or are poor in sulfate. If possible, such waters should not be mixed with less-saline waters or with sulfate-rich waters, respectively.

Conclusions

To control bacterial sulfate reduction in the aforementioned oil field near Hamburg, the following measures were taken and observed by chemical analyses of the water quality and by counting of SRB.

1. Removal of precipitates from oil tanks and avoidance of a re-entrance of precipitates during recycling of the separated oil.
2. Limitation of added chemicals to an oil-soluble demulgator and corrosion inhibitor; no application of biocides.
3. Removal of particles from the injection water by a flotation unit.
4. Lowering of the pH to nearly 5.0 by addition of hydrochloric acid, which also favored oil/water separation and diminished FeS precipitation.
5. Avoidance as far as possible of a dilution of the high salt concentrations that diminish SRB growth; recycling

of all separated water and limitation of added fresh water to the oil replacement volume.

In the examined oil field, these measures improved the water quality significantly. Since the beginning of the measures 3 years ago, no plugging by precipitated FeS or other problems resulting from SRB have been observed.

Acknowledgments

We thank N. Pfennig, U. of Konstanz, for helpful discussions. We are indebted to Preussag AG and to the many people of the Konsortium Sinstorf for help during the oil-field studies.

References

1. Postgate, J.R.: *The Sulphate-Reducing Bacteria*. Cambridge U. Press, London (1984).
2. Widdel, F. and Pfennig, N.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore (1984) 1, 663-79.
3. Sørensen, J., Christensen, D., and Jørgensen, B.B.: "Volatile Fatty Acids and Hydrogen as Substrates for Sulfate-Reducing Bacteria in Anaerobic Marine Sediment." *Appl. Environ. Microbiol.* (1981) 42, 5-11.
4. Archer, D.B. and Harris, J.: *Anaerobic Bacteria in Habitats Other Than Man*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1986) 185-223.
5. Bos, P. and Kuenen, J.G.: *Microbial Corrosion*, The Metals Society, London (1983) 18-27.
6. Brandis, A. and Thauer, R.K.: "Growth of *Desulfovibrio* Species on Hydrogen and Sulphate as Sole Energy Source." *J. Gen. Microbiol.* (1981) 126, 249-52.
7. Pfennig, N. and Widdel, F.: *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur*, Springer-Verlag, New York City (1981) 169-77.
8. Jørgensen, B.B.: *Microbial Geochemistry*, Blackwell Scientific Publications, Boston (1983) 91-124.
9. Cypionka, H., Widdel, F., and Pfennig, N.: "Survival of Sulfate-Reducing Bacteria After Oxygen Stress, and Growth in Sulfate-Free Sulfide Gradients." *FEMS Microbiol. Ecol.* (1985) 31, 39-45.
10. Hardy, J.A. and Hamilton, W.A.: "The Oxygen Tolerance of Sulfate-Reducing Bacteria from North Sea Waters." *Curr. Microbiol.* (1981) 6, 259-62.
11. Tuttle, J.H. et al.: "Microbial Dissimilatory Sulfur Cycle in Acid Mine Water." *J. Bacteriol.* (1969) 97, 594-602.
12. ZoBell, C.E.: "Ecology of Sulfate Reducing Bacteria." *Prod. Monthly* (1958) 22, 12-29.
13. Herbert, B.N. and Stott, F.D.J.: *Microbial Corrosion*, The Metals Society, London (1983) 7-17.
14. Miller, J.D.A.: *Economic Microbiology*, Academic Press, London (1981) 6, 149-202.
15. Tiller, A.K.: *Microbial Corrosion*, The Metals Society, London (1983) 54-65.
16. Crombie, D.J., Moodie, G.J., and Thomas, J.D.R.: "Corrosion of Iron by Sulphate-Reducing Bacteria." *Chemistry and Industry* (June 1980) 500-04.
17. Hamilton, W.A.: "Sulphate-Reducing Bacteria and Anaerobic Corrosion." *Ann. Rev. Microbiol.* (1985) 39, 195-217.
18. von Wolzogen Kühr, C.A.H. and van der Vliet, I.S.: "The Graphitization of Cast Iron as an Electrochemical Process in Anaerobic Soils." *Water* (1934) 18, 147-65.
19. Robinson, J.A. and Tiedje, J.M.: "Competition Between Sulfate-Reducing and Methanogenic Bacteria for H_2 under Resting and Growing Conditions." *Arch. Microbiol.* (1984) 137, 26-32.
20. Scranton, M.I., Novelli, P.C., and Loud, P.A.: "The Distribution and Cycling of Hydrogen Gas in the Waters of Two Anoxic Marine Environments." *Limnol. Oceanogr.* (1984) 29, 993-1003.
21. Hardy, J.A.: "Utilization of Cathodic Hydrogen by Sulphate-Reducing Bacteria." *Brit. Corros. J.* (1983) 18, 190-93.
22. Cord-Ruwisch, R. and Widdel, F.: "Corroding Iron as a Hydrogen Source for Sulphate Reduction in Growing Cultures of Sulphate-Reducing Bacteria." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1986).

23. Booth, G.H., Elford, L., and Wakerley, D.S.: "Corrosion of Mild Steel by Sulphate-Reducing Bacteria: An Alternative Mechanism." *Brit. Corros. J.* (1968) **3**, 242-45.
24. Costello, J.A.: "Cathodic Depolarization by Sulphate-Reducing Bacteria." *S. Afric. J. Sci.* (1974) **70**, 202-04.
25. Iverson, W.P. and Olson, G.J.: *Microbial Corrosion*, The Metals Society, London (1983) 46-53.
26. Sehaschl, E.: "Elemental Sulphur as a Corrodent in Deaerated Neutral Aqueous Environments." *Mat. Performance* (1980) **19**, 9-12.
27. Cord-Ruwisch, R., Kleinitz, W., and Widdel, F.: "Sulfatreduzierende Bakterien in einem Erdölfeld—Arten und Wachstumsbedingungen" (Abstract in English), *Erdöl, Erdgas, Kohle* (1986) **102**, 281-89.
28. Belyaev, S.S. *et al.*: "Microbiological Processes in the Critical Zone of Injection Wells" (translated from Russian), *Microbiology* (1982) **51**, 793-97.
29. Bache, R. and Pfennig, N.: "Selective Isolation of *Acetobacterium woodii* on Methoxylated Aromatic Acids and Determination of Growth Yields." *Arch. Microbiol.* (1981) **130**, 255-61.
30. Schink, B. and Stieb, M.: "Fermentative Degradation of Polyethylene Glycol by a Strictly Anaerobic, Gram-Negative, Nonsporeforming Bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov.." *Appl. Environ. Microbiol.* (1983) **45**, 1905-13.

SI Metric Conversion Factor

$$^{\circ}\text{F} \quad (^{\circ}\text{F}-32)/1.8 \quad = \quad ^{\circ}\text{C}$$

JPT

Original manuscript received in the Society of Petroleum Engineers office April 9, 1985. Paper accepted for publication Oct. 9, 1986. Revised manuscript received Sept. 25, 1986. Paper (SPE 13554) first presented at the 1985 SPE Intl. Symposium on Oilfield and Geothermal Chemistry held in Phoenix, AZ, April 9-11.

Corroding iron as a hydrogen source for sulphate reduction in growing cultures of sulphate-reducing bacteria

Ralf Cord-Ruwisch¹ and Friedrich Widdel²

¹ Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence,
3 Place Victor-Hugo, F-13 331 Marseille cédex 3, France

² Department of Microbiology, University of Illinois at Urbana-champaign,
131 Burrill Hall, Urbana, Illinois 61801, USA

Summary. In anaerobic corrosion experiments, hydrogenase-positive *Desulfovibrio* strains, grown with limiting lactate concentrations in the presence of steel wool, formed more sulphide than expected or observed with lactate alone. The additional sulphide obviously originated from sulphate reduction with cathodically formed hydrogen from the steel surface. The hydrogenase-negative *D. sapovorans* did not produce additional sulphide. The observations agree with the theory of von Wolzogen Kühn and van der Vlugt (1934) that explains anaerobic corrosion as a cathodic depolarization of iron surfaces by hydrogen-consuming sulphate-reducing bacteria. The influence of the iron surface area, the salt concentration and the pH-value on the utilization of cathodically formed hydrogen was investigated. The significance of an additional organic electron donor for the corrosion of iron in aqueous environments is discussed.

Introduction

The anaerobic corrosion of iron is of great economic importance (Postgate 1984). It diminishes drastically the life time of steel and iron material (e.g.: offshore oil-pipes, sewage pipes, oiltanks) in aqueous, oxygen-free, reduced environments (e.g.: marine sediments, interior of sewage pipes, flooded soils (gley)). The rapidity of metal decay is mostly due to locally corroded areas (pitting corrosion).

When iron is immersed in water, it releases Fe^{++} -cations, whereas the metal surface becomes

negatively charged by the remaining electrons (Table 1, Eq. 1). The dissolving process continues only if the electrons are removed, e.g. by an oxidizing agent. Under aerobic conditions oxygen serves as electron acceptor. The result is rust-formation.

In the absence of oxygen, the electrons left on the metal-surface reduce protons, from the dissociation of water, to hydrogen (Eq. 2, 3) which remains on the iron surface and protects the iron from further dissolving. A dynamic equilibrium is established which keeps the iron polarized. The classical theory of von Wolzogen Kühn and van der Vlugt (1934) suggests that the principal mechanism of anaerobic corrosion is a cathodic depolarization of the iron surface by hydrogen-consuming sulphate-reducing bacteria (SRB). The proposed reactions are listed in Table 1. SRB are supposed to disturb the equilibrium by oxidation of the cathodically formed elemental (or atomic) hydrogen (briefly termed "cathodic hydrogen"), with sulphate as electron acceptor (cathodic depolarisation). The result is a net oxidation of the metal.

In an amended corrosion theory it was suggested that solid ferrous sulphide in contact with iron acts as a cathode, like a noble metal, and facilitates the depolarization (Booth et al. 1968). Other authors proposed that reduced phosphorous compounds, too, are involved in the anaerobic corrosion process (Iverson and Olson 1984).

Anaerobic corrosion was usually measured as weight-loss of iron specimens (Booth and Wormwell 1961; Booth et al. 1966, 1967, 1968; Bell and Chor Kiang Lim 1981; King et al. 1973) or indirectly by changes in current/potential curves (polarization curves: Booth et al. 1968; Hardy 1983). Hardy (1983) supported the depolarization-theory

Table 2. Sulphide production by *Desulfovibrio sapovorans* (hydrogenase negative) and *D. vulgaris* (hydrogenase positive) after 14 days in freshwater medium with steel wool and/or lactate

Lactate given (mM)	Sulphide (mM)					
	Theoretically possible from lactate oxidation ^a	Produced by <i>D. sapovorans</i> ^b		<i>D. vulgaris</i> ^b		
		- steel wool	+ steel wool	- steel wool	+ steel wool	from cath. H ₂
0	0	0	0	0	0 ^c	0
10	5.0	3.6	3.9	4.0	6.6	1.6
15	7.5	6.2	6.9	6.5	10.1	2.6

^a Calculated from the equation $2\text{CH}_3\text{—CHOH—COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{S}$

^b The amount of sulfide determined in the control assays without lactate and without steel wool has been subtracted from all values measured

^c Also tested after 54 days of incubation

formed on the iron surface. In assays with hydrogenase-positive strains, the FeS produced adhered as a dense black layer to the iron surface. In contrast, in experiments with the hydrogenase-negative *D. sapovorans*, the steel wool kept its greyish surface. In the presence of lactate plus iron the hydrogenase positive strains were still motile after 14 days of incubation. In the absence of iron with lactate alone, most of the cells were lysed after this period and motile cells were not detected.

The sulphide production from cathodic hydrogen in the presence of different lactate concentrations was also tested with a salt-requiring hydrogenase-positive *Desulfovibrio* isolate (strain LaViS) from an oilfield (Table 3). The amount of cathodic hydrogen removed from the iron surface was the same for both hydrogenophilic strains (*D. vulgaris* and strain LaViS) and nearly proportional to the concentration of the added lactate. Between 24% and 33% of the electrons for the sulphate reduction was derived from the iron (Tables 2, 3).

Table 3. Sulphide production by *Desulfovibrio* strain LaViS with cathodic hydrogen from steel wool and different concentrations of lactate^a

Lactate given (mM)	Sulphide (mM)		
	Theoretically possible from lactate oxidation	Totally produced	From oxidation of cathodic hydrogen
5	2.5	4.1	1.6
10	5.0	7.7	2.7
20	10.0	13.3	3.3
40 ^a	20.0	26.4	6.4

^a Sulphate concentration was 40 mM

Influence of the iron surface area

The influence of the surface area of the steel wool on sulphide formation with cathodic hydrogen was tested by adding different amounts of steel wool to the tubes (Table 4). In the presence of 10 mM lactate, significant oxidation of cathodic hydrogen occurred if the surface area of the steel wool was larger than 10 dm²/l of culture medium. A surface area larger than 25 dm²/l did not further increase the amounts of sulphide after 14 days of incubation in the presence of 10 mM lactate.

Time course of cathodic hydrogen consumption

In order to study the time course of anaerobic corrosion, a series of tubes containing lactate medium and steel wool was inoculated with *Desulfovibrio* strain LaViS. After different periods of in-

Table 4. Influence of the iron surface area on sulphide production by *Desulfovibrio* strain LaViS in the presence of 10 mM lactate

Iron surface (dm ² /l)	Sulphide produced (mM)		
	Dissolved ^a	Total	From cathodic hydrogen
0	5.1	5.1	—
1	5.1	5.1	—
5	1.2	4.7	—
10	0.0	5.6	0.5
25	0.0	5.6	2.7
50	0.0	7.8	2.7
100	0.0	7.7	2.6

^a Determined before dissolving FeS by acid

cubation, the totally formed sulphide was determined in two tubes from the series (Fig. 1). Oxidation of cathodic hydrogen was fastest during the first 3 days, i.e. when lactate was probably still present. During this time the *Desulfovibrio* strains LaViS produced 0.83 mM sulphide/day by the oxidation of cathodic hydrogen. This corresponds to a corrosion-rate of at least 7.4 mg Fe/dm²·day. After about 3 days, the corrosion continued only slowly with a rate of approximately 1.8 mg/dm²·day.

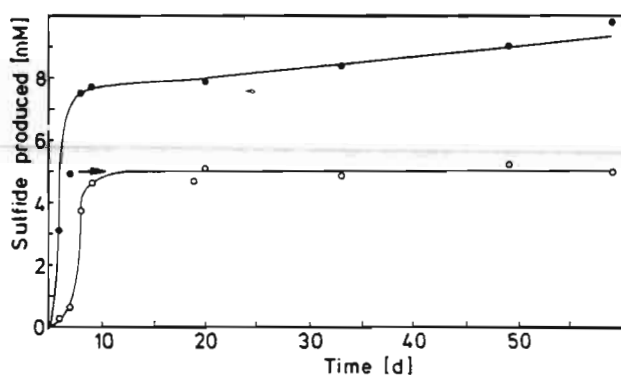


Fig. 1. Time course of total sulphide production by *Desulfovibrio* strain LaViS in medium with lactate (10 mM) in the presence (●---●) or absence (○---○) of steel wool. The arrow indicates the maximum sulfide concentration that can be theoretically formed from the added lactate concentration. (Further information is given in the text)

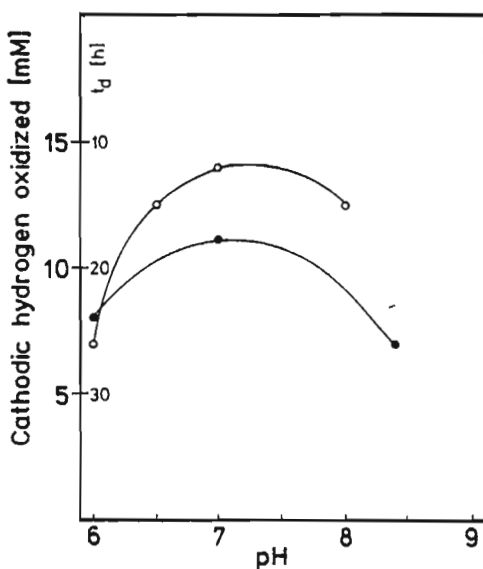


Fig. 2. Influence of the pH-value on cathodic hydrogen utilization by *Desulfovibrio* strain LaViS. ○---○ = doubling time (t_d) on lactate only; ●---● = cathodic hydrogen oxidized

Influence of pH, salinity and temperature

Low pH-values, which favour aerobic corrosion, are expected to stimulate also the anaerobic corrosion by shifting the proton-hydrogen-equilibrium on the polarized metal-surface in the direction of hydrogen formation. However, strain LaViS utilized cathodic hydrogen fastest at a pH of 7 which was also optimal for its growth (Fig. 2).

Also changing of salt concentrations between 1 and 100 g NaCl per l did not increase the amount of oxidized cathodic hydrogen (Fig. 3). Strain LaViS was most "corrosive" at its optimal salt concentrations of about 30 g/l.

The influence of the temperature on bacterial cathodic hydrogen oxidation was studied using *Desulfovibrio* strain LaViT, which tolerated temperatures up to 49°C and which had an optimum of 43°C. At 34°C this strain consumed less cathodic hydrogen within 14 days than strain LaViS. At higher temperatures, however, the amount of cathodic hydrogen oxidized by strain LaViT and thus the corrosion-rate increased (Fig. 4). The increase was still observed somewhat above the optimum temperature of growth. At 46°C strain LaViT oxidized more cathodic hydrogen (13.2 mM per 14 days) than strain LaViS at 34°C (11.2 mM).

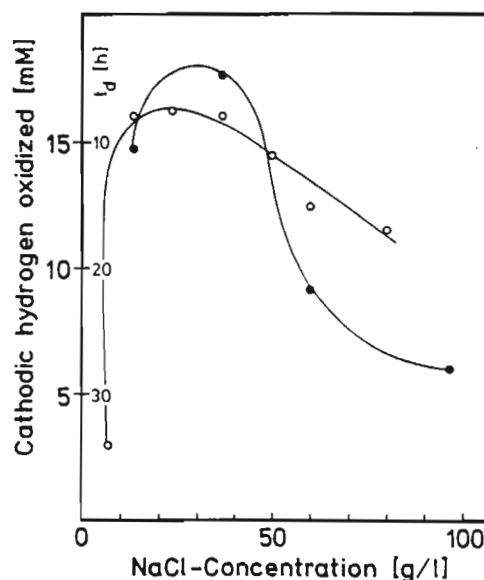


Fig. 3. Influence of the NaCl-concentration on the cathodic hydrogen-utilization by *Desulfovibrio* strain LaViS. ○---○ = doubling time on lactate only; ●---● = cathodic hydrogen oxidized

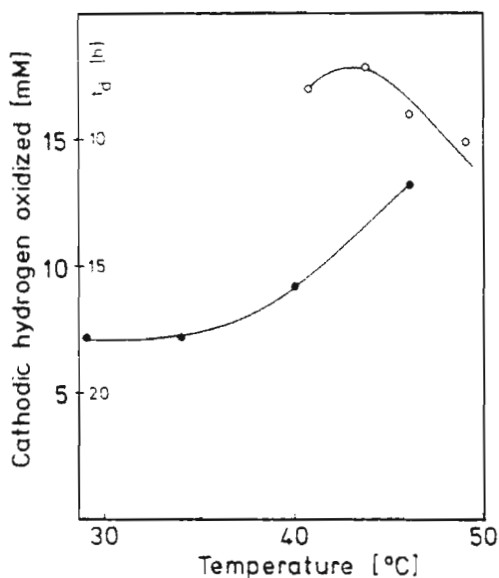


Fig. 4. Influence of the temperature on cathodic hydrogen-utilization by *Desulfovibrio* strain LaViT. ○---○ = doubling time on lactate only; ●---● = cathodic hydrogen oxidized

Discussion

The use of steel wool providing a large surface area of metallic iron (approx. 25 dm²/l of medium) and the determination of sulphide formed instead of the metal weight loss, turned out to be useful methods for investigating the involvement of sulphate reducers in anaerobic corrosion. The experiments demonstrate that metallic iron without application of an external electron-motive force is in fact used as a source of reducing equivalents for dissimilatory reduction of sulphate in growing cultures of hydrogenase-positive SRB. The reducing equivalents were obviously molecular hydrogen formed by the cathodic reaction of iron with protons from water (Table 1, Eq. 3). The observations confirm the classical theory of von Wolzogen Kühr and van der Vlugt (1934).

However, *Desulfovibrio* used cathodically formed hydrogen only if an organic electron donor such as lactate was present. Iron alone did not allow sulphate-reduction during the period of the experiment (up to 54 days). To explain the dependence of the cathodic hydrogen oxidation on the presence and concentration of an organic electron donor, two, possibly cumulative effects have to be considered:

Firstly, the cathodic hydrogen was preferentially oxidized together with the organic substrate (Fig. 1). The possibility of simultaneous utilization of hydrogen and an organic substrate, etha-

nol, has been demonstrated with *Desulfohalobus propionicus* (Laanbroek et al. 1982).

Secondly, sulphide from sulphate reduction with the organic substrate (lactate) reacts with remaining ferrous ions or ferrous hydroxide from the anodic process (Table 1, Eq. 5, 6) to further ferrous sulphide. The scavenging of ferrous iron as almost insoluble sulphide may promote ("pull") the overall reaction (Table 1, Eq. 7) significantly (anodic depolarization). Furthermore, the increase of the precipitated ferrous sulphide may also increase its effectivity as cathode (Booth et al. 1968), especially if the FeS remains firmly attached to the metallic surface as observed in our experiments with hydrogenase-positive SRB.

The first effect (simultaneous oxidation of H₂ and lactate) was apparently the more important one in short-term H₂-removal from the iron surface. The utilization of cathodic hydrogen was faster during the oxidation of organic substrate than after its depletion. The corrosion-rate diminished from 7.4 mg/dm²·day initially, to 1.8 mg/dm²·day after consumption of lactate in spite of increased sulfide concentrations (Fig. 1).

The corrosion rates obtained with the described method are in the same order of magnitude as those observed by weightloss measurements in batch cultures by other authors (Booth and Wormwell 1961). However, 10 to 20 fold higher corrosion rates are observed in continuous culture experiments (Booth et al. 1966, 1967; Bell and Chor Kiang Lim 1981).

In conclusion, the availability of organic electron donors appears to be an important factor that influences the removal of cathodic hydrogen from iron surfaces. Hence, anoxic aqueous environments rich in anaerobically degradable organic matter (e.g. interior of sewage pipes) should be more corrosive than environments that are mainly inorganic (e.g. water in geothermal heating plants).

Acknowledgements. We thank Prof. Dr. N. Pfennig, Universität Konstanz, FRG and W. Kleinitz, Preussag AG, Hannover, FRG for stimulating discussions. This work was carried out at the Fakultät für Biologie, Universität Konstanz.

References

- Bell RG, Chor Kiang Lim (1981) Corrosion of mild and stainless steel by four tropical *Desulfovibrio desulfuricans* strains. *Can J Microbiol* 27:242–245
- Booth GH, Wormwell F (1961) Corrosion of mild steel by sulphate-reducing bacteria. Effect of different strains of organisms. *Proceedings of the 1st International Congress of Metallic Corrosion*, London, pp 341–353

- 174 R. Cord-Ruwisch and F. Widdel: Corroding iron as hydrogen-source for sulfate-reducing bacteria
- Booth GH, Cooper PM, Wakerley DS (1966) Corrosion of mild steel by actively growing cultures of SRB, the influence of ferrous iron. *Br Corros J* 1:345—349
- Booth GH, Cooper AW, Cooper PM (1967) Rates of Microbial Corrosion in Continuous Culture. *Chem Ind* 9:2084—2085
- Booth GH, Elford L, Wakerley DS (1968) Corrosion of mild steel by sulfate reducing bacteria: an alternative mechanism. *Br Corros J* 3:242—245
- 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
- Cord-Ruwisch R, Widdel F, Kleinitz W (1985) Sulfate-reducing bacteria and their economic activities. International Symposium on Oilfield and Geothermal Chemistry held in Phoenix Arizona, Society of Petroleum Engineers of AIME (SPE) 13 554:53—64
- Hardy JA (1983) Utilization of cathodic hydrogen by sulfate reducing bacteria. *Br Corros J* 18:190—193
- Iverson WP, Olson GJ (1984) Anaerobic corrosion of iron and steel: a novel mechanism. In: Klug MJ, Reddy CA (eds) *Current perspectives in microbial ecology*. American Society for Microbiology, Washington, pp 623—627
- King RA, Miller JDA (1971) Corrosion by sulfate reducing bacteria. *Nature* 233:491—492
- King RA, Miller JDA, Wakerley DS (1973) Corrosion of mild steel in cultures of sulfate-reducing bacteria, effect of changing the soluble iron concentration during growth. *Br Corros J* 8:pp 89—93
- Laanbroek HJ, Abee T, Voogd IL (1982) Alcohol conversation by *Desulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. *Arch Microbiol* 133:178—184
- Pfennig N, Widdel F, Trüper HG (1981) The dissimilatory sulfate reducing bacteria. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) *The procaryotes*. Vol I, Springer Verlag Berlin, pp 926—940
- Postgate JR (1984) *The sulfate-reducing bacteria*, 2nd ed, Cambridge University Press, London
- Von Wolzogen Kühr CAH, van der Vlugt IS (1934) The graphitization of cast iron as an electrobiochemical process in anaerobic soils. *Water* 18:147—165
- Widdel F, Pfennig N (1984) Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Baltimore/London: Williams & Wilkins, pp 663—679

Received March 3, 1986/Revised June 25, 1986

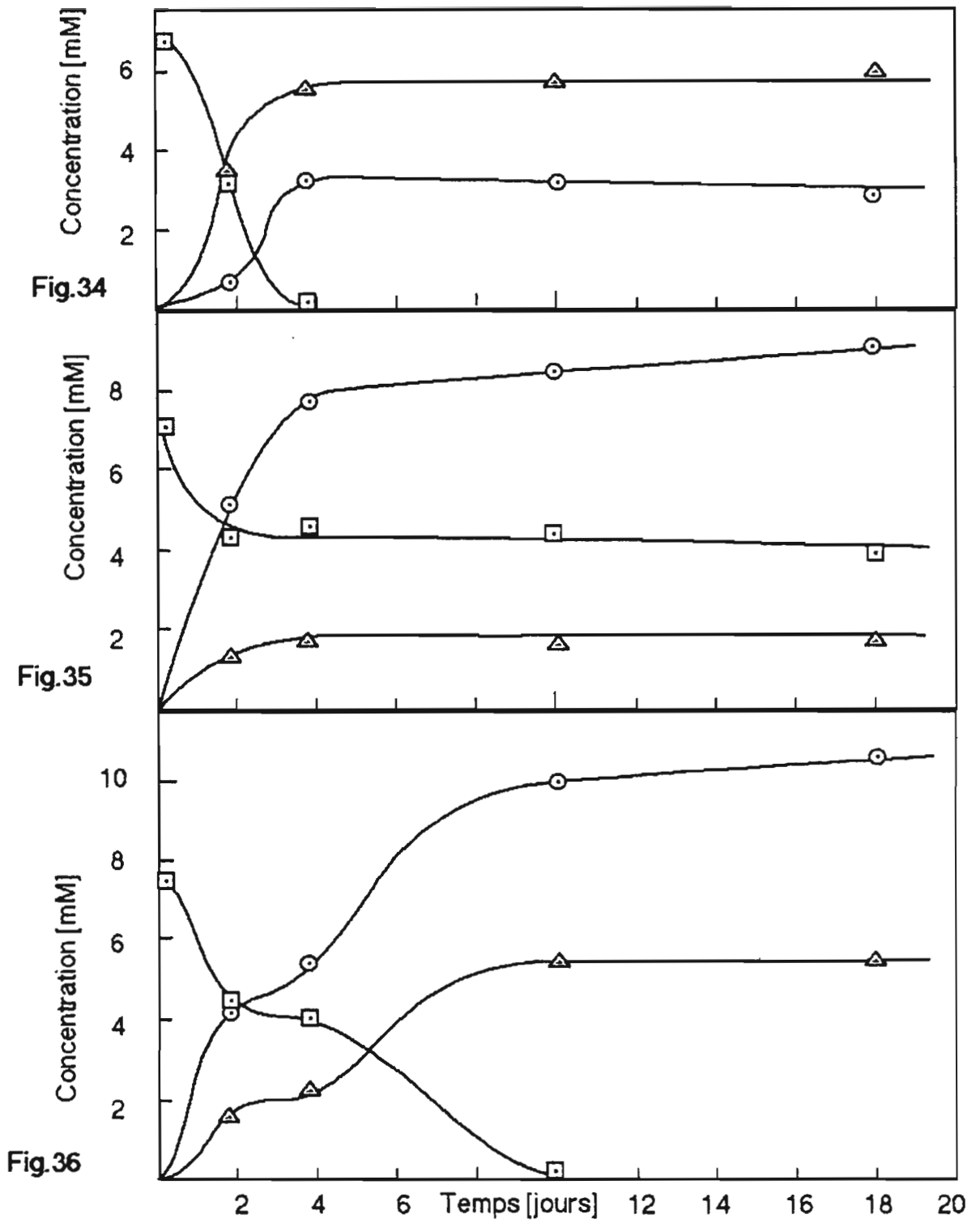
5.2 Oxydation de l'hydrogène cathodique par les bactéries en l'absence de sulfate

La combinaison des informations des articles 6 et 8 nous conduit aux réflexions suivantes :

Article 8: Par leur capacité à oxyder efficacement de faibles concentrations d' H_2 , les BSR provoquent la corrosion.

Article 6: Ce sont les bactéries en présence des accepteurs d'électrons les plus favorables d'un point de vue thermodynamique (nitrate ou fumarate), qui oxydent le plus efficacement les traces d'hydrogène.

Ainsi même en l'absence de sulfate la corrosion bactérienne est possible. Par conséquent, les bactéries capables de réduire les accepteurs d'électrons les plus favorables thermodynamiquement, tels que le nitrate et le fumarate, devraient également corroder le fer et même de façon plus intensive que les BSR. Nous avons testé l'utilisation de l' H_2 cathodique par des cultures bactériennes pures réduisant le fumarate et le nitrate. Les donneurs d'électrons organiques fournis dans ces expériences (formiate 10mM ou lactate 7mM) correspondent respectivement à 10mM et 14 mM d' H_2 . Les figures 34 à 40 montrent qu'en présence de fer, la réduction des accepteurs d'électrons (Fumarate ou Nitrate) est plus importante qu'en l'absence de fer. Le fer corrodé sert de donneur d' H_2 aussi bien pour *Desulfovibrio* sp. que pour *Wolinella succinogenes*. Cela prouve de nouveau que le fer corrodé sert de donneur d' H_2 pour les bactéries qui oxydent l' H_2 .



Dégradation du lactate par *Desulfovibrio desulfuricans* ESSEX avec nitrate (30mM) comme accepteur d'électrons en présence (Fig. 35 et 36) et en absence (Fig. 34) de fer métallique (limaille de fer).

□ = lactate, ○ = ammonium, △ = acétate

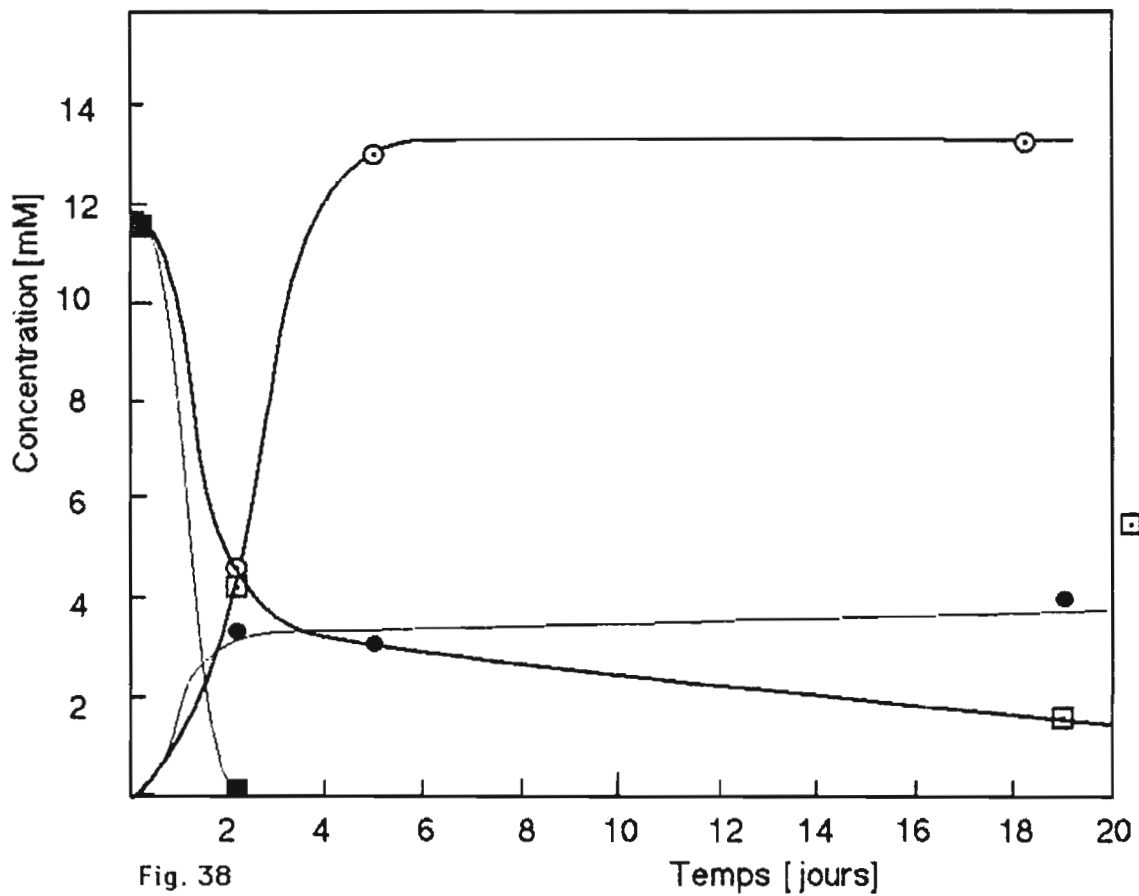


Fig. 38

Dégradation du formiate par *Wolinella succinogenes* avec nitrate (30mM) comme accepteur d'électrons en présence (symboles ouverts) et en l'absence (symboles fermés) de fer métallique.

- ammonium
- formiate

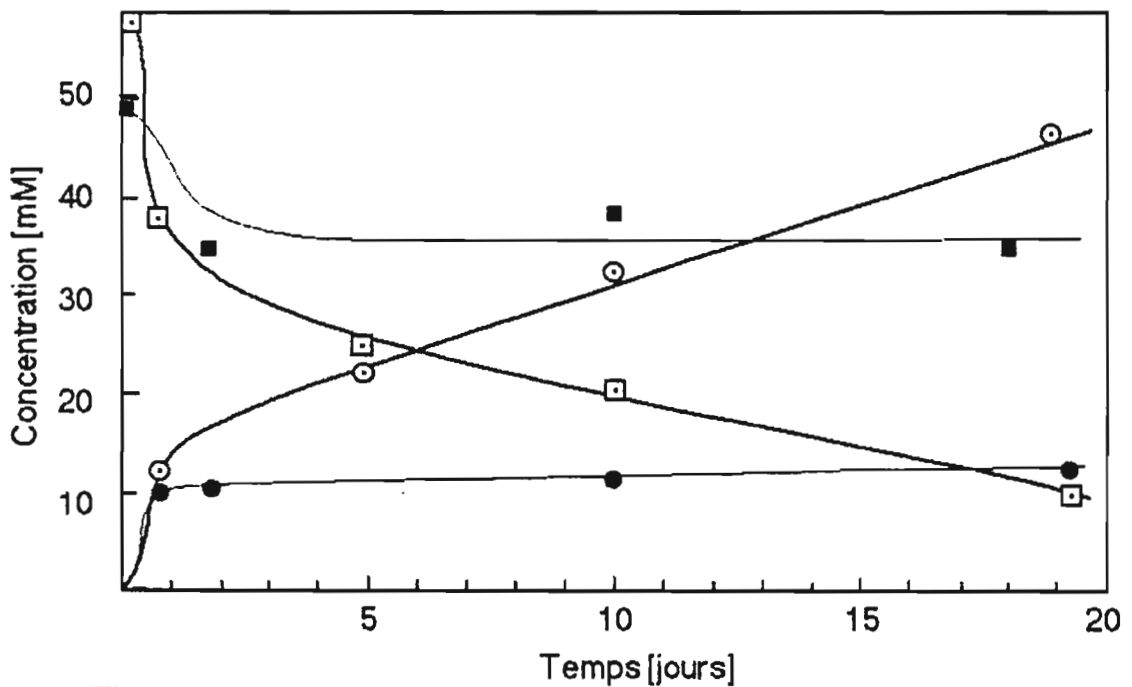
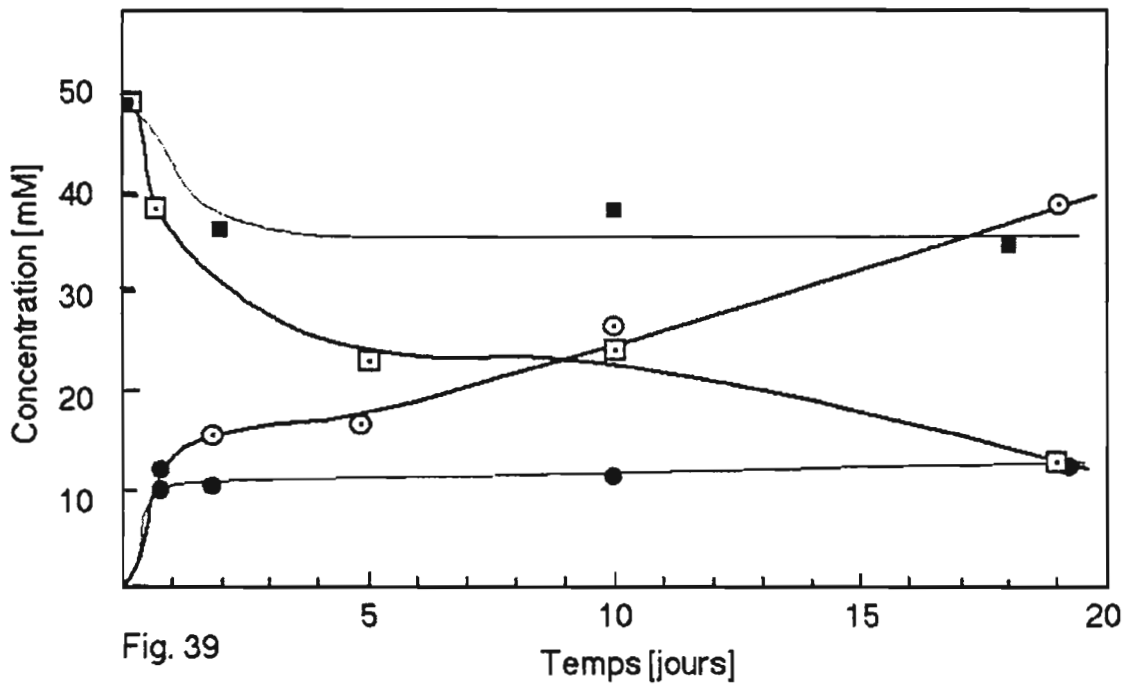


Fig. 40

Dégradation du formiate [12mM] par *Wolinella succinogenes* avec fumarate comme accepteur d'électrons en présence (symboles ouverts) et en l'absence de fer métallique comme donneur d'électron additionnel.

○ ● = succinate

□ ■ = fumarate + malate*

* Au cours de la réduction du fumarate par *Wolinella* et par *Desulfovibrio fructosovorans* des grandes quantités nonreproductibles de malate ont été formées. Comme la transformation du fumarate en malate ne représente pas une réaction rédox (au niveau des électrons: 1 mole malate = 1 mole fumarate = 12 équivalents réducteurs), la somme malate + fumarate nous a servi d'accepteur d'électrons non utilisé.

En enlevant à la quantité totale d'accepteur d'électrons réduit, celle correspondant à l'oxydation du substrat organique, on peut calculer, dans chaque expérience, la concentration en H_2 oxydé issue du processus de corrosion du fer (Fig. 41, Tab. 15). Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans l'article 8. Ce travail constitue la première démonstration de l'oxydation de l' H_2 cathodique par des bactéries ne réduisant pas le sulfate.

Les bactéries réduisant le nitrate ou le fumarate oxydent une quantité plus importante d' H_2 cathodique que les bactéries réduisant le sulfate (Tab. 15 et Fig. 41). Ceci est en accord avec les résultats précédemment obtenus, à savoir que les bactéries réduisant le fumarate ou le nitrate sont plus efficaces à dégrader les traces d' H_2 (article 6) et de ce fait à accélérer le taux de croissance d'une bactérie syntrophique. L'essai de démonstration d'une corrosion par *Methanospirillum hungateia* été négatif. La culture n'a pas démarré en présence de fer, peut être à cause de la toxicité des ions Fe^{2+} .

5.3 Démonstration directe de l'oxydation de l' H_2 cathodique

Jusqu'à maintenant, la consommation par les bactéries hydrogénophiles, de l'hydrogène produit à la surface du fer élémentaire, reste encore à démontrer. Pour mettre en évidence cette oxydation, nous avons suivi la concentration en hydrogène produit par le fer (Fig. 42) ainsi la diminution de la $[H_2]$, due à une utilisation par les bactéries (Fig. 43). On observe que l' H_2 cathodique produit au cours du processus de corrosion du fer, diffuse

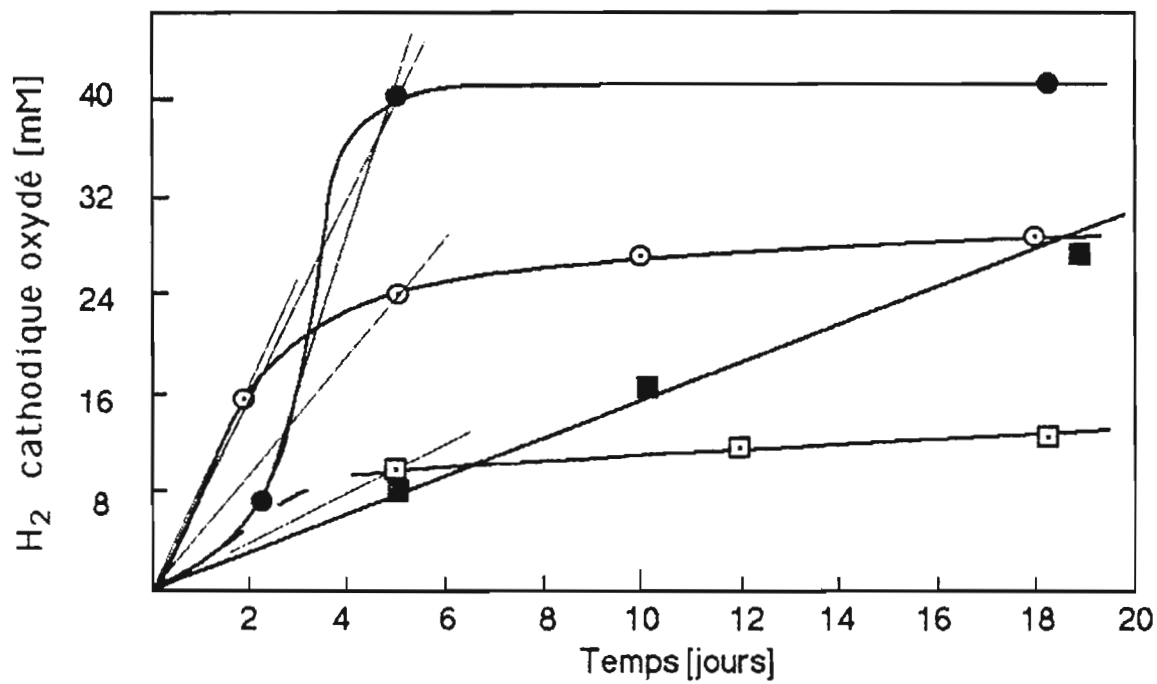


Fig. 41

Consommation de l'hydrogène cathodique par

- Desulfovibrio desulfuricans Essex avec nitrate.
- Desulfovibrio souche LaViS avec sulfate
- Wolinella succinogenes avec nitrate.
- Wolinella succinogenes avec fumarate.

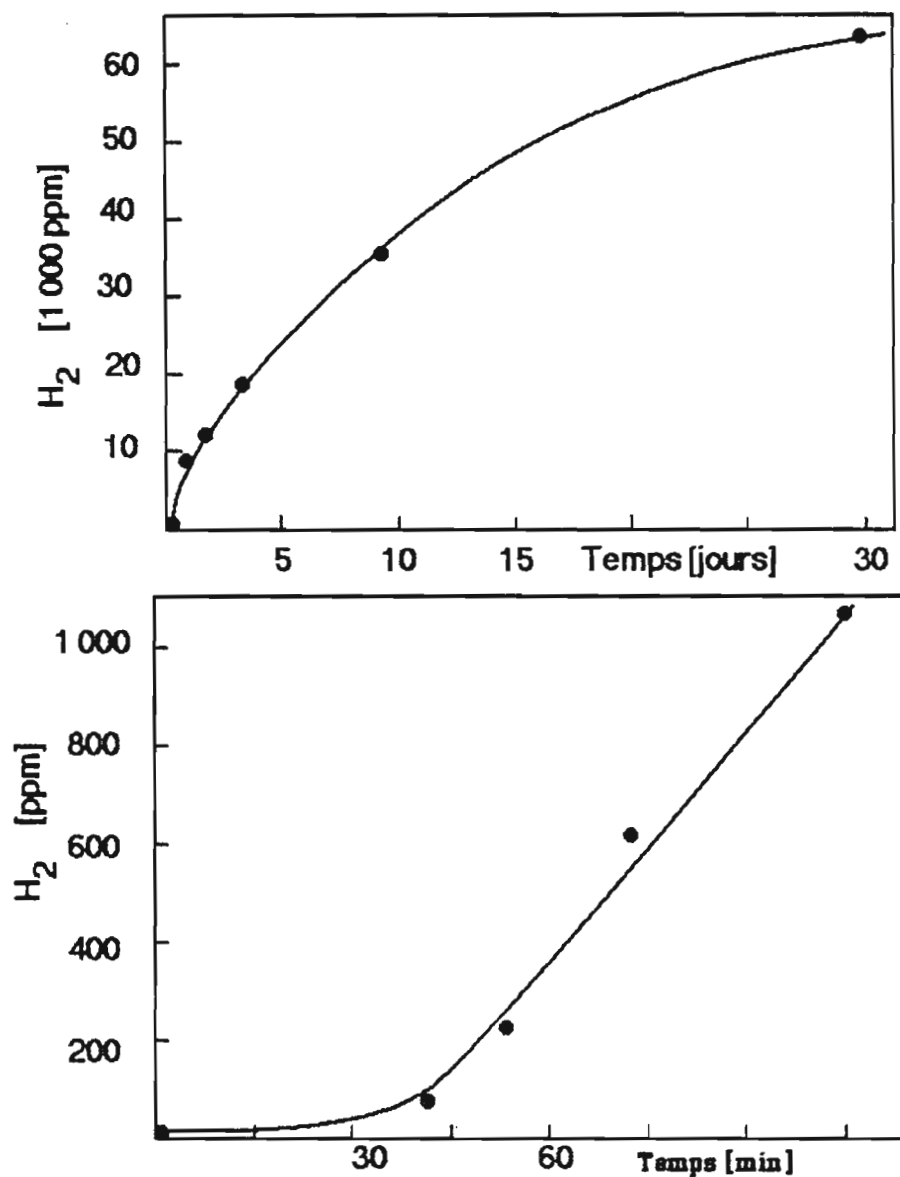


Fig. 42

Début de la production d'hydrogene par un specimen d'acier doux (4 x 7 x 40 mm) dans 7 ml de milieu pour bactéries anaerobies, stérile. L'hydrogène a été déterminé dans la phase gazeuse (7ml).

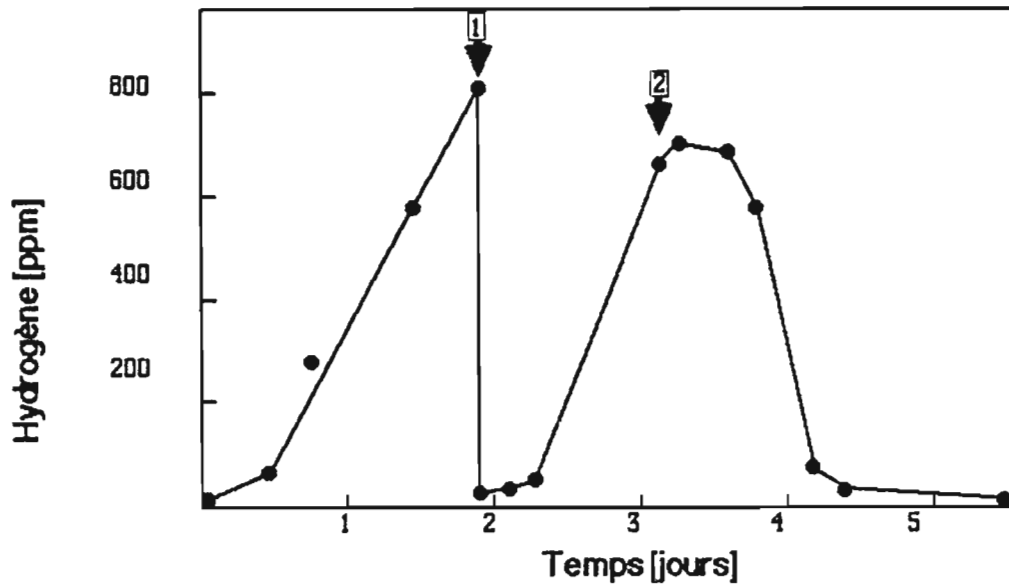


Fig. 43

Comparaison de deux effets d'élimination de l'hydrogène cathodique en condition aérobie .

1 remplacement de la phase gazeuse par l'air.

2 injection d'une bactérie consommatrice d'hydrogène (*Paracoccus denitrificans*).

Condition de culture: Flacons serum (120ml) avec 40 ml de milieu + 0.5 g de l'aimelle de fer. Modification du milieu: tampon phosphate, sans réducteur, 3 mM acétate, 0.02% extrait de levure.

Tableau 15

Cooxydation anaérobie de H₂ cathodique avec un donneur d'électrons organique par des bactéries utilisant le nitrate ou le fumarate comme accepteur d'électrons. Substrat organique: lactate (7mM) pour *D. desulfuricans* et formiate (12mM) pour *W. succinogenes*. (Conditions d'expériences comme décrit dans l'article 8)

Souche	accepteur d'électrons	Fe traite avec HCl	H ₂ cathodique oxydé	Fe ²⁺ formé
Témoin	-	+	-	22.0
	-	-	-	3.3
<i>D. fructosovorans</i>	Sulfate	+	22.4	33.8
		+	15.8	29.5
		-	22.2	19.1
<i>D. fructosovorans</i>	Nitrate	+	25.2	66.2
		+	21.0	80.0
		-	38.9	64.7
<i>W. succinogenes</i>	Fumarate	+	34.2	22.0
		++	26.6	30.8
"	Nitrate	+	41.2	51.1
		++	4.4	13.2

*) Limaille de fer stérilisée à l'éthanol pour éviter une contamination en présence de l'extrait de levure.

W. succinogenes a été cultivé en présence de 0.01 % d'extrait de levure.
D. fructosovorans " " " " l'absence d'extrait de levure.

dans le milieu et s'accumule dans la phase gazeuse. Ceci est en contradiction avec la théorie de la polarisation du fer en milieu anoxique selon laquelle l' H_2 fourni par la réaction cathodique s'adsorbe à la surface du métal sous forme d'une couche protectrice. Après addition d'une culture bactérienne hydrogénéophile, la concentration en H_2 diminue ce qui prouve qu'il y a oxydation de l' H_2 cathodique.

Même en milieu aérobie, il y a formation d' H_2 cathodique qui est donc utilisable par des bactéries aérobies oxydant l' H_2 (Fig. 43). Apparemment, dans ces conditions, les protons sont d'abord réduits préférentiellement à l'oxygène. Cela peut être dû au fait qu'ils sont chargés négativement et qu'ils sont donc attirés par la surface négative du fer.

Par conséquent, nous supposons que la formation de l' H_2 cathodique intervient même au cours de la corrosion aérobie et que les bactéries aérobies hydrogénéophiles jouent un rôle dans la corrosion aérobie du fer*.

* Les produits chimiques classiques utilisés pour protéger les métaux ferreux contiennent des composés extrêmement toxiques pour les bactéries comme le plomb (minium), ou le zinc.

Conclusions générales

L'hydrogène est l'un des intermédiaires les plus importants de la dégradation anaérobie de la matière organique. Il est oxydé exclusivement par des bactéries qui utilisent un accepteur externe d'électrons comme le CO_2 , le sulfate ou le nitrate. Par conséquent, la compétition des bactéries hydrogénophiles pour H_2 détermine, au moins en partie, la formation de produits finaux comme le CH_4 , le sulfure, l'ammonium ou l'azote.

La participation des bactéries anaérobies au turnover de H_2 est complexe. Il est difficile de distinguer les bactéries consommatrices des bactéries productrices d' H_2 car les bactéries hydrogénophiles classiques peuvent également produire de l' H_2 . En fait, les bactéries hydrogénophiles testées réduisant le CO_2 (*Methanospirillum* sp. sur isopropanol, *Sporomusa* sp. sur méthanol), le sulfate (*Desulfovibrio* sp.) et le nitrate (*Desulfovibrio desulfuricans* Essex) maintiennent toutes une certaine concentration d' H_2 au cours du métabolisme de leur substrat organique.

Cette concentration d' H_2 est en équilibre dynamique avec les transporteurs d'électrons comme nous l'avons montré par l'effet d'addition d' H_2 (===> consommation d' H_2) et l'effet d'enlèvement d' H_2 (===> production d' H_2). Donc, la concentration en H_2 maintenue au cours du métabolisme de telles bactéries reflète l'état d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons et représente une accumulation d'équivalents réducteurs (de transporteurs d'électrons réduits TE_{red}). L'accumulation des TE_{red} montre que la

vitesse de dégradation de ce substrat organique est limitée par l'oxydation des transporteurs d'électrons (respiration) plutôt que par l'oxydation du substrat organique (et la réduction des transporteurs d'électrons). Après dégradation du substrat organique par ces bactéries, la concentration en H_2 diminue en général au moins d'une puissance de 10 jusqu'à une valeur constante qui représente le seuil d'oxydation de H_2 .

Dans l'état actuel des connaissances, il n'est pas prouvé que la concentration en H_2 maintenue par les bactéries est seulement due à l'équilibre mentionné ci-dessus (catalysé par l'hydrogénase) ou à un recyclage obligatoire de l'hydrogène (H_2 comme intermédiaire) qui entraînerait une augmentation de la force proton-motrice.

La concentration d' H_2 maintenue par les bactéries consommatrices et productrices d' H_2 peut être disponible pour d'autres bactéries hydrogénophiles. Cela conduit à un transfert facultatif d' H_2 qui peut être total ou partiel. L'enlèvement de l' H_2 par une deuxième bactérie peut avoir un caractère compétitif ou parasitique dans la mesure où le gain d'ATP pour la première souche est diminué ou stoppé. Le transfert interspèces d'hydrogène ne correspond donc pas nécessairement à une association symbiotique. La concurrence pour H_2 entre deux représentants de différents groupes physiologiques bactériens, n'est donc pas seulement limitée à l' H_2 provenant d'une bactérie fermentative vraie; elle peut aussi concerner l' H_2 provenant de ces bactéries hydrogénophiles, qui sont aussi des productrices facultatives d' H_2 .

Comme dans la nature et dans les cocultures testées la concentration en

hydrogène est très faible, l'organisme capable d'utiliser efficacement ces traces d' H_2 devient dominant. Cette capacité à oxyder efficacement les traces d' H_2 dépend de l'accepteur terminal d'électrons. Les bactéries utilisant des accepteurs d'électrons présentant un potentiel rédox thermodynamiquement favorable (élevé) sont plus efficaces dans la compétition pour l' H_2 que les bactéries qui utilisent des accepteurs d'électrons ayant un potentiel redox moins favorable (plus bas) comme le CO_2 ou le sulfate. En conséquence les syntrophies (dont le taux de croissance dépend de la $[H_2]$ présente) qui utilisent un accepteur d'électrons favorable se développent plus rapidement

La prédominance d'une bactérie oxydant H_2 sur une bactérie concurrente, vis à vis des traces d' H_2 libérées par une bactérie syntrophique, s'explique par la capacité à maintenir la $[H_2]$ en dessous de celle nécessaire à un métabolisme significatif d' H_2 chez le concurrent. C'est plus le seuil d'oxydation d' H_2 que les paramètres cinétiques qui déterminent le résultat de la compétition pour H_2 .

Une bactérie capable d'utiliser deux accepteurs d'électrons différents est capable, en présence de l'accepteur thermodynamiquement le plus favorable, de diminuer la concentration en hydrogène à un niveau plus bas qu'avec l'accepteur le moins favorable. Le seuil de la concentration en H_2 oxydable dépend donc moins de l'hydrogénase que du potentiel de l'accepteur d'électrons. Le seuil de la $[H_2]$ correspond à l'incapacité d'oxyder les transporteurs d'électrons réduits ($TE_{red.}$) en dessous d'une certaine valeur du rapport $TE_{red.}/TE_{ox.}$ (c'est à dire un seuil de $TE_{red.}$). Un

meilleur accepteur d'électrons abaisse ce quotient et influe donc sur la vitesse de dégradation du substrat organique.

L'attractivité thermodynamique, c'est à dire le pouvoir oxydant, de l'accepteur terminal d'électrons, détermine l'efficacité d'une bactérie à oxyder de faibles concentrations en équivalents réducteurs, présents sous forme d' H_2 et peut être (selon l'équilibre $H_2 + TE_{ox} \rightleftharpoons 2H^+ + TE_{red}$.) aussi sous forme de transporteurs d'électrons réduits. Par conséquent la variation d'énergie libre des différentes respirations bactériennes peut, indirectement par la diminution du facteur limitant (la $[TE_{red}]$), influencer la vitesse du métabolisme de la cellule bactérienne. Cela pourrait être l'une des raisons (la raison fondamentale étant que la biomasse formée pendant la minéralisation est toujours plus importante en aérobiose qu'en anaérobiose) pour laquelle la dégradation des composés organiques est plus lente en anaérobiose qu'en aérobiose et plus rapide en présence de nitrate ou de sulfate qu'en présence de CO_2 uniquement.

Références Bibliographiques

Abram JW, Nedwell DB (1978) Inhibition of methanogenesis by sulfate-reducing bacteria competing for transferred hydrogen. *Arch Microbiol* 117: 89-92

Abram JW, Nedwell DB (1978) Hydrogen as a substrate for methanogenesis and sulfate reduction in anaerobic saltmarsh sediments. *Arch Microbiol* 117: 93-97

Alfredsson GA, Ingason A, Kristjansson JK (1986) Growth of thermophilic obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacteria on thiosulfate. *Lett Appl Microbiol* 2: 21-25

Akiyama T, Kawaharada Y, Kondo A, Kajitani M, Endo A, Shimizu K, Sugimori (1986) Photocatalytic behavior of Di- and triferrocenylbenzenes on reduction of methylviologen and photochemical hydrogen evolution from methanol under visible light. *Bull Chem Soc Jpn* 59: 3589-3597

Archer DB, Powell GE (1985) Dependence of the specific growth rate of methanogenic mutualistic cocultures on the methanogen. *Arch Microbiol* 141: 133-137

Badziong W, Thauer RK (1980) Vectorial electron transport in *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulfate as sole energy source. *J Gen Microbiol* 126: 249-252

Badziong W Thauer RK (1978) Growth yields and growth rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulfate and hydrogen plus thiosulfate as the sole energy sources. *Arch Microbiol* 117: 209-214

Badziong W Thauer RK, Zeikus JG (1978) Isolation and characterization of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulfate as sole energy source. *Arch Microbiol* 116: 41-49

Barik S, Brulla WJ, Bryant MP (1985) PA-1, a versatile anaerobe obtained in pure culture, catabolizes benzenoids and other compounds in syntrophy with hydrogenotrophs, and P-2 plus *Wolinella* sp. degrades Benzenoids. *Appl Environ Microbiol* 50: 304-310

Barker HA 1940 Studies upon the methane formation. IV the isolation and culture of *Methanobacterium omelianskii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 6: 201-220

Baushop T, Mountfort DO (1981) Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Appl Environ Microbiol* 42: 1103-1110

Beupère D, Massoui M, Ralainirina R, Uzan R (1986) Oxydation d'alcools par transfert d'hydrogène en présence de cétones saturées. Application de la selectivité du transfert catalysé par RhH (PPh₃)₄. *Nouveau Journal de Chimie* 10: 493-499

Biebl H, Pfennig N (1977) Growth of sulfate reducing bacteria with sulfur as electron acceptor. Arch Microbiol 112: 115-117

Bonjour F, Aragno M (1986) Growth of thermophilic obligatorily chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacteria related to *Hydrogenobacter* with thiosulfate and elemental sulfur as electron and energy source. FEMS Microbiol Lett 35: 11-15

Boone DR, Bryant MP (1980) Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. Nov., from methanogenic ecosystems. Appl Environ Microbiol 40: 626-632.

Boone DR, Menaia JAGF, Mah RA (1987) Effects of hydrogen pressure during growth and effects of pregrowth with hydrogen on acetate degradation by *Methanosarcina* species. Appl Environ Microbiol 53: 83-87

Booth GH, Elford L, Wakerley DS (1966) Polarisation of mild steel in the presence of hydrogen bacteria and methane bacteria. Brit Corros J 1

Brandis A, Thauer RK (1981) Growth of *Desulfovibrio* species on hydrogen and sulfate as sole energy source. Arch Microbiol 125: 167-174

Brousseau JD, Yan JY, Lo KY (1986) The relationship between hydrogen gas and butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Biotechnol Bioengineering 28: 305-310

Bryant MP, Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS (1967) *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. Arch Microbiol 59: 20-31

Bryant MP (1979) Microbial methane production- theoretical aspects. J Animal Sci 48:193-201

Chen PC, Almon H, Böger P (1986) Evidence for nitrogenase catalyzed hydrogen uptake in nitrogen fixing filamentous blue-green algae. FEMS Microbiol Lett 37: 45-51

Chen Min, Wolin MJ (1977) Influence of CH₄ production by *Methanobacterium ruminantium* on the fermentation of glucose and lactate by *Selenomonas ruminantium* Appl Environ Microbiol 34: 756-759

Chung KT (1976) Inhibitory effects of H₂ on growth of *Clostridium cellioperarum* Appl Environ Microbiol 31: 342-348

Conrad R, Phelps TJ, Zeikus JG (1985) Gas metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. Appl Environ Microbiol 50: 595-601

Conrad R, Bonjour F, Aragno M (1985) Aerobic and anaerobic microbial consumption of hydrogen in geothermal spring water. *FEMS Microbiol Lett* 29: 201-205

Conrad R, Schink B, Phelps (1986) Thermodynamics of H₂ consuming and H₂ producing metabolic reactions in diverse methanogenic environments under in situ conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 38: 353-361

Crabtree RH (1986) Dihydrogen binding in hydrogenase and nitrogenase. *Inorganica Chimica Acta* 125: L7

Cyplonka H, Pfennig N (1986) Growth Yields of *Desulfotomaculum -orientis* with hydrogen in chemostat culture. *Arch Microbiol* 143: 396-399

Daumas S (1987) Corrosion bactérienne en géothermie basse temperature mécanismes de corrosion par les bactéries sulfato-réductrices. Thèse, Université de Provence, Marseille

Domen K, Kudo A, Shinozaki A, Tanaka A, Maruya K, Onishi T (1986) Photodecomposition of water and hydrogen evolution from aqueous methanol solution over novel niobate photocatalysts. *J Chem Soc Chem Commun* 4: 356-357

Dugani L, Wyrsh I, Gandolla M, Aragno M (1986) Biological oxidation of hydrogen in soils flushed with a mixture of H₂, CO₂, O₂ and N₂. *FEMS Microbiol Ecol* 38: 347-353

Eichler B, Schink B (1984) Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Arch Microbiol* 140: 147-152

Eichler B, Schink B (1985) Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes. *Arch Microbiol* 143: 60-66

Fardeau ML, Belaich JP (1986) Energetics of the growth of *Methanococcus thermolithotrophicus* *Arch Microbiol* 144: 381-385

Fenchel T, Perry T, Thane A (1977) Anaerobiosis and symbiosis with bacteria in free-living ciliates. *Ophelia* 5: 73-121

Guyot J-P, (1986) Role of formate in methanogenesis from xylan by *Cellulomonas* sp. associated with methanogens and *Desulfovibrio vulgaris* inhibition of the acetoclastic reaction. *FEMS Microbiol Lett* 34: 149-153

Guyot JP, Traore I, Garcia JL (1985) Methane production from propionate by methanogenic mixed culture. *FEMS Microbiol Lett* 26: 329-332

Hatchikian EC, Chaigneau M, LeGall (1976): Analysis of gas production by growing cultures of three species of sulfate-reducing bacteria. In Schlegel HG, Gottschalk G, Pfennig N (eds.): "Microbial production and utilization of gases." Göttingen: Erich Goltze, pp 109-118.

Heyndrickx M, Vansteenbeeck, Devos P, Deley J (1987) Hydrogen Gas Production from continuous fermentation of glucose in a minimal medium with *Clostridium butyricum* LMG-1213T1. Syst Appl Microbiol 8: 239-244

Hirayma O, Uya K, Hiramatsu Y, Yamada H, Moriwaki K (1986) Photoproduction of hydrogen by immobilized cells of a photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* G-9 BM. Agr Biol Chem Tokyo 50: 891-899

Holleman A F (1976) Lehrbuch der anorganischen Chemie, Hollemann-Wiberg, De Gruyter, Berlin

Hungate RE (1967) Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. Arch Mikrobiol 59: 158-164

Iannotti EL, Kafkewitz P, Wolin MJ, Bryant MP (1973) Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio succinogenes*: changes caused by interspecies transfer of H₂. J Bact 114: 57-70

Iverson N, Jørgensen BB (1985) Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). Limnol Oceanogr 30: 944-955

Jewell JB, Coutinho JB, Kropinski AM (1986) Bioconversion of propionic valeric and 4-hydroxybutyric acids into the corresponding alcohols by *Clostridium acetobutylicum*. Curr Microbiol 13: 215-221

Jørgensen BB (1977) The sulphur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). Limnol Oceanogr 22: 814-832

Jørgensen BB (1980) Mineralization and the bacterial cycling of carbon nitrogen and sulfur in marine sediments. In DC Ellwood, JN Hedger, MJ Latham, JM Lurch, JH Slater (eds) Contemporary microbial ecology. Academic Press, London New York Toronto Sydney San Francisco, pp 239-351

Kaspar HF, Wuhrmann K (1978) Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. Appl Environ Microbiol 36: 1-7

Kisch H, Fernandez A, Millini R (1986) Catalytic and stoichiometric hydrogen formation by UV irradiation of sodium and zinc sulfide. Chem Berichte 119: 3473-3483

Kovács KL, Dér A (1986) Hydrogen evolution from dithionite and H₂-photoproduction by hydrogenase incorporated into various hydrophobic matrices. *Biochimie* 68: 211-217

Kristiansson JK, Schönheit P, Thauer RK (1982) Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch Microbiol* 131: 278-282

Kröger A (1978) Fumarate as terminal electron acceptor of phosphorylative electron transport *Biochim Biophys. Acta* 505: 129

Krzycki JA, Morgan JB, Conrad R, Zeikus JG (1987) Hydrogen metabolism during methanogenesis from acetate by *Methanosarcina barkeri*. *FEMS Microbiol Lett* 40: 1193-1198

Laanbroek HJ, Abee T, Voogd JL (1982) Alcohol conversion by *Desulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. *Arch Microbiol* 133: 178-184

Lancaster JR Jr (1986) A unified scheme for carbon and electron flow coupled to ATP synthesis by substrate-level phosphorylation in the methanogenic bacteria. (FEBS 3519) *FEBS* 199: 12-18

Levitt MD (1969) Production and excretion of hydrogen gas in man. *N Engl J Med* 281: 122-107

Liebmann H (1937) Bakteriensymbiose bei Faulschlammciliateen. *Biol Zbl* 57: 278-282

Lovitt RW, Kell DB, Morris JG (1986) Proline reduction by *Clostridium sporogenes* coupled to vectorial proton ejection. *FEMS Microbiol Lett* 36: 269-275

Lovley DR (1985) Minimum threshold for hydrogen metabolism in methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 49: 1530-1531

Lovley DR, Dwyer DF, Klug MJ (1982) Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl Environ Microbiol* 43: 1373-1379

Lovley DR, Ferry JG (1985) Production and consumption of H₂ during growth of *Methanosarcina* spp. on acetate. *Appl Environ Microbiol* 49: 247-249

Lovley DR, Klug MJ (1983) Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Appl Environ Microbiol* 45: 187-192

Lupton FS, Conrad R, Zeikus JG (1984) Physiological function of hydrogen metabolism during growth of sulfidogenic bacteria on organic substrates. *J Bacteriol* 159: 843-849

Macy JM, Schröder I, Thauer RK, Kröger A (1986) Growth of *Wolinella succinogenes* on H₂S plus fumarate and on formate plus sulfur as energy sources. *Arch Microbiol* 144: 147-151

Mah RA (1982) Methanogenesis and methanogenic partnerships. *Phil Trans R Soc Lond B* 297: 599-616

Mahro B, Grimme LH (1986) Improving the photosynthetic H₂-productivity of the green alga *Chlorella fusca* by physiologically directed O₂ avoidance and ammonium stimulation. *Arch Microbiol* 144:25-28

Mahro B; Küsel AN, Grimme LH (1986) The significance of hydrogenase activity for the energy metabolism of green algae: anaerobiosis favours ATP synthesis in cells of *Chlorella* with active hydrogenase

Martens Berner CS, Berner RA (1974) Methane production in the interstitial waters of sulfate depleted marine sediments. *Science* 185: 1167-1169

Matsunaga T, Matsunaga N, Nishimura S (1985) Regeneration of NAD(P)H by immobilized whole cells of *Clostridium butyricum* under hydrogen high pressure. *Biotechnology and Bioengineering* 27: 1277-1281

McInerney MJ, Bryant MP (1980) Review of methane fermentation fundamentals. In: Wise DL (ed) Fuel gas production from biomass. Chemical Rubber Co. Press, Inc., West Palm Beach, pp 20-46

McInerney MJ, Bryant MP (1981) Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis. In: Biomass conversion processes for energy and fuels. Sofer SS, Zaborsky OR (eds) Plenum Publishing Corp.

McInerney MJ, Bryant MP (1981) Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of H₂ on acetate degradation. *Appl Environ Microbiol* 41:346-354

McInerney MJ, Bryant MP, Hespell RB, Costerton JW (1981) *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 41: 1029-1039

McInerney MJ, Bryant MP, Pfennig N (1979) Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch Microbiol* 122: 129-135

McInerney MJ, Mackie RI, Bryant MP (1981) Syntrophic association of a butyrate-degrading bacterium and *Methanosarcina* enriched from bovin rumen fluid. Appl Environ Microbiol 41: 826-828

Milde K (1983) *Thiobacilli* of the corroded concrete walls of the Hamburg sewer system. J Gen Microbiol 129: 1321-1333

Miura Y, Ohta S, Mano M, Miyamoto K (1986) Isolation and characterization of a unicellular marine green alga exhibiting high activity in dark hydrogen production. Agr Biol Chem 50: 2837-2845

Mountfort DO, Asher RA (1979) Effect of inorganic sulfide on the growth and metabolism of *Methanosarcina barkeri* strain DM. appl Environ Microbiol 37 : 670-675

Mountfort DO, Asher RA, Mays EL, Tiedje JE (1980) Carbon and electron flow in mud and sandflat intertidal sediments of Delaware inlet, Nelson , New Zealand. Appl Environ Microbiol 39: 686-694

Mountfort DO, Brulla WJ, Krumholz LR, Bryant MP (1984) *Syntrophus bushwellii* gen.nov. spec. nov.: a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems. Int J Syst Bacteriol 34:216-217

Mountfort DO, Bryant MP (1982) Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate degrading bacterium from sewage sludge. Arch Microbiol 133: 249-256

Müller V, Blaut M, Gottschalk G (1986) Utilization of methanol plus hydrogen by *Methanosarcina barkeri* for methanogenesis and growth. Appl Environ Microbiol 52: 269-274

Nanninga HJ , Gottschal (1985) Amino acid fermentation and hydrogen transfer in mixed cultures. FEMS Microbiol Ecol 31: 261-269

Nethe-Jaenchen R, Thauer R (1984) Growth yield and saturation constant of *Desulfovibrio vulgaris* in chemostat culture Arch Microbiol (1984) 137: 236-240

Odom JM, Peck HD Jr (1981) Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate reducing bacteria *Desulfovibrio* sp. FEMS Microbiol Lett 12: 47-50

Ollivier B, Cord-Ruwisch R, Hatchikian CE, Garcia JL (1987) Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. nov.. Arch Microbiol, sous presse.

- Ohmiya K, Takeuchi M, Chen W, Shimizu S, Kawakami H** (1986) Anaerobic reduction of ferulic acid to dihydroferulic acid by *Wolinella succinogenes* from cow rumen. *Appl Microbiol Biotechnol* 23:274-279
- Oremland RS, Taylor BF** (1978) Sulfate reduction and methanogenesis in marine sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 42 : 209-214
- Ottow JCG, Fabig W** (1985) Influence of oxygen aeration on denitrification and redox level in different bacterial batch cultures. In: *Planetary Ecology*. DE Caldwell, JA Brierly, CL Brierly (eds.) Van Nostrand Reinhold Comp. New York, pp 427-440
- Pankhania IP, Gow LA, Hamilton WA** (1986) The effect of hydrogen on the growth of *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) on lactate. *J Gen Microbiol* 132: 3349-3356
- Peck HD Jr, Odom JM** (1984) hydrogen cycling in *Desulfovibrio* a new mechanism for energy coupling in anaerobic microorganisms. In: *Microbial Mats: Stromatolites* pp. 215-243. Alan R. Liss, Inc., 150 Avenue; New York, NY 10011
- Phelps TJ, Conrad R, Zeikus JG** (1985) Sulfate-dependent interspecies H₂ transfer between *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio vulgaris* during coculture metabolism of acetate or methanol. *Appl Environ Microbiol* 50 : 589-594
- Postgate JR** (1979) *The sulphate-reducing bacteria*. Cambridge University Press
- Powell GE** (1985) Stable Coexistence of syntrophic associations in continuous culture. *J Chem Tech Biotechnol* 35B: 46-50
- Powell GE** (1984) Equalisation of specific growth rates for syntrophic associations in batch culture. *J Chem Tech Biotechnol* 34B: 97-100
- Reddy CA, Bryant MP, Wolin MJ** (1972) Characteristics of S organism isolated from *Methanobacillus omelianskii*. *J Bacteriol* 109: 539-545
- Robinson JA, Tiedje JM** (1984) Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H₂ under resting and growing conditions. *Arch Microbiol* 137: 26-32
- Robinson JA, Strayer RF, Tiedje JM** (1981) Method for measuring dissolved hydrogen in anaerobic ecosystems: application to the rumen. *Appl Environ Microbiol* 41: 545-548
- Roy F, Samain E, Dubourguier HC, Albagnac G** (1986) *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Arch Microbiol* 145: 142-147

- Samain E, Albagnac G, Dubourguier HC, Touzel JP** (1982) Characterization of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor-dependent association with a Gram-negative homoacetogen. *FEMS Microbiol Lett* 15: 69-74
- Samain E, Dubourguier HC, Albagnac G** (1984) Isolation and characterization of *Desulfobulbus elongatus* sp. nov. from a mesophilic industrial digester. *System Appl Microbiol* 5: 391-401
- Samain E, Dubourguier HC, Le Gall J, Albagnac G** (1987) Regulation of hydrogenase activity in the propionate oxidizing sulfate-reducing bacterium *Desulfobulbus elongatus*. In *Biology of Anaerobic Bacteria* (Dubourguier et al. eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 23-27
- Sansone FJ, Martens QCS** (1981) Methane production from acetate and associated methane fluxes from anaoxic coastal sediments. *Science* 211: 707-708
- Scheifinger CC, Linehan B, Wolin MJ** (1975) H₂-production by *Selenomonas ruminantium* in the absence and presence methanogenic bacteria. *Appl Microbiol* 29: 480-483
- Schönheit P, Kristiansson Thauer RK** (1982) Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to outcompete methanogens for acetate. *Arch Microbiol* 132: 285-288
- Seitz H-J, Cypionka H** (1986) Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* with hydrogen coupled to ammonification of nitrate or nitrite. *Arch Microbiol* 146: 63-67
- Simon H, Bader J, Günther H, Neumann S, Thanos J** (1985) Chiral compounds synthesized by biocatalytic reductions. *Angew Chem Int Ed Engl* : 539-553 VCH Verlagsgesellschaft mbH D-6940 Weinheim
- Sleat R, Robinson JP** (1983) Methanogenic degradation of sodium benzoate in profundal sediments from a small eutrophic lake. *J Gen Microbiol* 129: 141-152
- Sorensen J, Christensen D, Jorgensen BB** (1981) Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate reducing bacteria in anaerobic marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 137: 163-167
- Stams AJM, Hansen TA** (1984) Fermentation of glutamate and other compounds by *Acidaminobacter hydrogeniformans* gen. nov. sp. nov., an obligate anaerobe isolated from black mud. Studies with pure cultures and mixed cultures with sulfate-reducing and methanogenic bacteria. *Arch Microbiol* 137: 329-337
- Stetter KO, Gaag G** (1983) Reduction of molecular sulphur by methanogenic bacteria. *Nature* 305: 309-311

Stetter KO, König H (1983) Leben am Siedepunkt. Spektrum der Wissenschaft, Scientific American, October 1983: 26-40

Stieb M, Schink B (1985) Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryanti* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. Arch Microbiol 140: 387-390

Stieb M, Schink B (1986) Anaerobic degradation of isovalerate by a defined methanogenic coculture. Arch Microbiol 144: 291-295

Stouthamer AH (1977) Energetic aspects of the growth of micro-organisms. In: Microbial Energetics (Haddock BA, Hamilton WA eds) Cambridge University Press, London, NY, Melbourne. pp 285-315

Strayer RF, Tiedje JM (1978) Kinetic parameters of the conversion of methane precursors to methane in hypereutrophic lake sediment. Appl Environ Microbiol 36: 330-340

Szewzyk U, Szewzyk R, Schink B (1985) Methanogenic degradation of hydroquinone and catechol via reductive dehydroxylation to phenol. FEMS Microbiol Ecol 31: 79-87

Thanos I, Simon H (1986) Stereospecific reductions with hydrogen gas, modified metal catalysts, methylviologen and enzymes or microorganisms. Angewandte Chemie 25: 462-463

Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemolithotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol Rev 41: 100-180

Thompson DG, O'Brien JD, Hardie JM (1986) Influence of the oropharyngeal microflora on the measurement of exhaled breath hydrogen. Gastroenterology 91: 853-860

Traoré SA, Fardeau M-L, Hatschikian CF, Le Gall J, Belaich J-P (1983) Energetics of growth of a defined mixed culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: interspecies hydrogen transfer in batch and continuous cultures. Appl Environ Microbiol 46: 1152-1156

Traoré SA, Gaudin C, Hatschikian CE, Le Gall J, Belaich J-P (1983) Energetics of growth of a defined mixed culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: Maintenance Energy coefficient of the sulfate-reducing organism in the absence and presence of its partner. J Bacteriol 155: 1260-1264

Traoré SA, Hatschikian EC, Belaich JP, LeGall J (1981): Microcalorimetric studies of the growth of sulfate-reducing bacteria. Energetics of *Desulfovibrio vulgaris* growth. J Bacteriol 45: 191-199.

Tschech A, Pfennig N (1984) Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. Arch Microbiol 137: 163-167

Tsuji K, Yagi T (1980) Significance of hydrogen burst from growing cultures of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki and the role of hydrogenase and cytochrome c₃- in energy producing system. Arch Mikrobiol 125: 35-42

Van Bruggen JJA, Stumm CK, Vogels GD (1983) Symbiosis of methanogenic bacteria and spropelic protozoa. Arch Microbiol 136:89-95

Van Bruggen JJA, Stumm CK, Zwart KB, Vogels GD (1985) Endosymbiotic methanogenic bacteria of the sapropelic amoeba Mastigella. FEMS Microbiol Ecol 31: 187-192

Van Bruggen JJA, Zwart KB, Van Assema RM, Stumm CK, Vogels GD (1984) Methanobacterium formicum, an endosymbiont of the anaerobic ciliate *Metopus striatus* McMurrich. Arch Microbiol 139: 1-7

Van Bruggen JJA, Zwart KB, Hermans JGF, Van Hove EM, Stumm CK, Vogels GD (1986) Isolation of Methanoplanus endosymbiosus sp.nov., an endosymbiont of the marine sapropelic ciliate Metopus contortus Quennerstedt. Arch Microbiol 144: 367-374

Van derMeijden P, Van der Drift C, Vogels GD (1984) Methanol conversion in Eubacterium limosum. Arch Microbiol 138: 360-364

Von Wolwogen Kühr CAH, Van der Vlugt LS (1934) The graphitization of cast iron as an electrobiochemical process in anaerobic soils. Water (the Hague)18: 147-165

Widdel F (1986) Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. Appl Environ Microbiol 51: 1056-1062

Wieringa KT (1940) The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol 6: 251-262

Wildenauer FX, Winter J (1986) Fermentation of isoleucine and arginine by pure and syntrophic cultures of *Clostridium sporogenes* FEMS Microbiol Ecol 38: 373-381

Winfrey MR, Zeikus JG (1977) Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments. Appl Environ Microbiol 33: 275-281

Winter J (1980) Glucose fermentation to methane and CO₂ by defined mixed cultures. Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig C1: 293-306

Winter JV, Wolfe RS (1979) Complete degradation of carbohydrates to carbon dioxide and methane by syntrophic cultures of *Acetobacterium woodii* and *Methanosarcina barkeri*. Arch Microbiol 121: 97-102

Winter JV, Wolfe RS (1980) Methane formation from fructose by syntrophic associations of *Acetobacterium woodii* and different strains of methanogens. Arch Microbiol 124: 73-79

Wong TY, Graham L, O'Hara E, Maier RJ (1986) Enrichment for hydrogen-oxidizing *Acinetobacter* spp. in the rhizosphere of hydrogen evolving soybean root nodules. Appl Environ Microbiol 52: 1008-1013

Yarlett N, Coleman GS, Williams AG, Lloyd D (1984) Hydrogenosomes in known species of rumen entodiniomorphid protozoa. FEMS Microbiol Lett 21: 15-19

Yerushalmi L, Volesky B, Szczesny T (1985) Effect of increased hydrogen partial pressure on the acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. Appl Microbiol Biotechnol 22: 103-107

Zehnder AJB (1978) Ecology of methane formation. Water pollution Microbiol 2: 349-376

Zehnder AJB, Ingvorsen K (1982) Microbiology of methane bacteria. In: Anaerobic Digestion 1981 (DE Hughes et al eds.) Elsevier Biochemical Press B.V. Amsterdam

Zeikus JG (1983) Metabolism of one-carbon compounds by chemotrophic anaerobes. Adv Microb Physiol 24: 215-299

Zeikus JG, Dawson MA, Thompson TE, Ingorsen K, Hatchikian EC (1983) Microbial ecology of volcanic sulphidogenesis: isolation and characterisation of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. sp. nov.. J Gen Microbiol 129: 1159-1169.

Zeikus JG, Kerby R, Krzycki JA (1985) Single carbon chemistry of aceogenic and methanogenic bacteria. Science 227: 1167-1173

Zinder SH, Koch M (1984) Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. Arch Microbiol 138: 263-272

Zillig W, Yeats S, Holz I, Bock A, Rettenberger M, Gropp F, Simon G (1987) *Desulfurolobus ambivalens* gen nov sp nov, an autotrophic archaeobacterium facultatively oxidizing or reducing sulfur. Syst Appl Microbiol 8: 197-204

RESUME

La capacité des bactéries anaérobies hydrogénotrophes à utiliser efficacement des traces d' H_2 , que l'on a mesurées comme étant le seuil d'oxydation de l'hydrogène, dépend du pouvoir oxydant de leur accepteur terminal d'électrons. Ce seuil est 200 fois plus bas pour les bactéries réduisant le nitrate par rapport à celles utilisant le sulfate. Ces dernières peuvent oxyder l' H_2 à des concentrations plus basses que les bactéries réduisant le CO_2 .

L'importance de l'accepteur d'électrons intervient également dans les cocultures syntrophiques. Le taux de croissance de la bactérie syntrophique *Acidaminobacter hydrogeniformans* en coculture avec des bactéries hydrogénotrophes, a été corrélé au potentiel rédox de divers accepteurs terminaux d'électrons.

La consommation de traces d' H_2 n'est pas limitée par la première étape, l'action de l'hydrogénase, mais par l'élimination des équivalents réducteurs. Cela conduit en général à une accumulation d'équivalents réducteurs grâce à l'hydrogénase, donc également à une accumulation d' H_2 au cours de la dégradation d'un substrat organique par les bactéries hydrogénotrophes appartenant aux genres *Desulfovibrio*, *Acetobacterium*, *Sporomusa* et *Methanospirillum*. A la fin de la croissance, l' H_2 est réutilisé. La possibilité d'un recyclage de H_2 est discutée.

La concentration d' H_2 qui est maintenue pendant le métabolisme de ces bactéries, est utilisable par une autre bactérie hydrogénotrophe lors d'un transfert interspèce d' H_2 . Une telle coculture a un caractère plutôt compétitif que symbiotique. Le transfert peut être complet ou incomplet. Avec le méthanol comme substrat organique, la bactérie consommant de l' H_2 joue le rôle d'un parasite énergétique. Le flux d'électrons (sous forme d' H_2) dans de telles cocultures de deux bactéries hydrogénotrophes, est contrôlé par le pouvoir oxydant des accepteurs d'électrons mis en jeu.

Le phénomène de formation d'une couche protectrice d' H_2 à la surface du fer plongé dans l'eau (polarisation) n'a pas pu être confirmé. Au contraire, l' H_2 cathodique se dissout dans l'eau, diffuse et s'échappe dans la phase gazeuse; il est utilisable par les bactéries hydrogénotrophes comme les bactéries qui réduisent le sulfate, le fumarate ou le nitrate. L'utilisation de l' H_2 cathodique permet l'accélération du processus de corrosion anaérobie. La corrosion anaérobie bactérienne n'est donc pas nécessairement liée à la présence de sulfate. La corrosion bactérienne via l'utilisation de l' H_2 cathodique par les bactéries aérobies semble également possible.