

UNIVERSITE DE PROVENCE

AIX-MARSEILLE I

THESE

présentée par

ABDEL-ILLAH QATIBI

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR-MENTION SCIENCES

spécialité : BIOLOGIE CELLULAIRE-MICROBIOLOGIE

**FERMENTATION DU LACTATE, DU GLYCEROL ET
DES DIOLS PAR LES BACTERIES
SULFATO-REDUCTRICES DU GENRE
*DESULFOVIBRIO***

soutenue le 11 Mai 1990 devant la commission d'examen

MM JP. BELAICH

A. BORIES

P. CAUMETTE Rapporteur

JL. GARCIA

TA. HANSEN Rapporteur

R. MOLETTA

ORSTOM



1200062638
1er FDI
Non Num

30 JUL. 1993

Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence, 3, place V-Hugo, 13331 Marseille cédex 3, France

I.N.R.A.

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement des I. A. A., 11104 Narbonne cédex, France

084 FERMEN 02 QAT

F 34.035

لا تأسف على ما فاتك ولا تتردد على ما آتاك

La grande faillite d'un être humain, c'est de perdre son enthousiasme. S'il sait le conserver, peu importe que tout le reste l'abandonne; le succès le favorisera sûrement de nouveau.

يا أمي
أشكرك على كل شيء

*A ma mère,
en témoignage de mon affection*

A tous mes amis

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé successivement :

Dans le laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement des Industries Agro-alimentaires de l'INRA, Narbonne, France.

Dans le laboratoire de microbiologie ORSTOM, au sein de l'Université de Provence Aix-Marseille I, Marseille, France.

Ce mémoire de thèse représente un travail personnel qui n'aurait pas pu se réaliser sans la coopération constante d'équipes de recherche que je tiens à remercier pour m'avoir soutenu et aidé au cours de ces trois longues années.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur **Jean Louis GARCIA**, Directeur de recherche, responsable du Laboratoire de Microbiologie ORSTOM de l'université de Provence et directeur scientifique de ces travaux, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et le soutien constant qu'il n'a cessé de me prodiguer. Il a su guider mes premiers pas de microbiologiste dans le domaine encore mal connu et difficile de l'anaérobiose.

Je remercie également Monsieur **André BORIES**, chargé de recherches à l'INRA, qui est l'instigateur du thème de ce travail et qui m'a conseillé et accueilli dans son laboratoire. Avec sa grande connaissance du domaine de la digestion anaérobie d'effluents agro-alimentaires, cette étude semée d'embûches en a été facilitée.

J'exprime ma gratitude la plus profonde à Monsieur le professeur **Théo A. HANSEN**, du Département de Microbiologie, Université de Groningen, Pays-Bas, pour avoir su, à travers ses nombreuses publications et au cours de nos fructueuses discussions, me transmettre ses connaissances et sa passion du métabolisme des bactéries anaérobies, et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteur; qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur **Pierre CAUMETTE**, Maître de conférence à l'Université Aix-Marseille III, pour m'avoir apporté sa compétence de spécialiste des bactéries sulfato-réductrices en jugeant ce travail comme rapporteur.

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur **Jean Pierre BELAICH**, Professeur de Microbiologie à l'Université de Provence, qui a bien voulu faire partie de ce jury.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur **René MOLETTA**, Directeur de recherche, responsable de la station d'Oenologie et de Biotechnologie de l'Environnement des Industries Agro-alimentaires de l'INRA, pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux, et pour sa participation à ce jury. Je n'oublierai pas ses qualités humaines, sa constante disponibilité et son indéfectible amitié.

Comment oublier la compétence et la bonne humeur de **Bernard OLLIVIER**, chargé de recherche à l'ORSTOM; qu'il soit assuré de ma sympathie et de mes remerciements.

Je remercie **Jean-Louis CARSOL** et **Jean-Luc CAYOL** pour leur assistance technique; **Jean-Louis BATTLE** et **Joe RAYNAL**, ingénieurs à l'INRA, pour leur aide et leur gentillesse.

Je remercie l'ensemble du personnel des équipes des laboratoires ORSTOM et INRA pour leur aide constante et leur chaleur humaine qui m'ont été précieuses pour la réalisation de ce travail.

Qu'il me soit permis d'exprimer toute ma gratitude et ma considération à la famille **NIVIERE** pour son aide constante aussi bien matérielle que morale qui m'a été prodiguée lors de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens enfin à remercier l'ORSTOM et l'INRA qui m'ont assuré une allocation pour mener à bien ces recherches.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
--------------	---

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION	3
--------------	---

1-1. Classification des bactéries sulfatoréductrices (BSR) et métabolisme de H₂ chez les espèces du genre *Desulfovibrio*

1. Réduction dissimilatrice du sulfate	4
2. Historique-Evolution des BSR	4
3. Classification des BSR	5
4. Propriétés physiologiques et biochimiques des espèces du genre <i>Desulfovibrio</i>	9
4.1. Les espèces "classiques" du genre <i>Desulfovibrio</i>	9
4.2. <i>Desulfovibrio carbinolicus</i> , <i>Desulfovibrio fructosovorans</i> et <i>Desulfovibrio giganteus</i>	11
4.3. <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Norway 4 et <i>Desulfovibrio baculatus</i>	12
4.4. <i>Desulfovibrio thermophilus</i> et <i>Thermodesulfobacterium commune</i>	12
4.5. <i>Desulfovibrio sulfodismutans</i>	13
4.6. <i>Desulfovibrio saporans</i>	13
4.7. <i>Desulfovibrio baarsii</i>	13
5. Protéines d'oxydoréduction chez <i>Desulfovibrio</i>	14
5.1. Cytochromes	15
5.2. Ferrédoxines et Flavoprotéines	16
5.3. Autres protéines d'oxydoréduction	16
5.4. Hydrogénases	17
6. Métabolisme des bactéries sulfatoréductrices du genre <i>Desulfovibrio</i>	17
6.1. Voie de réduction du sulfate	18
6.2. Réduction d'autres accepteurs d'électrons	20
6.3. Métabolisme de H ₂ et rôle de l'hydrogénase chez <i>Desulfovibrio</i>	21
6.3.1. Modèle de recyclage de H ₂	22
6.3.2. Modèle de régulation rédox par production de traces d'H ₂	23

1-2. Rôle de l'accepteur terminal dans la dégradation du glycérol et du 1,3-propanediol par les bactéries anaérobies

1. Métabolisme du glycérol	26
1.1. les bactéries aérobies	26
1.2. les bactéries homoacétogènes	28
1.3. Les clostridies	30

1.4. Les lactobacilles	31
1.5. <i>Anaerovibrio glycerini</i>	33
1.6. Les bactéries sulfatoréductrices du genre <i>Desulfovibrio</i>	34
2. Métabolisme des diols	37
2.1. Les bactéries du genre <i>Pelobacter</i>	37
2.2. Les bactéries sulfatoréductrices du genre <i>Desulfovibrio</i>	39

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1. Origine et maintien de la culture mixte indéfinie	44
1.1. Origine	44
1.2. Maintien	44
2. Milieu de culture	46
2.1. Composition	46
2.2. Préparation	46
3. Conditions de culture	47
4. Méthodes analytiques	48
4.1. Analyse de la phase liquide	48
4.1.1. Dosage enzymatique des alcools et des acides organiques	48
4.1.2. Dosage de l'acroléine	49
4.1.3. Dosage des aldéhydes	50
4.1.4. Détermination du carbone organique total dissous (COT)	50
4.1.5. Dosage du 1,3-propanediol	50
4.1.6. Dosage des acides gras volatils (AGV)	51
4.1.7. Dosage du sulfate	52
4.2. Analyse de la phase gazeuse	53
5. Techniques de l'anaérobiose	54
5.1. Manipulations à l'abri de l'oxygène	54
5.1.1. Boîte à gants anaérobie	54
5.1.2. Technique de Hungate, modifiée par Bryant	55
6. Milieux de culture	56
6.1. Composition	56
6.2. Préparation	57
7. Techniques de numérations	58
7.1. Estimation de la densité bactérienne par MPN (Most Probable Number)	58
7.1.1. Prélèvement de l'échantillon	58
7.1.2. Ensemencement	58
7.1.3. Lecture des résultats et détermination du nombre de bactéries	59
7.2. Estimation par comptage direct	59

8. Purification des bactéries sulfatoréductrices	59
8.1. Milieu de culture	59
8.2. Ensemencements et dilutions	60
8.3. Isolements	60
9. Etudes des bactéries sulfatoréductrices en culture pure	60
9.1. Etude des caractères morphologiques	60
9.2. Etude des caractères physiologiques	61
9.2.1. Etude des paramètres physico-chimiques de la croissance	61
9.2.1.1. Température optimale de croissance	61
9.2.1.2. pH optimum de croissance	61
9.2.1.3. Comportement vis-à-vis de la salinité	61
9.2.1.4. Etude nutritionnelle	62
9.3. Etude des caractères biochimiques	62
9.3.1. Etude de la composition en bases de l'ADN	62
9.3.2. Détection des cytochromes et de la désulfovirdine	62
10. Etude de BSR en cultures mixtes définies	63
10.1. Origine des microorganismes	63
10.2. Milieu et conditions de croissance	63
10.2.1. Milieu de culture	63
10.2.2. Détermination des rendements de croissance	64
11. Méthodes analytiques des études bactériologiques	64
11.1. Analyse de la phase liquide	64
11.1.1. Dosage des AGV	65
11.1.2. Dosage des alcools et des acides organiques	65
11.1.3. Dosage du 3-hydroxypropionate	65
11.1.3.1. Séparation	65
11.1.3.2. Dosage	66
11.1.4. Dosage des sulfures	67
11.2. Analyse de la phase gazeuse	67
11.2.1. Dosage du méthane	67
11.2.2. Dosage de l'hydrogène	67

CHAPITRE 3 : ROLE DE LA SULFATOREDUCTION DANS LE METABOLISME ANAEROBIE DU LACTATE - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE DEUX BSR DOMINANTES SUR LACTATE ET PROPIONATE

3-1 Rôle de la sulfatoréduction dans la digestion anaérobie du lactate, du propionate et de l'acétate par une culture mixte indéfinie.

1. Dégradation anaérobie du lactate	68
2. Dégradation anaérobie du propionate	70
3. Dégradation anaérobie de l'acétate	72
4. Relation entre sulfato-réduction et Méthanogénèse	73
5. Dénombrement des bactéries impliquées dans le métabolisme du lactate	76
6. Discussion	78

3-2 Isolement et caractérisation de deux bactéries sulfatoréductrices dominantes sur lactate (souche dQ) et sur propionate (souche dFC3)

1. Isolement des souches dQ et dFC3	81
2. Caractérisation des souches dQ et dFC3	81
2.1. Souche dQ	81
2.1.1. Morphologie comparée	81
2.1.2. Donneurs et Accepteurs d'électrons utilisés par la souche dQ	83
2.1.3. Conditions optimales de croissance de la souche dQ	85
2.2. Souche dFC3	87
2.2.1. Morphologie comparée	87
2.2.2. Donneurs et accepteurs d'électrons utilisés par la souche dFC3	89
2.2.3. Conditions optimales de croissance de la souche dFC3	90
3. Discussion	90

CHAPITRE 4 : FERMENTATION DU GLYCEROL ET DES DIOLS PAR LES BACTERIES SULFATO - REDUCTRICES DU GENRE *DESULFOVIBRIO*

4-1. Réduction du sulfate et fermentation du glycérol et du 1,3-propanediol par une culture mixte indéfinie

1. Dégradation anaérobie du glycérol	93
1.1. Fermentation du glycérol en l'absence de sulfate	93
1.2. Fermentation du glycérol en présence de sulfate et molybdate	94
1.3. Fermentation du glycérol en fonction du rapport carbone/soufre (C/S)	95
1.3.1. Glycérol, 10,7 g/l; Sulfate, 2,2 g/l (C/S = 6,1)	96
1.3.2. Glycérol, 4,1 g/l; Sulfate 2,2 g/l (C/S = 2,1)	97
1.4. Bilans carbonés	98
2. Dégradation anaérobie du 1,3-propanediol	99
2.1. Première technique d'incubation	100
2.2. Deuxième technique d'incubation	100

2.3. Rôle de la sulfatoréduction et de la méthanogénèse dans la dégradation anaérobie	
du 1,3-propanediol -----	101
3. Dénombrement des groupes bactériens impliqués dans le métabolisme du glycérol et du	
1,3-propanediol -----	103
4. Discussion -----	104
4-2. Isolement et caractérisation d'une nouvelle espèce de bactérie sulfatoréductrice, <i>Desulfovibrio alcoholovorans</i> sp. nov. (souche SPSN), dominante sur 1,3-propanediol	
1. Isolement de la souche SPSN -----	108
2. Morphologie cellulaire -----	108
3. Etude physiologique -----	110
3.1. Effet de la température sur la croissance -----	110
3.2. Effet du pH sur la croissance -----	110
3.3. Effet de la concentration en NaCl sur la croissance -----	110
3.4. Etude nutritionnelle -----	110
3.4.1. Donneurs d'électrons -----	110
3.4.2. Accepteurs d'électrons -----	113
4. Etude biochimique -----	114
4.1. Pigments -----	114
4.2. Composition en base de l'ADN (G+C%) -----	115
5. Discussion -----	115
4-3. Implication des bactéries sulfatoréductrices du genre <i>Desulfovibrio</i> dans l'oxydation du 1,3-propanediol par transfert interspécifique d'hydrogène dans les milieux pauvres en sulfate	
1. Enrichissement -----	118
2. Effet de l'addition d' H ₂ sur la croissance de l'enrichissement -----	119
3. Effet de l'addition de sulfate sur le métabolisme du 1,3-propanediol -----	119
4. Identification de la souche DFG -----	120
4.1. Isolement -----	120
4.2. Morphologie cellulaire -----	121
4.3. Etudes physiologiques -----	122
4.3.1 Effet de la température sur la croissance -----	122
4.3.2 Effet du pH sur la croissance -----	122
4.3.3. Effet de la concentration en NaCl sur la croissance -----	122
4.4. Etude nutritionnelle -----	124
4.4.1. Donneurs d'électrons -----	124

4.4.2. Accepteurs d'électrons -----	125
4.5. Etudes biochimiques -----	126
4.5.1. Composition en base de l'ADN (G+C %) -----	126
4.5.2 Pigments -----	126
5. Discussion -----	127
4-4. Compétition entre <i>Desulfovibrio</i> sp. souche DFG et <i>Sporomusa acidovorans</i> pour le glycérol	
1. Dégradation du glycérol par <i>S. acidovorans</i> en culture pure -----	130
2. Compétition entre <i>Desulfovibrio</i> sp. souche DFG et <i>S. acidovorans</i> -----	130
3. Discussion -----	133
4-5. Dégradation anaérobie des composés réduits tels que le glycérol, le 1,2-propanediol et le 1,3-propanediol par <i>Desulfovibrio alcoholovorans</i> en culture pure et par transfert interspécifique d'hydrogène	
1. Dégradation anaérobie du 1,2-propanediol -----	135
2. Dégradation anaérobie du 1,3-propanediol -----	138
3. Dégradation anaérobie du glycérol -----	141
4. Discussion -----	142
4-6. Dissimilation du glycérol par les espèces du genre <i>Desulfovibrio</i>	
1. Introduction -----	149
2. Dissimilation du glycérol par les espèces du genre <i>Desulfovibrio</i> en présence de sulfate et en association avec <i>Methanospirillum hungatei</i> -----	149
3. Effet des repiquages successifs sur le métabolisme du glycérol par les espèces du genre <i>Desulfovibrio</i> -----	152
4. Effet du lactate sur la dissimilation du glycérol par les espèces du genre <i>Desulfovibrio</i> -----	155
5. Effet du 1,2-propanediol sur la dissimilation du glycérol par <i>D. carbinolicus</i> et <i>D. fructosovorans</i> -----	156
6. Effet de la dismutation du glycérol sur la fermentation du fructose par <i>D. fructosovorans</i> -----	157
7. Discussion -----	158
CONCLUSIONS -----	162
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	166
ANNEXES -----	187

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'oxydation des différents intermédiaires de la digestion anaérobie de la matière organique tels que les acides gras volatils (AGV), les alcools et l'hydrogène par les bactéries sulfatoréductrices (BSR), dans des habitats tels que les sédiments lacustres ou marins, a été étudiée par plusieurs auteurs (Banat *et al.*, 1981; Smith et Klug, 1981; Balbat et Nedwell, 1982). La compétition pour l'hydrogène et l'acétate entre bactéries sulfatoréductrices et méthanogènes dans ces sédiments ou dans des cultures mixtes a été largement établie (Jørgensen, 1977; Winfrey et Zeikus, 1977; Abram et Nedwell, 1978 a, 1978 b; Mountfort *et al.*, 1980; Sorensen, 1981). Les principaux composés organiques constituant les eaux résiduaires de la distillation vinicole, sont le glycérol et le lactate; ils représentent approximativement 60% du carbone total dissous (Tableau 2.1, Matériels et méthodes). Le propionate est le principal acide gras volatil qui s'accumule durant la digestion anaérobie de cette eau résiduaire (Segrétaïn et Moletta, 1987; Qatibi et Bories, 1988). Comme cela a été observé dans d'autres écosystèmes méthanogènes (Cohen *et al.*, 1982), l'acétogénèse à partir du propionate est l'étape limitante (et à un moindre degré celle à partir du 1,3-propanediol, chapitre 4-1) de tout le processus méthanogène de cette eau résiduaire; par contre il est moins fréquent qu'il y ait une limitation de la méthanisation par la dégradation de l'acétate (Kennedy *et al.*, 1985). Néanmoins, ce composé s'accumule généralement pendant le traitement de cette eau résiduaire, en proportion beaucoup plus importante que dans les sédiments lacustres ou marins.

La digestion anaérobie est la meilleure voie de dépollution de ces déchets (Bories, 1981; Bories *et al.*, 1982). D'un point de vue économique, elle permet le contrôle de la pollution et produit du biogaz avec un potentiel énergétique directement utilisable. Dans cet écosystème, et contrairement aux sédiments lacustres ou marins, la sulfatoréduction a été très peu étudiée sur le plan fondamental. Il était donc important d'avoir des données sur le rôle des BSR dans le processus de digestion anaérobie de ces déchets qui contiennent des quantités non négligeables de sulfates.

La première partie de ce mémoire est consacrée à l'étude du rôle de ces bactéries dans la dégradation anaérobie du lactate et ses produits de fermentation, le propionate, l'acétate et l'hydrogène par une culture mixte indéfinie traitant des effluents de distillations vinicoles. Différents dénombrements ont été réalisés afin de déterminer l'importance de chaque groupe bactérien impliqué dans ce métabolisme; des isollements de bactéries sulfatoréductrices dominantes sur lactate et propionate ont été également effectués.

Le glycérol est le deuxième composé majeur de cette eau résiduaire, et le 1,3-propanediol constitue un intermédiaire important de sa dégradation (Laroche, 1983; Qatibi et Bories, 1988). La production de 1,3-propanediol a été également observée dans les eaux résiduaires de certaines industries (Noves et Watkins, 1985). Il a été également démontré que ce composé peut être dégradé en méthane par une boue anaérobie, traitant une eau résiduaire industrielle (Symons et Buswell, 1933).

De récentes études ont étendu la gamme des substrats utilisés par les espèces du genre *Desulfovibrio* tels que les acides aminés (Stams *et al.*, 1985), le méthanol (Braun et Stolp, 1985), le fructose (Ollivier *et al.*, 1988) et le saccharose (Joubert et Britz, 1987). Il a été également démontré que le glycérol est une source d'énergie et de carbone utilisable par certaines bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* en culture pure (Stams *et al.*, 1985; Nanninga et Gottschal, 1986, 1987; Ollivier *et al.*, 1988; Esnault *et al.*, 1988).

Très peu d'études ont concerné le métabolisme du glycérol et du 1,3-propanediol par les bactéries sulfatoréductrices. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier le métabolisme de ces deux composés retrouvés dans cette eau résiduaire. Notre travail a consisté, dans la deuxième partie de ce mémoire, à étudier l'effet de la sulfato-réduction sur la dégradation anaérobie du glycérol et du 1,3-propanediol par la culture mixte indéfinie. Des dénombrements ainsi que des isollements de bactéries sulfatoréductrices utilisant ces substrats réduits, ont été effectués. La compétition pour le glycérol entre une bactérie sulfatoréductrice du genre *Desulfovibrio*, isolée d'une culture d'enrichissement et une bactérie homoacétogène a été ensuite abordée. Nous avons également étudié la dégradation anaérobie du glycérol, du 1,2-propanediol et du 1,3-propanediol par une espèce du genre *Desulfovibrio*, *Desulfovibrio alcoholovorans* (Qatibi *et al.*, 1990) en culture pure, en présence de sulfate ou en association avec *Methanospirillum hungatei*, ainsi que l'effet de l'accepteur terminal d'électrons sur la dissimilation du glycérol par *Desulfovibrio fructosovorans* et *Desulfovibrio carbinolicus*.

1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Ce chapitre fait le point de la littérature sur la physiologie et le métabolisme des bactéries sulfatoréductrices (BSR), un groupe bactérien dont la connaissance ne cesse d'évoluer. La découverte de nouvelles espèces ou genres n'arrête pas, en effet, de remettre en question les connaissances déjà acquises tant sur le plan physiologique que biochimique. Une revue bibliographique concernant le métabolisme des composés réduits tels que le glycérol et le 1,3-propanediol, par les bactéries sera également examinée.

Nous aborderons donc en premier lieu la classification taxonomique des BSR et le métabolisme de l'hydrogène en insistant plus particulièrement sur les espèces du genre *Desulfovibrio* dont l'activité métabolique est très diverse (chapitre 1-1). Nous ferons ensuite le point sur le métabolisme du glycérol et le 1,3-propanediol, jusqu'à présent très peu étudié chez les espèces du genre *Desulfovibrio*. Ce métabolisme parfaitement appréhendé chez les bactéries aérobies, demeure encore mal connu chez les anaérobies, notamment chez les bactéries sulfatoréductrices (chapitre 1-2).

Chapitre 1-1

Classification des bactéries sulfatoréductrices et métabolisme de l'hydrogène chez les espèces du genre *Desulfovibrio*

1. REDUCTION DISSIMILATRICE DU SULFATE

La réduction dissimilatrice du sulfate est un processus au cours duquel l'énergie est obtenue par l'oxydation de certains composés organiques ou inorganiques avec une réduction concomitante de sulfate. Ceci est réalisé par un groupe spécialisé, mais très diversifié, de bactéries anaérobies strictes, les bactéries sulfatoréductrices (BSR). C'est probablement l'une des formes de vie les plus anciennes rencontrées sur terre (Pfennig *et al.*, 1981). Elles réduisent le sulfate en sulfure, un processus énergétique permettant la synthèse d'ATP.

La réduction dissimilatrice du sulfate est caractérisée par la présence d'enzymes constitutifs, l'accumulation des sulfures et l'existence de phosphorylations oxydatives liées au transport d'électrons; elle est distincte de la réduction assimilatrice que l'on rencontre chez les plantes vertes, les algues, les champignons et beaucoup de bactéries aérobies, et qui permet à ces organismes de se procurer des composés soufrés réduits, nécessaires à leurs biosynthèses. La réduction du sulfate est une véritable respiration où l'oxygène est remplacé par le sulfate, d'où la terminologie "respiration sulfate". Ce processus peut également désigner tous les processus conduisant à la formation de sulfures tels que la réduction dissimilatrice des composés soufrés comme le sulfate, le sulfite, le thiosulfate, le soufre élémentaire et la fermentation de la cystéine.

2. HISTORIQUE-EVOLUTION DES BSR

La production de sulfures dans les eaux a été reconnue pour la première fois comme un processus biologique par Meyer (1864, cité par Widdel), qui supposa que cette réaction était obtenue par certaines algues. Peu d'années après, Cohn attribue ce phénomène à des microorganismes filamenteux du genre *Beggiatoa* (Widdel, 1988). En 1895, Beijerinck (cité par Widdel, 1988) obtient en culture mixte les premières BSR responsables de ce processus. Il les décrit sous le nom de *Spirillum desulfuricans*, rebaptisé ultérieurement *Desulfovibrio desulfuricans*. La première culture pure de cette bactérie est obtenue par Van Delden en 1903 (cité par Widdel, 1988). En 1930, Baars fait une étude plus détaillée de plusieurs cultures de BSR, et regroupe ces bactéries dans le genre *Vibrio*. Cependant, il décrit à part une souche capable de métaboliser l'acétate, le propionate et le butyrate en gaz carbonique, alors que les autres en sont incapables (cité par Widdel, 1988).

Selwyn et Postgate (1959), après plusieurs tentatives d'isolement de souches capables de réaliser ce métabolisme, déduisent que la souche de Baars est impure et que les BSR oxydant les acides gras à courtes chaînes n'existent pas. De ce fait, jusqu'à la fin des années 1970, les BSR ont été longtemps considérées comme un petit groupe hautement spécialisé, avec une

versatilité métabolique très réduite. Elles étaient classées en deux genres, *Desulfotomaculum* et *Desulfovibrio* (Campbell et Postgate, 1965; Postgate et Campbell, 1966). Tout récemment, l'équipe allemande de Pfennig et Widdel a isolé les premières BSR capables d'utiliser les substrats décrits par Baars (Pfennig et Biebl, 1976; Widdel et Pfennig, 1977; Widdel, 1980; Widdel et Pfennig, 1981; Widdel et Pfennig, 1982). Depuis 1895 et jusqu'en 1980, on admettait l'existence de seulement 3 genres de BSR : *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* et *Desulfomonas* (Moore *et al.*, 1976). Jusqu'en 1977, on admettait que les espèces représentatives de ces trois genres, étaient incapables d'utiliser l'acétate comme source d'énergie et que l'oxydation du lactate et de l'éthanol en acétate était incomplète.

3. CLASSIFICATION DES BSR

L'isolement de la première BSR sporulante capable d'oxyder l'acétate, *Desulfotomaculum acetoxidans* (Widdel et Pfennig, 1977), a permis la découverte et la description d'un grand nombre de nouveaux genres différents, tant sur le plan morphologique que nutritionnel : *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema*, et *Desulfobacterium*. De nouvelles espèces ont ensuite été décrites : *Desulfovibrio sapovorans* (Widdel, 1980), *D. sulfodismutans* (Bak et Pfennig, 1987) et *D. baarsii* (Jansen *et al.*, 1985) (Tableaux 1.1 et 1.2). Dans la dernière édition du Manuel de Bergey, Widdel et Pfennig (1984) proposèrent une classification de ces microorganismes sur la base de leur morphologie et définirent huit genres. Widdel (1988) a proposé depuis une classification actualisée et détaillée (Tableau 1.1). D'un point de vue physiologique et métabolique, on peut distinguer deux types de BSR : celles qui oxydent incomplètement les substrats carbonés en acétate et celles qui dégradent complètement les substrats carbonés en CO₂ (Tableau 1.2). Cette classification physiologique ne recoupe pas exactement celle qui est basée sur la morphologie; il existe en effet des espèces de *Desulfovibrio* et de *Desulfotomaculum* qui dégradent complètement leurs substrats carbonés (Tableau 1.2).

Les relations phylogéniques existant entre BSR et bactéries sulforéductrices obligatoires (BS[°]R), ont été déterminées par Fowler et collaborateurs (1986). Elles montrent une différenciation nette entre les BSR sporulées du genre *Desulfotomaculum*, qui sont liées à la branche des Clostridies, et les autres BSR ou BS[°]R non sporulées. Ces dernières ont pu être séparées en 3 groupes :

- les BS[°]R obligatoires (genre *Desulfuromonas*)
- les bactéries du genre *Desulfovibrio*
- les 5 autres genres : *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfonema* et *Desulfosarcina*.

Ces trois groupes paraissent d'une manière phylogénétique faiblement cohérents, mais tous liés aussi bien avec les myxobactéries (aérobies) que le genre *Bdellovibrio*. En outre, des études portant sur l'analyse de composés cellulaires (Chimiotaxonomie) et des acides nucléiques des BSR sont en accord dans la majorité des cas, avec la classification actuelle basée essentiellement sur des critères nutritionnels et morphologiques.

Le fait que pratiquement toutes les études biochimiques et physiologiques des BSR aient été réalisées sur les espèces "classiques" du genre *Desulfovibrio*, et à un degré moindre sur les espèces du genre *Desulfotomaculum* (Peck et Le Gall, 1982; Postgate, 1984 a; Le Gall et Fauque, 1988; Peck et Lissolo, 1988), rend difficile la classification des BSR sur d'autres critères que les critères morphologiques et physiologiques.

Récemment, des études biochimiques et physiologiques ont porté sur d'autres genres de BSR, tels que *Desulfobacter* (Brandis-Heep *et al.*, 1983; Gebhardt *et al.*, 1983; Schauder *et al.*, 1986; Möller-Zinkhan et Thauer, 1988), *Desulfobulbus* (Stams *et al.*, 1984; Samain *et al.*, 1986; Kremer et Hansen 1988), *Desulfobacterium* (Schauder *et al.*, 1987; Brysch *et al.*, 1987) et *Desulfovibrio baarsii* (Jansen *et al.*, 1985).

Récemment encore, des études comparatives de l'ARN 16S de 22 espèces de BSR appartenant à des genres différents, ont permis de les classer en 7 groupes (Devereux *et al.*, 1989). Les relations phylogénétiques existant entre ces espèces sont en accord avec les données physiologiques (Devereux *et al.*, 1989).

Il est clair que les bactéries sulfatoréductrices appartiennent à des groupes phylogénétiquement divers; la généralisation des études de biochimie ou physiologie ne peut être faite de façon aisée, surtout si l'on considère qu'on connaît mal les propriétés biochimiques ou physiologiques de beaucoup de nouveaux genres.

Par conséquent, des études systématiques supplémentaires sont nécessaires pour affiner la classification des BSR. L'isolement d'autres espèces entraînera des aménagements constants de la classification actuelle. Il est à noter qu'avec la description de nouvelles souches, le nombre de substrats utilisés par les bactéries sulfatoréductrices a augmenté (Hansen, 1988; Widdel, 1988).

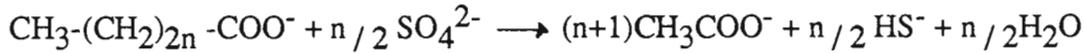
Tableau 1.1 Classification Morphologique des Bactéries Sulfatoréductrices

Genre	Morphologie	Références
<i>Desulfovibrio</i>	vibrio, spirille, bacille incurvé	Potgate et Campbell (1966)
<i>Desulfotomaculum</i>	bacille sporulé	Campbell et Postgate (1965)
<i>Desulfomonas</i>	bacille droit non mobile	Moore <u>et al.</u> (1976)
<i>Desulfomicrobium</i>	petit bâtonnet	Rozanova <u>et al.</u> (1988)
<i>Desulfobulbus</i>	bacille citriforme	Widdel et Pfennig (1982)
<i>Thermodesulfobacterium</i>	bâtonnet	Rozanova et Khudrakova (1974)
<i>Desulfobacterium</i>	bâtonnet, parfois incurvé	Widdel (1988)
<i>Desulfobacter</i>	bacille de forme ellipsoïdale	Widdel et Pfennig (1981)
<i>Desulfosarcina</i>	sarcine, coques en paquet	Widdel (1980)
<i>Desulfococcus</i>	coque	Pfennig <u>et al.</u> (1981)
<i>Desulfonema</i>	filament	Widdel <u>et al.</u> (1983)

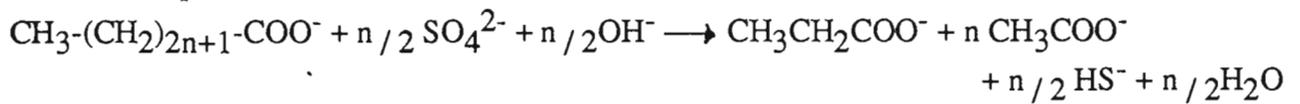
Tableau 1.2 Classification Physiologique des Bactéries Sulfatoréductrices

* Oxydation incomplète des substrats organiques

-Substrats pairs :



-Substrats impairs :



Desulfovibrio : *africanus* ; *carbinolicus* ; *desulfuricans* ; *fructosovorans* ; *furfuralis* ; *giganteus* ; *gigas* ; *salexigens* ; *sapovorans* ; *simplex* ; *sulfodismutans* ; *vulgaris* ;

Desulfotomaculum : *nigrificans* ; *orientis* ; *ruminis* ; *antarticum* ; *guttoideum* ; *kutnevsovii*

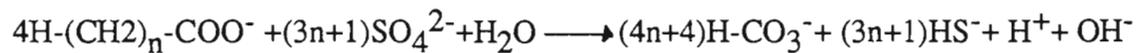
Desulfobulbus : *elongatus* ; *propionicus*

Desulfomonas : *pigra*

Thermodesulfobacterium : *commune* ; *mobile* .

Desulfomicrobium : *aspheronum* ; *baculatus*

*Oxydation complète des substrats organiques



Desulfobacterium : *anilini* ; *autotrophicum* ; *catecholicum* ; *indolicum* ; *macestii* ; *phenolicum* ; *vacuolatum*

Desulfovibrio : *baarsii*

Desulfotomaculum : *acetoxidans* ; *geothermicum* ; *sapomandans*

Desulfobacter : *curvatus* ; *hydrogenophilus* ; *latus* ; *postgatei*

Desulfococcus : *multivorans* ; *niacini*

Desulfonema : *limicola* ; *magnum*

Desulfosarcina : *variabilis*

la récente découverte du genre *Archaeoglobus* (Stetter, 1988) a révélé l'existence de bactéries sulfatoréductrices appartenant aux archéobactéries (Zellner *et al.*, 1989) et représentant une troisième branche au sein de ce groupe. Elles ont été isolées de sédiments et possèdent l'unique particularité de réaliser une sulfatoréduction dissimilatrice en extrême thermophilie (Zellner *et al.*, 1989); *Archaeoglobus fulgidus* (souche VC-16) a un optimum de croissance situé à 83°C (Stetter, 1988), alors que celui de *Archaeoglobus fulgidus* (souche Z) se situe entre 75 et 80°C (Zellner *et al.*, 1989). Ces deux souches ont été isolées de sédiments provenant du système hydrothermal marin de la région volcanique du Vulcano (Italie). *Archaeoglobus fulgidus* (souche VC-16) est la première représentante des BSR au sein des Archéobactéries. En effet, jusqu'à présent, les BSR appartenaient toutes aux eubactéries, et étaient mésophiles ou thermophiles modérées. Ces archéo-BSR fluorescent à 420 nm, comme les bactéries méthanogènes (Stetter, 1988; Zellner *et al.*, 1989). Le composé responsable de cette fluorescence est, pour la souche VC-16, une 8-OH-5-dézaflavine, similaire au F₄₂₀ des bactéries méthanogènes. Par contre aucun facteur F₄₃₀ n'a pu être détecté et la présence du CoM n'est pas évidente. La production de méthane est en effet très faible (max = 0,01 mmol.ml⁻¹), comparable aux très faibles productions décrites pour certaines bactéries (Schauder *et al.*, 1986).

L'appartenance à la troisième branche des archéobactéries est due à la présence d'une membrane cellulaire de type archéobactérien et d'une ARN polymérase d'un type nouveau, possédant huit sous-unités de poids moléculaires différents. Cette sulfatoréduction réalisée à des températures extrêmes par des archéobactéries sulfatoréductrices, pourrait expliquer les résultats de Zobell (1957) sur la croissance de BSR jusqu'à une température de 104 °C et une pression de 1000 bars. Stetter et collaborateurs (1987), estiment que les quantités de sulfate d'origine magmatique, présentes localement dans les systèmes hydrothermiques anciens, permettraient de relier cette sulfatoréduction extrême à la subsistance d'un ancien type de métabolisme.

4. PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES ESPECES DU GENRE *DESULFOVIBRIO*

4.1. Les espèces "classiques" du genre *Desulfovibrio*

Ce genre est connu depuis longtemps et comprend principalement cinq espèces (Postgate et Campbell, 1966) : *D. gigas*, *D. salexigens*, *D. desulfuricans*, *D. vulgaris* et *D. africanus*. Toutes ces espèces ont en commun la capacité d'utiliser le lactate, le pyruvate, l'hydrogène moléculaire et le formate comme sources d'énergie en présence de sulfate; elles contiennent des cytochromes de type *c*; elles sont mobiles et Gram négatif (Postgate, 1984a). Dans toutes ces

souches, le cytochrome majoritaire est un cytochrome tétrahémique de type *c*₃. A l'exception de quelques espèces comme *D.desulfuricans* Norway 4 (voir paragraphe 5.3), ce sont des cellules incurvées, vibrioïdes, spirilloïdes ou sigmoïdes. Elles contiennent une sulfite réductase de type désulfovirdine (Postgate, 1984a). Les substrats utilisés sont le malate, le fumarate, le succinate, l'éthanol, des alcools primaires supérieurs, la choline, le glycérol, l'oxamate, l'oxalate, la cystéine, l'alanine, l'aspartate, la sérine, la thréonine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la glycine, le furfural, le (poly)éthylène glycol et le monoxyde de carbone (Lupton *et al.* , 1984b; Postgate, 1984a; Stams *et al.* , 1985; Dwyer et Tiedje, 1986).

Le malate et l'éthanol sont les substrats les plus couramment utilisés (Postgate, 1984a; Kremer *et al.* , 1988; Kremer *et al.* , 1989). A l'exception des aminoacides à chaîne branchée, qui sont désaminés et décarboxylés (Stams *et al.* , 1985), et les alcools supérieurs qui sont oxydés en leur acide gras correspondant (Postgate, 1984a), tous les substrats contenant des liaisons c-c, et qui sont plus réduits que l'acétate, sont oxydés en acétate (Postgate, 1984a; Widdel, 1988). L'hydrogène moléculaire est une excellente source d'énergie, mais aucune croissance autotrophe n'a été observée avec ce substrat: en effet, la croissance nécessite l'acétate comme source de carbone (Sorokin, 1966; Brandis et Thauer, 1981).

Les critères taxonomiques pour séparer les souches de *Desulfovibrio* "classiques" ne sont pas satisfaisants (Skyring *et al.* , 1977; Postgate, 1984a). Cette classification est basée sur des petites différences d'utilisation de substrats. Citons par exemple, la capacité à faire fermenter le pyruvate et la choline chez *D.desulfuricans*. Les besoins en NaCl, la morphologie et la présence de flagelles sont les principaux critères pour la classification de ces souches en cinq espèces mentionnées ci-dessus (Postgate et Campbell, 1966). *D.salexigens* constitue une espèce à part du fait de la composition en base de son ADN : elle est en effet, de 46% alors que chez les autres espèces, elle se situe entre 55 et 61% (Postgate, 1984a). Récemment cependant, Zellner et collaborateurs (1989) ont isolé d'un digesteur, une nouvelle espèce du genre *Desulfovibrio* appelée *D.simplex* et ayant une composition en G+C de 47,5%. Mais elle est différente de *D.salexigens* par le fait qu'elle ne requiert que des traces de NaCl pour sa croissance et par son incapacité à utiliser un certain nombre de substrats tels que, la choline, le glucose et le glycérol. Récemment encore, des études sérologiques avec des antigènes de membrane cellulaire (Abdollahi et Nedwell, 1980; Singleton *et al.* , 1985), ou des antigènes d'enzymes purifiées (Aketagawa *et al.* , 1985a), ou encore des antigènes de protéines de l'enveloppe cellulaire (Norqvist et Roffey, 1985) ont montré que les réactions immunologiques croisées existant entre les souches de différentes espèces ne sont pas plus grandes entre les souches appartenant à la même espèce qu'entre les souches appartenant à des espèces différentes. Par contre, les propriétés antigéniques des protéines de l'enveloppe cellulaire des

souches de *D.salexigens* sont différentes des autres espèces de *Desulfovibrio* (Norqvist et Roffey, 1985); ceci est en accord avec les compositions en G+C % de l'ADN mentionnées ci-dessus et les habitats de ces espèces. Mais beaucoup de nouvelles souches ont été décrites, non encore classées au niveau de l'espèce (Skyring *et al.* , 1977; Stams *et al.* , 1985).

4.2. *Desulfovibrio carbinolicus*, *Desulfovibrio fructosovorans* et *Desulfovibrio giganteus*

De nouvelles espèces ont été isolées récemment; elles ressemblent aux espèces du genre *Desulfovibrio* déjà décrites mais avec des propriétés physiologiques différentes :

D.carbinolicus , non mobile, est la seule espèce capable d'utiliser le méthanol comme source d'énergie (Nanninga et Gottschal, 1986, 1987); en présence de sulfate, le glycérol et le 1,3-propanediol sont oxydés en 3-hydroxypropionate. (Nanninga et Gottschal, 1986, 1987, chapitres 4-2, 4-5 et 4-6).

D.fructosovorans est la seule espèce du genre *Desulfovibrio* capable d'oxyder le fructose en acétate en présence de sulfate (Ollivier *et al.* , 1988). (rappelons que *D.salexigens* utilise le glucose (Zellner *et al.* , 1989)). En l'absence de sulfate, le fructose est fermenté en acétate, succinate et des traces d'éthanol (Cord-Ruwisch, 1987; Ollivier *et al.* , 1988, chapitre 4-6). Cette espèce oxyde le glycérol en acétate, en présence de sulfate (Ollivier *et al.* , 1988, chapitre 4-6); Le 1,3-propanediol est oxydé en 3-hydroxypropionate, en présence de sulfate (chapitres 4-2 et 4-5).

En l'absence de sulfate, le glycérol est dismuté par les deux espèces en 3-hydroxypropionate et 1,3-propanediol (Nanninga et Gottschal, 1986, 1987; Cord-Ruwisch, 1987; Ollivier *et al.* , 1988, chapitre 4-6). Il est probable que cette dismutation du glycérol s'effectue via la 3-hydroxypropionaldéhyde (voir chapitre 4-6), comme chez certaines espèces du genre *Lactobacillus* (Sobolov et Smiley, 1960), *Klebsiella pneumoniae* (Slininger *et al.* , 1983), *Pelobacter carbinolicus* (Schink, 1984), *Pelobacter venetianus* (Schink et Stieb, 1983) et *Ilyobacter polytropus* (Stieb et Schink, 1984).

Il est étonnant de constater que la seule différence physiologique existant entre ces deux espèces est la nature du produit final de l'oxydation du glycérol en présence de sulfate. Par contre, la conversion du 1,3-propanediol aboutit à la formation du même produit terminal, le 3-hydroxypropionate (chapitre 4-5). Pour comprendre cette différence métabolique, nous avons testé l'effet de l'accepteur terminal d'électrons sur la ou les voies de dégradation du glycérol par *D.carbinolicus* et *D.fructosovorans* (chapitre 4-6).

D. giganteus se présente sous la forme de gros bâtonnets droits ou incurvés, légèrement halophile; cette espèce est également capable d'oxyder le glycérol en présence de sulfate (Esnault *et al.* , 1988).

Au cours de notre travail, nous avons isolé plusieurs souches du genre *Desulfovibrio* , dont *Desulfovibrio alcoholovorans* sp. nov. (Qatibi *et al.*, 1990). Cette espèce oxyde une variété d'alcools et diols tels que, le glycérol et le 1,3-propanediol (chapitre 4-2).

Dans une étude récente concernant la composition en lipides de la membrane de 35 espèces du genre *Desulfovibrio* , il a été établi que *D. carbinolicus* , *D. fructosovorans* , *D. giganteus* et *D. alcoholovorans* forment un groupe à part au sein de ces espèces (Hippe, communication personnelle).

4.3. *Desulfovibrio desulfuricans* Norway 4 et *Desulfovibrio baculatus*

D. desulfuricans Norway 4 ressemble par la plupart de ses caractéristiques physiologiques, aux autres espèces du genre *Desulfovibrio* . Cependant, il se présente sous la forme de bâtonnets et ne possède pas la désulfoviridine. Sa sulfite réductase a été caractérisée par Lee et collaborateurs (1973), et a été dénommée desulforubidine. Malgré de grandes différences dans les propriétés spectrales, les réactivités antigéniques croisées se situent entre la desulforubidine et la désulfoviridine (Lee *et al.* , 1973; Aketagawa *et al.* , 1985a). Plusieurs sulfatoréducteurs se présentant sous forme de bâtonnets ont été isolés; ils n'ont pas de désulfoviridine mais ils possèdent tous les caractéristiques des *Desulfovibrio* "classiques" : par exemple, *D. baculatus* (Roanova et Nazina, 1976) et *Desulfovibrio* HL 21 (Laanbroek et Pfennig, 1981).

Des recherches complémentaires sont nécessaires pour établir si ces souches sont identiques. Tout récemment, Roanova et collaborateurs (1988) ont proposé la création du nouveau genre *Desulfomicrobium* pour regrouper ces espèces.

4.4. *Desulfovibrio thermophilus* et *Thermodesulfobacterium commune*

Un sulfatoréducteur thermophile présentant une température optimale de croissance de 65°C, a été isolé par Roanova et Khudyakova (1974). Selon la publication originale,

D.thermophilus posséderait la désulfovirdine. Fauque et collaborateurs (1986), ont établi par la suite que la sulfite réductase de cette souche est en réalité une désulfofuscidine. Cette protéine avait été identifiée chez *T.commune* (Hatchikian et Zeikus, 1983), une bactérie isolée par Zeikus et collaborateurs (1983). Ces deux bactéries thermophiles, ressemblent cependant aux autres espèces de *Desulfovibrio* "classiques" si l'on tient compte des substrats utilisés et de la présence du cytochrome de type c_3 (Rozanova et Khudyakova, 1974; Zeikus *et al.* , 1983; Hatchikian *et al.* , 1984; Fauque *et al.* , 1986). Comme les deux espèces sont morphologiquement très similaires et que *D. thermophilus* a été décrit en premier, il a été suggéré que le genre *Thermodesulfobacterium* soit aboli (Fauque *et al.* , 1986; Le Gall et Fauque, 1988). Dans le même temps, Rozanova et Pivovarova (1988) ont proposé de reclasser *Desulfovibrio thermophilus* dans l'espèce *Thermodesulfobacterium mobile*.

4.5. *Desulfovibrio sulfodismutans*

La description de *D.sulfodismutans* (Bak et Pfennig, 1987) a été l'occasion d'une découverte unique dans le groupe des BSR; cette espèce présente en effet un mode de croissance chimiolithotrophe. C'est le premier cas de fermentation d'un substrat minéral décrit. Elle peut en effet, croître par fermentation du sulfite ou du thiosulfate utilisé comme seule source d'énergie en convertissant ces composés en sulfure et sulfate. Elle peut également utiliser la réduction du sulfate en oxydant le lactate en acétate, et l'hydrogène comme source d'énergie. Cependant, la croissance autotrophe n'est pas observée. Cette espèce contient des cytochromes de type c et de la désulfovirdine.

4.6. *Desulfovibrio sapovorans*

D.sapovorans est un vibrio capable d'utiliser les acides gras tels que le butyrate, le 2-méthylbutyrate et les acides gras à longue chaîne, jusqu'à 18 atomes de carbone. Ces substrats sont oxydés en acétate ou propionate, selon que le nombre de carbone est pair ou impair. Excepté le pyruvate, aucun de ces substrats n'est utilisé par les *Desulfovibrio* "classiques". La désulfovirdine est absente (Postgate, 1984b).

4.7. *Desulfovibrio baarsii*

D.baarsii est un vibrio qui utilise l'acétate, le propionate, le butyrate, le 2- et le 3-méthylbutyrate et des acides gras à longue chaîne, jusqu'à 18 atomes de carbone; ces substrats sont

tous complètement oxydés en CO₂. Cette souche utilise le formate sans source de carbone supplémentaire. Excepté le formate, aucun de ces substrats n'est utilisé par les espèces de *Desulfovibrio* "classiques". La désulfovirdine est absente (Postgate, 1984b).

En conclusion, il est clair que les espèces "classiques" du genre *Desulfovibrio*, constituent un groupe plutôt cohérent sur le plan nutritionnel, physiologique et biochimique. Peu de données existent concernant la phylogénie, mais des catalogues basés sur l'analyse de l'ARN ribosomique 16s montrent que *D.desulfuricans* et *D.gigas* sont phylogénétiquement proches, mais révèlent peu de relations avec les bactéries sulfatoréductrices appartenant aux autres genres (Fowler *et al.*, 1986). Les organismes de type *D.baculatus* et *D.thermophilus* sont nutritionnellement et biochimiquement (présence de cytochrome *c*₃) proches des espèces "classiques" du genre *Desulfovibrio*. Cependant, la découverte d'un cytochrome de type *c*₃ chez *Desulfobulbus elongatus* (Samain *et al.*, 1986), montre que la présence d'un tel cytochrome n'est pas un critère unique au genre *Desulfovibrio*. La relation entre *D.sulfodimutans* et les autres espèces reste à établir. L'appartenance de *D.sapovorans* et *D.baarsii* au genre *Desulfovibrio* est basée sur le simple fait que ce sont des bactéries sulfatoréductrices avec une morphologie de vibrio. Cependant les différences nutritionnelles qui existent entre ces espèces et les autres espèces du genre *Desulfovibrio* sont importantes par rapport aux différences mineures qui caractérisent les espèces "classiques" du genre *Desulfovibrio*. On se demande, pourquoi *D.sapovorans* et *D.baarsii* ne sont pas inclus dans l'étude phylogénétique de Fowler et collaborateurs (1986). Récemment, des études basées sur des analyses génétiques ont permis d'éliminer *D.sapovorans* et *D.baarsii* du genre *Desulfovibrio* (Devereux *et al.*, 1989). Donc la création d'un nouveau genre regroupant ces espèces est à considérer.

On pourrait mentionner ici le genre *Desulfomonas* qui ressemble fortement au genre *Desulfovibrio* "classique" sur le plan nutritionnel et par le fait qu'il contient la désulfovirdine (Moore et Holdeman, 1984). Cependant, ce genre est différent par sa morphologie, l'absence de flagelle et la composition en G+C de l'ADN (66%).

5. PROTEINES D'OXYDORÉDUCTION CHEZ *DESULFOVIBRIO*

De nombreuses protéines d'oxydoréduction sont impliquées dans les chaînes de transport d'électrons qui assurent le couplage entre l'oxydation des substrats énergétiques et la réduction dissimilatrice du sulfate chez les BSR. On distingue : les protéines hémiques (cytochromes) et les protéines non hémiques (ferrédoxines, rubrédoxines et flavoprotéines).

5.1. Cytochromes

Trois types de cytochrome *c* ont été mis en évidence chez les *Desulfovibrio* :

Le cytochrome *c*₃ fut découvert par Postgate (1956). Il a un potentiel rédox beaucoup plus bas (environ - 300 mV) que ceux des cytochromes *c* des mitochondries, contient quatre hèmes par molécule et a un poids moléculaire d'environ 13.000 (Bruschi, 1981), comparable à celui des mitochondries. Il a été trouvé chez toutes les espèces de *Desulfovibrio* et sa présence est considérée comme un critère taxonomique (Postgate, 1984a). Le cytochrome *c*₃ est localisé dans l'espace périplasmique (Le Gall *et al.*, 1965); c'est l'accepteur d'électrons physiologique de l'hydrogénase périplasmique (Odom et Peck, 1984; Le Gall et Fauque, 1988; Peck et Lissolo, 1988). Il intervient dans toutes les réactions d'oxydo-réduction qui mettent en jeu l'hydrogénase : réaction phosphoroclastique, couplage entre l'hydrogénase et la thiosulfate réductase et couplage entre l'hydrogénase et la sulfite réductase (Suh et Akagi, 1969; Odom et Peck, 1981b). La localisation périplasmique du cytochrome *c*₃ a été décrite chez de nombreuses espèces de *Desulfovibrio*, *D.gigas* (Le Gall *et al.*, 1965), *D.vulgaris* Hildenborough (Van der Westen *et al.*, 1978).

Le cytochrome *c*_{c3} d'un poids moléculaire de 26.000, contient huit hèmes par molécule; il a été purifié chez *Desulfovibrio gigas*, *D.vulgaris* et *D.desulfuricans* (Bruschi *et al.*, 1969; Guerlesquin *et al.*, 1982). Guerlesquin et collaborateurs (1982), ont montré que le cytochrome *c*_{c3} de *D.desulfuricans* Norway est constitué de deux monomères de PM de 13 500, contenant quatre hèmes chacun. La composition N-terminale et la composition en acides aminés montrent que le cytochrome *c*_{c3} est différent du cytochrome *c*₃ (PM =13 000). Sa localisation cytoplasmique a été rapportée par Bell et collaborateurs (1978) et par Le Gall et Fauque (1988). Il est réduit directement par l'hydrogénase et est impliqué dans le transfert d'électrons entre l'hydrogénase et la thiosulfate réductase (Hatchikian, 1975).

Le cytochrome *c*₅₅₃ a été isolé pour la première fois à partir d'extraits de *D.vulgaris* par Le Gall et Bruschi (1968). C'est un cytochrome monohémique d'un poids moléculaire de 9100. Il est autooxydable à l'air et possède un potentiel rédox (-20 mV) plus élevé que celui du cytochrome *c*₃. Son rôle physiologique n'est pas connu avec exactitude (Le Gall et Fauque, 1988). Il pourrait intervenir comme cofacteur de la formate déshydrogénase. Le cytochrome *c*₅₅₃ se retrouve chez la plupart des *Desulfovibrio* excepté chez *D.gigas*. La plupart des cytochromes isolés de bactéries sulfatoréductrices proviennent des souches de *Desulfovibrio*.

5.2. Ferrédoxines et flavodoxines

Les flavodoxines et les ferrédoxines sont des protéines cytoplasmiques qui interviennent comme cofacteurs de la pyruvate déshydrogénase (Fauque, 1985).

Les ferrédoxines sont des protéines de bas potentiel, de faible poids moléculaire (6 000), possédant des centres fer-soufre. De multiples formes de ferrédoxines ont été décrites chez *D.gigas*, *D.desulfuricans* Norway 4, *D.desulfuricans* Berre-eau, *D.africanus* et *D.baculatus* (Le Gall et Fauque, 1988). Chez *D.gigas*, la ferrédoxine existe sous deux formes (I et II) séparables par chromatographie (Bruschi *et al.*, 1976). Ces deux formes sont respectivement des trimères et des tétramères d'une même unité de base ayant un poids moléculaire de 6000. La ferrédoxine I (trimère) a un potentiel d'oxydoréduction ($E'^{\circ} = -400$ mV) nettement plus bas que celui de la ferrédoxine II ($E'^{\circ} = -130$ mV) (Cammack *et al.*, 1977). Chez les espèces du genre *Desulfovibrio*, les ferrédoxines n'interagissent pas directement avec l'hydrogénase.

Les flavodoxines ont été mises en évidence chez la plupart des espèces de *Desulfovibrio* et joueraient le même rôle physiologique que les ferrédoxines. Comme ces dernières, elles existent sous deux états d'oxydoréduction : une forme semiquinone-hydroquinone ($E'^{\circ} = -440$ mV) et une forme semiquinone-quinone ($E'^{\circ} = -130$ mV). La flavoprotéine isolée chez *D.vulgaris*, stimule la réduction du sulfite par l'hydrogène (Peck et Le Gall, 1982).

5.3. Autres protéines d'oxydoréduction

les rubrédoxines se rencontrent chez toutes les espèces de *Desulfovibrio* : elles ont des potentiels rédox élevés (- 50 à 0 mV) et ne peuvent donc pas agir comme transporteurs d'électrons dans le processus de réduction du sulfate en sulfure (Le Gall et Fauque, 1988). Leur rôle physiologique n'est pas connu. Le rôle possible d'une NAD : rubrédoxine oxydoréductase de *D.gigas* (Le Gall, 1968) a été discuté par Kremer et collaborateurs (1988).

La désulforédoxine trouvée chez *D.gigas* est une protéine ressemblant à une rubrédoxine; son rôle physiologique est inconnu (Le Gall et Fauque, 1988).

Les cytochromes de type b ont été mis en évidence dans la fumarate réductase de *D.gigas* (Hatchikian et Le Gall, 1972) et dans la succinate deshydrogénase de *Desulfohalobus elongatus* (Samain *et al.*, 1984).

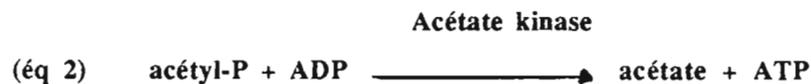
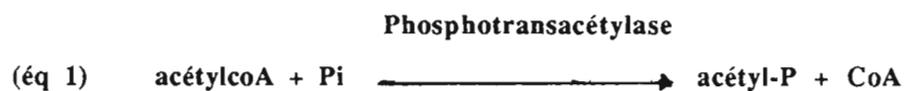
5.4. Hydrogénases

Même lorsqu'elles sont cultivées en l'absence d'hydrogène, les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* contiennent de fortes activités hydrogénasiques; celles-ci peuvent être localisées dans le périplasma et le cytoplasme ou associées à la membrane. Des hydrogénases ont été purifiées chez de nombreuses souches appartenant au genre *Desulfovibrio*. Ce sont des protéines à centre fer-soufre et certaines comme celles de *D.gigas* contiennent du nickel. (Le Gall *et al.* , 1982, Moura *et al.* , 1982).

6. METABOLISME DES BACTERIES SULFATOREDUCTRICES DU GENRE *DESULFOVIBRIO*

Ce sont essentiellement les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* qui ont fait l'objet d'études approfondies; ces études ont porté sur le métabolisme, la croissance, la biochimie des transporteurs d'électrons et des enzymes d'oxydo-réduction. Les processus cataboliques des BSR sont caractérisés par la déshydrogénation du substrat, le transport d'électrons par des chaînes protéiques spécifiques et par la réduction du sulfate en sulfure. Les BSR accumulent l'énergie nécessaire à leur croissance sous forme d'ATP (Haddock et Jones, 1977). Cet ATP provient de deux processus de conservation d'énergie :

1) Phosphorylation au niveau du substrat : le catabolisme de certains substrats peut conduire à la formation d'un intermédiaire contenant une liaison riche en énergie (éq.1). Cet intermédiaire est l'acétylCoA (Thauer *et al.*, 1977); il est utilisé pour la synthèse d'ATP à partir de l'ADP (éq.2):

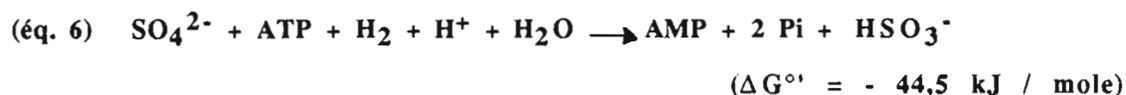
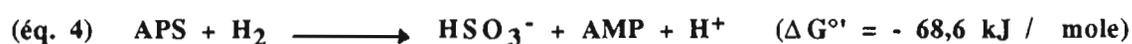


2) Phosphorylation oxydative : la synthèse d'ATP est couplée à un transfert d'électrons le long d'une chaîne de transport d'électrons. Les électrons proviennent de l'oxydation de l'hydrogène ou d'un composé organique comme le lactate et le pyruvate, avec production d'énergie sous forme d'ATP, liée à la réduction d'un transporteur terminal d'électrons.

6.1. Voie de réduction du sulfate

Chez les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio*, huit électrons sont utilisés pour réduire complètement 1 mole de sulfate en 1 mole de sulfure. Comme l'indique la figure 1.1, on peut distinguer deux étapes dans le déroulement de ce processus :

La voie de réduction dissimilatrice du sulfate en sulfite, est bien étudiée; les détails de cette étape et les enzymes impliquées ont fait l'objet de récentes revues (Akagi, 1981; Peck et Lissolo, 1988; Le Gall et Fauque, 1988; Kremer *et al.*, 1988). Le potentiel rédox du couple $\text{HSO}_4^- / \text{HSO}_3^-$ est très négatif ($E'^{\circ} = - 516 \text{ mV}$) et le sulfate doit tout d'abord être activé en adénosine phosphosulfate (APS), avant d'être réduit. Cette réaction, catalysée par une ATP sulfurylase, libère du pyrophosphate (éq.3) et n'est favorable thermodynamiquement que si ce dernier est hydrolysé en phosphate inorganique grâce à une pyrophosphatase (éq.5). L'activation du sulfate nécessite donc l'apport d'énergie sous forme d'ATP et les bactéries doivent se le procurer par l'oxydation de leur substrat (éq. 6).



La première étape de réduction est la transformation de l'APS en sulfite et AMP (éq.5); elle est catalysée par une flavoprotéine (APS réductase) localisée dans le cytoplasme. Les donneurs d'électrons physiologiques impliqués dans cette réduction ne sont pas connus. Le mécanisme de la réduction du sulfite est encore aujourd'hui un sujet de controverse et deux schémas ont été proposés (Fig. 1.1). Le premier fait intervenir une réduction directe du sulfite en sulfure, catalysée par une bisulfite réductase, sans libération d'intermédiaire libre (Chambers et Trudinger, 1975). Quatre bisulfite réductases ont été purifiées et caractérisées : la désulfovirdine (Lee et Peck, 1971) et la désulforubidine (Lee *et al.*, 1973) qui ont été mises en évidence chez les espèces du genre *Desulfovibrio* et le pigment P 582 et la désulfofuscidine qui ont été trouvés respectivement chez les *Desulfotomaculum* (Trudinger, 1970) et chez *Thermodesulfobacterium* (Hatchikian et Zeikus, 1983). Ces enzymes produisent cependant du trithionate (S_3O_6^-) et du thiosulfate (S_2O_3^-) de manière irréversible. Drake et Akagi (1977) et Akagi (1981) ont proposé un mécanisme cyclique dans lequel ces deux composés seraient produits comme intermédiaires (Fig. 1.1). Des thiosulfate réductases ont été purifiées chez plusieurs espèces du genre *Desulfovibrio* (Haschke et Campbell,

1971; Hatchikian, 1975) et un complexe enzymatique catalysant la réduction du trithionate a récemment été isolé chez *D.vulgaris* (Kim et Akagi, 1985). Les quantités de thiosulfate et de trithionate formées durant la réduction du sulfite dépendent des conditions expérimentales et il est possible que ces composés ne soient pas produits dans les conditions physiologiques. L'APS réductase et les bisulfite réductases (désulfovirdine, désulforubidine et désulfofuscidine) trouvées dans les différents espèces du genre *Desulfovibrio* ont été caractérisées sur les plans biochimique et biophysique mais on ne connaît pas leurs localisation ou leurs donneurs d'électrons naturels (Peck et Lissolo, 1988; Le Gall et Fauque, 1988). Il a été récemment démontré que l'APS réductase et la sulfite réductase sont localisées dans le cytoplasme chez *D.gigas* et *D.vulgaris* (Kremer *et al.*, 1988).

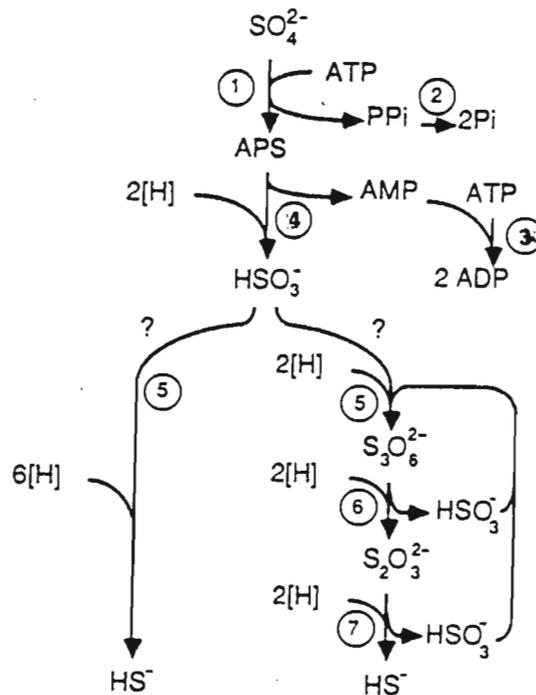
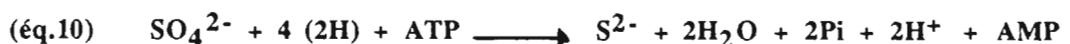
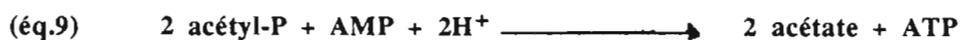


Fig. 1.1 Voie de réduction du sulfate en sulfure chez les espèces du genre *Desulfovibrio*. Les chiffres indiquent les enzymes suivants : 1, ATP sulfuryle; 2, pyrophosphatase; 3, adénylate kinase; 4, APS réductase; 5, sulfite réductase; 6, trithionate réductase (n'est jamais vraiment établie, voir texte) et 7, thiosulfate réductase.

Peck (1960) a proposé le bilan énergétique suivant, lors de l'oxydation du lactate en acétate en présence de sulfate :

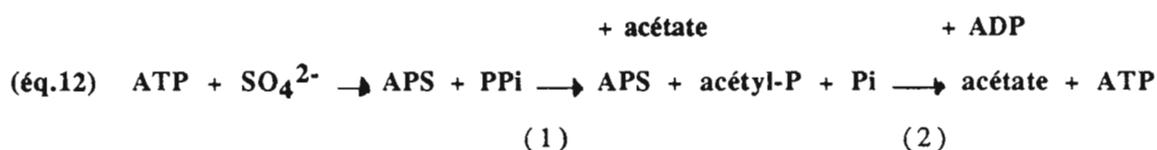


La réaction globale s'écrit alors :



Le bilan global indique que tout l'ATP formé par phosphorylation au niveau du substrat par la réaction phosphoroclastique d'oxydation du pyruvate, est utilisé pour la réduction du sulfate. Il est donc admis que d'autres phosphorylations oxydatives ont lieu (Peck, 1962; voir paragraphe 6.3).

Rappelons que les genres *Desulfovibrio* et *Desulfotomaculum* diffèrent essentiellement par le métabolisme du pyrophosphate (PP_i) (Liu et Peck, 1981). Il est métabolisé par les espèces du genre *Desulfotomaculum* avec l'acétate, lorsque le sulfate est activé par l'enzyme PP_i:acétokinase, donnant l'acétylphosphate (Reeves et Guthrie, 1975) permettant ainsi la régénération d'une molécule d'ATP. L'APS formé sera réduit en sulfure. Ces bactéries ne possèdent pas de quantités suffisantes de PPases pour hydrolyser le PP_i produit lors de la formation d'APS (via l'ATP sulfurylase). Par contre elles peuvent conserver l'énergie fournie par ce PP_i, ainsi que cela a été mis en évidence par leur capacité d'utiliser le PP_i comme source d'énergie pour la croissance (Liu *et al.* , 1982). La réaction globale lors d'une croissance sur lactate plus sulfate est donc :



(1), PP_i : acétate kinase ; (2), acétate kinase



Cependant, récemment Thebrath et collaborateurs (1989) reportaient que la PP_i acétate kinase n'est pas importante chez *Desulfotomaculum* et que les résultats reportés par Liu et Peck (1981) pourraient être expliqués comme un artefact expérimental.

6.2. Réduction d'autres accepteurs d'électrons

Outre le sulfate, le sulfite et le thiosulfate sont généralement utilisés comme accepteurs terminaux d'électrons (Postgate, 1984a; Widdel, 1988) ; le sulfite peut être réduit selon

une partie de la voie décrite figure 1.1 et le thiosulfate peut être réduit en sulfure et sulfite par la thiosulfate réductase (Haschke et Campbell, 1971; Aketagawa *et al.* , 1985 b). Le soufre élémentaire, le tétrathionate et la dithionite peuvent être également des accepteurs terminaux d'électrons (Widdel, 1988).

Certaines espèces réduisent le nitrate et le nitrite en ammoniacque (Steenkamp et Peck, 1981), le fumarate en succinate. Klemps et collaborateurs (1985) ont montré que *Desulfotomaculum ruminis* et *D.orientis* réduisaient le CO₂ en acétate, en l'absence de sulfate.

6.3. Métabolisme de l'hydrogène et rôle de l'hydrogénase chez les espèces du genre *Desulfovibrio*

La mise en évidence d'une importante activité hydrogénasique chez les espèces du genre *Desulfovibrio* a joué un rôle déterminant dans le développement des connaissances sur le métabolisme de ces microorganismes. Ils peuvent se développer en présence de sulfate soit en culture pure, en utilisant l'hydrogène comme seule source d'énergie, (Badziong *et al.* , 1978; Brandis et Thauer, 1981), soit en cultures mixtes avec des bactéries fermentatives en agissant comme piège à hydrogène (Boone et Bryant, 1980). On ne connaît pas à l'heure actuelle de mécanisme de conservation d'énergie autre que la phosphorylation oxydative lors de l'oxydation de l'hydrogène par les espèces du genre *Desulfovibrio* .

L'étude de l'énergétique de la croissance de *D.vulgaris* Marburg en milieu H₂ + sulfate effectuée par Badziong et Thauer (1978), a permis d'établir que 3 moles d'ATP sont synthétisées au cours de la réduction du sulfate en sulfure. La réduction du sulfate en sulfite consommant 2 ATP, le gain net en ATP est donc de 1 ATP par mole de sulfate réduit en sulfure.

Badziong et Thauer (1980) ont déterminé la localisation des oxydoréductases et des transporteurs d'électrons impliqués dans la croissance sur H₂ + sulfate (ou sulfite) chez *D.vulgaris* Marburg. Ils rapportent que l'hydrogénase et le cytochrome *c*₃ se trouvent localisés dans le périplasme alors que les enzymes de la réduction des accepteurs terminaux d'électrons sont localisés dans le cytoplasme. Les propriétés des différentes hydrogénases des espèces du genre *Desulfovibrio* ont été largement étudiées, et ont fait l'objet de récentes revues (Odom et Peck, 1984; Le Gall et Fauque 1988). Basés sur leurs observations, Badziong et Thauer (1980) ont proposé le schéma de conservation de l'énergie suivant : l'hydrogène est oxydé à l'extérieur de la membrane périplasmique en réduisant le cytochrome *c*₃ et en libérant des protons; Les électrons libérés sont ensuite transférés du périplasme, où a lieu l'oxydation de l'hydrogène, vers le cytoplasme où les accepteurs terminaux

d'électrons sont réduits en sulfures. Ce transfert vectoriel d'électrons provoquerait une accumulation de protons sur la face externe de la membrane cytoplasmique et par conséquent, la création d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane, et permettrait la synthèse d'ATP grâce à une ATPase membranaire (Fig .1.2).

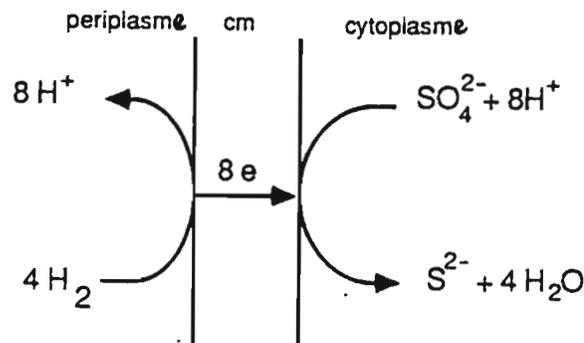


Fig.1.2 Modèle du couplage énergétique expliquant la croissance de *Desulfovibrio vulgaris* souche Marburg en milieu H_2 + sulfate (Badziong et Thauer, 1980)

La production d'hydrogène en milieu lactate + sulfate a été démontrée chez deux souches du genre *Desulfovibrio*, *D.vulgaris* Hildenborough (Hatchikian *et al.*, 1976) et *D.vulgaris* Miyazaki (Tsuji et Yaki, 1980). Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer cette production d'hydrogène qui peut être liée : à un recyclage d'hydrogène couplé à un processus chimiosmotique générateur d'énergie (Odom et Peck, 1981b); à un contrôle de l'état rédox des protéines de transfert d'électrons pendant la dégradation du lactate (Lupton *et al.*, 1984a).

6.3.1 Modèle de recyclage de l'hydrogène

Les espèces du genre *Desulfovibrio* peuvent, soit consommer de l'hydrogène, soit en produire et possèdent des hydrogénases périplasmiques et cytoplasmiques (Odom et Peck, 1981a). Partant de ces observations, un modèle original mais controversé a été avancé par Odom et Peck (1981b). Ces auteurs ont proposé un mécanisme de recyclage d'hydrogène qui permettrait d'expliquer le métabolisme énergétique des BSR en milieu lactate+sulfate. Dans cette hypothèse, le lactate serait oxydé en acétate dans le cytoplasme en produisant de l'hydrogène grâce à l'hydrogénase cytoplasmique. L'hydrogène diffuserait librement au travers de la membrane et serait oxydé par l'hydrogénase périplasmique dont le cofacteur est le cytochrome c_3 . Comme dans le schéma de Badziong et Thauer (1980), les électrons seraient ensuite transférés dans le cytoplasme pour réduire le sulfate en sulfure, permettant ainsi la formation d'un gradient de protons (Fig. 1.3A).

Ce schéma expliquerait que les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* puissent pousser en l'absence de sulfate en association avec des bactéries méthanogènes. Dans ce cas, seule l'hydrogénase interne interviendrait. Le même modèle est basé sur le fait que des sphéropastes lavés de *D. gigas* (qui ne possèdent donc pas l'hydrogénase et le cytochrome c_3), sont incapables d'oxyder le lactate en présence de sulfate, et que cette propriété est restaurée lorsque les cofacteurs manquants sont ajoutés. Ce modèle est également basé sur le fait que certaines espèces du genre *Desulfovibrio* produisent de l'hydrogène, en l'absence de sulfate, durant la conversion du lactate en acétate, en association avec une bactérie méthanogène (Bryant *et al.*, 1977).

On remarque que dans ce modèle il n'y a pas de couplage direct entre la translocation des protons et le transfert des électrons vers l'accepteur terminal d'électrons (sulfate). Il représente un mécanisme bioénergétique primitif de génération d'un gradient de protons (Odom et Peck, 1981b). Selon ce même modèle, la formation transitoire d'hydrogène lors de la première phase de croissance pourrait être due à une insuffisance d'activité de l'hydrogénase périplasmique.

6.3.2. Modèle de régulation rédox par production de trace d'hydrogène

Lupton et collaborateurs (1984a) ont proposé un autre modèle bioénergétique pour expliquer le rôle physiologique du métabolisme de l'hydrogène en milieu lactate + sulfate. Selon ces auteurs, l'hydrogène jouerait un rôle secondaire dans le métabolisme des espèces du genre *Desulfovibrio* et sa production permettrait de contrôler le niveau d'oxydo-réduction des transporteurs internes d'électrons. Les auteurs argumentent leur théorie en se basant sur trois observations :

1) La production d'hydrogène est beaucoup plus importante en début de croissance en milieu lactate + sulfate qu'en milieu pyruvate + sulfate (lactate / pyruvate, $E^{\circ} = -190$ mV; Pyruvate/acetylCoA, $E^{\circ} = -540$ mV). La production d'hydrogène rendrait donc l'oxydation du lactate en pyruvate thermodynamiquement plus favorable en diminuant le taux de réduction des transporteurs d'électrons.

2) La production d'hydrogène est identique en présence de sulfate ou thiosulfate; ceci indique que l'hydrogène n'est pas un produit de fermentation lié à la formation d'ATP nécessaire à l'activation du sulfate (Tsuji et Yagi, 1980).

3) L'hydrogène n'inhibe pas compétitivement l'oxydation du substrat en présence de sulfate.

Les auteurs en déduisent donc que l'hydrogène n'est pas un intermédiaire obligatoire du métabolisme. L'ensemble de ces observations suggère que l'hydrogène jouerait un rôle dans la régulation des équilibres rédox des transporteurs d'électrons (Fig.1.3B) : au cours de la croissance sur un substrat organique en présence de sulfate, un gradient de protons s'établit sur la face externe de la membrane lors du transfert des électrons provenant des oxydations dans le cytoplasme. Ce mécanisme d'établissement d'un gradient de protons, directement lié au transfert des électrons, correspond à la théorie de Mitchell (1961). Donc, contrairement à Odom et Peck (1981b) qui attribuent un rôle majeur à l'hydrogénase périplasmique dans leur modèle, Lupton et collaborateurs (1984a) lui attribueraient un rôle mineur en milieu lactate+sulfate. Ces mêmes auteurs pensent que cette hydrogénase périplasmique n'interviendrait que dans le métabolisme de l'hydrogène en milieu H_2 + sulfate.

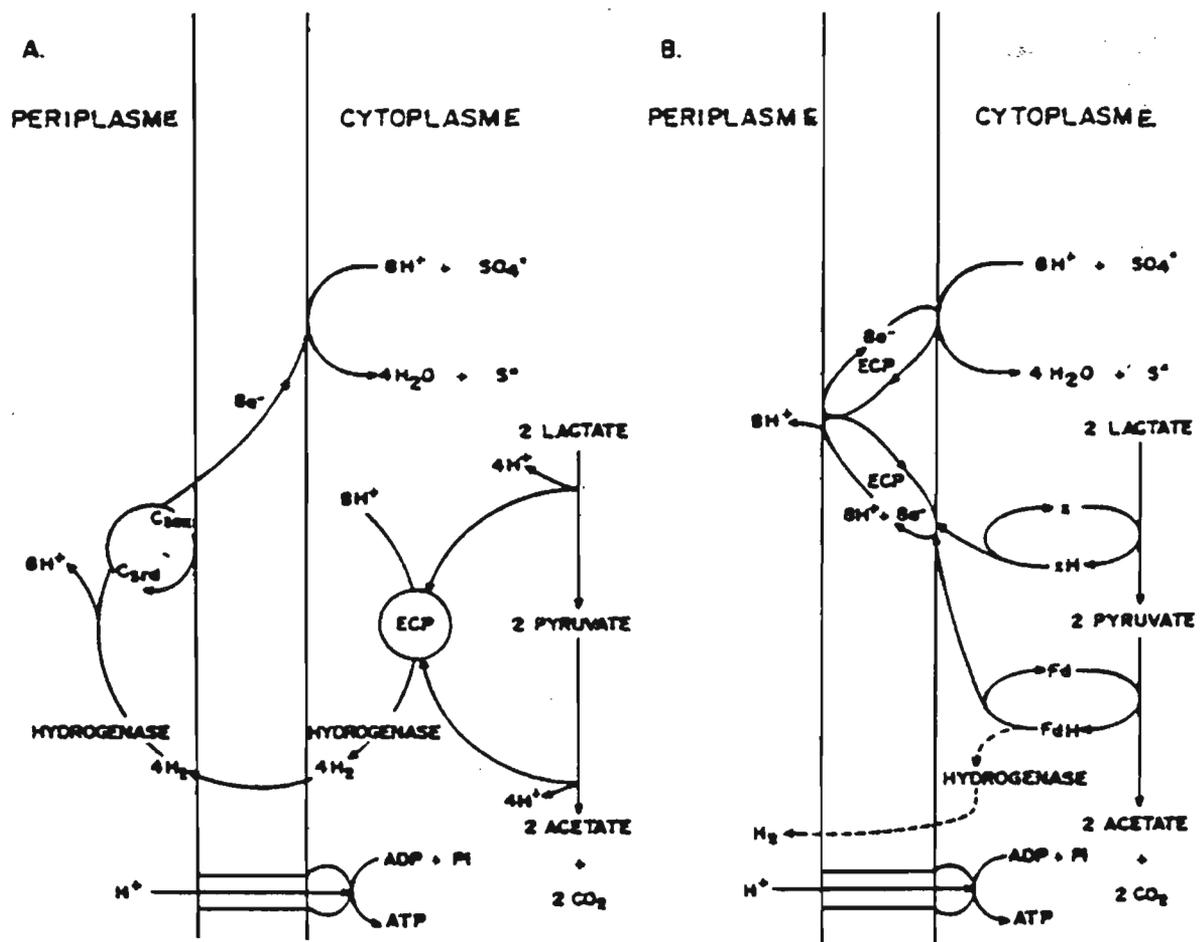


Fig. 1.3 Rôle de l'hydrogène dans le métabolisme énergétique des espèces du genre *Desulfovibrio* en milieu lactate + sulfate. A, modèle de recyclage de l'hydrogène (Odom et Peck, 1981b); B, modèle de la régulation rédox par production de traces d'hydrogène (Lupton et al., 1984a)

L'hydrogène semble donc avoir un rôle très différent selon le modèle proposé. Celui d'Odom et Peck ne semble pas pouvoir s'appliquer à toutes les bactéries sulfatoréductrices. Certaines nouvelles espèces décrites par Widdel (1980) sont, en effet, incapables d'utiliser l'hydrogène. De plus, il a été démontré qu'avec une espèce du genre *Desulfobulbus*, l'activité hydrogénase est réprimée lorsque les cellules sont incubées en présence de lactate et de sulfate (Samain, 1987). Pour que le modèle proposé par Odom et Peck soit fonctionnel, il faut, au préalable, l'existence d'une hydrogénase cytoplasmique qui catalyse la production d'hydrogène, et une hydrogénase périplasmique qui catalyse la consommation d'hydrogène. Or la présence de multiples hydrogénases a pu être établie chez plusieurs souches, et la présence simultanée d'une hydrogénase périplasmique et une hydrogénase cytoplasmique n'a été démontrée chez aucune espèce du genre *Desulfovibrio* testée (Le Gall et Fauque, 1988; Nivière, 1989). De plus, sur le plan thermodynamique, en considérant le potentiel rédox du couple pyruvate/lactate ($E^{\circ} = -190$ mV) et celui du couple H^+/H_2 ($E^{\circ} = -414$ mV), si le recyclage de l'hydrogène se faisait avec les électrons libérés lors de l'oxydation du lactate en acétate, il serait complètement bloqué, même par des faibles pressions partielles d'hydrogène. Or plusieurs auteurs ont montré, avec des souches du genre *Desulfovibrio*, que l'oxydation du lactate n'est pas ou légèrement inhibée par la présence d'hydrogène (Lupton 1984a; Stams, 1985; Pankhania *et al.*, 1986). Bien que le recyclage d'hydrogène à partir des électrons libérés lors de la conversion du lactate en pyruvate, soit matière à controverse, il existe des indications selon lesquelles le recyclage de l'hydrogène durant l'oxydation du pyruvate, doit être considéré comme un réel modèle de couplage énergétique.

Peck et collaborateurs (1987) ont trouvé que chez *D. vulgaris* Hildenborough, des quantités d'hydrogène sont simultanément produites et consommées en milieu pyruvate + sulfite. Ces auteurs concluent que l'hydrogène est un intermédiaire obligé du métabolisme de *D. vulgaris* Hildenborough dans ces conditions de croissance. Ce résultat renforce l'hypothèse du recyclage de l'hydrogène proposé précédemment par Odom et Peck (1981b).

Cependant, aucun des deux modèles ne peut expliquer de façon satisfaisante l'absence d'inhibition par l'hydrogène lors d'une croissance en milieu lactate+sulfate et l'accumulation d'une quantité importante d'hydrogène en fin de croissance, de *D. vulgaris* Hildenborough en milieu lactate+sulfate.

Chapitre 1-2

Rôle de l'accepteur terminal d'électrons dans la dégradation du glycérol et du 1,3-propanediol par les bactéries

1. METABOLISME DU GLYCEROL

Le glycérol est un constituant très important des déchets de distillation vinicole; sa concentration, ajoutée à celle du lactate, peut représenter jusqu'à 60% du carbone soluble total (Tableau 2.1, Matériels et Méthodes). C'est également l'un des constituants des lipides bactériens. Ce même composé est aussi présent en grande quantité comme osmorégulant chez les champignons (Jennings, 1984), les levures (Larssone et Gustafsson, 1987; André *et al.* , 1988), les algues vertes (Brown, 1978) et les cyanobactéries (Reed *et al.* , 1984; Hagemann *et al.* , 1987); chez ces bactéries, le glycérol est présent sous forme de glycosyl-glycérol.

La dégradation aérobie par les eucaryotes, ou celle qui est couplée à la réduction du nitrate par les procaryotes, ne cause aucune difficulté majeure (Lin, 1976; 1977), puisque le glycérol peut rejoindre la voie glycolytique par le biais d'une oxydation en dihydroxyacétone, suivie d'une phosphorylation en dihydroxyacétone-phosphate, ou une phosphorylation en glycérol-3-phosphate suivie d'une oxydation en dihydroxyacétone-phosphate.

Par contre, la dégradation du glycérol par les bactéries fermentatives pose un problème car ce substrat est plus réduit (2 équivalents en plus) que les sucres. Donc beaucoup de bactéries fermentatives qui dégradent le glycérol, utilisent différents accepteurs d'équivalents réducteurs pour convertir le glycérol tels que par exemple : Le fumarate chez *E. Coli* (Quastel *et al.* , 1925; Miki et Lin, 1975) ou *Streptococcus faecalis* (Gunsalus, 1947). La fermentation en butyrate requiert l'acétate (Bhat et Baker, 1947) ou le pyruvate comme co-substrat (Azova, 1967). Certaines bactéries comme *Bacillus fastidiosus* , n'utilisent le glycérol que si un composé azoté tel que l'urée ou l'allantoïne est présent dans le milieu de culture (Vander Drift *et al.* , 1986). Plusieurs bactéries anaérobies strictes dismutent le glycérol en 3-hydroxypropionate et 1,3-propanediol, comme produit réduit (Schink et Stieb, 1983; Stieb et Schink, 1984). *Citrobacter freundii* fait fermenter le glycérol principalement en formate, acétate et éthanol (Magasanik *et al.* , 1953). La fermentation du glycérol dans le rumen produit de l'acétate, propionate, butyrate et lactate (Wright, 1969).

1.1. Les bactéries aérobies

La voie de conversion du glycérol en 1,3-propanediol a été bien établie pour les espèces du genre *Klebsiella* . Cette voie implique la déshydratation du glycérol par la glycérol déshydratase pour former la 3-hydroxypropionaldéhyde, qui est ensuite réduite en 1,3-propanediol par une glycol-déshydrogénase à NAD (Fig. 1.4 et 1.5).

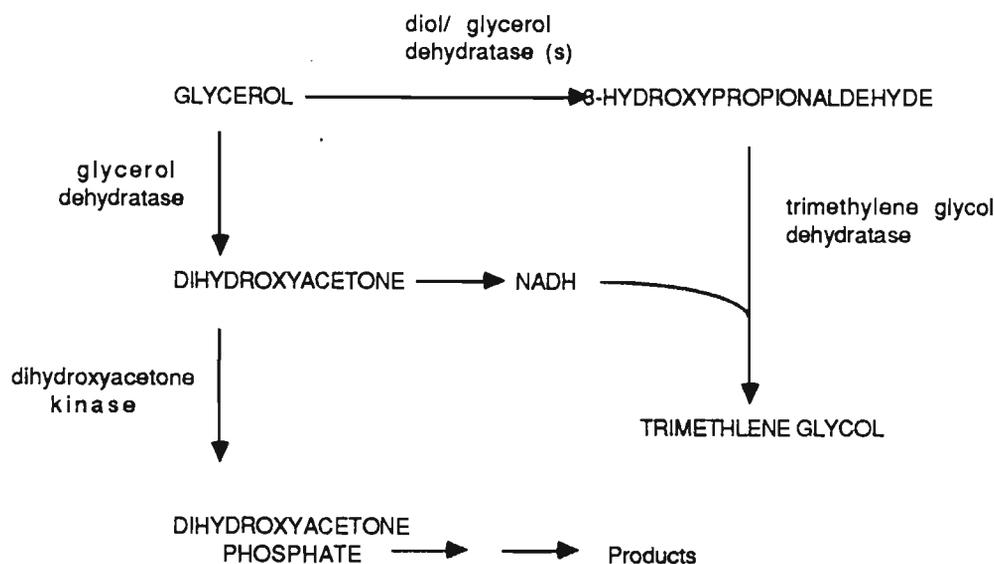


Fig. 1.4 Catabolisme anaérobie du glycérol chez les espèces du genre *Klebsiella*. Chez *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955, la diol- et la glycérol-déshydratase sont présentes. Chez la souche ATCC 8724, la diol-déshydratase est seule présente.

La glycérol-déshydratase est une enzyme inductible, n'apparaissant que lors de la croissance anaérobie sur glycérol; son rôle est de produire un accepteur d'hydrogène, comme la 3-hydroxypropionaldéhyde (Sobolov et Smiley, 1960). Les organismes possédant donc cette activité enzymatique, peuvent faire fermenter le glycérol en l'absence d'accepteurs exogènes d'électrons tels que le fumarate et les nitrates (Toraya *et al.*, 1980); c'est le cas par exemple des espèces du genre *Klebsiella* qui contrairement à *Escherichia coli*, sont capables de faire fermenter le glycérol en l'absence d'un accepteur terminal d'électrons (Ruch *et al.*, 1974). Il semble que cette différence physiologique soit attribuée à l'existence simultanée chez les espèces du genre *Klebsiella*, des systèmes *dha* et la voie de synthèse du 1,3-propanediol, permettant la formation de dihydroxyacétone et la régénération du NAD à partir du NADH produit (Fig. 1.4) (Mickelson et Werkman, 1940; Abeles *et al.*, 1960).

Les voies de transport et de dissimulation du glycérol chez *K. pneumoniae* ont été décrites par plusieurs auteurs (Magasanik *et al.*, 1953; Lin *et al.*, 1960; Sanno *et al.*, 1968; Ruch *et al.*, 1974; Lin, 1976; Hadler *et al.*, 1980; Forage et Foster, 1982; Forage et Lin, 1982;). Après le transport du glycérol dans la cellule, la dissimulation du glycérol se produirait par l'intermédiaire de deux voies inductibles, la voie de la glycérol phosphate ou celle de la dihydroxyacétone. Les mécanismes régulateurs qui gouvernent le cours de la dissimulation du glycérol sont complexes; la source carbonée ainsi que l'accepteur d'hydrogène tel que l'oxygène, sont les facteurs influençant ce choix (Fig.1.5). L'induction par le glycérol et la répression par le glucose des enzymes des deux voies sont bien étudiées (Neidhardt et Magasanik, 1956, 1957; Lin *et al.*, 1960; Sanno *et al.*, 1968; Ruch *et al.*, 1974; Ruch et Lin, 1975; Toraya et Fukui, 1978; Forage et Foster, 1979; 1982).

Chez *Escherichia coli* (Thoren, 1975), la glycérolkinase est inhibée par le fructose 1,6-diphosphate. Cette inhibition allostérique empêche l'utilisation du glycérol lors de la croissance sur glucose, évitant ainsi l'accumulation du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) lors de la croissance sur glycérol (Lin, 1976). En effet, de grandes quantités de DHAP dans la cellule de *E.coli*, conduisent à la synthèse de méthylglyoxal, produit létal; cette conversion est assurée par la méthylglyoxal synthase (Cooper, 1984).

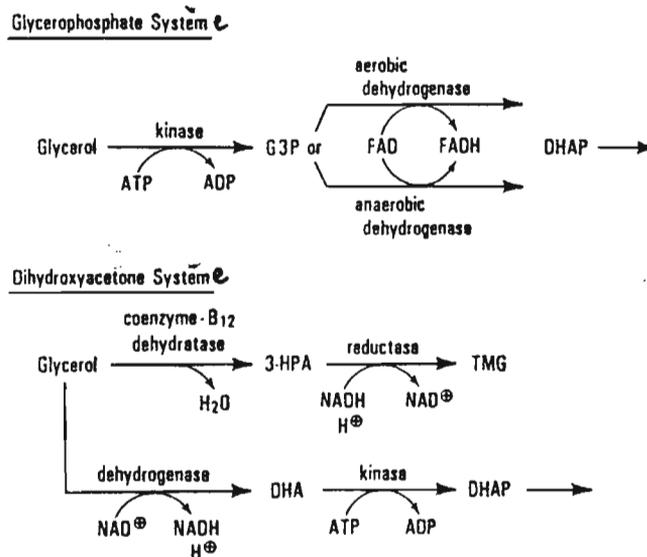
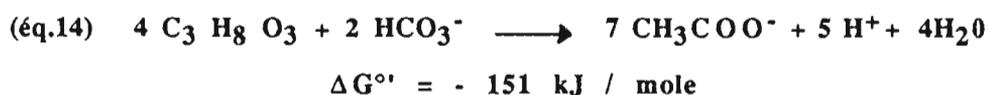


Fig.1.5 Coexistence de la voie dihydroxyacétonephosphate (DHAP) et de la voie dihydroxyacétone (DHA) dans la dissimilation du glycérol chez *Klebsiella pneumoniae*.

La diol-déshydratase qui convertit le glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde, est induite non seulement par le glycérol, mais également par le 1,2-propanediol et l'éthanediol. Les études sur la production de la 3-hydroxypropionaldéhyde par *K. pneumoniae* ATCC 8754 (Toraya *et al.*, 1979) ont montré que l'induction de l'activité déshydratase par le glycérol se fait aussi bien en aérobie qu'en anaérobie (Abeles *et al.*, 1960; Slininger *et al.*, 1983).

1.2. les bactéries homoacétogènes

Elles utilisent le CO₂ comme accepteur terminal d'électrons pour oxyder le glycérol en acétate (Eichler et Schink, 1984) :

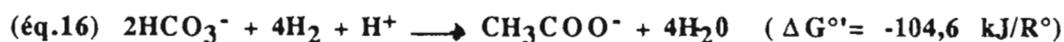
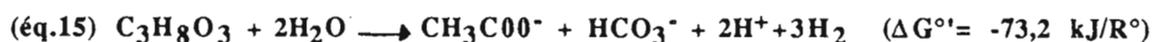


Emde et schink (1987) ont montré cependant que des bactéries homoacétogènes, telles que *Acetobacterium carbinolicum* et *Acetobacterium woodi*, produisent des quantités variables de 1,3-propanediol, comme produit réduit de la fermentation du glycérol. Ces auteurs ont conclu qu'une partie du glycérol était réduite par l'intermédiaire de la glycérol déshydratase et la 1,3-propanediol déshydrogénase (Lin, 1976). Cette réaction est utilisée également par plusieurs bactéries fermentatives telles que les *Lactobacillus*, *Klebsiella* et *Citrobacter* comme voie dérivée de la fermentation du glycérol (Abeles *et al.*, 1960; Schütz et Radler, 1984).

D'autres bactéries homoacétogènes appartenant notamment au genre *Sporomusa* (Möller *et al.*, 1984) utilisent le glycérol comme source d'énergie en présence de CO₂ comme accepteur terminal d'électrons :

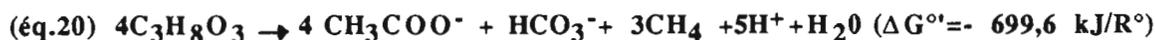
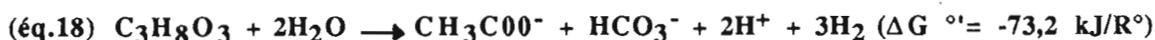
- *Sporomusa acidovorans* oxyde le glycérol en acétate en présence de CO₂ (Ollivier *et al.*, 1985). Nous avons démontré qu'il produisait également des quantités non négligeables de 1,3-propanediol (chapitre 4-4).

- *Sporomusa paucivorans* (Hermann *et al.*, 1987), dégrade très légèrement le glycérol lorsqu'il est cultivé en présence d'un tampon phosphate, sous N₂. Par contre, en présence de bicarbonate sous CO₂, une bonne utilisation du glycérol est observée. Ceci prouve que le CO₂ joue le rôle d'accepteur terminal des équivalents réducteurs libérés lors de l'oxydation du glycérol (éqs.15, 16, 17):



De plus, dans un milieu tamponné au phosphate et sous N₂, *S.paucivaurans* utilise le glycérol, en présence de *Methanobacterium formicicum*. Cette association syntrophique produit de l'acétate, du CO₂ et du méthane (éq.18), montrant ainsi que la bactérie méthanogène a joué le rôle d'accepteur des équivalents réducteurs en réduisant le CO₂ produit (éq.18, 19,20).

Ceci est un argument supplémentaire sur la nécessité d'un accepteur d'électrons externe pour dégrader le glycérol par *S. paucivorans* :



S. paucivorans est non seulement capable d'utiliser le glycérol, mais convertit également l'éthylèneglycol en acétate et le 1,2-propanediol en acétate, propionate et n-propanol (Hermann *et al.* , 1987).

1.3. Les Clostridies

La production de 1,3-propanediol comme produit réduit de la fermentation du glycérol a été démontrée chez *Clostridium pasteurianum* (Nakas *et al.* , 1983) et *Clostridium butylicum* (Forsberg, 1987).

Cette propriété métabolique a été également trouvée chez des bactéries appartenant à d'autres genres tels que *Klebsiella pneumoniae* (Forage et Foster, 1982, voir paragraphe 1.1) et *Lactobacillus* spp. (Schütz et Radler, 1984, paragraphe 1.4).

L'efficacité de conversion du glycérol en 1,3-propanediol est différente; par exemple *C.pasteurianum* (Nakas *et al.* , 1983), *Citrobacter freundii* (Mickelson et Werkman 1940) et *K.aerogenes* (Thiamann, 1955), convertissent le glycérol en 1,3-propanediol avec une efficacité de 15, 60 et 40% respectivement. Il a été observé par Forsberg (1987), que l'addition de 1,2-propanediol dans le milieu de culture de *C.butylicum* B593 contenant du glycérol, inhibe la conversion du glycérol en 1,3-propanediol.

Forage et Foster (1984) ont montré que la glycérol déshydratase et la 1,2-propanediol déshydratase sont toutes les deux induites chez *K. pneumoniae* cultivé sur glycérol. Effectivement, chez *Propionibacterium freudenreichii* (Hosoi *et al.* , 1978) et *K. pneumoniae* (Toraya *et al.* , 1979), le 1,2-propanediol est déshydraté en propionaldéhyde qui est ensuite soit réduite en n-propanol par une déshydrogénase à NAD, soit convertie par une multitude de voies en propionate (Toraya *et al.* , 1979).

Forsberg (1987) indique que la quantité de 1,3-propanediol produite lors de la dégradation du glycérol par *C.butylicum* 593, dépend du pH du milieu. Ainsi, lorsque le pH est de 6,5 , 97% du glycérol est utilisé et le 1,3-propanediol représente 61% des produits formés. Par contre, à un pH de 5,6 et 4,9 , la croissance sur glycérol diminue, et l'efficacité de conversion du glycérol en 1,3-propanediol est fortement abaissée. L'auteur pense que les enzymes impliqués dans le

métabolisme du glycérol ou leurs synthèses, sont sensibles au pH, et plus particulièrement la voie conduisant à la formation du 1,3-propanediol.

De même, il a été démontré par ce même auteur que le cobalt a un rôle très important dans le métabolisme du glycérol chez *C.butylicum* B593 et qu'il jouerait probablement un rôle dans la glycérol déshydratase qui est cobalt dépendante.

En outre, le rôle fondamental du CO₂ dans le métabolisme anaérobie du glycérol chez *C.butylicum* B593 a été prouvé (Forsberg, 1987) : la croissance de cette bactérie double lorsque le milieu de culture contient du bicarbonate de sodium comme tampon et du gaz carbonique comme phase gazeuse.

1.4. Les Lactobacilles

L'altération bactérienne du vin due à la fermentation du glycérol est connue depuis longtemps. La formation à partir du glycérol de l'acroléine (Voisenet, 1918) et ses réactions avec les tannins étaient considérées comme un phénomène important dans cette altération (Wilharn et Holtz, 1951; Rentschler et Tanner, 1951). Serjak et collaborateurs (1954), ont observé la formation de l'acroléine lors de la distillation de fruits ou de purée de grains de fruits.

A partir de tels milieux, une espèce hétérofermentaire du genre *Lactobacillus* a été isolée; elle est capable de faire fermenter le glycérol. Il a été démontré que la fermentation du glycérol produisait du 1,3-propanediol (Sobolov et Smiley, 1960) et qu'un coenzyme B₁₂ de la glycérol déshydratase catalysait la formation de 3-hydroxypropanal à partir du glycérol (Smiley et Sobolov, 1962).

Il a été conclu que l'acroléine n'est pas un produit de fermentation des *Lactobacillus*, mais plutôt un produit de la déshydratation thermique du 3-hydroxypropanal à des pH acides, pendant la distillation de la purée de grains de fruits.

Les espèces de *Lactobacillus* sont incapables d'utiliser le glycérol comme source d'énergie et de carbone; cependant la conversion du glycérol en 1,3-propanediol par ces espèces peut s'effectuer avec une efficacité allant jusqu'à 80% si le glucose et le glycérol sont présents simultanément dans le milieu de culture (Schutz et Radler, 1984), (Fig.1.6).

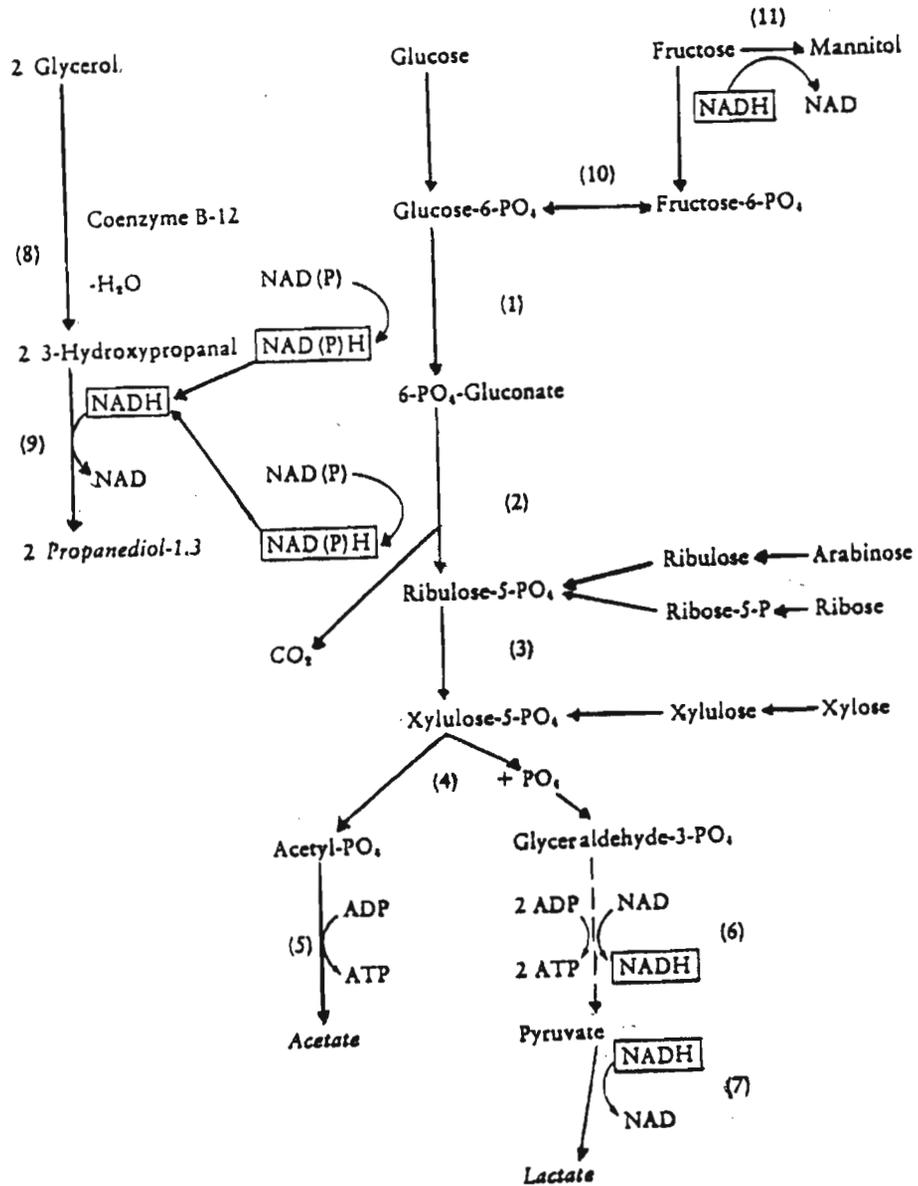


Fig.1.6 Métabolisme du glycérol et des carbohydrates chez *Lactobacillus brevis* B18. Les chiffres correspondent aux enzymes suivants : 1, glucose-6-phosphate:NAD(P)⁺1-oxdoréductase; 2, 6-phosphogluconate:NAD(P)⁺2-oxdoréductas ; 3, ribulose-5-phosphate-3-épimirase; 4, xylulose-5-phosphateglycéraldéhyde-3-phosphate-lyase; 5, ATP : acétatephosphotransférase; 6, glycéraldéhyde-3-phosphate : NAD⁺ oxydoréductase; 7, lactate : NAD⁺ oxydoréductase; 8, 1,2-propanediolhydrolyase ; 9, 1,3propanediol : NAD⁺ oxydoréductase; 10, glucose-6-phosphate cétole-isomérase; 11, iditole:NAD⁺5-oxdoréductase.

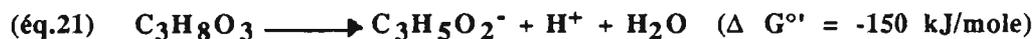
Ces auteurs ont étudié ce métabolisme chez des espèces appartenant au genre *Lactobacillus* utilisant faiblement le glucose. Lorsque le glucose et le glycérol sont tous deux présents, le glucose est dégradé en acétate ou éthanol, lactate et CO₂. Le glycérol est déshydraté en 3-hydroxypropanal, lequel est réduit en 1,3-propanediol (Fig.1.6).

Schutz et Radler (1984), ont démontré l'existence d'une glycérol déshydratase B₁₂-dépendante et une 1,3-propanediol déshydrogénase dans des extraits cellulaires de *L.brevis* et *L.buchneri*. La formation de 1,3-propanediol à partir du glycérol peut être également obtenue en remplaçant le glucose par le fructose (Fig.1.6). Par contre, le ribose ne permet pas la conversion du glycérol en 1,3-propanediol. En effet, aucune activité glycérol déshydratase ou 1,3-propanediol déshydrogénase n'a été détectée dans les extraits cellulaires dont les cellules avaient poussé sur un mélange glycérol et ribose (Schutz et Radler, 1984). De plus, les cellules lavées de deux *L. brevis*, B18 et B20, forment du 1,2-propanediol et du 1,3-propanediol à partir du glycérol. Par contre des cellules de *L.brevis* B22, produisent seulement du 1,2-propanediol à partir du glycérol en l'absence de glucose (Schutz et Radler, 1984).

1.5. *Anaerovibrio glycerini*

La fermentation du glycérol en propionate est une réaction simple qui est réalisée par les bactéries propioniques (Stjernholm et Wood, 1960), chez *Selenomonas ruminantium* et *Anaerovibrio lipolytica* (Hobson et Mann, 1961). Tout récemment Schauder et Schink (1989) ont isolé de sédiment de rivière, et ont décrit une bactérie, *Anaerovibrio glycerini*, capable de convertir le glycérol en propionate et hydrogène. Ces mêmes auteurs ont rapporté l'existence d'une hydrogénase chez cette bactérie. Ils expliquent la production d'hydrogène par une simple fuite et non pas par une activité hydrogénase liée à un métabolisme énergétique. Néanmoins, ce processus semble donner à cette bactérie les moyens de résoudre le problème de l'excès d'équivalents réducteurs. Ceci présente un intérêt particulier, car chez les espèces du genre *Propionibacterium*, l'existence d'une hydrogénase n'a jamais été rapportée; ces bactéries doivent avoir des difficultés pour dégrader le glycérol. Cependant, puisqu'elles sont habituellement cultivées en présence de grandes quantités d'extrait de levure (Devries *et al.*, 1977; Stouthamer, 1980), le problème de la libération des électrons pendant l'utilisation du glycérol n'a jamais été posé. Par exemple, la peptone qu'on ajoute aux milieux de cultures complexes pourrait agir entre autre comme accepteur d'électrons durant la fermentation du glycérol.

Anaerovibrio glycerini semble donc être spécialisé dans l'utilisation du glycérol et la formation du propionate comme seul produit carboné de fermentation; cette réaction libère une quantité importante d'énergie (éq.21) :



Cette spécialisation s'explique par l'absence de l'acétate kinase et de la phosphotransacétylase (Schauder et Schink, 1989). Par conséquent, la formation d'acétate par l'intermédiaire de l'acétylCoA est impossible. Ceci expliquerait la production exclusive de propionate que ces auteurs supposent être produit par l'intermédiaire du méthylmalonylCoA et qui permettrait une synthèse supplémentaire d'ATP; elle serait le résultat d'une phosphorylation oxydative couplée à un transport d'électrons libérés lors de l'oxydation du glycérolphosphate (G-3P) en dihydroxyacétone phosphate (DHAP/G3P, $E^\circ = -190\text{mV}$); ces électrons réduiraient le fumarate en succinate (fumarate²⁻/succinate²⁻, $E^\circ = +33 \text{ mV}$). En plus de l'acétate, la plupart des bactéries connues accumulent le 1,3-propanediol comme produit réduit de fermentation du glycérol. Les rendements théoriques en ATP de telles fermentations sont fonctions de la quantité d'hydrogène ou de formate libérées. Ces rendements sont situés entre 0,50 et 0,67 moles d'ATP par mole de glycérol fermenté (Schauder et Schink, 1989). Ils sont faibles par rapport au rendement déterminé avec *Anaerovibrio glycerini* et qui est de 1,67 mole ATP/mole de glycérol fermenté (Schauder et Schink, 1989).

En conclusion, différentes voies sont impliquées chez les bactéries anaérobies, pour résoudre le problème d'excès d'électrons libérés lors de la fermentation du glycérol. De plus, il est très important de souligner la nécessité d'un accepteur terminal d'électrons pour permettre cette fermentation. Il serait intéressant de cultiver *A. glycerini* en présence d'une bactérie consommatrice d'hydrogène, telle qu'une bactérie sulfatoréductrice en présence de sulfate, afin de vérifier si *A. glycerini* ne produit effectivement pas d'acétate. Il a été obtenu dans notre laboratoire un enrichissement métaboliquement stable sur glycérol comme seule source d'énergie en présence de sulfate dont les partenaires sont une espèce bactérienne (ANA2) ressemblant à *A. glycerini* et un vibrio du genre *Desulfovibrio* n'utilisant pas le glycérol. Cet enrichissement produit de l'acétate à partir du glycérol. La souche ANA2 produit du propionate, du lactate et de l'hydrogène à partir du glycérol, en culture pure (Ouattara, communication personnelle).

1.6. Les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio*

Il a été récemment démontré que le glycérol peut être utilisé par les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* (Stams *et al.*, 1985; Nanninga et Gottschal, 1986, 1987; Kremer et Hansen, 1987; Esnault *et al.*, 1988; Ollivier *et al.*, 1988). Kremer et Hansen (1987) ont étudié du point de vue biochimique la conversion du glycérol, en déterminant les voies et les enzymes responsables de cette réaction chez 2 souches marines, *Desulfovibrio* sp. souche 20020 et

Desulfovibrio sp. souche 20028, ainsi que chez *D. vulgaris* souche Hildenborough. Ces auteurs ont comparé les différentes activités enzymatiques impliquées dans la conversion du glycérol et du lactate en présence de sulfate.

Contrairement à *Klebsiella pneumoniae* et *Cellulomonas* sp. (Jin *et al.*, 1982; Nishise *et al.*, 1985), qui possèdent les activités dihydroxyacétone phosphate kinase (DHAK) et glycérol déshydrogénase (GH), Kremer et Hansen (1987) ont montré que ces enzymes étaient absentes chez *Desulfovibrio* sp. souche 20020 et 20028, qui convertissent le glycérol par l'intermédiaire du L-glycérolphosphate et non par l'intermédiaire de la dihydroxyacétone (DHA). La DHA ne constitue donc pas un intermédiaire dans la conversion du glycérol en dihydroxyacétone phosphate. Ces auteurs expliquent la conversion de la DHA, par le fait que la glycérol kinase n'est pas spécifique et qu'elle est également active sur ce substrat qui est converti en DHAP qui est ensuite métabolisé en pyruvate. L'existence d'une glycérol kinase (GK) constitutive a été également démontrée chez une souche mutante de *Klebsiella pneumoniae* qui ne possède pas la DHAK et qui est capable d'utiliser la DHA (Jin *et al.*, 1982).

Les propriétés cinétiques de la GK chez les deux souches marines de *Desulfovibrio* (Kremer et Hansen, 1987), sont comparables à celles rapportées chez *Escherichia coli* (Thorner, 1975), à la seule exception que le fructose 1,2-diphosphate n'inhibe pas la GK chez les deux souches marines de *Desulfovibrio*. Ceci s'explique par l'incapacité des souches à utiliser le glucose ou un autre sucre (Kremer et Hansen, 1987).

Chez *D. vulgaris* Hildenborough utilisant faiblement le glycérol, les activités enzymatiques impliquées dans la conversion du glycérol en DHAP, et celles impliquées dans la voie glycolytique pour convertir la DHAP en pyruvate, ont été démontrées; la plupart de ces activités sont moins importantes lors d'une croissance en milieu lactate+sulfate qu'en milieu glycérol + sulfate (Kremer et Hansen, 1987). Ces mêmes auteurs ont démontré que *D. gigas*, qui est incapable d'utiliser le glycérol, possède tous les enzymes impliqués dans la glycolyse et responsables de la conversion du DHAP en pyruvate; par contre aucune activité concernant la conversion du glycérol en DHAP n'a pu être mise en évidence lors d'une croissance en milieu lactate+sulfate. Ceci est surprenant dans la mesure où *D. gigas* n'utilise ni le glucose ni aucun autre sucre (Kremer et Hansen, 1987). La présence de ces enzymes s'explique par le fait qu'en plus de leur implication dans la glycolyse et dans la biosynthèse, elles peuvent également jouer un rôle dans la formation et la dégradation de polyglucose, composé de réserve, synthétisé constitutivement en grande quantité chez *D. gigas* (Stams *et al.*, 1983).

Kremer et Hansen (1987) ont proposé un schéma général de la dissimilation du glycérol chez les BSR du genre *Desulfovibrio* (Fig. 1.7).

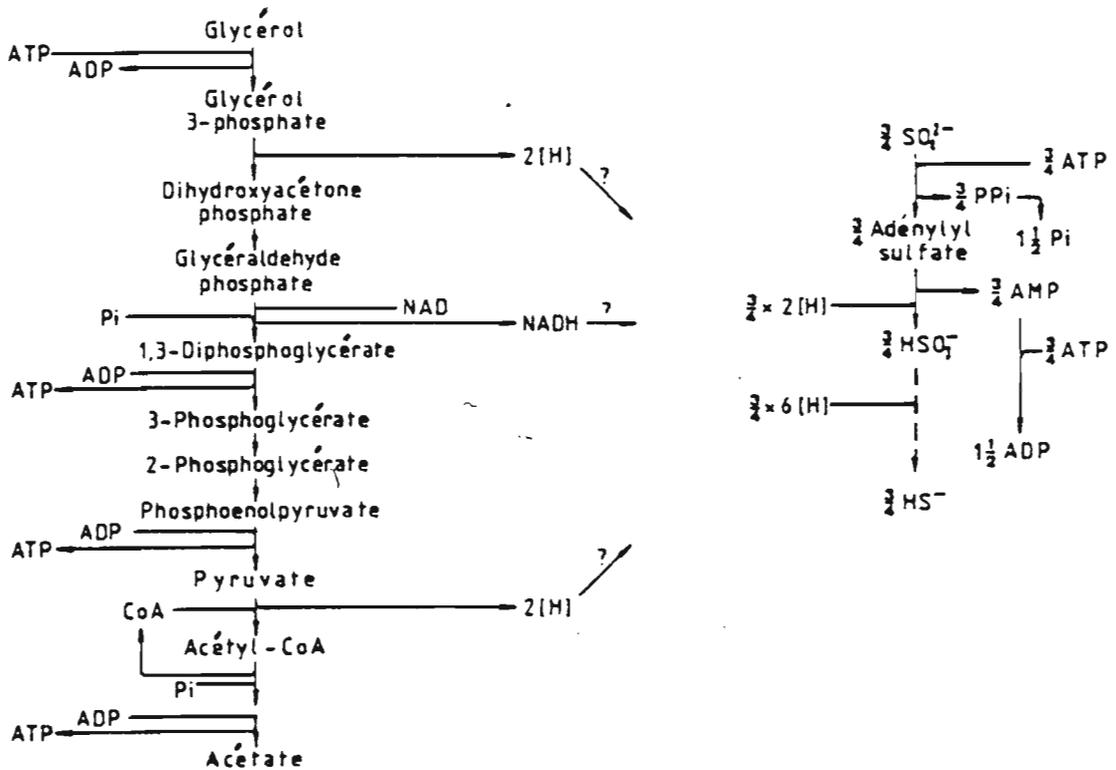


Fig. 1.7 Voie de dissimilation du glycérol en présence de sulfate chez les espèces du genre *Desulfovibrio*.

Il est à noter que toutes les activités responsables de la conversion du glycérol en pyruvate ont été démontrées (sauf celle de la phosphoglyceraldéhyde mutase) en proportions plus que suffisantes pour justifier la voie proposée par les auteurs; en outre, toutes ces activités sont beaucoup plus importantes lors d'une croissance en milieu glycérol+sulfate qu'en milieu lactate + sulfate.

Ces mêmes auteurs ont démontré l'existence d'une enzyme à NAD, la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (NAD-dépendante), chez *Desulfovibrio* sp. souche 20020; il semblerait que le NAD ait un rôle clé dans le processus catabolique (Kremer, 1989) du glycérol. Ceci est d'autant plus important que tous les substrats énergétiques nécessaires à la croissance des espèces du genre *Desulfovibrio*, n'utilisent pas des enzymes à NAD (Postgate, 1984 a). Cependant, il a été récemment démontré l'implication des enzymes cataboliques à NAD dans le métabolisme de certaines bactéries sulfatoréductrices. Chez *Desulfovibrio propionicus*, une malate déshydrogénase est impliquée dans l'oxydation du propionate (Stams *et al.*, 1984); *Desulfotomaculum ruminis* et *Desulfovibrio* sp. souche 20020 20028, dissimilent l'alanine avec une alanine déshydrogénase à NAD (Stams et Hansen, 1986). Une alcool déshydrogénase à NAD est également impliquée dans la dissimilation de l'éthanol par *Desulfovibrio* sp. souche 20020 et

D.gigas ; ce même enzyme est impliqué dans le métabolisme du méthanol par *D.carbinolicus* (Kremer *et al.* , 1988).

Kremer et Hansen (1987) ont également démontré que les activités glycérol déshydrogénase et NADH déshydrogénase, sont localisées dans la membrane, ce qui suggère que les électrons libérés lors des oxydations du NADH en NAD (NAD / NADH , $E^{\circ} = -340 \text{ mV}$) et du DHAP en glycérol 3-phosphate (G3P) ($\text{DHAP} / \text{G3P}$, $E^{\circ} = -190 \text{ mV}$), servent à la réduction du sulfate (adénysulfate / $\text{HSO}_3^- + \text{AMP}$, $E^{\circ} = -60 \text{ mV}$; $\text{HSO}_3^- / \text{HS}^-$, $E^{\circ} = -116 \text{ mV}$); il y a donc probablement un transport d'électrons couplé à une phosphorylation oxydative. Il faut noter qu'aucune des espèces étudiées par ces auteurs n'utilise le 1,2-propanediol, le 1,3-propanediol, le 3-hydroxypropionate ni ne fait fermenter le glycérol.

Le schéma proposé pour la dissimilation du glycérol en présence de sulfate, semble être général chez les espèces du genre *Desulfovibrio* (Kremer et Hansen, 1987); cependant, Nanninga et Gottschal (1986) ont isolé et décrit *D.carbinolicus* qui convertit le glycérol en 3-hydroxypropionate, en présence de sulfate. *D.fructosovorans* utilise également le glycérol et l'oxyde en acétate, en présence de sulfate (Ollivier *et al.* ,1988). Ce sont les deux seules souches décrites jusqu'à présent capables de dismuter le glycérol en 1,3-propanediol et 3-hydroxypropionate, en l'absence de sulfate (Nanninga et Gottschal, 1986, 1987; Ollivier *et al.* ,1988). Nos travaux concernant le métabolisme du glycérol par ces souches (quoiqu'aucune étude de détermination d'activités enzymatiques n'ait été effectuée), montreront que ce métabolisme est beaucoup plus complexe (Qatibi *et al.* , 1989; chapitre 4-6).

2. METABOLISME DES DIOLS

2.1. les bactéries du genre *Pelobacter*

Comme on l'a vu dans les paragraphes précédents, le 1,3-propanediol est formé par beaucoup de bactéries comme produit réduit de la fermentation du glycérol. Le 1,3-propanediol peut constituer un intermédiaire important dans la dégradation anaérobie du glycérol par une culture mixte indéfinie traitant une eau résiduaire de distillation vinicole (chapitre 4-1). Sa formation a été également démontrée pour d'autres eaux résiduaires industrielles (Noves et Watkins, 1985). Ce composé est dégradé en méthane par une boue résiduaire (Symons et Buswell, 1933; chapitre 4-1). Cependant, Schauder et Schink (1989), pensent que le 1,3-propanediol ne constitue pas un intermédiaire important dans la digestion anaérobie du glycérol, dans les sédiments pauvres en sulfate où il est dégradé par *Anaerovibrio glycerinii* qui peut être importante dans ces milieux. Néanmoins, les mêmes auteurs pensent que dans les cultures d'enrichissement en batch, le

1,3-propanediol peut être formé par les bactéries aérobies facultatives qui peuvent entrer en compétition avec les autres bactéries fermentatives et ceci à cause de leur croissance très rapide.

La dégradation anaérobie du 1,3-propanediol pose également le même problème que celui du glycérol. Schink et Stieb (1983) ont étudié la dégradation anaérobie du polyéthylène glycol (P.E.G) et isolé plusieurs souches fermentant ce polymère en acétate et éthanol (Fig. 1.8). Les seuls substrats utilisés par ces isolats sont l'acétoïne, le glycérol, le 1,2-propanediol et le 1,2-butanediol. Ils ont également montré qu'en coculture avec *Methanospirillum hungatei*, ces souches convertissaient l'éthanol en acétate et hydrogène et dégradait le PEG en acétate sans formation d'alcool. Ces bactéries ne réduisant pas les sulfates, Schink et Stieb ont proposé de les rattacher à une nouvelle espèce, *Pelobacter venetianus*.

Schink (1984) a ensuite isolé à partir d'enrichissements anaérobies sur 2,3-butanediol, une autre espèce, *Pelobacter carbinolicus*, fermentant ce composé en acétate et éthanol. En association avec *M.hungatei*, cette bactérie utilise également l'éthanol, le propanol et le butanol en produisant de l'hydrogène et les acides gras volatils correspondants. Des espèces appartenant au genre *Pelobacter* ont été isolées d'un digesteur traitant des eaux résiduaires d'industries alimentaires par Dubourguier et collaborateurs (1986). Ces souches sont capables d'utiliser, en association syntrophique avec *Methanobrevibacter arboriphilus*, en plus des alcools primaires, les diols tels que le 1,2-propanediol et le 1,3-propanediol. Ces auteurs ont également montré que ces espèces sont présentes à de fortes concentrations dans les digesteurs anaérobies où elles représentent la flore utilisatrice d'éthanol dominante.

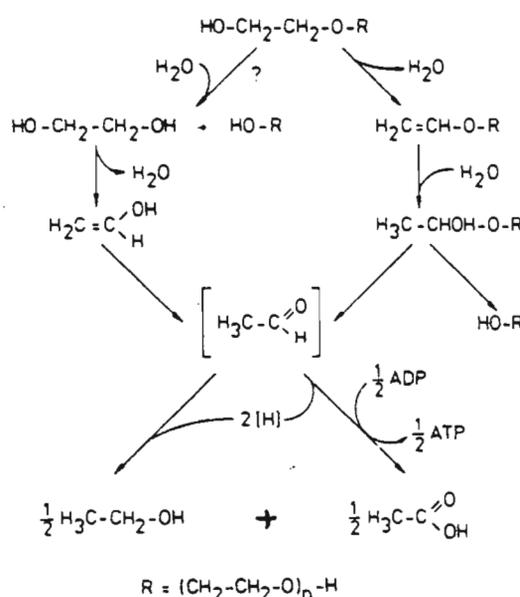


Fig.1.8 Voies hypothétiques de la dégradation du polyéthylène glycol par *Pelobacter* souche Gra PEG1. Le composé entre crochets peut être attaché à un transporteur.

Tout récemment, Oppenberg et Schink (1989), ont isolé de sédiments d'eau douce, à partir d'un enrichissement sur 1,3-propanediol, deux souches appartenant au genre *Pelobacter*, souche Ottglyc1 et WOAcI. Ces souches ne dégradent le 1,3-propanediol qu'en association syntrophique avec *M.hungatei*. Les substrats utilisés par les bactéries acétogènes du genre *Pelobacter* en culture pure ou en association avec une bactérie méthanogène, sont résumés dans le Tableau 1.3.

Substrats	<i>P.venitianus</i> ^a	<i>P.carbinolicus</i> ^b	RE1 ^c	BE4 ^c	Ottglyc ^d	WoAcI ^d
Ethanol	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-
Propanol	nd	(+)	(+)	(+)	-	-
Butanol	nd	(+)	(+)	(+)	-	-
Ethylène glycol	-	+	+	-	-	-
Polyéthylène glycol	+	-	-	-	-	-
Glycérol	+	nd	nd	nd	+	(+)
1,2-propanediol	+	-	(+)	-	-	-
1,2-butandiol	+	-	-	-	-	-
1,3-propanediol	nd	nd	(+)	(+)	(+)	(+)
2,3-butanediol	-	+	(+)	(+)	-	-
Acétoïne	+	+	+	+	+	+

+, croissance en culture pure; (+), croissance en association avec une bactérie méthanogène; -, pas de croissance; nd, non déterminé; a, Schink et Stieb, 1989; b, Schink, 1984; Dubourguier et al. 1986; d, Oppenberg et Schink 1989.

Tableau 1.3 Alcools et polyols utilisés par les bactéries acétogènes du genre *Pelobacter*.

On remarque d'une part qu'aucune de ces souches n'utilise le 1,3-propanediol en culture pure. De plus, les souches Ottglyc1 et WOAcI sont capables d'oxyder le glycérol en acétate et CO₂, en association syntrophique avec *M.hungatei*. Mais seule la souche Ottglyc1 est capable de faire fermenter le glycérol en culture pure, en acétate et 1,3-propanediol. La formation du 1,3-propanediol suggère que cette souche possède une glycérol déshydratase, pour convertir le glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde, alors que la souche WOAcI n'en possède pas. Il en résulte que les voies de formation et d'oxydation du 1,3-propanediol doivent être différentes et que l'oxydation du 1,3-propanediol n'est pas une simple réaction réversible de sa formation.

2.2. Les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio*

Les seules descriptions sommaires concernant l'utilisation des diols tels que les 1,2-diols et les 1,3-diols par les bactéries sulfatoréductrices ont concerné quelques espèces appartenant au genre *Desulfovibrio* : *D.carbinolicus* convertit le 1,3-propanediol en 3-hydroxypropionate, et n'utilise pas le 1,2-propanediol en présence de sulfate (Nanninga et

Gottschal, 1987); *D.fructosovorans* est également capable de convertir le 1,3-propanediol en 3-hydroxypropionate; il n'utilise pas le 1,2-propanediol (chapitres 4-2 et 4-6). Au cours de notre travail, il a été isolé plusieurs souches parfaitement performantes pour l'oxydation du 1,3-propanediol en acétate (chapitres 4-2, 4-3).

Ce n'est que très récemment qu' Oppenberg et Schink (1989) se sont intéressés à ce problème. Ils ont isolé à partir d'un enrichissement sur 1,3-propanediol comme seule source d'énergie en présence de sulfate, une bactérie sulfatoréductrice appartenant au genre *Desulfovibrio* (souche Ott Pd1). L'inoculum provenait de sédiments d'eau douce. Cette bactérie oxyde le 1,3-propanediol en acétate. Elle utilise également l'éthanol, le glycérol, le propanol et le butanol. Par contre, elle n'utilise pas le 3-hydroxypropionate, le fumarate, le malate, le succinate ou le 1,2-propanediol. Ces auteurs ont mesuré un rendement de croissance sur 1,3-propanediol de 7,5 g / mole de 1,3-propanediol dégradé, et de 6,3 g / mole de glycérol dégradé. Ils ont également fait une étude biochimique préliminaire en dosant quelques activités enzymatiques impliquées dans les voies de conversion du 1,3-propanediol en acétate : l'acétaldéhyde déshydrogénase, la phosphate acétyltransférase, l'acétate kinase, la pyruvate oxydoréductase et l'hydrogénase. Ni l'alcool déshydrogénase ni la lactate déshydrogénase n'ont été détectées par les auteurs. Ils en ont conclu que l'acétaldéhyde et l'acétylCoA joueraient un rôle central dans le métabolisme du 1,3-propanediol.

Ces auteurs ont proposé une voie hypothétique de dégradation du 1,3-propanediol en acétate (Fig. 1.9). Un rendement de 7,8 g / mole d'éthanol a été également obtenu, comparable à celui sur 1,3-propanediol. D'après eux, ceci laisserait supposer que l'acétaldéhyde serait un intermédiaire commun dans le métabolisme du 1,3-propanediol et l'éthanol; en conséquence, il ne pourrait y avoir synthèse d'ATP, couplée à l'oxydation de la 3-hydroxypropionaldéhyde en 3-hydroxypropionate. Ce même intermédiaire existerait chez *D.carbinolicus* en milieu éthanol/sulfate (Kremer *et al.*, 1988). Selon Oppenberg et Schink, la synthèse d'ATP ne pourrait pas intervenir lors de la décarboxylation de la malonate semialdéhyde ($\Delta G^{\circ} = - 20 \text{ kJ / mole}$). Donc, selon Oppenberg et Schink, la seule phosphorylation au niveau du substrat se ferait uniquement au niveau de l'acétaldéhyde phosphate qui, en présence d'une mole d'ADP, synthétiserait une mole d'ATP. Rappelons que *D.carbinolicus* et *D.fructosovorans* (chapitres 4-2 et 4-5), convertissent le 1,3-propanediol en présence de sulfate, en 3-hydroxypropionate (couplé à une croissance bactérienne) et non pas en acétate.

Un schéma basé uniquement sur des études physiologiques sera proposé pour la dégradation du 1,3-propanediol par *D.alcoholovorans* ; celui-ci oxyde 1 mole de 1,3-propanediol en 1 mole d'acétate, avec la réduction concomitante d'une mole de sulfate (chapitre 4-5); le rendement de croissance est presque le double de celui rapporté par Oppenberg et Schink (1989) pour la souche OttPd1.

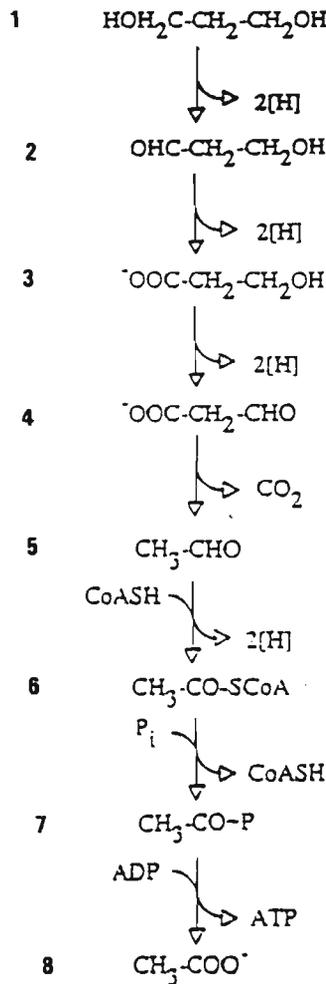


Fig. 1.9 Voie hypothétique de dégradation du 1,3-propanediol par *Desulfovibrio* souche ottPD1. Légendes : 1, 1,3-propanediol; 2, 3-hydroxypropionate; 3, 3-hydroxypropionaldéhyde; 4, malonate semialdéhyde; 5, acétaldéhyde; 6, acétylCoA; 7, acétylphosphate; 8, acétate.

Les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio*, sont non seulement capables d'utiliser les substrats réduits, généralement utilisés par les bactéries fermentatives (cas du glycérol) ou par les bactéries syntrophiques, les seules décrites ayant la capacité d'utiliser le 1,3-propanediol, mais également des substrats plus réduits tels que les polyéthylènes glycols (PEG).

Dwyer et Tiedje (1986) ont isolé et décrit une bactérie sulfatoréductrice, *Desulfovibrio desulfuricans* souche DG2 à partir d'une culture d'enrichissement méthanogène, dégradant les polyéthylènes glycols. Cette souche est capable de convertir les oligomères d'éthylène glycol (EG) en acétate, éthanol et hydrogène.

Elle produit l'acétaldéhyde comme intermédiaire. En coculture avec une bactérie méthanogène du genre *Methanobacterium*, le produit final est l'acétate.

En conclusion, l'oxydation anaérobie du 1,3-propanediol comme dans le cas du glycérol, nécessite la présence d'un accepteur terminal d'électrons tel qu'une bactérie méthanogène hydrogénotrophe ou le sulfate.

D'un point de vue thermodynamique, l'oxydation du 1,3-propanediol couplée à la réduction du sulfate ($\Delta G^{\circ} = -151$ kJ / mole) l'emporte sur celle qui s'effectuerait en association syntrophique avec une méthanogène hydrogénotrophe ($\Delta G^{\circ} = -135,6$ kJ / mole), (chapitres 4-3 et 4-5).

Théoriquement, la nature de l'accepteur terminal d'électrons joue un rôle non seulement sur la vitesse d'utilisation des équivalents réducteurs (Cord-Ruwisch, 1986) libérés sous forme d'hydrogène, lors de la dégradation anaérobie de ces composés réduits, mais également sur la ou les voies de dégradations du substrat et la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative (Tableau 1.4; chapitres 4-4, 4-5 et 4-6).

Parmi les accepteurs d'électrons représentés dans le Tableau 1.4, le CO_2 est surtout utilisé par les bactéries homoacétogènes pour oxyder le glycérol; ceci leur donne un avantage par rapport aux bactéries fermentatives, car le CO_2 est largement rencontré dans les milieux anoxiques.

On montrera dans le chapitre 4-4 que *Desulfovibrio* sp. souche DFG, peut entrer en compétition directe (même à des concentrations non limitantes en substrat), avec *S.acidovorans* pour le glycérol. Ce même accepteur (CO_2), peut être également utilisé par les bactéries méthanogènes comme un accepteur terminal d'électrons pour oxyder les équivalents réducteurs libérés sous forme d'hydrogène, lors de l'oxydation du glycérol (cas de *S.paucivorans*) et du 1,3-propanediol (cas des espèces du genre *Pelobacter*) par les associations syntrophiques.

Couples rédox	E° mV ^a	ΔG° kJ / mole H ₂ ^b
O ₂ / H ₂ O	+ 818	- 237,3
nitrate / nitrite	+ 433	-
nitrate / ammonium	-	- 149,9
nitrite / ammonium	-	- 145,5
fumarate / succinate	+ 33	- 86,2
APS / AMP+HSO ₃ ⁻	- 60	-
S ₂ O ₃ ²⁻ / SH ⁻ + HSO ₃ ⁻	- 402	-
HSO ₃ ⁻ / SH ⁻	- 116	- 43,2
S ° / SH ⁻	- 270	- 28,0
HCO ₃ ⁻ / acétate ⁻	- 290	- 26,2
CO ₂ / CH ₄ ^c	- 244	- 33,9
NAD / NADH	-	+ 18,0
H ⁺ / H ₂	- 414	-

a, Thauer (1977); b, Cord-Ruwisch 1987; c, pour les couples rédox intermédiaires, voir Keltjens et Van der Drift. 1986

Tableau 1.4 Potentiels rédox d'accepteurs d'électrons et variations d'énergie libres standards par mole d'H₂ transférée.

2

MATERIELS ET METHODES

1. ORIGINE ET MAINTIEN DE LA POPULATION MICROBIENNE MIXTE

1.1. Origine

Les boues de digesteurs urbains utilisées comme inoculum, n'offrant pas de bons résultats pour traiter les effluents de distilleries, la prospection de différents biotopes naturels anaérobies a conduit à utiliser les sédiments d'une lagune de distillerie proche de Narbonne (France); ces inoculums présentent une très grande activité ainsi que des conditions de fermentation peu communes (Bories, 1981; Bories et Raynal, 1982). Dès l'ensemencement, On note une rapide formation d' AGV (acides gras volatils), l'acide propionique constituant plus de 80% des AGV. La dégradation de cet acide est immédiate, et à vitesse très élevée : $1.2 \text{ mM l}^{-1}\text{h}^{-1}$. La production de méthane est enregistrée dès le début de la fermentation, même pendant la phase acidogène, avec une proportion de 40% de méthane dans le biogaz. Une inversion des proportions des gaz intervient lors de la phase de dégradation des AGV (CO_2 , 26%; CH_4 , 74%). Un ensemencement des vinasses avec 2% (V/V) de cet inoculum conduit à la fermentation complète de ce substrat à 35°C. De plus, de très bonnes performances sont obtenues à 20°C. Ainsi, en fermentation continue, un temps de séjour de 13 j est actuellement appliqué pour la fermentation des vinasses à 30 000 mg O_2 / l de DCO.

1.2. Maintien

Vinasse de vin	
pH	4.5 -4.7
DCO g O_2 / l	78 -83
DBO g O_2 / l	37 - 41
Matière en suspension g/l	0.75
Glycérol g / l	18.6-25.8
Acide lactique g / l	13.0-21.0
Acide malique g / l	1.0-9.5
Sucres totaux g / l (glucose)	4.0
Polyphénols g d'ac. gallique / l	0.8
Azote total Kjeldahl mg / l	210.0
Phosphore mg / l	200.0
Potassium mg / l	47.5 - 51.5
Sodium mg / l	55.0
Sulfate mg / l	600-1200

Tableau 2.1 Exemple de composition d'une eau résiduaire de distillerie vinicole (préconcentré 3fois).

L'inoculum est cultivé en présence d'une eau résiduaire provenant de la distillation du vin. Cette eau est la phase désalcoolisée, appelée vinasse, et a subi industriellement une préconcentration thermique et un détartrage à la chaux (Tableau 2.1). Ce polysubstrat contient, comme la plupart des rejets polluants de l'industrie agro-alimentaire, des éléments minéraux et des substrats organiques, dont les principaux sont le glycérol et l'acide lactique. Ces deux composés représentent à eux seuls, 60% environ du carbone organique total, le reste se répartissant en substrats multiples tels que l'acide malique, des sucres, de l'acide citrique, des polyphénols, etc. La concentration en sulfate varie entre 600 et 1200 mg / l. Afin de disposer en permanence d'un inoculum actif et stable, la culture mixte indéfinie est maintenue, tout au long des essais, en réacteur infiniment mélangé (Biolafitte) de 20 litres de volume utile (Fig. 2.1). Les conditions opératoires sont les suivantes :

- agitation mécanique 50 rpm
- charge appliquée..... 0.4 g DCO l⁻¹ j⁻¹
- temps de séjour..... 60 jours
 - température 35°C
 - pH 7,1-7,5

L'alimentation est semi-continue à raison d' 1l de substrat tous les 3 jours.

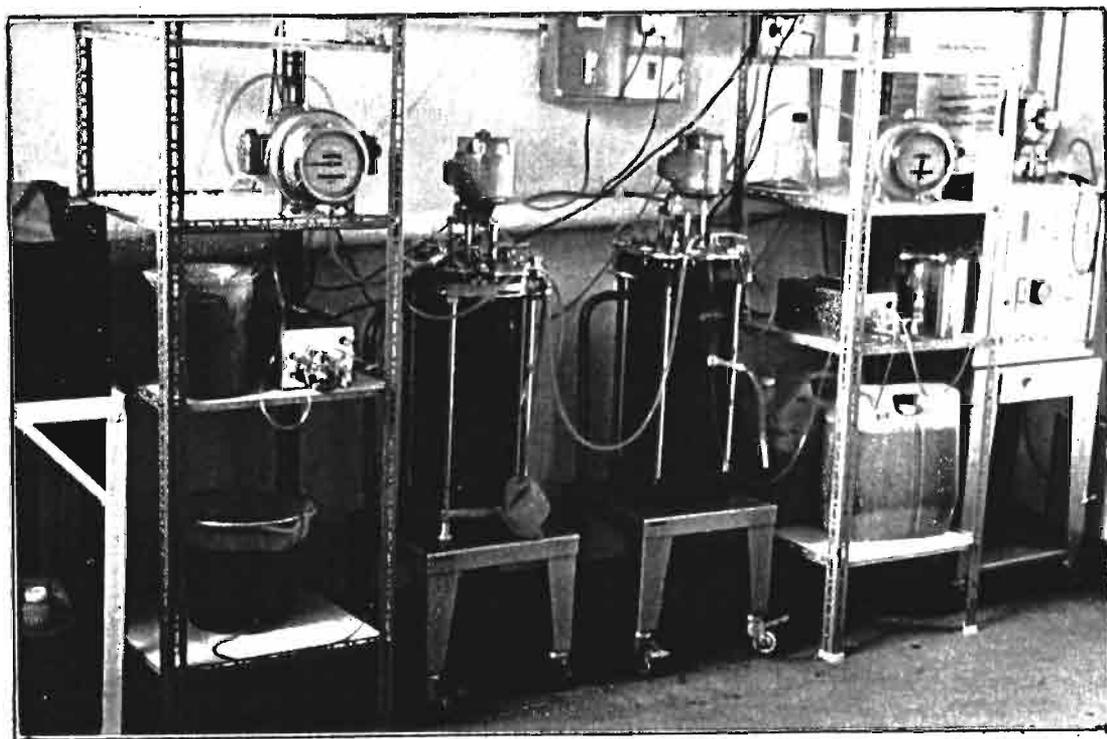


Photo 2.1. Réacteurs de 20 litres et accessoires périphériques (voir texte)

2 . MILIEU DE CULTURE

2. 1. Composition

Le milieu de culture utilisé est un milieu strictement minéral sans sulfate; sa composition est donnée en annexe. Le tampon et le réducteur utilisés sont respectivement le tampon phosphate et la cystéine.

2. 2. Préparation

Le dispositif servant pour la préparation du milieu minéral est reporté sur la figure 2.1. Dès la sortie de l'autoclave, lorsque le milieu est encore bouillant, l'atmosphère du ballon est évacuée (sortie, 2) et remplacée (entrée,1) par de l'azote stérile. Le milieu est ensuite refroidi sous cette atmosphère contrôlée et maintenu en légère surpression (0, 2 bars), les sorties 2 et 4 sont alors fermées. On ajoute ensuite la cystéine , préparée dans des flacons antibiotiques en anaérobiose et stérilisés par autoclavage (120°C pendant 20 mn). Le flacon contenant le réducteur est mis en surpression et la totalité de cette solution est introduite dans le ballon à travers le septum (entrée, 3), grâce à une double aiguille stérile. Quand la résazurine est décolorée, la culture mixte indéfinie prélevée dans des récipients stériles en anaérobiose, est introduite par l'entrée 4 grâce à une pompe double canal , la sortie 2 reste ouverte. De cette manière, on dilue notre culture mixte stérilement et sans introduction d'oxygène.

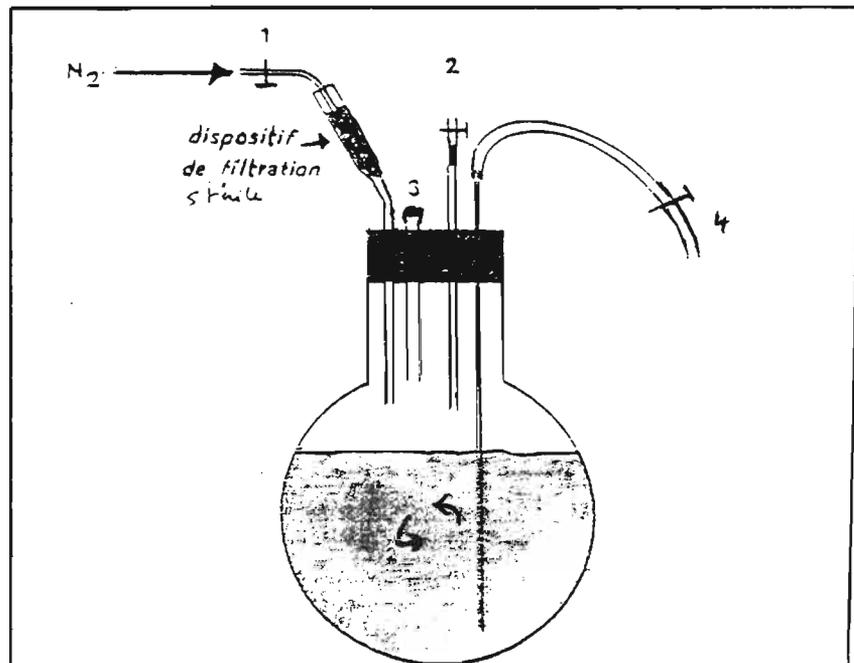


Fig 2.1. Principe du ballon servant à la préparation du milieu minéral et à la préparation de la culture mixte indéfinie.

3. CONDITIONS DE CULTURE

Avant d'effectuer nos expériences, la culture mixte indéfinie, est prélevée directement du fermenteur, stérilement et en anaérobiose; elle est diluée dans le ballon de 6 litres contenant le milieu minéral sous atmosphère d'azote pur, préalablement stérilisé (20mn à 120 °C) et réduit (Fig. 2.1). La dilution effectuée est de 40 à 50% (V/V). Après dilution, la culture mixte est incubée à 35°C pendant 3 à 4 jours. Le but de cette préincubation est de stimuler la croissance bactérienne et de consommer complètement le sulfate qui peut provenir de l'inoculum. Le milieu est ensuite distribué dans des fermenteurs d'1 litre de volume utile (photo 2-1) munis d'une sonde de pH reliée à un régulateur qui maintient le pH choisi, par addition de soude 3 N. La température est stabilisée à 35°C par un circuit d'eau externe provenant d'un bain thermostaté. L'homogénéisation des milieux se fait par agitation magnétique. Lorsque le pH n'est pas contrôlé, le milieu est réparti dans des flacons sérum de 500 ml adaptés, contenant 300 ml de liquide réactionnel sous atmosphère contrôlée. L'homogénéisation des milieux se fait sur une table d'agitation dans une enceinte thermostatée à 35°C.

Les substrats, le sulfate, le molybdate à 20mM (inhibiteur spécifique de la sulfatoréduction) et le chloroforme à 0.003% (inhibiteur de la méthanogénèse) sont ajoutés à partir de solutions stocks stériles et anaérobies, en utilisant des seringues préalablement purgées avec de l'azote. Toutes nos expériences ont été effectuées en batch.

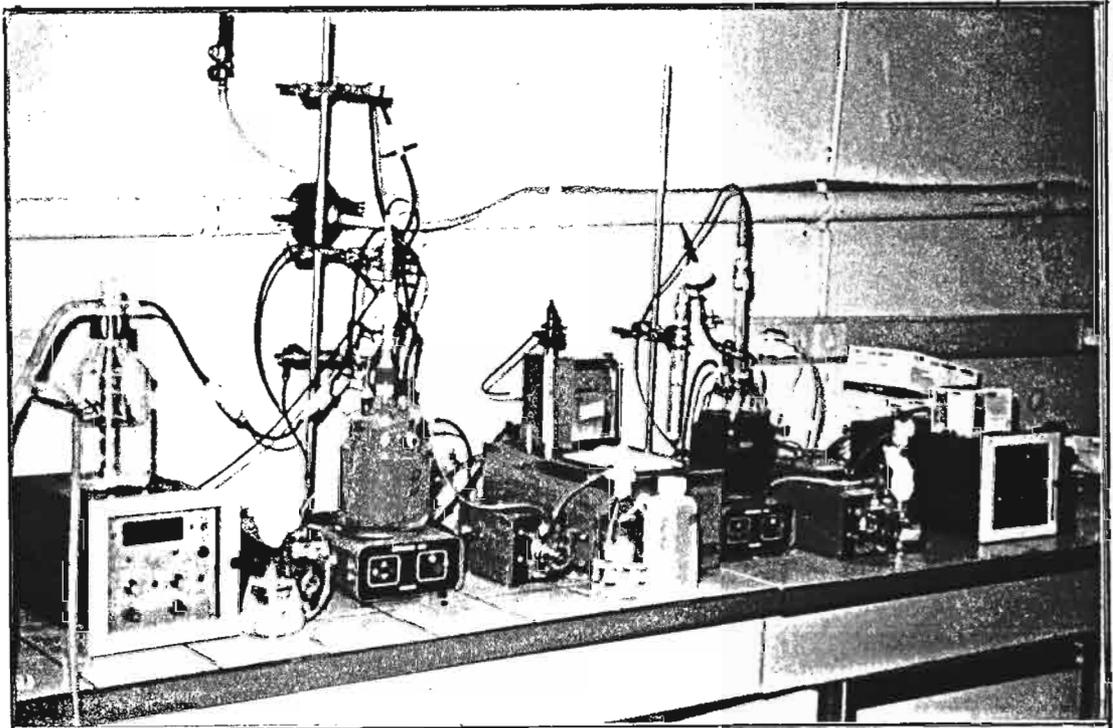


Photo 2.2. Dispositifs servant à effectuer les expériences de fermentation du glycérol en batch avec une régulation automatique de pH (voir texte). Noter la différence de coloration du milieu en fonction de la teneur en sulfures.

4. METHODES ANALYTIQUES

4.1. Analyse de la phase liquide

Les échantillons de 5 ml, prélevés lors des expériences, sont centrifugés à froid 30 mn à 9000 t. mn^{-1} à l'aide d'une centrifugeuse (SORVALL); le surnageant est stocké au congélateur jusqu'au moment de l'analyse.

4.1.1. Dosages enzymatiques des alcools et acides organiques

Ils utilisent tous la formation ou la disparition du NADH dont l'absorption à 340 nm peut être suivie au spectrophotomètre. Les analyses sont réalisées en continu soit de façon manuelle, soit sur chaîne automatique de type Technicon (Batlle *et al.*, 1978; Batlle et collon, 1979), d'après les méthodes Boehringer et avec un spectrophotomètre Perkin Elmer.

Ethanol

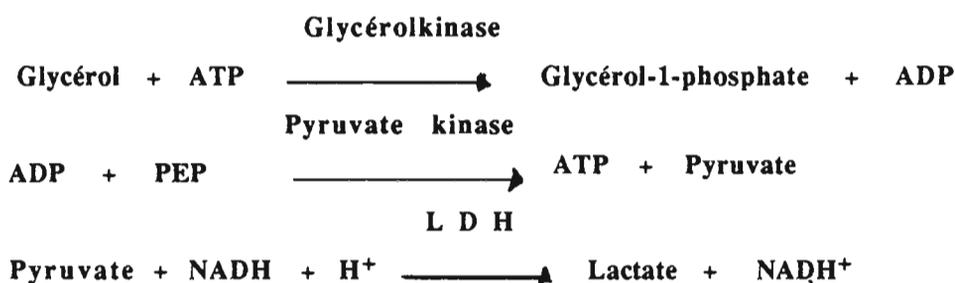
L'éthanol est oxydé en présence de NAD^+ en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase (ADH) selon la réaction :



L'équilibre est déplacé dans le sens de la formation d'acétaldéhyde par un excès de NAD^+ , en milieu alcalin et l'élimination de l'acétaldéhyde par le semicarbazide.

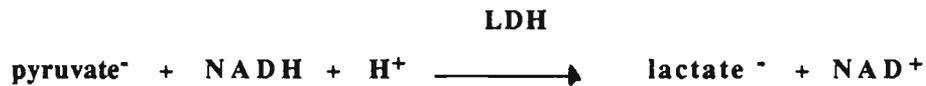
Glycérol

Ce dosage fait intervenir une série de trois réactions enzymatiques dont la dernière consiste en une consommation de NADH proportionnelle à la quantité de glycérol mise en jeu :



Acide pyruvique

Le pyruvate est dosé par réduction en présence de lactate déshydrogénase (LDH) et de NADH, H⁺ selon l'équation suivante :



La consommation de NADH, mesurée par la diminution de l'extinction du mélange réactionnel à 340 nm, est proportionnelle à la quantité de pyruvate présent.

Acide lactique

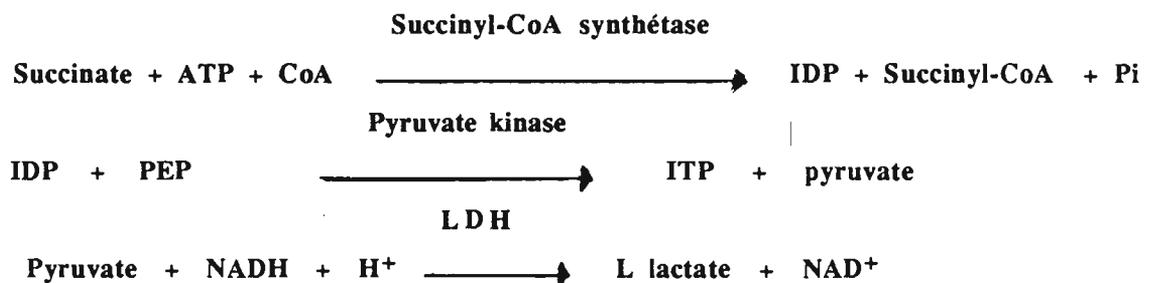
Il s'agit de la réaction inverse de la précédente où l'on mesure la formation du NADH :



Dans ce cas, l'équilibre de la réaction est déplacé en faveur de la production de pyruvate par un excès de NAD, en milieu alcalin et l'élimination par l'hydrazine, du pyruvate produit.

Succinate

Même principe que pour le glycérol avec les trois réactions suivantes :

**4.1.2. Dosage de l'acroléine**

La méthode colorimétrique mise au point par Circle et al (1945), consiste à former un complexe coloré acroléine-tryptophane. La lecture de la densité optique se fait à 555 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Varian 634.

4.1.3. Dosage des aldéhydes

La méthode de Jaulmes et Espezel (1935) est basée sur la combinaison de la fonction aldéhyde avec le sulfite et le titrage du sulfite combiné. La combinaison a lieu en milieu tamponné à pH 7 avec un excès de sulfite. L'acide sulfureux libre est alors oxydé en milieu acidifié. Puis l'acide sulfureux combiné à l'aldéhyde est titré en solution boratée à pH 8.5; le sulfite est progressivement libéré au fur et à mesure de l'oxydation de la fraction dissociée. La grande instabilité de la combinaison à ce pH permet son titrage direct à l'iode.

4.1.4. Détermination du carbone organique total dissous (COT)

Le dosage se fait avec un analyseur DOHRMANN (DC-80) sur le principe d'une oxydation U.V., à basse température, dans un milieu très fortement oxydant (persulfate de potassium). Le CO_2 formé est détecté par infrarouge. Les échantillons préalablement acidifiés et décarboniqués par barbotage sous oxygène, sont introduits à l'aide d'une seringue. Un intégrateur donne les quantités de COT directement en mg/l grâce à un affichage digital. La figure 2-3 montre un schéma simplifié de l'analyseur DC-80.

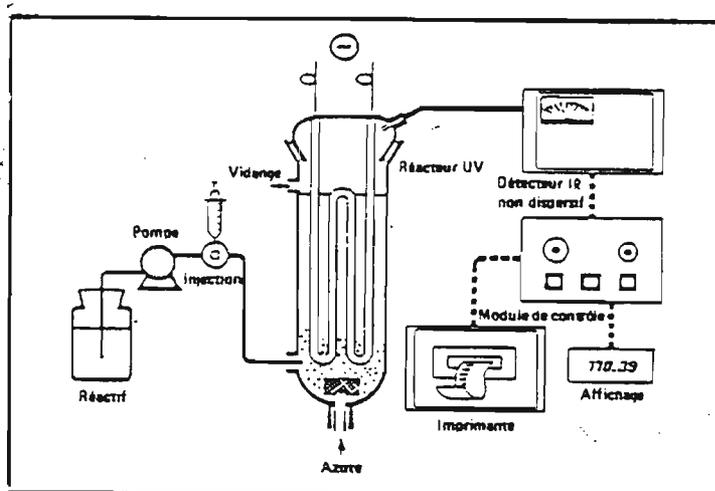


Fig 2.2. Schéma simplifié de l'analyseur DC-80. Le réactif d'oxydation au persulfate de potassium est amené en continu vers le réacteur à l'aide d'une pompe de faible débit.

4.1.5. Dosage du 1,3-propanediol

Il se fait par chromatographie en phase gazeuse (C.P.G). L'appareil utilisé est un chromatographe Intersmat IGC 120 DFL à ionisation de flamme, relié à un intégrateur enregistreur calculeur Shimadzu chromatopak CR 3A et muni d'une colonne en verre pyrex de 1 m de long et 2

mm de diamètre, garnie de Carbo-pack C/O (80-100 mesh, SUPELCO, Inc.) à 8% THEED. Les conditions opératoires sont les suivantes :

<u>Températures :</u>	- colonne	125°C
	- injecteur	150°C
	- détecteur	150°C
<u>Débits gaz :</u>	- gaz vecteur, N ₂ (azote C)	17 ml / mn
	- air	300 ml / mn
	- H ₂	30 ml / mn

Les échantillons centrifugés sont dilués de moitié par une solution étalon interne, d'éthylène glycol (méthode de dosage interne) dans de l'acide phosphorique à 5%. Les concentrations proportionnelles aux aires des pics correspondants, sont calculées directement par l'intégrateur préalablement calibré par un mélange étalon. Le volume injecté est de 2 µl à l'aide d'une seringue Hamilton. La figure 2.3 représente un chromatogramme du 1,3-propanediol et de l'éthylène glycol.

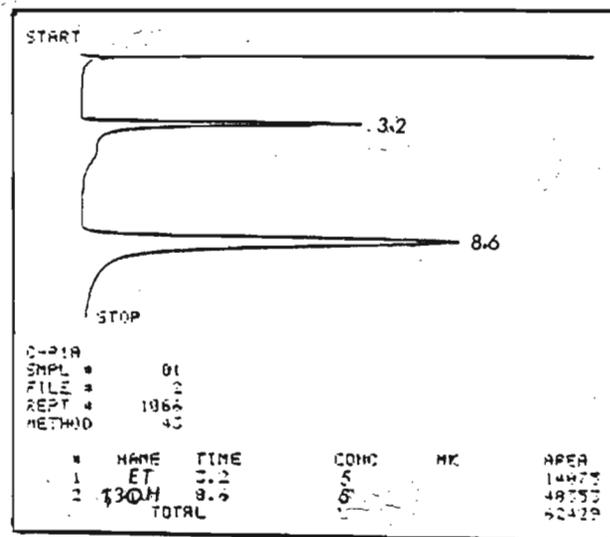


Fig 2.3. Courbe étalon pour le dosage du 1,3-propanediol par CPG.

4.1.6. Analyse des acides gras volatils (AGV)

L'analyse des AGV est réalisée en CPG avec un chromatographe Intersmat IGC 120 DFL à ionisation de flamme, muni d'une colonne en pyrex de 2 m de long et 1/8 de pouce de diamètre, garnie de phase SP 1200 à 10% sur Chromosorb WAW (80-100 mesh) à 1% d'acide

phosphorique.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

<u>Températures :</u>	- colonne	120°C
	- injecteur	180°C
	- détecteur	250°C
<u>Débits gaz :</u>	- gaz vecteur N ₂ (azote C)	17 ml / mn
	- air	300 ml / mn
	- H ₂	30 ml / mn

Comme pour le 1,3-propanediol, les échantillons sont dilués de moitié par une solution étalon interne d'acide éthyl 2-butyrique dans de l'acide phosphorique à 5% (Méthode de dosage interne). Le volume injecté est de 2 µl.

La figure 2.4 représente un chromatogramme d'AGV, de l'acétate au caproate.

4.1.7. Dosage du sulfate

La sulfatoréduction a été estimée par la disparition du sulfate du milieu de culture. Ce milieu de culture utilisé étant fortement coloré (voir photo 2.2) les méthodes colorimétriques de dosage des sulfures se sont avérées inefficaces.

Néanmoins dans ces milieux complexes, on a pu développer une méthode de dosage indirecte des sulfures, dont le principe est décrit en annexe. Le dosage du sulfate proprement dit est réalisé par chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC) dans les conditions suivantes :

- Colonne , Echangeuse d'anions Vydac 302 IC (25 cm de long)
- Pompe , Shimadzu LC 6A; Flux , 2 ml mn⁻¹
- Détecteur, Conductimètre (Shimadzu CDD 6A)
- Intégrateur calculateur, Shimadzu chromatopack CR 3A
- Eluant, Acide phtalique (3 mM, pH 4,9)
- Boucle d'injection, 100 µl
- Température, ambiante

Dans ces conditions, le temps d'élution du sulfate est de 5mn ± 5% .

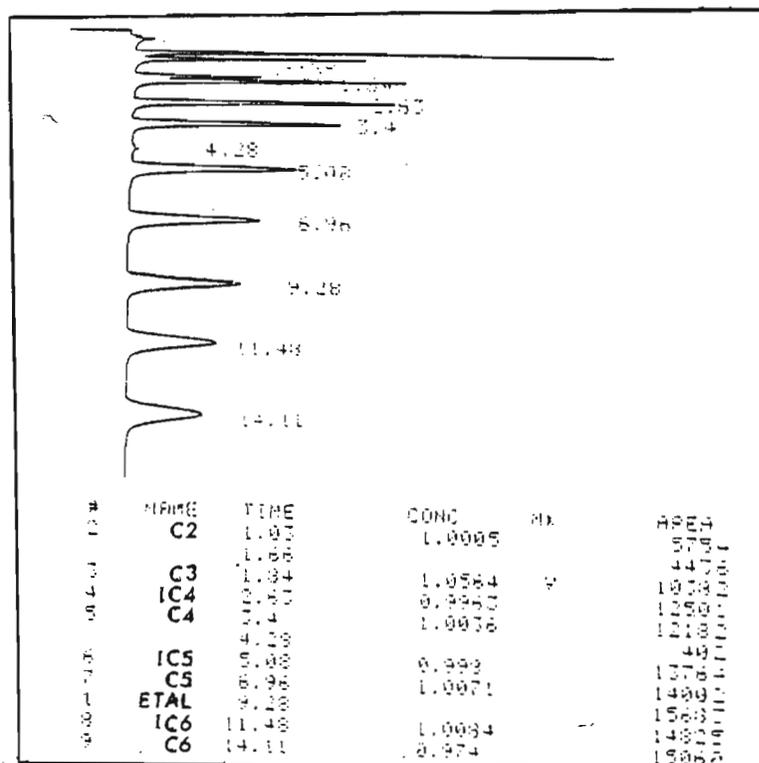


Fig 2.4. Chromatogramme d'un mélange d'acides gras de l'acétate au caproate

4.2. Analyse de la phase gazeuse

L'analyse des gaz (CH_4 , H_2 et CO_2) est effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur appareil INTERSMAT IGC 10 M équipé d'un catharomètre et relié à un intégrateur ICR 1. La séparation des gaz est réalisée par deux colonnes en série dont le montage est précisé dans la figure 2.5 :

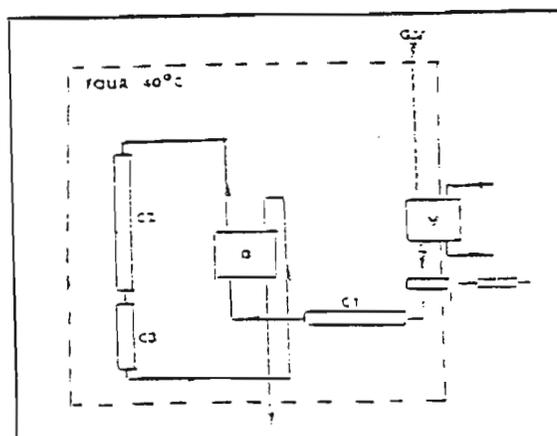


Fig. 2.5. Montage d'un chromatographe à catharomètre pour doser les gaz. voir légendes, page 54

I, injection directe à la seringue (1ml); V, injection par vanne rotative (0,3 ml); G.V , gaz vecteur : argon 34ml/mn ; D, catharomètre, intensité du courant : 115 mA; CL, colonne en acier inoxydable, longueur : 50 cm, diamètre : 1/8 de pouce, garnie de silicagel 80 / 100 mesh, sépare le CO₂ des autres gaz ; C2, colonne vide longueur : 10 m, diamètre : 1 / 8 pouce; elle retarde le passage des gaz au niveau du détecteur; C3, colonne en acier inoxydable, longueur : 2 m, diamètre 1 / 8 pouce, garnie de tamis moléculaire 13 X, 80 / 100 mesh; elle sépare O₂, N₂, H₂ et CH₄. Les deux filaments du détecteur servent tour à tour à l'analyse et à la référence. L'étalonnage de type externe est réalisé grâce à un mélange gazeux de proportions connues. Les résultats sont donnés directement en pourcentage par l'intégrateur (Fig.2.6)

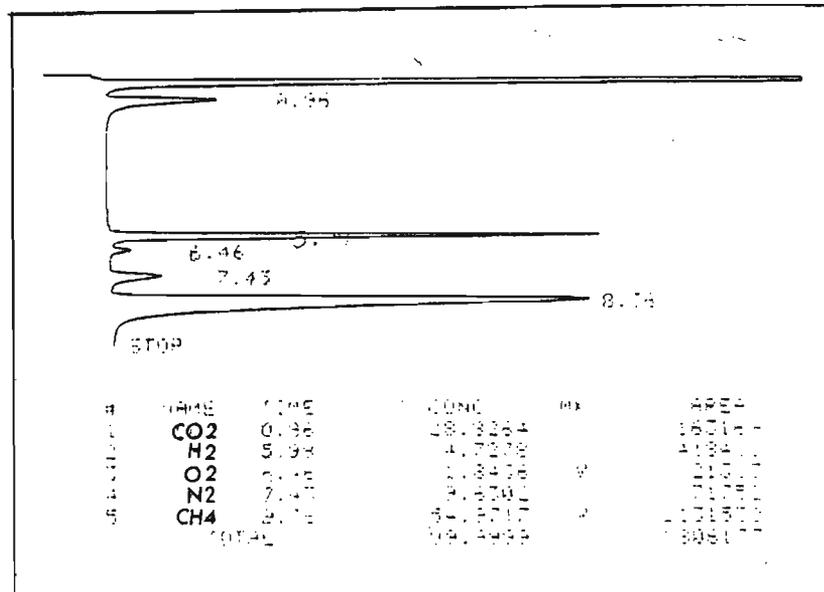


Fig. 2.6 Chromatogramme d'un mélange gazeux (CO₂, H₂, O₂, N₂ et CH₄)

5. TECHNIQUES DE L'ANAEROBIOSE

5.1. Manipulations à l'abri de l'oxygène

Les manipulations des germes E.O.S (extrêmement sensibles à l'oxygène) est possible grâce à l'utilisation de deux techniques :

5.1.1. Boîte à gants anaérobie

Les techniques classiques de microbiologie peuvent être appliquées à des bactéries anaérobies strictes à l'intérieur d'une enceinte anaérobie. L'atmosphère y est constitué de 95% de N₂ et 5 % de H₂. Les manipulations se font par l'intermédiaire de gants en néoprène fixés sur une paroi

de vinyl. Cette technique présente l'inconvénient lié au temps de préparation de la boîte, et au choix limité du gaz. Néanmoins elle reste efficace pour la préparation d'échantillons destinés à des études de numérations.

5.1.2. Technique de Hungate (1960) modifiée par Bryant (1972)

Ces techniques reposent sur l'utilisation de flacons et de tubes sertis, obturés par des bouchons en butyl noir. Ceux-ci peuvent être transpercés par des aiguilles stériles, assurant les échanges liquides et gazeux, sans risque de contamination ou d'introduction d'air (Fig. 2.7 et 2.8). Les manipulations se font à l'aide d'une rampe de gazage, qui permet de travailler en anaérobiose et stérilement. Ainsi la technique d'Hungate adaptée pour l'utilisation de seringues, garantit de meilleures conditions anaérobies que la boîte à gants et permet de choisir le mélange gazeux et de contrôler sa pression.

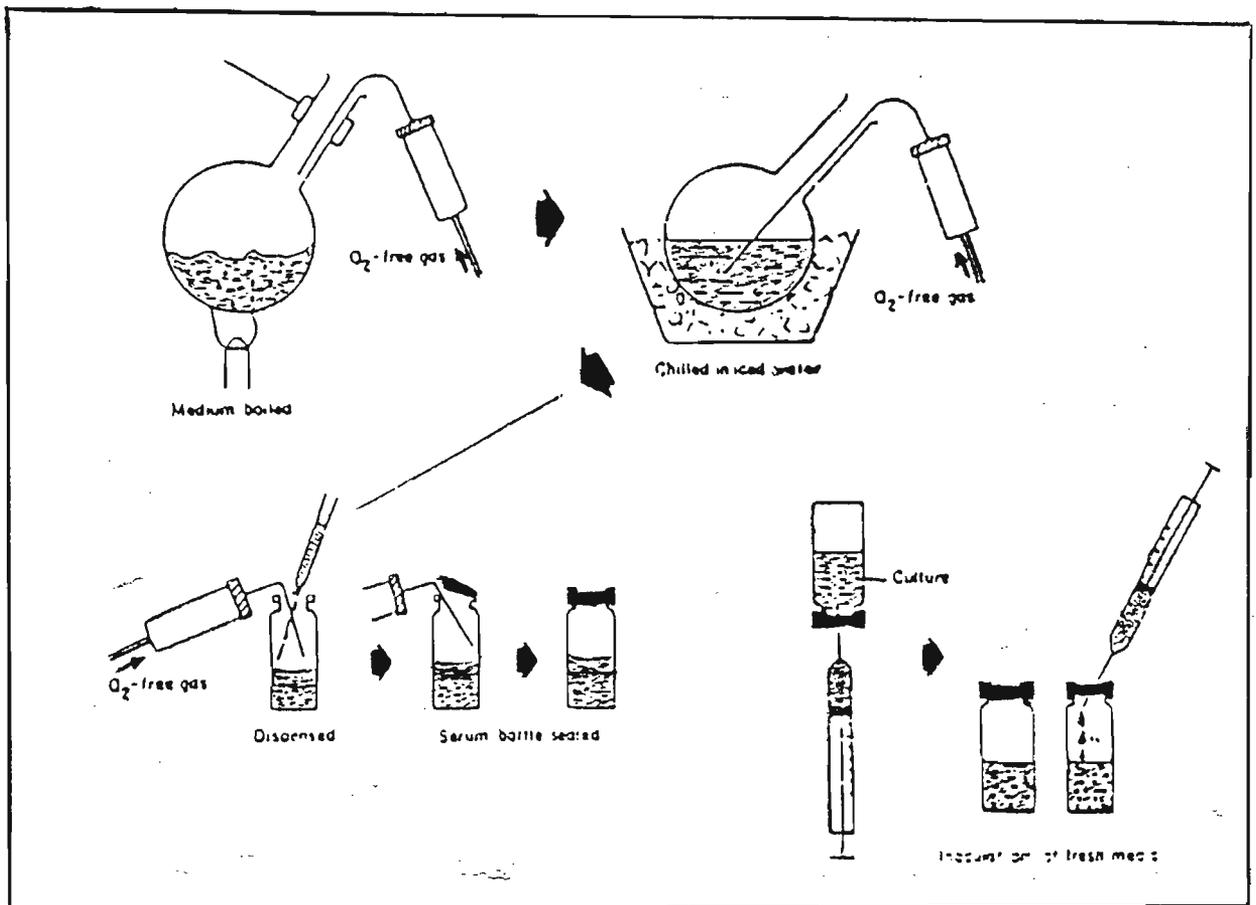


Fig. 2.7. Schéma montrant la préparation et l'inoculation des milieux de cultures par la technique d'Hungate modifiée (d'après Latham et Wolin, 1978)

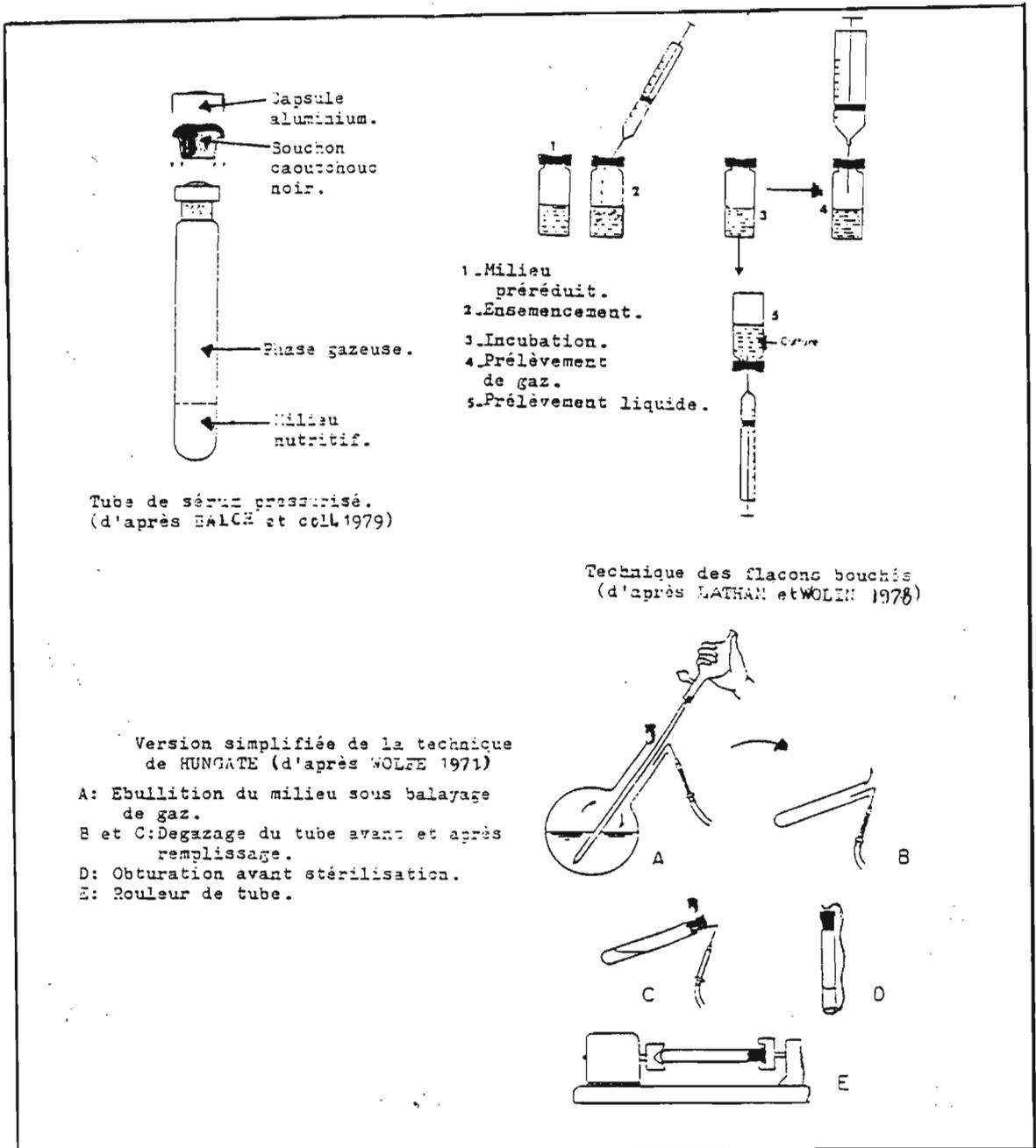


Fig. 2.8 Voir légendes commentant les différents schémas.

6. MILIEUX DE CULTURE

6.1. Composition

Le milieu utilisé est celui décrit par Widdel et Pfennig (1981); il a servi de milieu de référence pour toute la partie microbiologique (numérations, isollements, caractérisations, métabolismes, conservations, etc ...). Ce milieu a été choisi pour ses critères écologiques qui ont déterminé sa composition. La plupart des bactéries sulfatoréductrices isolées, l'ont été sur ce milieu.

Ce milieu a servi aussi pour les dénombrements des bactéries fermentatives et méthanogènes . Les variations apportées à sa composition sont décrites dans l'annexe.

6.2. Préparation

La préparation des milieux est réalisée selon la technique décrite par Widdel et Pfennig (1981) . Cette technique, qui a pour principe de répartir dans des tubes un milieu contenant tous les réactifs (vitamines, réducteurs, tampon, etc), permet d'obtenir un milieu homogène; elle s'applique surtout à la répartition de faibles volumes. A un litre de milieu de base, on ajoute : 1 ml d'une solution d'oligoéléments de Widdel (cf : annexe) et 1 ml de rézasurine à 0,1 % comme indicateur de potentiel rédox. Le milieu de base de Widdel est autoclavé à 110°C pendant 45 mn, dans un ballon conçu à cette fin (Fig 2.9). Dès la sortie de l'autoclave, lorsque le milieu est encore bouillant, l'atmosphère du ballon est évacuée (sortie, 2) et remplacée (entrée, 1) par un mélange de gaz stérile N_2-CO_2 (80-20%). Le milieu est ensuite refroidi sous cette atmosphère contrôlée et maintenu en légère surpression (0, 2 bars), la sortie 2 est alors fermée.

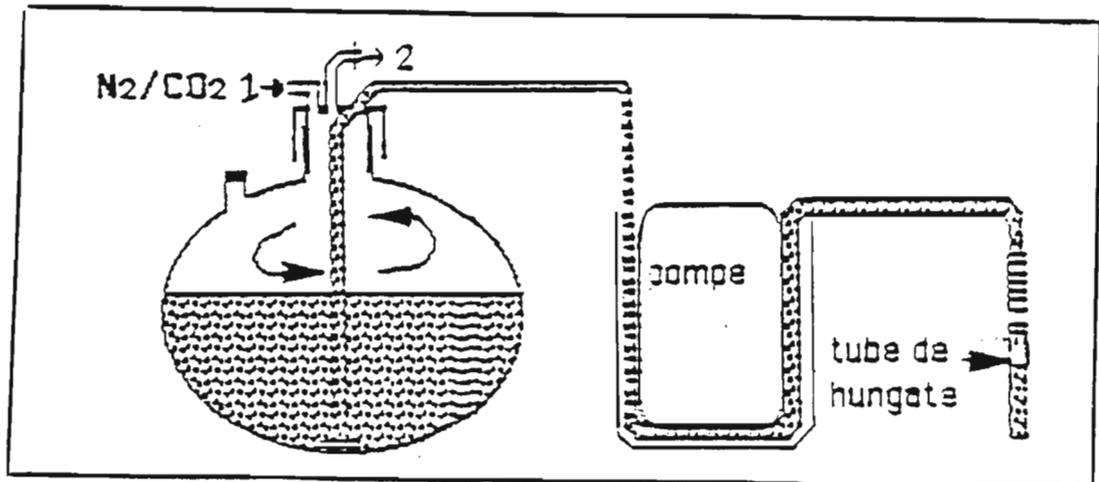


Fig.2.9. Dispositif de préparation et de distribution (modifiée) du milieu de Widdel.

Les solutions suivantes (composition en annexe) sont alors rajoutées au milieu : 0,1 ml d'une solution de vitamines de Widdel, concentrée 10 fois; 30 ml d'une solution tampon bicarbonate ($NaHCO_3$) 1M, anaérobie, stérile et saturée en CO_2 , pour avoir une concentration finale de 30 mM et 3 ml de $Na_2S, 9H_2O$ 12%. Après décoloration de la rézasurine, le pH du milieu est vérifié en prélevant stérilement 5 ml de milieu . Le pH final doit être compris entre 7,2 et 7,3; il est ajusté au besoin par une solution anaérobie stérile de NaOH 3M ou HCl 3 M. Le milieu est ensuite réparti stérilement près d'une flamme, dans des tubes de Hungate ou flacons préalablement dégazés avec un mélange (N_2/CO_2 , 80-20%) et stérilisés à 110°C pendant 45 mn.

7. TECHNIQUES DE NUMERATIONS

7.1. Estimation de la densité bactérienne par MPN (Most Probable Number)

Nous avons utilisé la technique du MPN (De Man, 1975) avec 5 répétitions par dilution. Cette méthode statistique est basée sur la dilution de l'échantillon : on admet que l'activité du groupe bactérien recherché, intervenant dans la dernière dilution positive, est due à une seule cellule .

7.1.1. Prélèvement de l'échantillon

L' échantillon à analyser, soutiré du fermenteur de 20 litres directement dans un flacon stérile gazé sous N₂, est introduit dans une boîte à gants anaérobie (La Calhène, Bezons). Après homogénéisation au Potter, on réalise à l'intérieur de la boîte à gants une série de dilutions au 1/10^{ème} à l'aide de seringues stériles de 1 ml, pour obtenir les inoculums dilués nécessaires à toute la suite de l'expérimentation en tubes de Hungate (Bellco. Glass Inc., Vineland, New Jersey). Les dilutions au 1/10^{ème} sont réalisées dans 9 ml d'eau réduite, stérile et tamponnée , afin d'éviter tout choc osmotique.

7.1.2. Ensemencement

Après réalisation des dilutions, les différents milieux spécifiques des numérations sont ensemencés stérilement, en anaérobiose stricte, hors de la boîte à gants, selon la technique de Hungate (1960), modifiée par Bryant (1972). Les dénombrements sont déterminés en double à partir de la même dilution , en ensemençant 5 tubes par dilution.

Les bactéries sulfatoréductrices ont été dénombrées avec le glycérol (20 mM) + sulfate (20 mM); le 1,3-Propanediol (20mM) + sulfate (20mM); le propionate (20mM) + sulfate (20mM); le lactate (20mM) + sulfate (20mM) et l'acétate (20mM) + sulfate (20mM). Les bactéries fermentatives ont été dénombrées avec le glycérol (20 mM); le 1,3-Propanediol (20mM); le propionate (20mM) et le lactate (20mM). Les dénombrements des bactéries méthanogènes acétoclastes et hydrogénophiles ont été réalisés avec les substrats suivants : acétate (20mM) et H₂/CO₂ (3 bars) + acétate (5 mM), comme source de carbone.

Tous nos dénombrements ont été réalisés en milieu liquide, en tubes de Hungate et en anaérobiose. Les tubes, préparés en anaérobiose stricte selon la technique de Hungate (1960), sont complètement pleins (pour les numérations des bactéries sulfatoréductrices), ou contiennent 9 ml de milieu de culture (pour les numérations des bactéries fermentatives et méthanogènes).

7.1.3. Lecture des résultats et détermination du nombre de bactéries

Le milieu de Widdel et Pfennig ne contient pas suffisamment de fer pour permettre le noircissement de la culture; ce dernier s'obtient par la production de sulfures qui précipitent avec le fer présent en solution, sous forme de FeS, comme dans le cas du milieu de Posgate (1966). La lecture des tubes pour la détermination des BSR, se fait alors par le dosage des sulfures produits, pour les tubes présentant un trouble bactérien. Ce milieu, bien que sélectif, peut permettre le développement d'autres espèces bactériennes anaérobies strictes ou facultatives également présentes dans l'échantillon. Pour cette raison, la présence de BSR ne peut pas être visualisée uniquement par l'apparition de ce trouble et nécessite donc la recherche d'un caractère propre à ce groupe. On les caractérise alors par l'apparition des sulfures; les produits de dégradation sont également déterminés. Les sulfures sont dosés par la méthode colorimétrique de Cord-Ruwisch (1985) décrite au paragraphe 11.1.4. Le nombre de bactéries fermentatives est déterminé par le virage du bleu de méthylène au jaune et la nature des métabolites produits. Le nombre de bactéries méthanogènes est déterminé par la mesure qualitative du méthane. Les tubes sont incubés pendant 4 à 5 semaines à 35°C.

7.2. Estimation par comptage direct

On a utilisé la technique à l'acridine orange (méthode AODC); cette numération s'effectue par comptage direct des bactéries présentes, après dilution, dans le champ d'un microscope optique à épifluorescence. La fluorescence bactérienne est obtenue après coloration à l'acridine orange (voir composition et préparation en annexe) (Hobbie *et al.*, 1977). Cette technique est utilisée pour le comptage total des bactéries dans le fermenteur.

8. PURIFICATION DES BACTERIES SULFATOREDUCTRICES

8.1. Milieu de culture

Le milieu de base utilisé est celui de Widdel et Pfennig, préparé initialement sans sulfate et sans substrat carboné, auquel il est possible d'ajouter, sous forme de solutions stériles, l'accepteur et le donneur d'électrons choisis. Le milieu solide est préparé selon la méthode de Pfennig et collaborateurs (1981) : une suspension d'agar est lavée 5 fois à l'eau distillée par agitation et décantation. Elle est ajustée à un volume précis de façon à obtenir une concentration finale de 6%. Cette suspension est répartie en tube de Hungate à raison de 1,5 ml par tube. L'atmosphère des tubes est remplacée par un mélange N₂-CO₂/20%-80% avant stérilisation à 110°C pendant 45 mn. Au moment de l'emploi, les tubes sont chauffés au bain marie à 60°C pour liquéfier l'agar, puis maintenus en surfusion à 45°C; 7,5 ml du milieu liquide contenant le substrat approprié à une

concentration de 20mM et le sulfate également à 20mM, sont additionnés à chaque tube. Les tubes ainsi préparés contiennent 9 ml de milieu à 1% d'agar.

8.2. Ensemencements et dilutions

Les tubes sont ensemencés avec 1 ml d'inoculum provenant des dernières dilutions positives des tubes de numérations. A partir du premier tube ensemencé, des dilutions de 10 en 10 sont réalisées jusqu'à 10^{-9} . Avant chaque transfert, le contenu des tubes est homogénéisé. Le milieu gélosé ainsi ensemencé est refroidi puis incubé à 35°C pendant environ 1 semaine, en position verticale, mais à l'envers. Ces dilutions permettent d'avoir des colonies bien individualisées dans la gélose. Cette opération est répétée au moins 3 fois : avec le dernier tube contenant une ou quelques colonies, on prépare une autre série de dilutions dans de l'agar, et ainsi de suite jusqu'à l'obtention d'une colonie pure.

8.3. Isolements

Les colonies de bactéries sulfatoréductrices sont entourées d'un halo noir à cause de la précipitation des sulfures produits avec le fer contenu dans le milieu. Ces colonies noires sont prélevées stérilement avec une pipette Pasteur effilée, puis repiquées et diluées séparément en milieu liquide. La dernière dilution positive est de nouveau diluée dans une série de 8 tubes de milieu gélosé. Trois séries successives sont généralement nécessaires pour l'obtention d'une culture pure. La pureté des souches est vérifiée d'une part par l'ensemencement sur le milieu de Widdel sans sulfate, avec 1% de glucose, 1% de Biotrypcase et 1% d'extrait de levure, et par examen au microscope d'autre part. Elles peuvent être conservées dans de la gélose profonde nutritive ou en milieu liquide à 4°C et entretenues par repiquages à intervalles réguliers.

9. ETUDE DES BSR ISOLEES EN CULTURE PURE

9.1. Etudes des caractères morphologiques

Sept caractères sont recherchés au cours de cette pré-identification sommaire : la mobilité des bactéries; la morphologie des cellules; la présence de spores et position de celles-ci dans la cellule; la présence de vacuoles de gaz dans le cytoplasme; la paroi; la taille des cellules et la position des flagelles.

L'étude des 5 premiers caractères est effectuée par observation microscopique (x 1000) de la culture pure à l'état frais et après coloration de Gram (paroi). Pour l'appréciation de la

taille des cellules, nous avons réalisé des photographies (contraste de phase x 1000). Une goutte de suspension bactérienne, obtenue après centrifugation, est déposée sur une fine pellicule d'agar séché, répartie sur une lame. La goutte est ensuite recouverte d'une lamelle lutée à la paraffine. La suspension pénètre dans l'agar et les cellules sont immobilisées pour la prise de vue. L'observation des flagelles est réalisée en microscopie électronique en transmission : des petites grilles de cuivre sont recouvertes d'un film très fin de formvar (150A). Ce film est solidifié par vaporisation de carbone. Les grilles ainsi préparées sont mises en contact avec une goutte de culture, puis immergées pendant 5 sec, dans une solution de phosphotungstate de sodium à 1% et à pH 7. L'excès de phosphotungstate est éliminé avec du papier filtre. Les échantillons sont alors prêts pour l'observation.

9.2. Etude des caractères physiologiques

La croissance des bactéries sulfatoréductrices est mesurée par l'évolution de la densité optique à 580 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Spectronic 21 Bausch et Lomb, directement dans les tubes de culture, et également par le dosage des sulfures et les produits du métabolisme.

9.2.1. Etude des paramètres physico-chimiques de la croissance

9.2.1.1. Température optimale de croissance

Les cultures sont réalisées sur le milieu de base de Widdel avec du sulfate (20 mM) et un substrat carboné à 20 mM. Pour chaque température testée, 2 tubes de milieu sont inoculés avec 5% (vol/vol) d'une préculture active. La croissance est suivie par la mesure de la densité optique à 580 nm. Les temps de génération et les taux de croissance sont calculés pour chaque température.

9.2.1.2. pH optimum de croissance

Les cultures sont réalisées comme précédemment dans des milieux à différents pH. Les tubes sont incubés à 35°C. Les différents pH sont obtenus avec un mélange de NaHCO_3 et Na_2CO_3 .

9.2.1.3. Comportement vis-à-vis de la salinité

Pour étudier l'influence de la concentration en sel sur la croissance des souches isolées, une gamme de salinité de 0 à 10% de NaCl est réalisée dans des tubes gazés avec un mélange de $\text{N}_2\text{-CO}_2/80\text{-}20\%$ avec le milieu de Widdel (9,5 ml) sans NaCl. Deux tubes sont utilisés

pour chaque concentration. Chaque série est ensuiteensemencée avec 0,5 ml d'une pré-culture en phase exponentielle de croissance. Plusieurs subcultures ont été réalisées. Le pH et la température d'incubation sont respectivement 7,2-7,3 et 35°C.

9.2.1.4. Etude nutritionnelle

Le milieu de base de Widdel est employé pour tester l'utilisation de différents substrats constituant les sources de carbone et d'énergie et les différents accepteurs terminaux d'électrons. Ces composés sont préparés et stérilisés séparément sous forme de solutions concentrées. Ils sont ajoutés de façon à obtenir les concentrations désirées. Chaque test est réalisé en double. 3 repiquages ou plus, sont effectués de façon à épuiser le milieu initial en carbone organique présent dans l'inoculum.

9.3. Etude des caractères biochimiques

9.3.1. Etude de la composition en bases de l'ADN

Une culture de 10 litresensemencée avec un inoculum de 10%, est effectuée sur milieu de Widdel. En fin de phase exponentielle de croissance, les cellules sont collectées par centrifugation de la totalité de la culture. Elle sont lavées 2 fois dans du tampon phosphate (KH_2PO_4 50mM- K_2HPO_4 50 mM, ajusté à pH 7, voir annexe). Le culot est récupéré puis envoyé à la DSM (collection allemande de microorganismes, Braunschweig, RFA) pour être analysé. La purification de l'ADN est faite selon la méthode décrite par Marmur (1961). La valeur du G+C % ($100 \times (\text{moles guanine} + \text{cytosine}) / \text{nombre total de moles de bases}$) a été déterminée par S. Verbag, Braunschweig, RFA, par chromatographie sur hydroxyapatite. L'ADN non méthylé du virus LAMBDA dont le G+C% est de 49,858 mol % a été utilisé comme référence. Les résultats représentent la moyenne de 3 déterminations.

9.3.2. Détection des cytochromes et de la désulfovirdine

Les cellules sont cultivées dans un ballon de 2 litres sur milieu de Widdel sans résazurine. En fin de phase exponentielle de croissance, elles sont collectées par centrifugation. 3 g de cellules sont suspendus dans 10 ml de tampon tris-HCl (pH 7,6, voir annexe); des cristaux de désoxyribonucléase I pancréatique sont ajoutés à cette solution pour empêcher la viscosité provoquée par l'ADN libéré lors de la rupture des cellules. Celle-ci s'effectue par 3 passages successifs dans une presse de French. La suspension cellulaire est centrifugée à 25 000 g pendant 20 mn pour éliminer les débris cellulaires et les cellules intactes. Le premier surnageant est séparé en un deuxième

surnageant et en une fraction particulière par une deuxième centrifugation à 140 000 g pendant 2 h. Le surnageant résultant est considéré comme la fraction soluble. Il est examiné pour la détection des cytochromes et de la désulfovirdine en utilisant un spectrophotomètre (Cary 219). Les protéines sont estimées par la méthode de Lowry *et al.* (1951), en utilisant la sérum albumine de bovin comme standard. La détection de la désulfovirdine est confirmée par le test de fluorescence (Postgate, 1959).

10. ETUDE DE BSR EN CULTURES MIXTES DEFINIES

10.1. Origine des microorganismes

Desulfovibrio fructosovorans (DSM 3604) et *Desulfovibrio carbinolicus* (DSM 3852) ont été obtenus de la Collection allemande de micro-organismes, Braunschweig, RFA.

Desulfovibrio sp. souche M, a été isolé de margines dans notre laboratoire; cette souche est choisie pour ses capacités à utiliser le glycérol comme source de carbone et d'énergie en présence de sulfate.

Desulfovibrio sp. souche SPSN baptisée *D.alcoholovorans* (DSM 5433) est une souche proposée comme nouvelle espèce du genre *Desulfovibrio*; elle a été isolée de la dernière dilution d'un dénombrement sur 1,3-propanediol en présence de sulfate (chapitre 4-2).

Desulfovibrio sp. souche DFG a été isolé d'une culture d'enrichissement sur 1,3-propanediol comme seule source d'énergie (chapitre 4-3).

Sporomusa acidovorans et *Methanospirillum hungatei* proviennent de la collection de notre laboratoire.

10.2. Milieu et conditions de croissance

10.2.1. Milieu de culture

Le milieu utilisé pour la culture des bactéries sulfatoréductrices est celui de Widdel additionné d'extrait de levure à 0.01%, comme facteur de croissance pour la culture en masse des cellules et pour les déterminations des rendements de croissances. Le milieu est préparé et réparti comme précédemment. Le pH est compris entre 7,2 et 7,3. La température est de 35°C. Toutes les bactéries sulfatoréductrices ont été adaptées sur glycérol (10 mM) ou 1,3-propanediol (10 mM) comme substrats énergétiques, en présence de sulfate (15mM) et d'extrait de levure (0,01%), dans des flacons penicilline de 60 ml sous atmosphère N₂-CO₂, 80-20%.

M. hungatei est cultivé dans des flacons penicilline de 60 ml contenant 20 ml de milieu de Widdel sans sulfate, complétement avec de l'acétate (5 mM) et de l'extrait de levure (0,01%) comme source de carbone et facteurs de croissance, et sous atmosphère H₂-CO₂, 80-20% (3 bars).

S. acidovorans est cultivé sur glycérol (10 mM) dans des flacons antibiotiques de 60 ml contenant 20 ml de milieu de Widdel sans sulfate et complétement avec de l'extrait de levure à 0.01 %.

Les cocultures *D.fructosovorans* + *M.hungatei* ; *D.carbinolicus* + *M.hungatei* ; *D.alcoholovorans* + *M.hungatei* ; *Desulfovibrio sp.* souche M + *M.hungatei* et *Desulfovibrio sp.* souche SPSN + *M.hungatei* sont cultivées dans des flacons penicilline de 120 ml. Les inoculums à 10 % (vol / vol) sont introduits sous N₂-CO₂ / 80-20 % avec glycérol (10 mM) pour toutes les cocultures et avec 1,3-propanediol (10 mM) ou 1,2-propanediol (10 mM) pour la coculture *D. alcoholovorans* + *M. hungatei*.

L'association de *S.acidovorans* et *Desulfovibrio sp.* souche DFG n'est pas une véritable coculture dans le sens où il n'y a pas eu adaptation au départ: *Desulfovibrio sp.* souche DFG a été ajouté à une culture pure de *S. acidovorans* en phase exponentielle de croissance sur glycérol; le caractère symbiotique ou compétitif de la coculture est examiné par la suite par repiquages successifs sur glycérol et sulfate (chapitre 4-4).

10.3. Détermination des rendements de croissance

2 litres de milieu de culture des différentes souches sulfatoréductrices en culture pure ou en coculture sur le milieu de Widdel sans résazurine, avec de l'extrait de levure à 0,01 %, sont centrifugés à froid. Les cellules sont lavées 3 fois dans du tampon phosphate puis remises en suspension dans 50 ml d'eau distillée. 10 ml et 20 ml de ces suspensions sont séchés jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le volume restant est dilué de 10 en 10 et la densité optique de chaque dilution est mesurée au spectrophotomètre à 580 nm, pour obtenir les différentes courbes étalons.

11. METHODES ANALYTIQUES DES ETUDES BACTERIOLOGIQUES

11.1. Analyse de la phase liquide

Les surnageants sont obtenus par centrifugation des échantillons (1 ml) prélevés lors des expériences. Cette centrifugation est réalisée à l'aide d'une microcentrifugeuse (MLW TH 12, BIOBLOCK SCIENTIFIC).

11.1.1. Dosage des AGV

L'analyse des AGV se fait par chromatographie en phase gazeuse. La colonne utilisée est une colonne HAYESS d' 1 m de long et de 1/8" de diamètre, garnie de Porapack,HAYESEP DEB 100-120 mesh. le gaz vecteur est de l'azote. Les conditions opératoires sont les suivantes :

<u>Températures :</u>	- colonne	200°C
	- injecteur	180°C
	- détecteur	250°C
<u>Débits gaz :</u>	- gaz vecteur, N ₂ (azote C)	17 ml / mn
	- air	300 m l/ mn
	- H ₂	30 ml / mn

La méthode de dosage ainsi que le volume injecté ont été décrits précédemment (voir paragraphe 4.1.6) .

11.1.2. Dosage des alcools et des acides

Le dosage du glycérol, 1,2-propanediol et 1,3-propanediol sont effectués par Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC), dans les conditions opératoires suivantes : pompe, Analprep 93, (Touzart et Matignon, Vitry sur Seine); boucle d'injection, 100 ml; colonne, Aminex Ion-Exclusion HPX-87 H, 300 x 7.8 mm (Biorad, Richmond, Californie); détection, Réfractomètre différentiel (Knauer,Berlin); enregistreur-intégrateur Shimadzu chromatopak CR 3A. La méthode d'étalonnage est une méthode d'étalonnage externe. L'analyse se fait dans les conditions opératoires suivantes:

- Température colonne.....	65 °C
- Débit.....	0,8 ml / mn

11.1.3. Dosage du 3-hydroxypropionate

11. 1.3.1. Séparation

La présence de 3-hydroxypropionate a été révélée à l'aide de la colonne utilisée pour quantifier les AGV (voir paragraphe11.1.1). Avec cette colonne, le propionate et le 3-hydroxypropionate sont séparés (Fig.2-10) . Les temps de rétention sont les suivants :

- propionate 3, 03 mn
- 3-hydroxypropionate 3, 33 mn

A titre de comparaison, les temps d'élution de l'acétate et de l'éthyle 2-butérique (étalon interne) sont 1, 50 mn et 5, 97 mn, respectivement. Ceci a été confirmé par HPLC comme le montre la figure 2.10; dans ce cas, le propionate est élué plus tardivement.

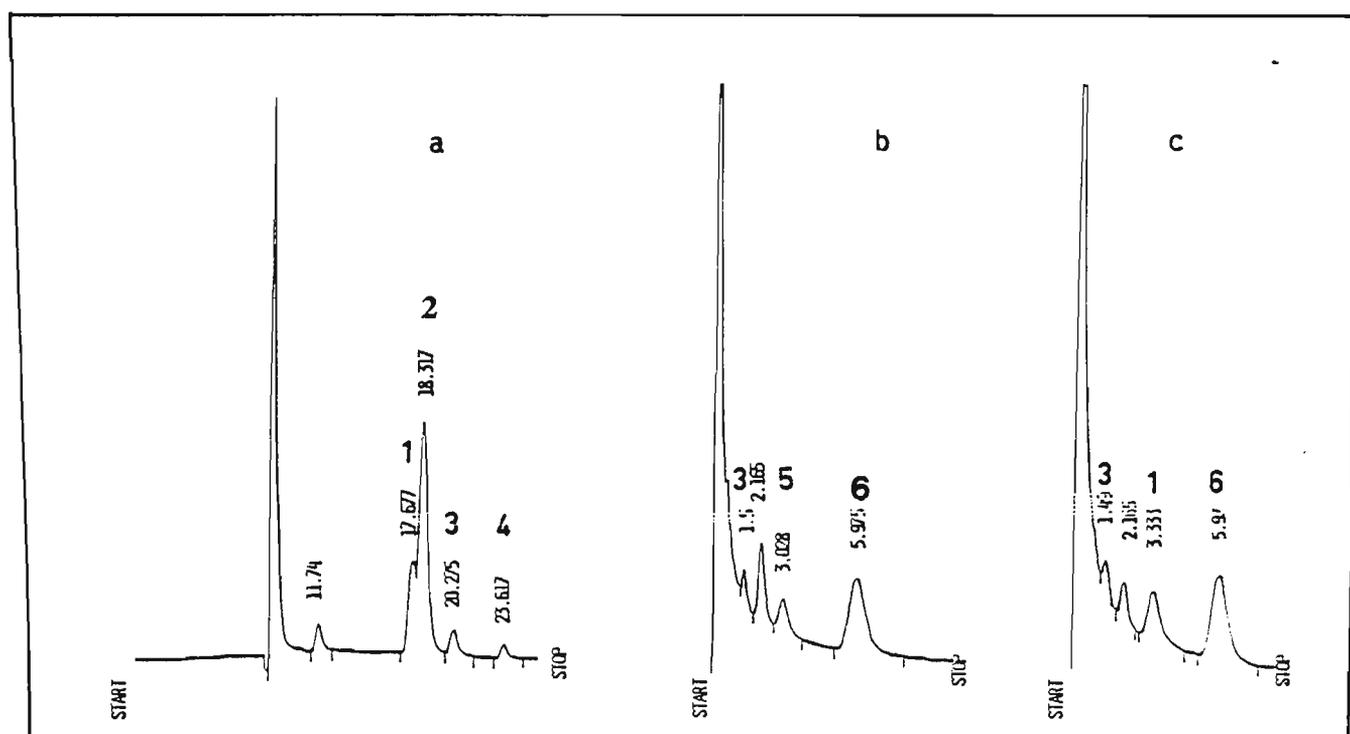


Fig. 2.10 Séparation des produits de dégradation du glycérol par HPLC (a) et par CPG (colonne HAYESS) (b et c), en l'absence de sulfate (b) et en présence de sulfate (a et c). Légendes : 1, 3-hydroxypropionate; 2, glycérol; 3, acétate; 4, 1,3-propanediol; 5, propionate; 6, éthyl-2 butyrique.

11.1.3.2. Dosage du 3-hydroxypropionate

Le dosage du 3-hydroxypropionate a été effectué par HPLC dans les mêmes conditions que le glycérol, ou en utilisant une autre colonne : (HPLC Pompe Analprep 93 (Touzart et Matignon, Vitry sur Seine); boucle d'injection : 100 µl; colonne : HPLC Silice sphérique C18, 3mm), et un autre mode de détection : détecteur Spectrophotométrique UV SPD6A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon); enregistreur-intégrateur : Chromatopack C-R3A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). L'analyse est effectuée dans les conditions opératoires suivantes : Température colonne, 30 °C; Débit; 0,8 ml / mn; Longueur d'onde, 210 nm.

11.1.4. Dosage des sulfures

Cette méthode a été décrite par Cord-Ruwisch (1985). 0,1 ml de la culture sont injectés rapidement dans 4 ml de réactif HCl 50 mM-CuSO₄ 5 mM sous agitation. Après cette acidification (voir équation ci-dessous), l'intensité de la coloration du complexe CuS formé, est mesurée à 480 nm au spectrophotomètre (Baush & Lomb). Une courbe étalon donne la concentration en ions sulfures solubles en fonction de la densité optique mesurée. Cette technique présente l'avantage d'offrir une réponse rapide et donne des résultats reproductibles dans une gamme de concentrations comprises entre 2mM et 20 mM.



11.2. Analyse de la phase gazeuse

11.2.1. Dosage du méthane

Le méthane est dosé à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse DELSI, série 30, muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne en acier inox de 2 m de long, et de 1/8" de diamètre, remplie de Porapak Q, 80-100 mesh. Le gaz vecteur est de l'azote. 0,1 ml de gaz est prélevé et injecté à l'aide d'une seringue Hamilton " Pressure Lock". Les conditions opératoires sont les suivantes :

<u>Températures :</u>	- colonne	190°C
	- injecteur	200°C
	- détecteur	250°C
<u>Débit gaz :</u>	- gaz vecteur, N ₂ (azote C).....	17 ml / mn
	- air	300 ml / mn
	- H ₂	30 ml / mn

11.2.2. Dosage de l'hydrogène

L'analyse de l'hydrogène est réalisée avec un chromatographe en phase gazeuse (Girdel série 30), muni d'un détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) et de deux colonnes en acier inox (1,80 m x 1/8") contenant de la carbosphère 60-80 mesh. Les conditions opératoires sont les suivantes : Températures (Injecteur, 105 °C; Colonne, 85 °C; Détecteur, 150 °C); Débit gaz vecteur (Azote), 45 ml /mn et courant filaments, 90 mA. 0,1 ml de gaz est injecté à l'aide d'une seringue Hamilton. Dans ces conditions, le temps d'élution de l'hydrogène est de 13 secondes.

**ROLE DE LA SULFATO-REDUCTION DANS LE
METABOLISME ANAEROBIE DU LACTATE -
ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE DEUX
BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES DOMINA
NTES SUR LACTATE ET PROPIONATE**

Chapitre 3-1

Rôle de la sulfatoréduction dans la digestion anaérobie du lactate, propionate et de l'acétate, par une culture mixte indéfinie

1. DEGRADATION ANAEROBIE DU LACTATE

La dégradation anaérobie du lactate par une culture mixte indéfinie, a été étudiée dans trois conditions différentes : en l'absence de sulfate, en présence de sulfate et molybdate et en présence de sulfate sans molybdate (20mM).

En l'absence de sulfate, le lactate est décomposé rapidement, en acétate, propionate, méthane et vraisemblablement CO_2 (Fig. 3.1a). Le rapport acétate/propionate est de 0,6. Le propionate est dégradé à son tour mais lentement, en méthane; il est à noter que la disparition du propionate n'est pas complète. Par contre, l'acétate se décompose le quatrième jour en produisant du méthane et vraisemblablement du CO_2 . Lorsqu'on incube la même culture mixte, en présence de sulfate et molybdate (Fig.3.1b), le sulfate n'est pas utilisé, indiquant que la sulfatoréduction est inhibée et que le lactate est fermenté. Dans ce cas, le rapport acétate /propionate est de 0,5; l'acétate est dégradé en méthane; le propionate s'accumule. Par contre en présence de sulfate sans molybdate, l'oxydation du lactate par la culture mixte est accompagnée d'une réduction du sulfate; celle-ci s'arrête lorsqu'il n'y a plus de lactate (Fig.3.1c); l'acétate est le seul acide produit; très peu de propionate s'accumule.

Ceci suggère que l'utilisation du lactate est surtout due aux bactéries sulfatoréductrices. Comme dans les cas précédents, l'acétate est dégradé en méthane. Comme il est montré dans les Fig. 3.1, le méthane n'est pas affecté par la présence de sulfate; par contre en présence de molybdate, il est produit en moindre quantité.

Afin de savoir si le molybdate n'a pas un effet inhibiteur direct sur les bactéries utilisatrices de propionate non sulfatoréductrices, ou sur les bactéries méthanogènes utilisatrices d'acétate, la culture mixte indéfinie a été incubée en présence de propionate ou d'acétate et avec ou sans molybdate.

Après 4 semaines d'incubation à 35°C , les acides, le sulfate et le méthane sont dosés (Tableau 3.1). les résultats obtenus vont dans le sens d'une inhibition directe de la dégradation du propionate par le molybdate, mais comme le profil de dégradation du propionate varie d'une expérience à l'autre, il est difficile de confirmer l'inhibition de la dégradation du propionate par le molybdate. Par contre, le molybdate n'a apparemment aucun effet sur la dégradation de l'acétate (ces résultats sont à comparer avec les résultats mentionnés dans le Tableau 3.2, voir paragraphe 4).

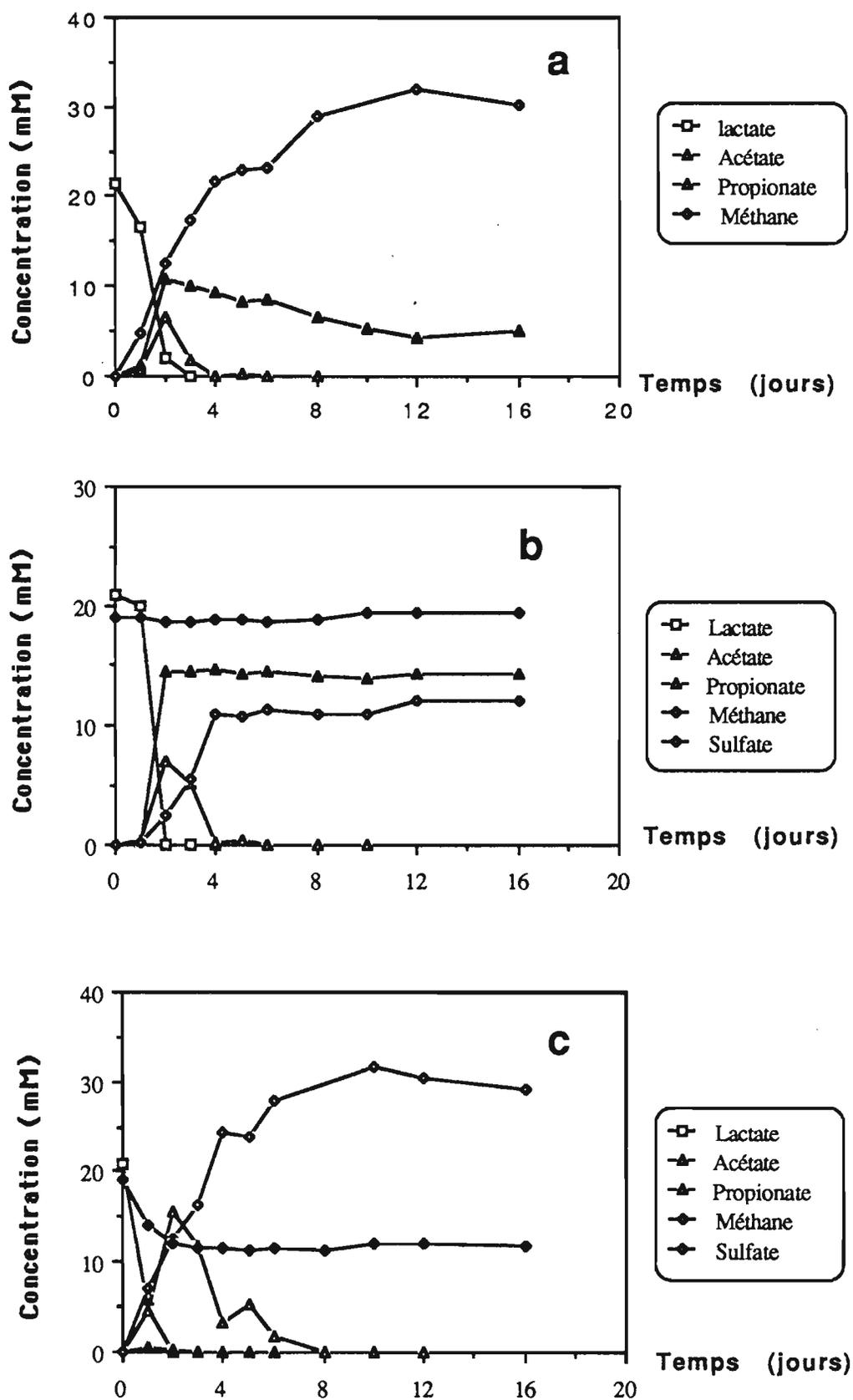


Fig. 3.1. Dégradation anaérobie du lactate par une culture mixte indéfinie. a, en l'absence de sulfate; b, en présence de sulfate et molybdate et c, en présence de sulfate.

Conditions	Concentrations (mM)							
	Initiales			Finales				
	Acétate	Propionate	Sulfate	Acétate	Propionate	Sulfate	Méthane	H ₂
Propionate + Sulfate + Molybdate	0	18,3	15,8	0	18,4	14,1	0	0
Acétate + Sulfate + Molybdate	19	0	15,4	0	0,5	14	22	0

Tableau 3.1. Effet de l'addition de molybdate sur la dégradation anaérobie du propionate et de l'acétate par une culture mixte indéfinie. La culture a été incubée à 35°C pendant 4 semaines

2. DEGRADATION ANAEROBIE DU PROPIONATE

Les résultats concernant la dégradation anaérobie du propionate sont reportés figure 3.2 .

En l'absence de sulfate, l'oxydation du propionate est lente; la quantité d'acétate produite est faible (Fig. 3.2a). Par contre la disparition du propionate est beaucoup plus grande en présence de sulfate. Cette dégradation est couplée à la réduction du sulfate, et il y a production plus importante d'acétate (Fig. 3.2b). Les mêmes figures montrent que le méthane est produit en l'absence ou présence de sulfate, et que la quantité produite est très voisine.

Il est important de noter que le taux d'oxydation du propionate en l'absence de sulfate est variable d'une expérience à l'autre, et que les différences observées concernant ces taux d'oxydation peuvent être dûes à la différence de composition bactérienne de la culture mixte pour chaque expérience ou aux conditions physico-chimiques du milieu.

Parfois en l'absence de sulfate, le propionate n'est pas dégradé par la culture mixte indéfinie (Fig. 3.2c). Quand le sulfate est ajouté, le propionate est rapidement dégradé en acétate; Cette dégradation s'accompagne d'une réduction du sulfate (Fig.3.2c).

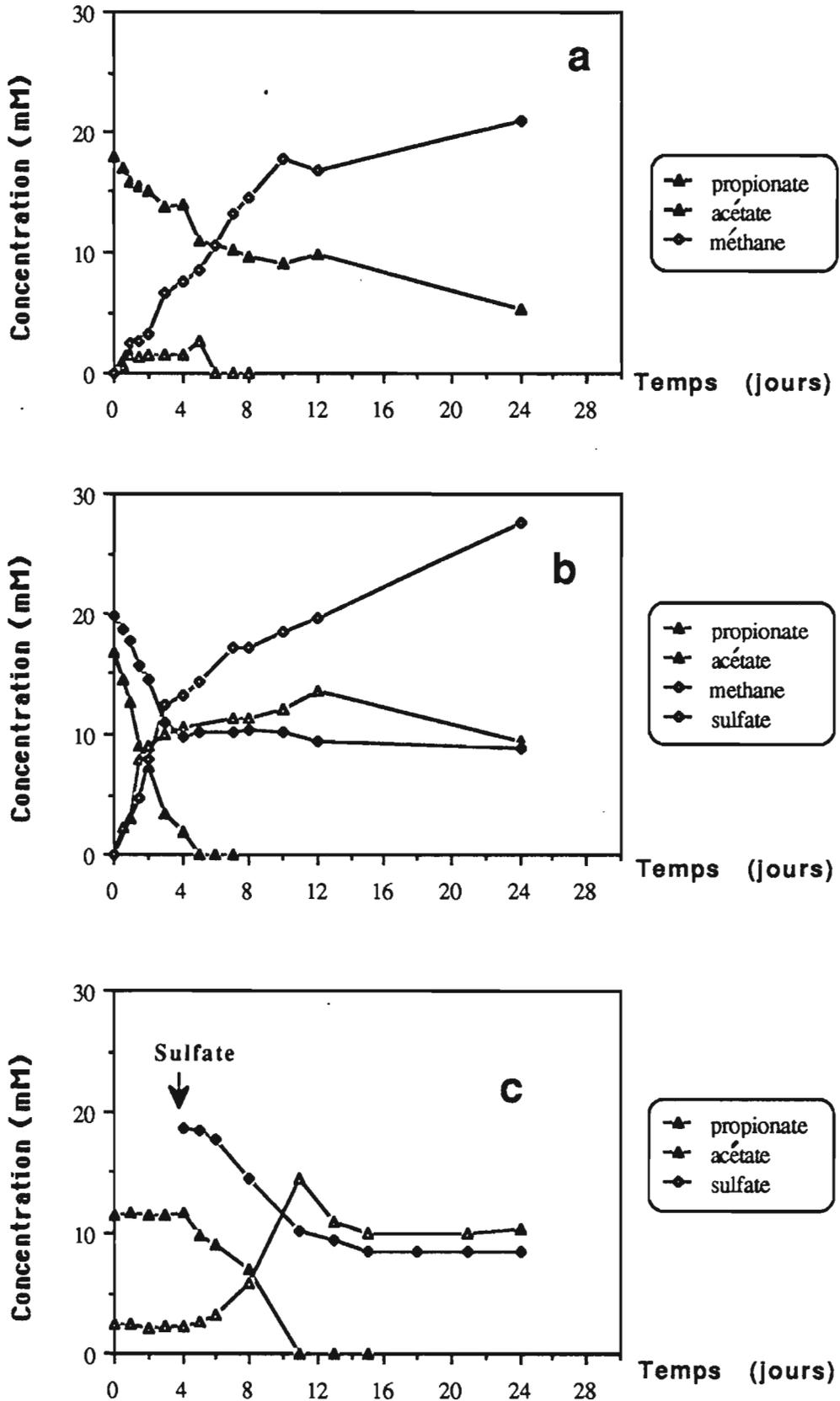


Fig. 3.2. Cinétique de dégradation anaérobie du propionate par une culture mixte indéfinie. **a**, en l'absence de sulfate; **b**, en présence de sulfate; **c**, le sulfate est ajouté (↓) à cette culture contenant du propionate, après 4 jours d'incubation.

3. DEGRADATION ANAEROBIE DE L'ACETATE

Comme il est reporté dans la figure 3.3, lorsque le sulfate est absent, l'acétate est dégradé en méthane et vraisemblablement en CO_2 (Fig.3.3a).

La présence de sulfate ne modifie en rien la décomposition d'acétate, et la concentration initiale de sulfate n'est pas modifiée (Fig.3.3b); cette non utilisation du sulfate montre qu'il n'y a pas d'activité sulfatoréductrice sur l'acétate, dans les conditions décrites. La quantité de méthane produite, en l'absence ou en présence de sulfate est sensiblement la même. De plus la dépendance de l'oxydation de l'acétate vis à vis du sulfate n'a jamais été observée même après une période de 60 jours d'incubation, quelque soit la composition de la culture mixte utilisée et la saison pendant laquelle l'eau résiduaire de distillerie vinicole est obtenue.

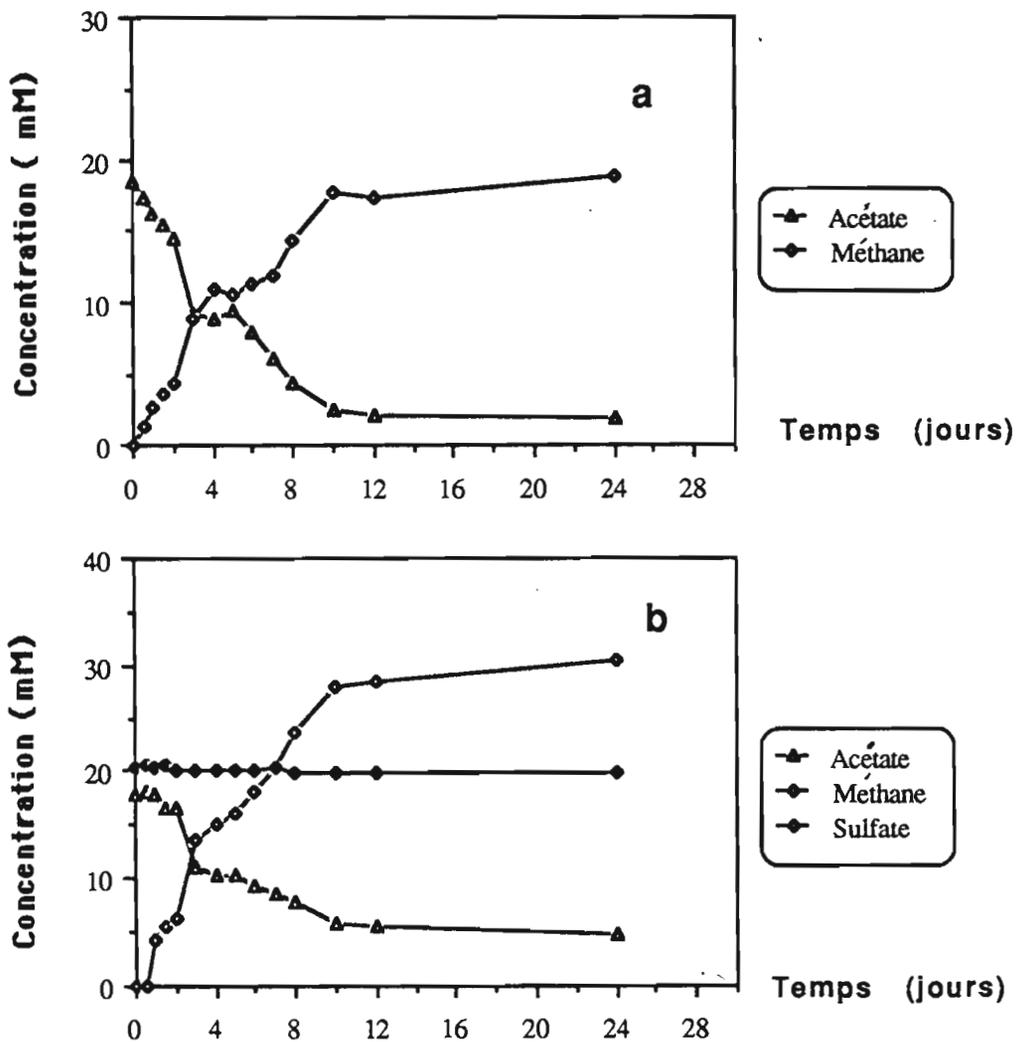


Fig. 3.3. Cinétique de dégradation anaérobie de l'acétate par une culture mixte indéfinie. a, en l'absence de sulfate et b, en présence de sulfate.

4. RELATION ENTRE SULFATO-REDUCTION ET METHANOGENESE

Pour connaître plus clairement la relation qui s'établit entre la sulfatoréduction et la méthanogénèse, des expériences d'inhibition sélective ont été réalisées.

L'inhibition de la méthanogénèse a été obtenue par l'addition de chloroforme à une concentration finale de 0,003 % (v/v).

L'inhibition de la sulfatoréduction a été réalisée en épuisant le milieu de culture en sulfate (voir chapitre matériels et méthodes). Les expériences ont été effectuées à 35°C pendant une période d'incubation de 4 semaines. Les résultats sont reportés dans les Tableaux 3.2 et 3.3.

Dans tous les cas de figures et quelque soit le substrat utilisé, la production de méthane est inhibée lorsque la culture mixte est incubée en présence de chloroforme.

Quand le chloroforme est ajouté en l'absence de sulfate, la méthanogénèse et la sulfatoréduction sont inhibées. Dans ces conditions, la concentration en acétate en fin d'incubation est la même qu'en début d'expérience (Tableau 3.2).

En présence de chloroforme et en l'absence de sulfate, l'hydrogène est produit après dégradation du propionate ou du lactate (Tableaux 3.2 et 3.3). Par contre, lorsque le sulfate est présent, cet hydrogène est consommé.

De plus, contrairement à ce que l'on observe avec le lactate, la décomposition du propionate est influencée par la présence du chloroforme, et lorsque le sulfate est ajouté, le propionate disparaît (Tableau 3.2).

Contrairement à la dégradation du propionate pour laquelle l'inhibition de la méthanogénèse se traduit par la production d'hydrogène et qui nécessite donc la présence d'un accepteur terminal d'électrons pour s'accomplir, l'acétate n'est pas décomposé et s'accumule même en présence de sulfate, sans aucune production d'hydrogène. Ceci indique que dans notre culture mixte indéfinie, l'acétate se décompose essentiellement par méthanogénèse et non pas par syntrophie comme décrit par Rozanova et collaborateurs (1990).

Table 3.2 Effets de l'addition du chloroforme et du sulfate sur la dégradation anaérobie de l'acétate, propionate et lactate par une culture mixte indéfinie. L'incubation est réalisée à 35°C pendant 4 semaines.

Substrats	Concentrations(mM)									
	Initiales				Finales					
	lactate	propionate	acétate	sulfate	lactate	propionate	acétate	sulfate	Méthane	Hydrogène
C2	0	0	19.6	0	0	0	0	0	23.2	0
C2 + sul	0	0	19.2	16.4	0	0	0	14.4	22.5	0
C2 + chl	0	0	20.2	0	0	0	20.5	0	0	0
C2 + sul + chl	0	0	19.7	16.3	0	0	20	14.7	0	0
C3	0	18.4	0	0	0	7.6	0.6	0	22.7	0
C3 + sul	0	19.3	0	16.5	0	2.4	1.8	7.1	19.5	0
C3 + chl	0	19.2	0	0	0	18.9	0.8	0	0	0.6
C3 + sul + chl	0	19.2	0	16.1	0	8.2	10.9	7.9	0	0
Lac	21.4	0	0	0	0	2.4	0	0	29.1	0
Lac + sul	20.7	0	0	16.1	0	0	0	7.2	21.8	0
Lac + chl	21.1	0	0	0	0	15.8	10	0	0	0.5
Lac + sul + chl	20.5	0	0	16.5	0	0.8	24.9	4.5	0	0

Symboles : C2, acétate; C3, propionate; Lac, lactate; sul, sulfate; chl, chloroforme.

Table 3.3 Effets de l'addition de chloroforme et de sulfate sur la dégradation anaérobie du lactate + acétate, lactate + propionate et propionate + acétate, par une culture mixte indéfinie. L'incubation est effectuée à 35°C pendant 4 semaines.

Substrats	Concentration (mM)									
	Initiales				Finales					
	lactate	propionate	acétate	sulfate	lactate	propionate	acétate	sulfate	Méthane	Hydrogène
Lac + C2	20.4	0	18	0	0	0	0	0	49.6	0
Lac + C2 + sul	20.2	0	18.9	15.9	0	0	0	6.3	50.7	0
Lac + C2 + chl	20.4	0	17.5	0	0	15	28.5	0	0	2
Lac + C2 + sul + chl	19.9	0	19.4	16.5	0	0.8	43.7	4	0	0
Lac + C3	20.8	21	0	0	0	0	0	0	71.9	0
Lac + C3 + sul	20.2	19.8	0	16.5	0	0.5	0.6	0	54.5	0
Lac + C3 + chl	20.6	18.8	0	0	0	34.9	9.6	0	0	2.4
Lac + C3 + sul + chl	20.6	19.3	0	15.6	0	16.4	27.6	1.5	0	0
C2 + C3	0	19.8	18.5	0	0	4.2	0.2	0	47	0
C2 + C3 + sul	0	19.4	20.5	15.7	0	0	6.2	4.7	41.1	0
C2 + C3 + chl	0	19.8	19.8	0	0	18.9	19.5	0	0	0.5
C2 + C3 + sul + chl	0	19.4	20.2	15.7	0	13.7	24.7	10.9	0	0

Symboles : C2, acétate; C3, propionate; Lac, lactate; sul, sulfate; chl, chloroforme.

5. DENOMBREMENT DES BACTERIES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME DU LACTATE

Approximativement entre 10^9 et 10^{10} cellules par ml ont été dénombrées dans notre culture mixte indéfinie en utilisant la méthode de l'acridine orange (Hobbie *et al.*, 1977). Il est important de préciser que la température d'incubation était de 35 °C. Le Tableau 3.4 reporte le nombre des différents groupes bactériens impliqués dans ce métabolisme. Nos résultats permettent de tirer les conclusions suivantes :

Substrats	Cellules viables / ml	Produits de fermentations
- Sulfate		
Lactate	$2,2 \cdot 10^7$	Acétate + propionate
Propionate	nd	nd
Acétate	$3,5 \cdot 10^8$	Méthane
H ₂ /CO ₂	$4,5 \cdot 10^8$	Méthane
+ Sulfate		
Lactate	$4,5 \cdot 10^8$	Acétate + sulfure
Propionate	$1,5 \cdot 10^6$	Acétate + sulfure
Acétate	$2,5 \cdot 10^4$	Sulfure + méthane

nd, non déterminé; les tubes de numérations ont été incubés à 35°C pendant 4 semaines.

Tableau 3.4 Dénombrements des différents groupes trophiques impliqués dans la dégradation anaérobie du lactate et des AGV.

1) Les bactéries sulfatoréductrices jouent un rôle important dans la dégradation du lactate. Leur concentration est, en effet, supérieure à celles des autres organismes fermentaires, utilisant le lactate. En présence de sulfate, les espèces du genre *Desulfovibrio* ont été reconnues comme les principaux utilisateurs de lactate, par leur morphologie et les produits de fermentation : acétate et sulfures. L'examen microscopique des plus fortes dilutions qui ont servi aux dénombrements sur lactate sans sulfate, a révélé la présence de bactéries appartenant au genre *Propionibacterium*. Une espèce du genre *Desulfovibrio* dominante sur lactate, a été isolée dans

les dilutions ultimes des dénombrements (chapitre 3-2).

2) Après plusieurs tentatives, la détermination du nombre de bactéries syntrophes utilisatrices de propionate n'a pu être obtenue dans nos conditions de travail. Nous n'avons donc aucune comparaison entre ces bactéries et les bactéries sulfatoréductrices dégradant ce même substrat. Néanmoins, le nombre de ces dernières est inférieur à celui des sulfatoréducteurs utilisateurs de lactate. Des bactéries du genre *Desulfobulbus* ont été identifiées dans les derniers tubes positifs. Une bactérie sulfatoréductrice dominante sur propionate, appartenant au genre *Desulfobulbus* a été isolée et caractérisée (chapitre 3-2).

3) Le nombre de bactéries sulfatoréductrices sur acétate est largement inférieur à celui des méthanogènes acétoclastes. Il est possible que la différence d'activité observée sur acétate peut provenir d'une différence d'affinité de ces deux groupes pour l'acétate, due à la température d'incubation (35°C); en effet, la plupart des bactéries sulfatoréductrices utilisatrices d'acétate connues ont des températures optimales de croissance situées entre 28 et 32°C (Widdel, 1988). Notons cependant que le choix de la température d'incubation est justifié par le fait que cette température est appliquée pour le traitement de ces déchets dans notre laboratoire. En l'absence de sulfate, le méthane est détecté dans les derniers tubes positifs. L'examen microscopique en épifluorescence révèle la présence de cellules typiques de *Methanosarcina mazei* et *Methanothrix soehngeni*. Par contre, en présence de sulfate sur ce même substrat, les principaux microorganismes présents sont des petits bâtonnets courts, aux bouts arrondis, isolés ou en paires, et ressemblant à *Desulfobacter postgatei*; les produits de fermentation sont les sulfures, le méthane et vraisemblablement le gaz carbonique. Ce résultat est en faveur d'une coexistence entre les deux groupes bactériens; la présence de sulfate n'inhibe pas la production de méthane à partir de l'acétate. Il ressort néanmoins de ces deux numérations que les bactéries méthanogènes acétoclastes dominent en nombre les bactéries sulfatoréductrices.

4) Le nombre de bactéries méthanogènes hydrogénotrophes est légèrement supérieur à celui des bactéries méthanogènes acétoclastes; Les bactéries dominantes sont des bâtonnets droits et courts, non mobiles, apparentés au genre *Methanobacterium*. Bien que l'espèce *Methanospirillum hungatei* n'ait jamais été observée, toutes nos expériences concernant la dégradation du glycérol et des diols par des cultures mixtes définies ont été effectuées avec *M. hungatei* comme accepteur terminal d'électrons, et il est important de souligner que le nombre de ces organismes (estimé par simple observation microscopique) dans de telles cultures mixtes, était toujours faible par rapport à celui des partenaires libérant de l'hydrogène (chapitres 4-5 et 4-6).

6. DISCUSSION

La bioconversion anaérobie de la matière organique en méthane et CO₂, implique l'action concertée de plusieurs microorganismes avec des interactions métaboliques. Ce processus comprend quatre étapes principales: hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse et méthanogénèse. La formation de méthane à partir des acides gras volatils (AGV) autres que l'acétate, implique l'oxydation préalable de ces acides par les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (OHPAB) en acétate, gaz carbonique et hydrogène, et ensuite la formation de méthane à partir de ces composés par les bactéries méthanogènes. Le propionate, avec l'acétate, est un intermédiaire très important lors de la méthanisation de la matière organique. Sa dégradation joue un rôle prédominant dans la stabilité du processus (Mc Carty, 1977; Kaspar et Wuhrmann, 1978a; Zehnder, 1978; Mackie et Bryant, 1981).

La bactérie acétogène *Syntrophobacter wolinii* productrice obligée d'hydrogène et responsable de la dégradation du propionate, croît très lentement quand elle est cultivée en association syntrophique avec une bactérie méthanogène telle que *Methanospirillum hungatei* (Boone et Bryant, 1980). De plus, cette bactérie syntrophique est très sensible aux effets inhibiteurs de l'acétate et l'hydrogène en particulier (Bathia *et al.*, 1985; Kaspar et Wuhrman, 1978b). Certaines espèces du genre *Desulfovibrio*, peuvent en présence de sulfate, jouer le rôle d'accepteurs d'hydrogène, en association avec les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (Abram et Nedwell, 1978b; Mc Inerney *et al.*, 1979). D'autre part, dans les écosystèmes riches en sulfate, la sulfatoréduction constitue l'étape terminale de minéralisation de la matière organique, avec l'acétate et l'hydrogène comme donneurs d'électrons (Jorgensen, 1977; Mountfort *et al.*, 1980; Mountfort et Ascher, 1981; Jorgensen, 1982; Lovley, 1986); les bactéries sulfatoréductrices inhiberaient la production de méthane à partir de l'hydrogène et l'acétate en maintenant leurs concentrations à des niveaux " seuils " de telle façon que les bactéries méthanogènes ne puissent les utiliser (Winfrey et Zeikus, 1977; Lovley et Klug, 1983; Lovley, 1985).

Au cours de la digestion anaérobie des eaux résiduaires de distilleries vinicoles, les acides gras volatils, principalement l'acétate et le propionate, s'accumulent à des concentrations plus importantes que celles rencontrées dans les autres biotopes anaérobies tels que les sédiments lacustres et marins. Le but principal de cette étude était de déterminer le ou les principaux donneurs d'électrons impliqués dans la sulfatoréduction durant la digestion anaérobie de ces déchets et de quantifier les bactéries sulfatoréductrices et non sulfatoréductrices responsables du métabolisme du lactate.

En l'absence de sulfate, le lactate est fermenté en propionate et acétate, en accord avec le profil de fermentation classique des *Propionibacteriaceae* ; alors qu'en présence de sulfate, le produit de dégradation du lactate est essentiellement l'acétate. Ceci suggère que les bactéries sulfatoréductrices utilisatrices de lactate, du genre *Desulfovibrio* , entrent en compétition avec les *Propionibacteriaceae* . Certaines espèces appartenant au genre *Desulfovibrio* peuvent aussi jouer un rôle important dans la digestion anaérobie : en l'absence de sulfate, elles dégradent le lactate par transfert interspécifique d'hydrogène (Bryant *et al.*, 1977).

L'oxydation anaérobie du propionate est fortement dépendante de la réduction du sulfate. Sans sulfate, l'oxydation de ce substrat s'effectue très lentement; par contre, en présence de sulfate, la vitesse est considérablement accélérée. Cette relation a été également observée pour les déchets animaux (Ueki *et al.*, 1986). La faible dégradation du propionate, observée en l'absence de sulfate suggère qu'elle dépend de *S. wolinii* . En effet cette bactérie est connue pour n'oxyder le propionate qu'en présence d'une bactérie utilisatrice d'hydrogène telle que les bactéries méthanogènes ou les bactéries sulfatoréductrices en présence de sulfate (Mackie et Bryant, 1981; Koch *et al.*, 1983; Mucha *et al.*, 1988; Robbins, 1988). De plus, elle a un faible taux de croissance en présence de *Methanospirillum hungatei* comme accepteur d'électrons (Boone et Bryant, 1980).

Nos résultats montrent que, contrairement à l'hydrogène qui constitue un substrat commun pour les bactéries sulfatoréductrices et méthanogènes, l'oxydation de l'acétate est indépendante de la sulfatoréduction. En effet, quand le chloroforme est ajouté à la culture mixte, l'acétate n'est pas consommé même en présence de sulfate. Par contre, sans addition de chloroforme, l'acétate est converti en méthane. Ces résultats indiquent que l'acétate joue un rôle mineur comme donneur d'électrons pour les bactéries sulfatoréductrices et que la sulfatoréduction n'inhibe pas la méthanogénèse à partir de l'acétate dans l'écosystème étudié. Nos résultats sont en agrément avec les travaux consacrés à ce problème (Isa *et al.*, 1986a, 1986b; Ueki *et al.*, 1986; Motoyuki *et al.*, 1987). Le dernier auteur observe cependant, l'existence d'une compétition à long terme entre les bactéries sulfatoréductrices et les bactéries méthanogènes pour des concentrations limitantes en acétate.

A fortes concentrations, le propionate inhibe la méthanogénèse (Andrews, 1969; Kaspar et Wuhrman, 1978b). Il est donc important que le propionate soit décomposé rapidement par réduction du sulfate. Ainsi l'aspect marquant de la sulfatoréduction est la rapide utilisation du propionate, l'orientation du rapport acétate / propionate vers l'acétate après la dégradation du lactate, et la contribution négligeable de l'acétate, principal précurseur de la méthanogénèse dans les digesteurs (Mc Carty, 1964), comme donneur d'électrons pour la réduction du sulfate.

Sur les bases de ces résultats, il est possible d'envisager un procédé de digestion anaérobie pour l'optimisation de la fermentation des déchets de distillerie vinicole, impliquant la séparation des phases acidogène et méthanogène. La présence de quantités variables de sulfate dans ces déchets, conduit à l'oxydation d'une fraction de la matière organique telle que le lactate (ce chapitre) et le glycérol (chapitres 4-1) par les bactéries sulfatoréductrices dans le réacteur où se déroulera l'acidogénèse, avant l'entrée de ces déchets ainsi traités, dans le réacteur où s'effectuera la phase méthanogène.

D'un point de vue pratique, il est très important que tout le sulfate disponible soit converti en sulfures, et éliminé avant l'entrée dans le réacteur méthanogène. Ce procédé offre les avantages suivants :

1) L'optimisation de l'appareillage et de l'environnement pour chaque microflore, permettant d'accroître le taux de dégradation des substrats et de réduire le volume réactionnel total.

2) Une meilleure stabilité, par contrôle de la charge appliquée au second réacteur, les baisses de pH pouvant être ainsi prévenues.

3) La disponibilité de la flore microbienne par la diminution des temps de séjour dans la phase acidogène qui opère une sélection de flore acidifiante à taux de croissance compétitif.

De cette façon on peut non seulement augmenter le rendement en méthane mais également obtenir un biogaz exempt de sulfures. Joergensen (1978) a montré que la composition en acides gras volatils variait avec le taux de dilution. S'il existe un spectre d'acides optimum pour les méthanogènes, il pourrait être uniquement obtenu par le choix du temps de rétention de la première phase. Cependant, certains auteurs (Nyns *et al.*, 1979) ne voient pas l'intérêt de séparer la phase acidogène de la phase méthanogène, étant donné les interactions microbiennes mises en jeu entre les deux groupes. Dans tous les cas, la phase acidogène conduira aux acides gras volatils et la phase méthanogène les transformera en méthane à partir de l'acétate.

Chapitre 3-2

Isolement et caractérisation de deux bactéries sulfatoréductrices dominantes sur lactate (souche dQ) et sur propionate (souche dFC3)

L'isolement des deux souches a été effectué à partir des derniers tubes positifs des numérations réalisées sur lactate (souche dQ) et sur propionate (souche dFC3).

1. ISOLEMENTS DES SOUCHES dQ ET dFC3

Après plusieurs repiquages sur lactate (10 mM) + sulfate (15 mM), ou propionate (10 mM) + sulfate (15 mM), des cultures stables ont été obtenues avec :

- un morphotype largement dominant sur lactate : un vibrio de petite taille très mobile.
- une forme en bâtonnet court non mobile à bouts arrondis sur propionate.

L'isolement des deux souches a été effectué par repiquages successifs en milieu semi solide. Après une semaine d'incubation à 35°C, des colonies blanchâtres et punctiformes sont apparues dans la gélose des tubes contenant le lactate, et des colonies lenticulaires de couleur marron dans les tubes contenant du propionate. La pureté des souches a été contrôlée plusieurs fois par repiquages sur milieu riche contenant du glucose (1%) + extrait de levure (1%) + de la biotrypcase (1%), sans sulfate et par observations microscopiques.

2. CARACTERISATION DES SOUCHES dQ ET dFC3

2.1. Souche dQ

2.1.1. Morphologie comparée

La souche dQ est un petit vibrio de 0,2-0,5 µm de largeur et de 1,4-1,8 µm de longueur (Photo 3.1); il est mobile par un flagelle polaire (Photo 3.2). Les cellules sont Gram négatives et les spores ne sont jamais observées.

Une étude comparée de la morphologie de la souche dQ avec celle de *D.desulfuricans* et *D.vulgaris* a été effectuée (Tableau 3.5). Seule la taille de la souche dQ apparaît comme une différence significative :

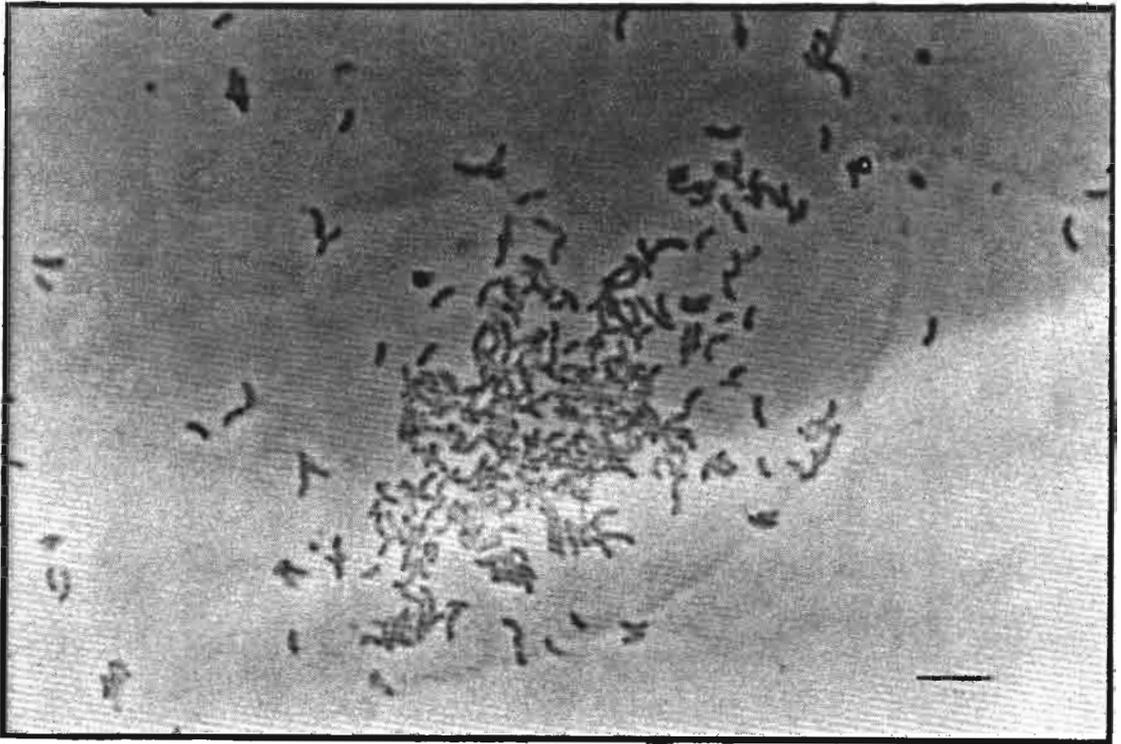


Photo 3.1. Microscopie optique à contraste de phase de la souche dQ. Barre , 5 μ m.

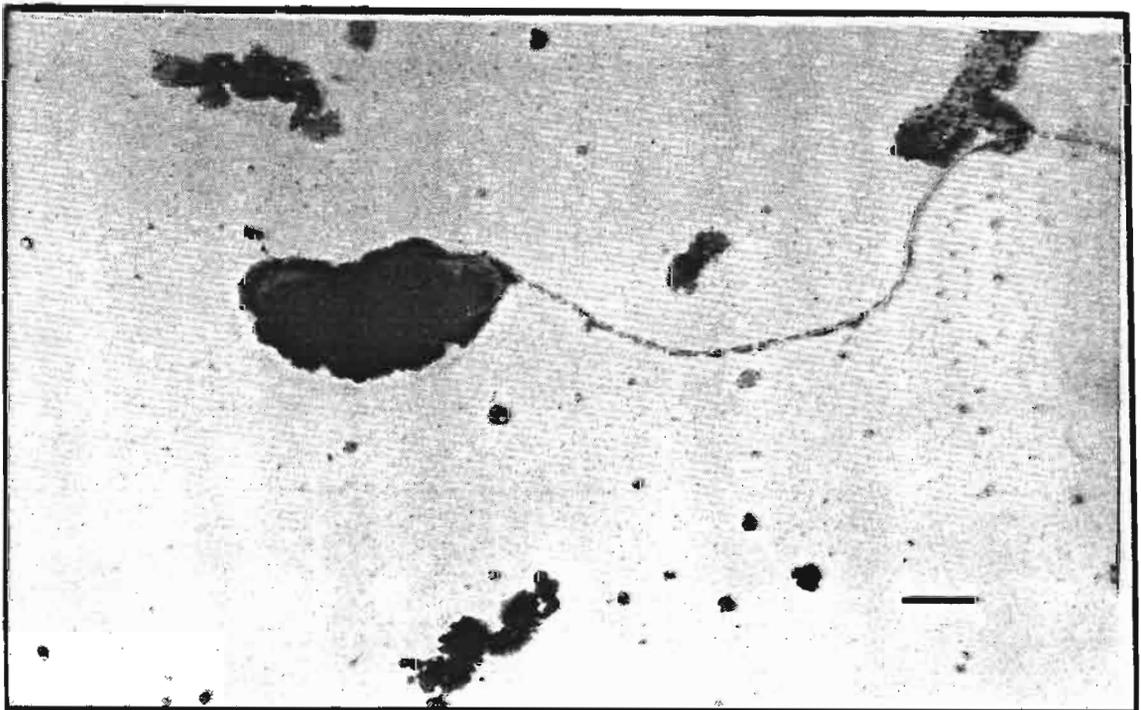


Photo 3.2. Microscopie électronique de la souche dQ. Barre, 500 nm. Noter le flagelle polaire.

Critères	souche dQ	<i>D.desulfuricans</i> ^a	<i>D.vulgaris</i> ^a
Forme	Vibrio	Vibrio	Vibrio
Mobilité	+	+	+
Gram	-	-	-
Largeur (µm)	0,2 - 0,5	0,5 - 0,8	0,5 - 0,8
Longueur (µm)	1,4 - 1,8	1,5 - 4,0	1,5 - 4,0

a , d'après Widdel (1988).

Tableau 3.5 Caractéristiques morphologiques de la souche dQ, *D.desulfuricans* et *D.vulgaris* .

2.1.2. Donneurs et accepteurs d'électrons utilisés par la souche dQ

La croissance de la souche dQ a été suivie par la densité optique à 580 nm et par la production de sulfures .

Le milieu de croissance contenait 10 mM de substrat et 15 mM de sulfate; la température et le pH d'incubation étaient 35°C et 7,2 respectivement. La souche dQ croît dans un milieu strictement minéral et ne requiert aucun facteur de croissance. Elle est capable de fixer l'azote atmosphérique.

Les substrats utilisés par la souche dQ sont reportés dans le Tableau 3.6. Elle oxyde incomplètement le lactate, le pyruvate et l'éthanol en acétate. Le propanol-1, butanol-1 et le pentanol sont oxydés respectivement en propionate, butyrate et valérate; une légère croissance est observée avec l'hydrogène en présence d'acétate. La DHA, le 1,3-propanediol, le 1,4-butanediol et l'éthylène glycol sont utilisés sans croissance bactérienne.

Le 1,2-propanediol est converti en propionate en l'absence ou en présence de sulfate; mais aucune production de sulfures n'a été notée. Le pyruvate est fermenté principalement en acétate.

Outre le sulfate, la souche dQ utilise comme accepteurs d'électrons, le sulfite et le thiosulfate. Le soufre élémentaire, le fumarate ou le nitrate ne sont pas utilisés.

Tableau 3.6 Utilisation des différents substrats comme donneurs d'électrons par la souche dQ

Substrats (mM)	+ Sulfate		- Sulfate	
	Croissance	Produits	Croissance	Produits
Lactate (10)	+	Acétate	-	nd
Dihydroxyacétone (10)	(+)	Acétate	-	nd
1,3-propanediol (10)	(+)	Acétate	-	nd
1,2-propanediol (10)	+ ^a	Propionate	+	Propionate
1,4-butanediol	(+)	Succinate	-	nd
Pentanol-1 (10)	(+)	Valérate	-	nd
Propanol-1 (10)	+	Propionate	-	nd
Butanol-1 (10)	+	Butyrate	-	nd
Ethanol (10)	+	Acétate	-	nd
Ethylène glycol (10)	(+)	Acétate	-	nd
H ₂ + CO ₂ (3 bars)	±	nd	-	nd
Pyruvate (10)	+	Acétate	+	Acétate

+, positif; -, négatif; (+); utilisation sans croissance bactérienne; ±, variable; a, croissance mais sans production de sulfures; nd, non déterminé. Le milieu de croissance contenait 15 mM de sulfate; l'hydrogène a été testé en présence de 5 mM d'acétate. Les substrats testés et non utilisés par la souche dQ sont : glycérol (10); méthanol (10), en présence de 5 mM d'acétate; formate (10), en présence de 5 mM d'acétate; fumarate (10); succinate (10); malate (10); 2,3-butanediol (10); propanol-2 (10); butanol-2 (10); glucose (10); fructose (10); acétate (10); propionate (10); butyrate (10); isobutyrate (10); valérate (10); ribose (10); oxaloacétate (10) et choline (10). La croissance a été aussi mesurée par la production de sulfures après 3 semaines d'incubation à 35 °C.

Sur le plan nutritionnel, la souche dQ montre quelques différences par rapport à *D.desulfuricans* et *D.vulgaris* (Tableau 3.7).

Substrats	souche dQ		<i>D. desulfuricans</i> ^a		<i>D. vulgaris</i> ^a	
	+SO ₄ ²⁻	-SO ₄ ²⁻	+SO ₄ ²⁻	-SO ₄ ²⁻	+SO ₄ ²⁻	-SO ₄ ²⁻
H ₂ /CO ₂	±	-	+	-	+	-
Formate	-	-	+	-	+	-
Lactate	+	-	+	-	+	-
Ethanol	+	-	+	-	(+)	-
Fumarate	-	-	+	nd	-	-
Malate	-	-	+	-	-	-
Oxalate	-	-	nd	nd	- ^b	nd
Pyruvate	+	+	+	+	+	- ^c
Choline	-	-	+	+	-	-

a, d'après Widdel (1988); b, positif pour subsp. *D.oxamicus*; négatif pour la sous-espèce *D.vulgaris*; c, positif pour la sous-espèce *D.oxamicus*; négatif pour subsp. *D.vulgaris* ; +, positif; -, négatif; (+), croissance positive pour certaines souches de l'espèce seulement; ±, variable; nd, non déterminé.

Tableau 3.7 Comparaisons des caractères nutritionnels de la souche dQ, *D.desulfuricans* et *D.vulgaris*.

2.1.3. Conditions optimales de croissance de la souche dQ

La souche dQ présente une croissance optimale entre 35 et 40 °C (Fig.3.4). Le pH optimum est situé entre 7,5 et 7,6 (Fig.3.5).

La croissance est améliorée en présence de NaCl, dans le milieu de culture, l'optimum de croissance se situant à environ 18g / l (Fig.3.6).

Comparée à *D.desulfuricans* et *D.vulgaris*, la souche dQ présente des différences pour la température optimale de croissance et le pH. De plus, elle requiert NaCl pour sa croissance (Tableau 3.8).

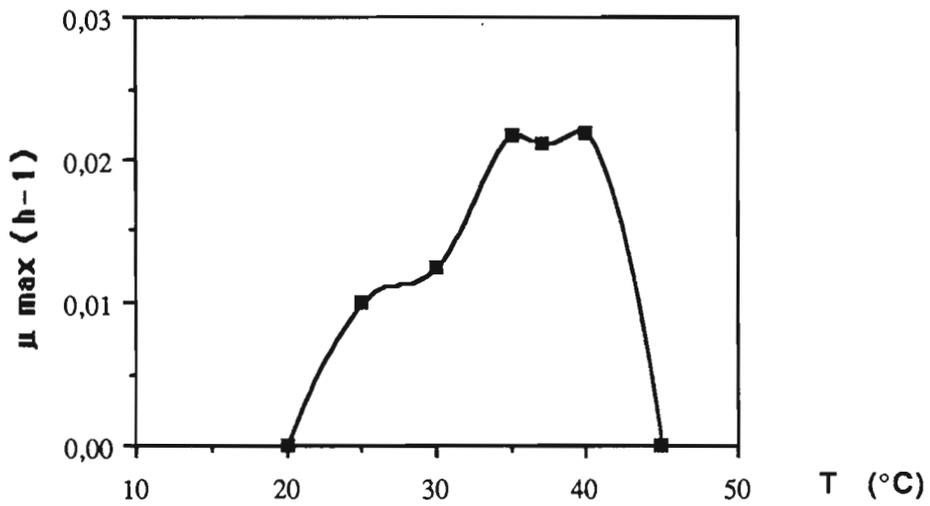


Fig. 3.4 Effet de la température sur la croissance de la souche dQ

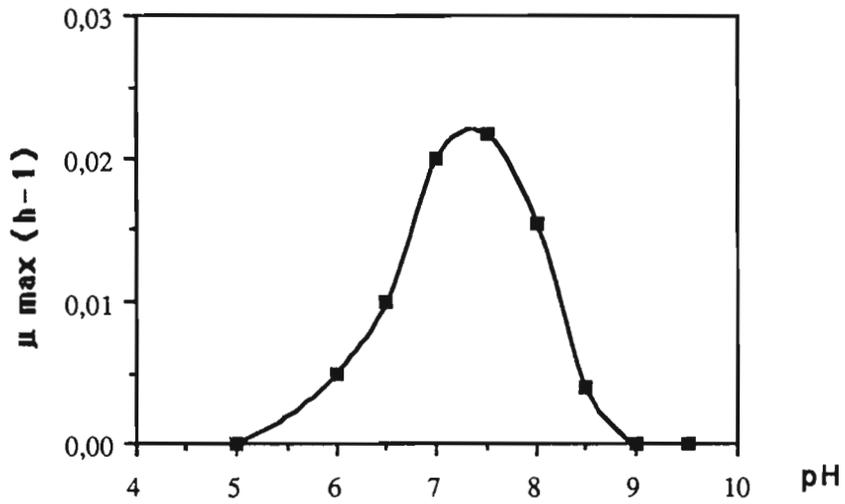


Fig. 3.5 Effet du pH sur la croissance de la souche dQ

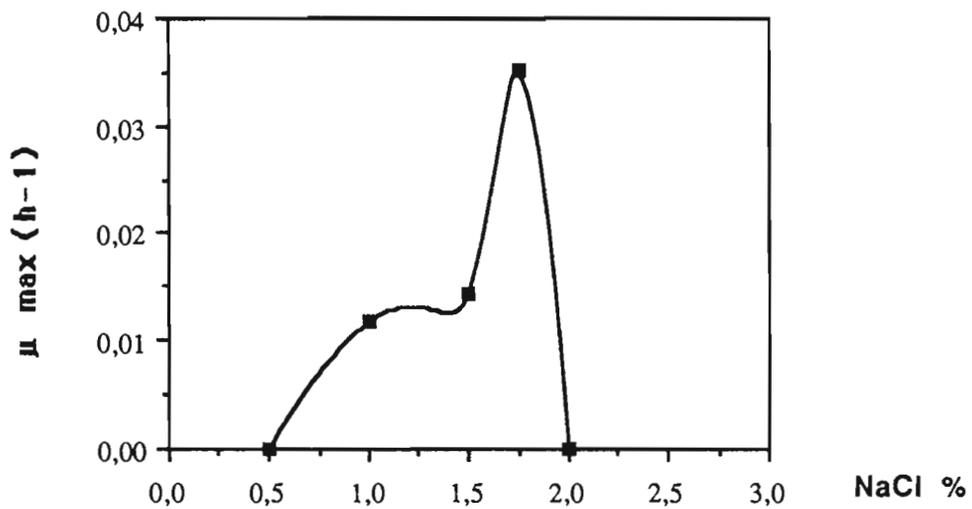


Fig . 3.6 Effet de la salinité sur la croissance de la souche dQ

paramètres	souche dQ	<i>D.desulfuricans</i> ^a	<i>D.vulgaris</i> ^a
T°. optimale	35 - 40	30 - 36	30 - 36
pH. optimum	7,2 - 7,6		
NaCl	+	- b	-
GC%	nd	59	65

a, d'après Widdel (1988); b, positif pour subsp. *estuarii* ; nd, non déterminé

Tableau 3.8. Comparaison des conditions optimales de croissance et du GC% de l'ADN de la souche dQ, *D.desulfuricans* et *D.vulgaris* .

2.2. Souche dFC3

2.2.1. Morphologie comparée

Les cellules de la souche dFC3 se présentent sous la forme de petits bâtonnets courts à bouts arrondis, isolés ou en paires, de 0,7 - 1 µm de largeur et de 2,0 - 2,5 µm de longueur (Photo 3.3), ou en amas (Photo 3.4). Les cellules sont Gram négatives et les spores ne sont jamais observées. Le Tableau 3.9 montre une comparaison morphologique de la souche dFC3 avec *Desulfobulbus propionicus* et *Desulfobulbus elongatus* .

Critères	souche dFC3	<i>D.propionicus</i> ^a	<i>D.elongatus</i> ^b
forme	bâtonnet	ovale - citron	bâtonnet
mobilité	-	-	+
largeur (mm)	0,7 - 1,0	1,0 - 1,3	0,6 - 0,7
longueur(mm)	2,0 - 2,5	1,8 - 2,0	1,5 - 2,5
GC%	nd	60	59

a, d'après Widdel (1988); b, d'après Samain *et al.* (1984); +, positif; -, négatif; nd, non déterminé.

Tableau 3.9. Morphologies comparées de la souche dFC3, *D.propionicus* et *D.elongatus*.

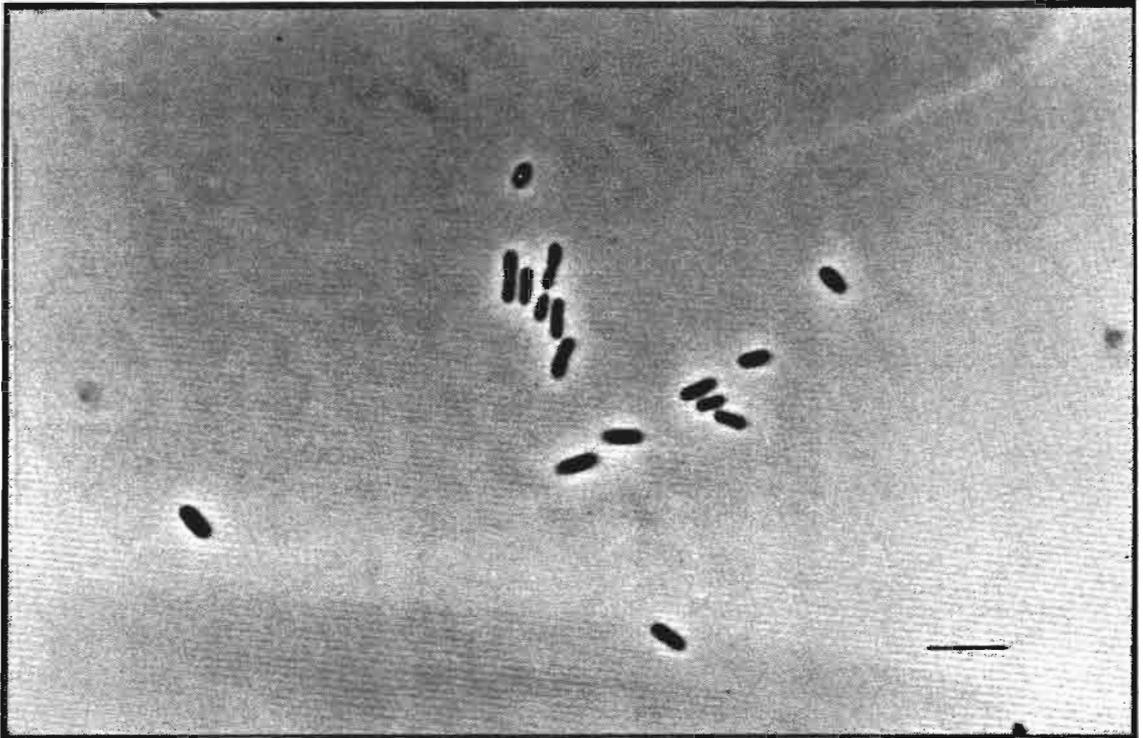


Photo 3.3. Microscopie optique à contraste de phase de la souche dFC3, isolée ou en paire.
Barre, 5 μm .

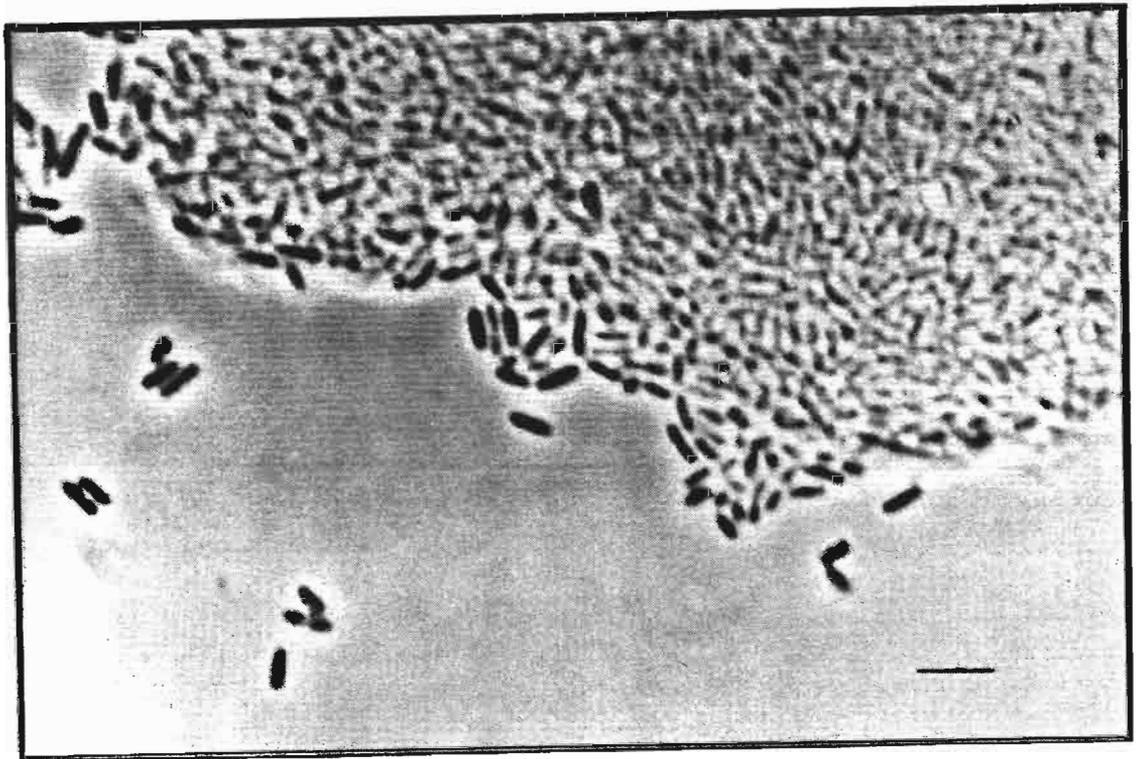


Photo 3.4. Microscopie optique à contraste de phase de la souche dFC3, en amas. Barre, 5 μm .

2.2.2. Donneurs et accepteurs d'électrons utilisés par la souche dFC3

La souche dFC3 croît dans un milieu strictement minéral, ni les vitamines ou l'extrait de levure ne sont nécessaires; le sélénate de sodium améliore la croissance (le sélénium est nécessaire pour l'activité des sélénoprotéines intervenant dans le métabolisme des acides gras à longues chaînes et des acides aromatiques). Aucune source d'azote autre que l'azote ammoniacal n'est utilisée. Le Tableau 3.10 reporte la liste des substrats utilisés par la souche dFC3 en présence et en l'absence de sulfate. En présence de sulfate, tous ces substrats sont incomplètement oxydés en acétate et probablement en CO₂. En l'absence de sulfate, la souche dFC3 effectue une fermentation du lactate et pyruvate en un mélange de propionate et acétate. Outre le sulfate, la souche dFC3 utilise comme accepteur d'électrons le thiosulfate; une légère réduction du sulfite et du soufre élémentaire a été notée; par contre, le fumarate ou le nitrate ne sont pas utilisés comme accepteurs terminaux d'électrons. De même, la souche dFC3 est incapable d'utiliser le propionate lorsqu'on l'a cultivée en présence de *Methanospirillum hungatei* comme acceptrice d'électrons, en l'absence de sulfate.

Substrats (mM)	+ Sulfate		- Sulfate	
	Croissance	Produits	Croissance	Produits
Lactate (10)	+	Acétate	+	Acétate + Propionate
Propionate (10)	+	Acétate	-	nd
Propanol-1 (10)	+	Acétate	-	nd
Pyruvate (10)	+	Acétate	+	Acétate + Propionate
Ethanol (10)	+	Acétate	-	nd
H ₂ + CO ₂	+	nd	-	nd

+, positif; -, négatif; nd, non déterminé; H₂ + CO₂ (3 bars), a été testé en présence d'acétate (5 mM). Le milieu de culture contient du sélénite de sodium. Les substrats testés et non utilisés par la souche dFC3, avec les concentrations en mM: le fumarate (10); le formate (10); le malate (10); le succinate (10); le méthanol (10); l'acétate (10); le butyrate (10); le propanol (10); le butanol (10); le glucose (10); le fructose (10) et le xylose. La croissance bactérienne a été suivie par la densité optique à 580 nm et par la production de sulfures à 35 °C pendant 3 semaines.

Tableau 3. 10 Substrats utilisés par la souche dFC3 en présence et en l'absence de sulfate.

2.2.3. Conditions optimales de croissance de la souche dFC3

La souche dFC3 présente une croissance optimale entre 35 et 37°C (Fig. 3.7). Le pH optimum est de 7 (Fig. 3.8). La croissance n'est pas améliorée par NaCl, l'optimum se situant à 0 g/l (Fig. 3.9). Comparée à *D.propionicus* et *D.elongatus* (Tableau 3.11), la souche présente quelques différences:

paramètres	souche dFC3	<i>D.propionicus</i> ^a	<i>D.elongatus</i> ^b
T°. optimale	35 - 37	39	35
pH. optimum	7	7,1 - 7,5	7
NaCl	-	nd	nd
GC%	nd	59,9	59,0
Vits. requises	-	P.A.B	P.A.B

a,d'après Widdel (1988); b, d'après Samain *et al.* (1984); +, positif;- , négatif; nd, non déterminé; P.A.B, p-aminobenzoate.

Tableau 3.11. Comparaison des conditions optimales de croissance et du GC% de l'ADN de la souche dFC3 , *D. propionicus* et *D. elongatus* .

3. DISCUSSION

La souche dQ est un vibrio de petite taille, non sporulé, Gram négatif et mobile par un flagelle polaire. Elle est capable de réduire le sulfate et oxyder incomplètement le lactate et le pyruvate en acétate et CO₂. l'acétate, le propionate et le butyrate ne sont pas utilisés. Ces caractéristiques placent la souche dQ parmi le genre *Desulfovibrio* (Pfennig *et al.*, 1981). La souche dQ se caractérise surtout par sa petite taille et sa très grande mobilité. Les cellules sont souvent isolées et elles ne deviennent jamais spirilloïdes en cultures âgées. Lorsqu'on la compare à *D.desulfuricans* et *D.vulgaris* morphologiquement proches, on remarque cependant des différences notables aussi bien sur le plan morphologique que sur le plan nutritionnel. Elle est différente de *D.desulfuricans* par la taille des cellules, l'incapacité d'utiliser le formate, le fumarate, le malate et la choline. La souche dQ est par contre beaucoup plus proche de *D.vulgaris* ; des différences morphologiques et physiologiques existent : température, pH et exigence en NaCl, taille des cellules, incapacité à

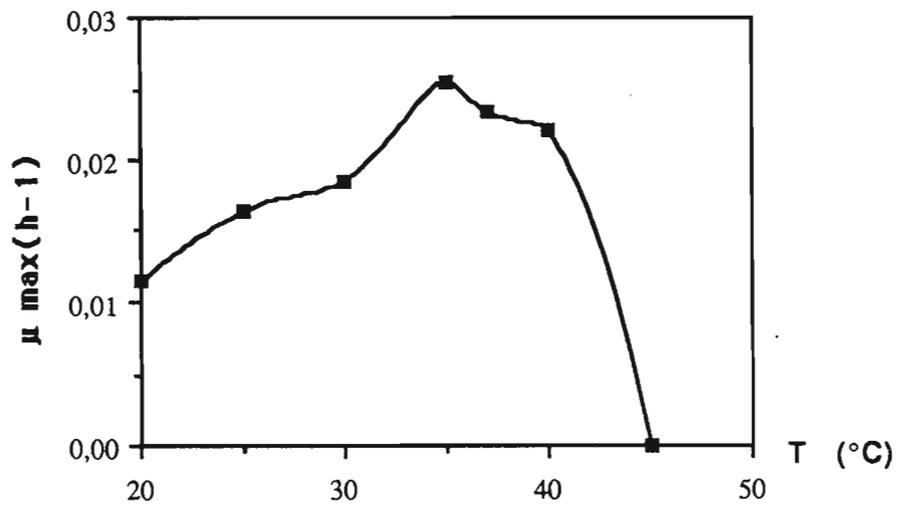


Fig. 3.7 Effet de la température sur la croissance de la souche DFC3

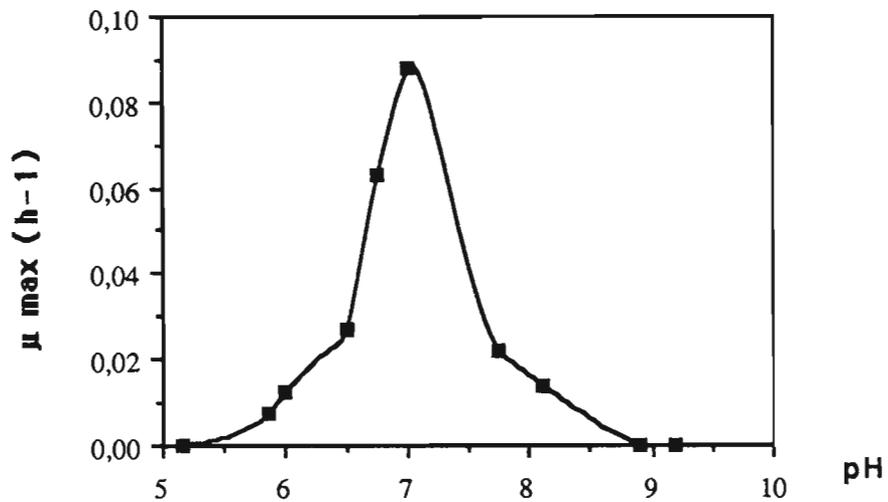


Fig. 3.8 Effet du pH sur la croissance de la souche DFC3

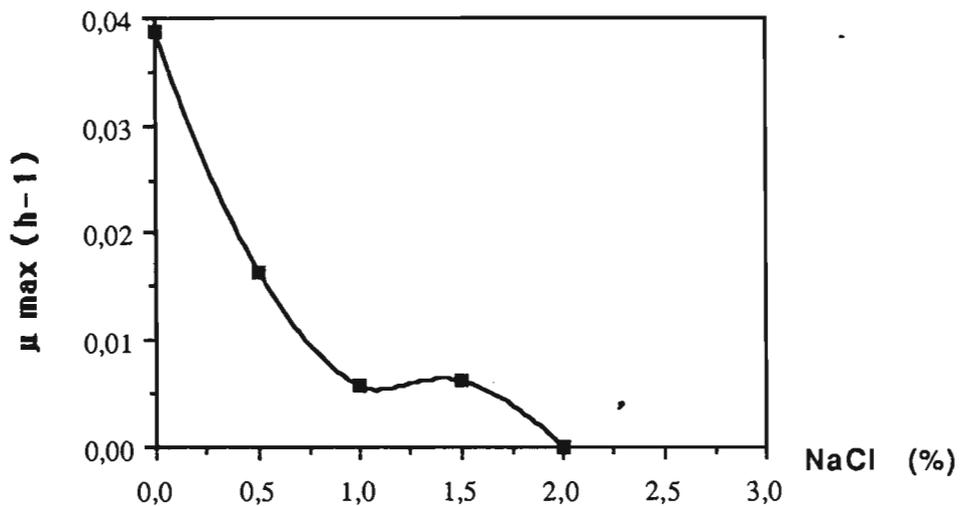


Fig. 3.9 Effet de la salinité sur la croissance de la souche DFC3

utiliser le formate comme donneurs d'électrons; et fermentation du pyruvate. Elle est différente de *D.oxamicus* par son incapacité à utiliser l'oxalate et l'oxamate. En se basant sur ces différences, la souche dQ semble appartenir à une nouvelle espèce, et le nom de *Desulfovibrio minusculus* sp. nov., est proposé.

Des cultures d'enrichissement de souches de *Desulfovibrio* dégradant le propionate ont été déjà décrites (Jankowski et Zobell, 1944). Un bâtonnet court, non mobile, aux extrémités arrondies, *Desulforistella hydrocarbonoblastica* a été décrit comme utilisant le formate, lactate, acétate et propionate (Hvid-Hansen, 1951). Mais la culture d'origine a été perdue. Actuellement, *Desulfobulbus* est le seul genre connu qui soit capable d'oxyder incomplètement le propionate en acétate; il est caractérisé par une morphologie particulière, avec des cellules ellipsoïdales, souvent en forme de citrons, avec des extrémités pointues (Widdel et Pfennig, 1982). Récemment, une autre espèce appartenant au genre *Desulfobulbus*, a été isolée par Samain et collaborateurs (1984). Elle se présente sous la forme de bâtonnets légèrement incurvés, d'où le nom de *Desulfobulbus elongatus*. Elle est très proche de *D.propionicus* par ses propriétés métaboliques et la composition en G+C de l'ADN.

La souche dFC3 appartient au genre *Desulfobulbus* (Widdel et Pfennig, 1982). Elle présente une forme intermédiaire entre *D. propionicus* et *D.elongatus*. Elle est également proche de ces espèces par ses propriétés physiologiques excepté que *D.propionicus* et *D.elongatus*, requièrent l'acide paraaminobenzoïque comme facteur de croissance.

La souche DFC3 étant beaucoup plus proche morphologiquement de *D.elongatus*, on propose qu'elle soit classée comme une sous espèce de *Desulfobulbus elongatus*, et le nom de *Desulfobulbus elongatus* subsp. *narbonense* est proposé.

D'un côté pratique, étant donné que la souche dFC3 ne requiert aucun facteur de croissance, croît sur un milieu strictement minéral contenant une source d'énergie et le sulfate, et oxyde le propionate en acétate qui peut être utilisé comme substrat par les bactéries méthanogènes telles que *Methanosarcina* ou *Methanotrix*, nous permet d'envisager son application dans des cas de digestion anaérobie où le propionate constitue une étape limitante de la méthanisation.

**FERMENTATION DU GLYCEROL ET DES DIOLS PAR
LES BACTERIES SULFATO - REDUCTICES DU
GENRE *DESULFOVIBRIO***

Chapitre 4-1

Réduction du sulfate et fermentation du glycérol et du 1,3-propanediol par une culture mixte indéfinie

1. DEGRADATION ANAEROBIE DU GLYCEROL

La dégradation du glycérol par la culture mixte indéfinie a été suivie en l'absence de sulfate, en présence de sulfate, et en présence de sulfate et de molybdate. Les essais ont été effectués en batch, à pH et température contrôlés à 7.2 et 35°C. La phase gazeuse est constituée d'azote à 100%.

1.1. Fermentation du glycérol en l'absence de sulfate

Comme le montre la figure 4.1a, le glycérol est rapidement dégradé en 1,3-propanediol avant la formation de propionate et de l'acétate. Le 1,3-propanediol est à son tour dégradé, mais moins rapidement que le glycérol, en propionate et acétate avec un rapport approximatif acétate / propionate de 2.3. Le rendement évalué à partir du carbone total dissous mesuré et calculé (Fig. 4.1b) est de 53 % lors de la disparition du glycérol, contre 90,5% à la fin de l'incubation.

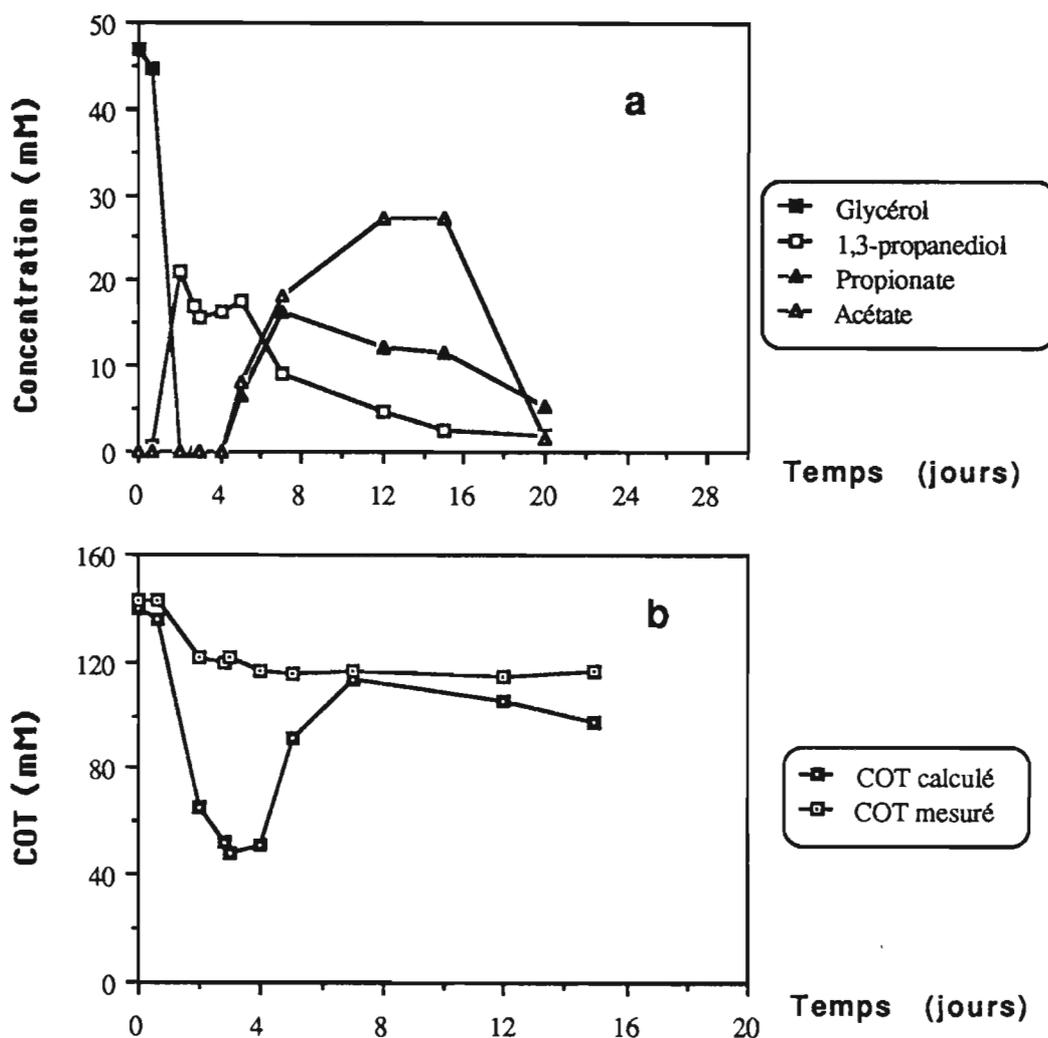
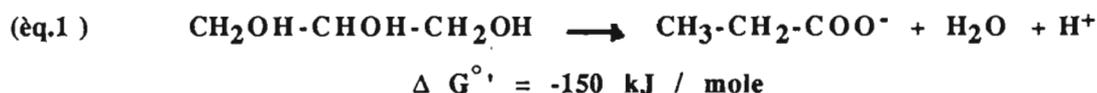


Fig. 4.1 Cinétique de dégradation anaérobie du glycérol par la culture mixte indéfinie (a) et évolution du carbone total dissous (COT), mesuré et calculé, (b) en l'absence de sulfate. Le COT ne prend pas en compte le CO₂ dissous (voir chapitre 2, Matériels et Méthodes).

Ceci révèle la présence d'un ou plusieurs intermédiaires non détectés par nos méthodes d'analyse et qui seraient convertis en propionate et acétate. La production de propionate n'est pas couplée à la dégradation du glycérol, pourtant sa formation à partir du glycérol est thermodynamiquement favorable (èq.1) :



1.2. Fermentation du glycérol en présence de sulfate et molybdate

Avec le molybdate à une concentration finale de 20 mM (inhibiteur de la sulfato-réduction), le sulfate n'est pas utilisé. Cependant, comme dans l'expérience précédente, le glycérol est rapidement consommé (Fig.4.2a). La formation de 1,3-propanediol est très faible; ni acétate ou propionate ne sont produits à partir du glycérol.

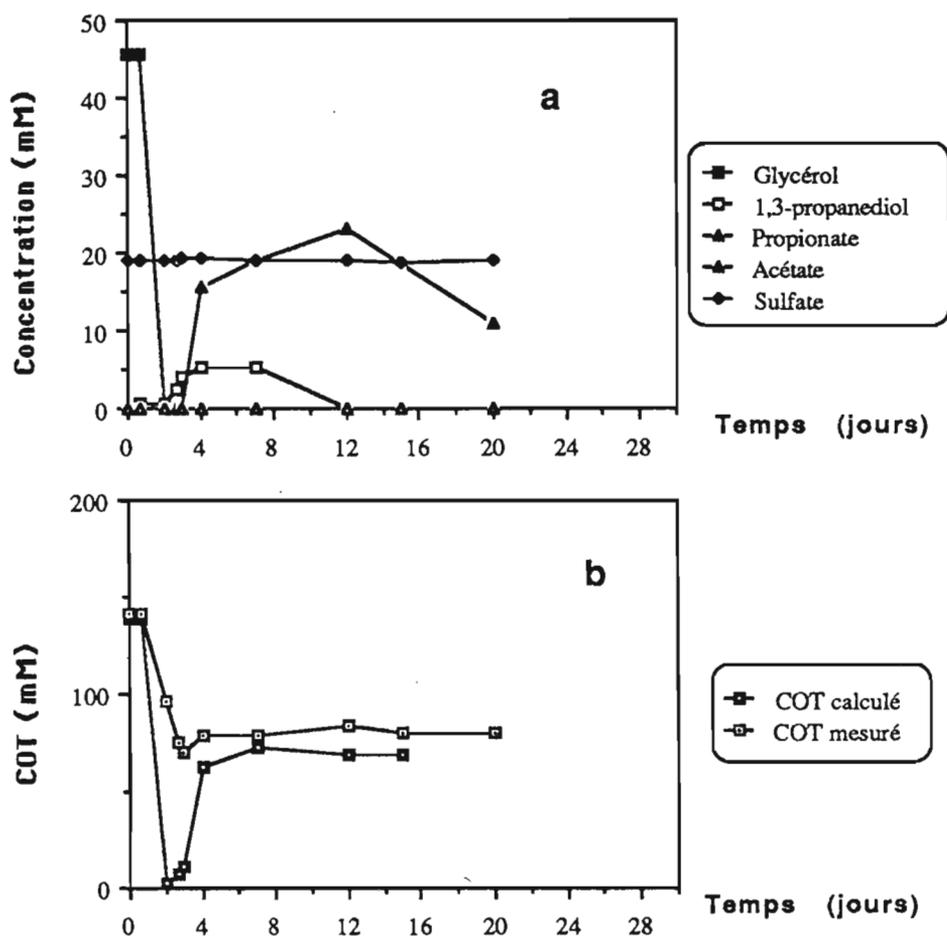


Fig.4.2 Cinétique de dégradation anaérobie du glycérol par la culture mixte indéfinie (a) et évolution du carbone total dissous (COT), mesuré et calculé (b) en présence de sulfate et de molybdate.

La production de propionate peut avoir deux origines : une faible partie résulte de la dégradation du 1,3-propanediol comme le montre la figure 4.2a, et une partie plus importante provient de la dégradation d'une autre source de carbone non identifiée comme le suggèrent les rendements évalués à partir du carbone total dissous mesuré (Fig. 4.2b) et calculé à partir des métabolites produits (2%, lorsque le glycérol disparaît contre 83 % lorsque la production des AGV est maximale). Ceci démontre la production d'un ou plusieurs intermédiaires de façon plus importante que dans l'expérience précédente.

L'inhibition de la production d'acétate à partir du 1,3-propanediol pourrait s'expliquer de deux manières différentes :

1) il est possible que le molybdate, inhibiteur spécifique de la sulfatoréduction (Smith et Klug, 1981; Lovley *et al.*, 1982; Postgate, 1984a), ait provoqué l'accumulation d'hydrogène (non recherché dans cet essai); ceci indiquerait que le 1,3-propanediol se dégraderait par association syntrophique entre bactéries fermentatives et sulfatoréductrices en présence de sulfate, et que cette dégradation dépendrait donc de la capacité des bactéries sulfatoréductrices à consommer cet hydrogène.

2) Selon une autre explication de cette inhibition de la production d'acétate, l'effet observé du molybdate serait le résultat d'une inhibition directe des bactéries fermentatives convertissant le 1,3-propanediol en acétate. L'inhibition directe par le molybdate de bactéries non sulfatoréductrices fermentant des acides aminés en culture pure, a été déjà observée par Nanninga et Gottschal (1985). Il est à noter que jusqu'à maintenant, l'effet réel du molybdate n'a jamais été démontré de façon non équivoque.

1.3. Fermentation du glycérol en fonction du rapport carbone / soufre (C/S)

Il s'agissait d'étudier l'influence directe ou indirecte de la quantité de sulfate disponible sur la fermentation anaérobie du glycérol.

les différents rapports carbone/soufre ont été obtenus en maintenant la même concentration en sulfate pour éviter une éventuelle inhibition par les sulfures, et en augmentant la concentration du glycérol ; dans ce cas, on ne doit pas craindre l'acidité du milieu puisqu' on maintient le pH à 7,2 , condition proche de celle du fermenteur (7,1 - 7,4).

1.3.1. Glycérol, 10.7 g / l; Sulfate, 2.2 g / l (C/S 6.1)

Le profil de dégradation du glycérol (Fig.4.3a) est proche de celui obtenu sans sulfate (Fig. 4.1a), sauf que non seulement il y a couplage entre la production de 1,3-propanediol et la dégradation du glycérol, mais aussi entre la dégradation du 1,3-propanediol et la production du propionate et de l'acétate. Notons cependant que la production des acides se fait en deux phases : Une phase superposée à la consommation du glycérol, avec un rapport acétate / propionate de 6 et une phase superposée à la dégradation du 1,3-propanediol avec un rapport acétate / propionate de seulement 1,2. La disparition du sulfate montre également deux phases : une légère consommation (5,8 mM) pendant la disparition du glycérol (116,3 mM), et une consommation plus importante (15 mM), lors de la dégradation du 1,3-propanediol (53,8 mM).

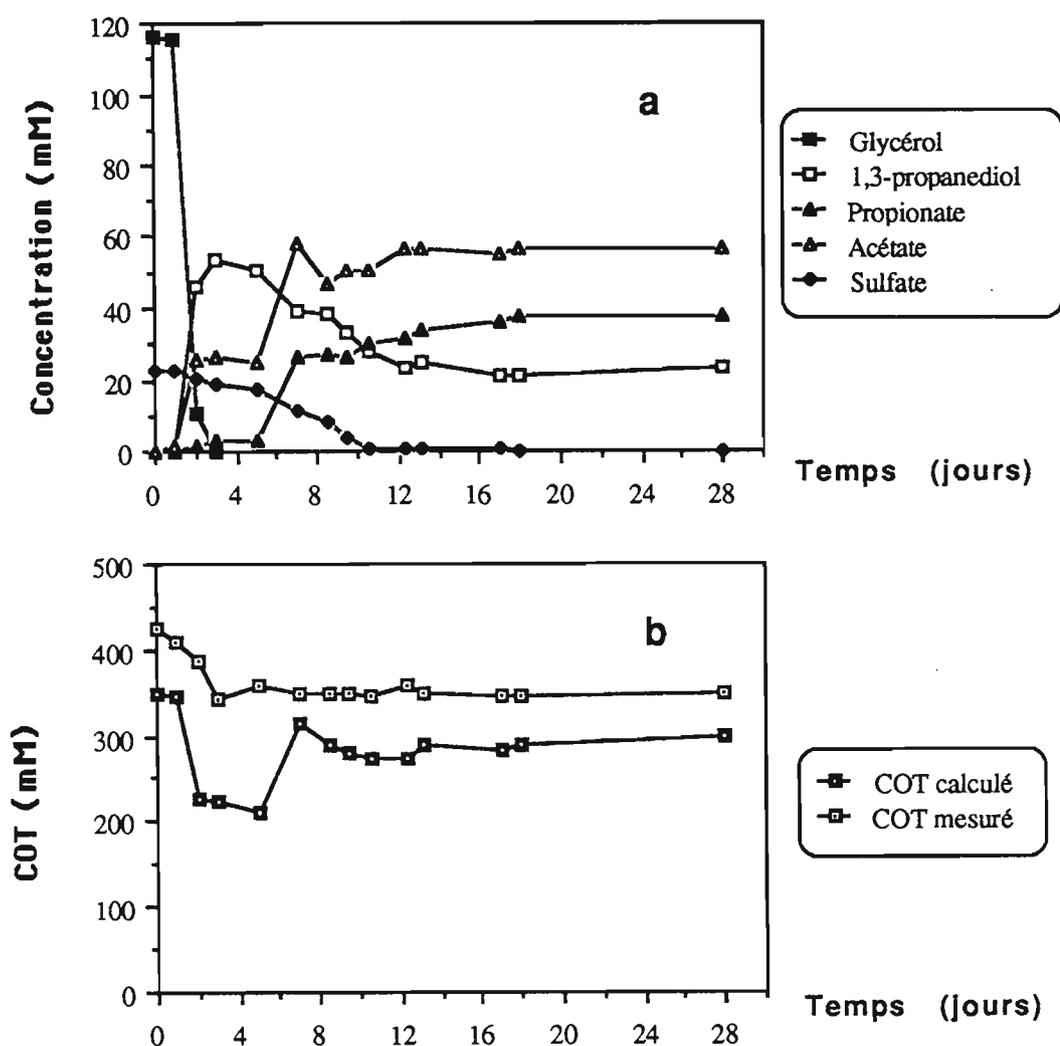


Fig. 4.3 Cinétique de dégradation anaérobie du glycérol par la culture mixte indéfinie (a) et évolution du carbone total dissous (COT), mesuré et calculé en présence de sulfate, avec un rapport carbone / soufre de 6,1 (b).

Les rendements en carbone, évalués quand le glycérol disparaît (64,8 %) et en fin d'expérience (82 %) (Fig. 4.1.2c) montrent clairement la formation transitoire à partir du glycérol d'un ou plusieurs intermédiaires autres que le 1,3-propanediol. Il est cependant étonnant de noter que, pendant la phase de dégradation du 1,3-propanediol (accompagnée d'une consommation du sulfate), le propionate continue à s'accumuler en même temps que le sulfate est utilisé (Fig.4.3a).

Il est possible que le 1,3-propanediol et le propionate constituent 2 substrats pour la même population sulfatoréductrice, comme ceci a été observé avec une bactérie sulfatoréductrice appartenant au genre *Desulfobulbus* par Tasaki et son équipe (1990); dans ce cas cette population a beaucoup plus d'affinité pour le 1,3-propanediol que pour le propionate, qui devrait normalement être consommé par la suite.

La population sulfatoréductrice utilisatrice de 1,3-propanediol comme source d'énergie, est plus nombreuse et active que celle utilisant le propionate, et dans ce cas, tout le sulfate disponible sert à l'oxydation du premier substrat.

Les résultats mentionnés dans le Tableau 4.1 (voir paragraphe 2.3), montrent qu'en l'absence ou présence de sulfate, le propionate et le 1,3-propanediol sont dégradés. Ceci montre que la présence de 1,3-propanediol n'a aucune influence sur la dégradation du propionate. D'autre part, des dénombrements de bactéries sulfatoréductrices utilisant le 1,3-propanediol comme source de carbone et d'énergie, révèlent que leur nombre est supérieur à celui des sulfatoréducteurs utilisant le propionate (Tableau 3.4, chapitre 3-1). L'examen microscopique des derniers tubes positifs du dénombrement des deux groupes bactériens, montre la présence de morphotypes très différents sur chaque substrat. En outre, les bactéries sulfatoréductrices isolées sur 1,3-propanediol sont incapables d'utiliser le propionate comme source d'énergie (chapitre 4-2). Il est donc possible que la production de propionate ne soit pas liée à une activité sulfatoréductrice sur 1,3-propanediol.

1. 3.2. Glycérol 4.1 g / l ; Sulfate 2.2 g / l (C / S 2.1)

La figure 4.4a reporte la cinétique de dégradation du glycérol en présence de sulfate pour un rapport carbone/soufre de 2,1. Le glycérol (44,5 mM) disparaît rapidement, accompagné d'une utilisation du sulfate (4,8mM) qui coïncide avec une formation transitoire de 1,3-propanediol dont la concentration est fortement abaissée (3,9 mM), et d'autres intermédiaires comme le montrent les rendements calculés : 8.8% contre environ 100 % à la fin de l'expérience (Fig.4.4b). La dégradation du sulfate (18 mM) continue après la disparition du glycérol, avec une production parallèle de propionate. Si on compare la quantité de propionate produite (en terme de carbone) à celle du 1,3-propanediol consommée, on trouve un rapport d'environ 5. Ceci prouve

clairement que la production de propionate est le résultat de la dégradation d'autres sources de carbone produites lors de la consommation du glycérol.

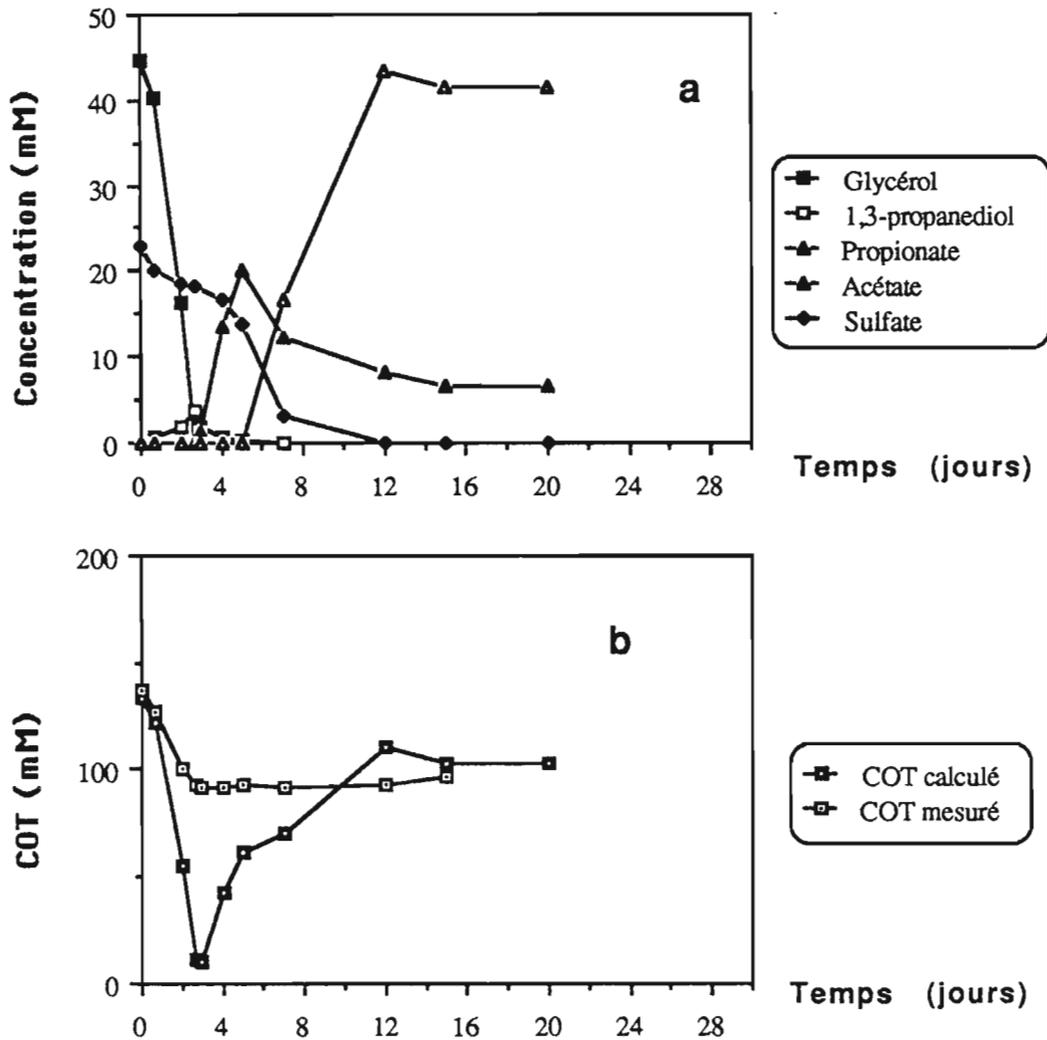


Fig.4.4 Cinétique de dégradation anaérobie du glycérol, par la culture mixte indéfinie (a) et évolution du carbone total dissous (COT), mesuré et calculé en présence de sulfate, avec un rapport carbone / soufre de 2,1 (b).

1.4. Bilans carbonés

Les figures 4.1b; 4.2b; 4.3b et 4.4b rendent compte des cinétiques des bilans du carbone total dissous, dosé directement ou calculé à partir des produits de dégradation du glycérol, selon les conditions décrites ci-dessus : dans tous les cas de figure, on constate que lorsque le glycérol disparaît (première phase), la production de métabolites est bien inférieure à la dégradation du glycérol. Par contre, le bilan carboné global de l'ensemble des réactions en fin d'incubation (deuxième phase) est bien supérieur à celui de la première phase. La première et la deuxième phase mettent donc en évidence l'existence d'un ou plusieurs intermédiaires réactionnels non décelés par

l'analyse. Dans le but de détecter ces composés susceptibles de s'accumuler au cours de la fermentation du glycérol, les produits suivants ont été recherchés et n'ont pas été trouvés : l'éthanol, le pyruvate (principal intermédiaire de beaucoup de fermentations), le malate (également intermédiaire connu de la fermentation propionique), le succinate, le butyrate (un des produits de fermentation des bactéries du genre *Clostridium*), les composés aldéhydiques (des dosages appropriés ont montré qu'aucun composé possédant une fonction aldéhyde, ne s'accumule de façon notoire), l'acroléine (produit possible de dégradation du glycérol), le lactate (intermédiaire possible de la dégradation du glycérol); il est effectivement thermodynamiquement possible que le lactate constitue un intermédiaire réactionnel de la fermentation du glycérol selon la réaction suivante (éq.2) :



2. DEGRADATION ANAEROBIE DU 1,3-PROPANEDIOL

La dégradation anaérobie du 1,3-propanediol a été étudiée en utilisant deux techniques d'incubation, dans deux milieux différents. La première technique d'incubation est celle décrite pour le glycérol ; après dilution à 40 - 50 % (v / v) de la culture mixte indéfinie, dans le milieu minéral sans sulfate (tampon phosphate, réducteur : cystéine, et phase gazeuse : 100 % N₂), le substrat et le sulfate sont ajoutés dans des flacons sérum de 500 ml contenant 200 ml de l'inoculum ainsi préparé. L'activité sulfatoréductrice est déterminée par la disparition du sulfate du milieu.

Ce procédé d'incubation présente l'inconvénient de ne pas permettre de doser correctement les sulfures produits lors de la réduction du sulfate à cause de la forte coloration du milieu industriel utilisé et la variation de couleur, en fonction de la teneur en sulfures dans le milieu (voir photo 2.2, Matériels et Méthodes). Pour démontrer la production de sulfures, une autre méthode d'incubation a été utilisée : la culture mixte, directement issue du fermenteur, sans préincubation préalable, a été introduite dans une proportion de 10 % (vol/vol) seulement, dans des flacons antibiotique de 60 ml contenant 20 ml de milieu de Widdel, sous atmosphère N₂-CO₂ / 80 - 20 %, de façon à diluer au maximum l'inoculum. On a pu de cette façon quantifier les sulfures produits, par la méthode colorimétrique décrite par Cord-Ruwisch (1985) et sans interférence de couleur. Dans tout les cas, le pH n'est pas contrôlé et la température est de 35 °C. Le but de cette étude était d'étudier l'effet du sulfate sur le métabolisme du 1,3-propanediol par la culture mixte indéfinie.

2.1. Première technique d'incubation

En l'absence de sulfate (Fig. 4.5a), le 1,3-propanediol est fermenté en propionate et acétate avec un rapport acétate / propionate de 0,5, et en méthane. Pendant cette fermentation, aucun intermédiaire ne s'accumule. En présence de sulfate (Fig. 4.5b), l'acide en C₃ produit est le 3-hydroxypropionate; la production d'acétate est toujours observée. Les dégradations du 1,3-propanediol et du 3-hydroxypropionate sont couplées à la consommation de sulfate, suggérant ainsi une activité sulfatoréductrice sur ces substrats.

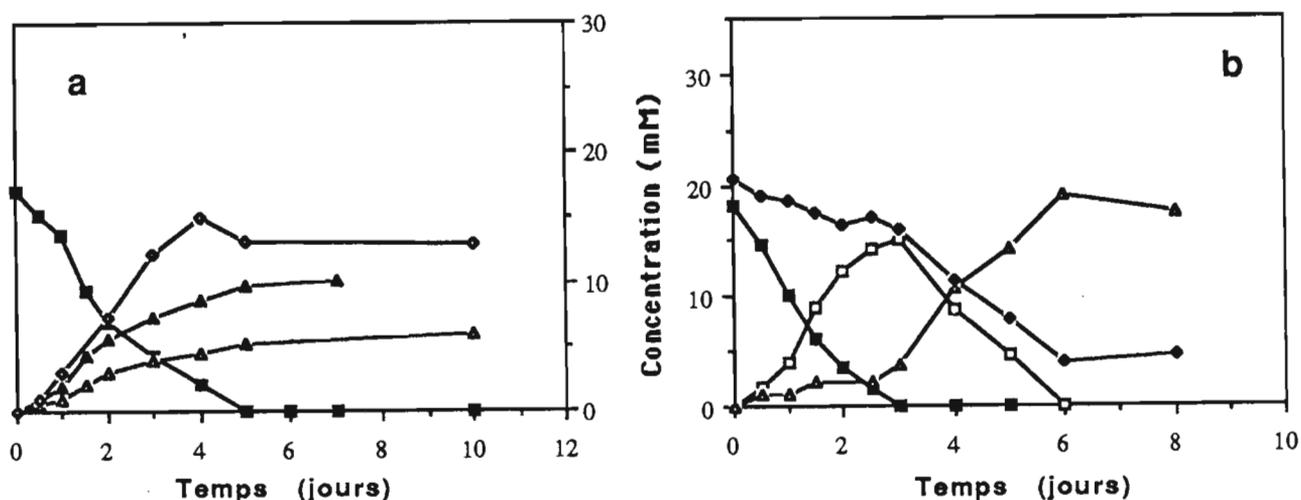


Fig. 4.5 Cinétique de dégradation anaérobie du 1,3-propanediol par la culture mixte indéfinie en l'absence de sulfate (a) et en présence de sulfate (b). La phase gazeuse est constituée de 100% N₂, tampon phosphate, pH non régulé et l'inoculum est de 40 à 50%. Légendes : ■, 1,3-propanediol; □, 3-hydroxypropionate; △, acétate; ▲, propionate; ◆, sulfate et ◇, méthane.

2.2. Deuxième technique d'incubation

En l'absence de sulfate, le 1,3-propanediol est dégradé en propionate, acétate et méthane. (Fig.4.6a) Par contre, en présence de sulfate, le 1,3-propanediol est oxydé essentiellement en 3-hydroxypropionate, puis cet intermédiaire est oxydé en acétate (Fig. 4.6b). La production de sulfure est couplée à la fois à la dégradation du 1,3-propanediol et du 3-hydroxypropionate. Le profil de dégradation du 1,3-propanediol en l'absence ou présence de sulfate, est exactement le même quelque soit le milieu et la technique d'incubation utilisés. Seuls les temps de disparition du 1,3-propanediol sont plus longs; cela est probablement dû à la taille de l'inoculum et à la nature du milieu utilisé. Dans les deux cas, la présence de sulfate entraîne l'inhibition complète de la production de propionate et de méthane et la déviation du métabolisme vers la production de 3-hydroxypropionate.

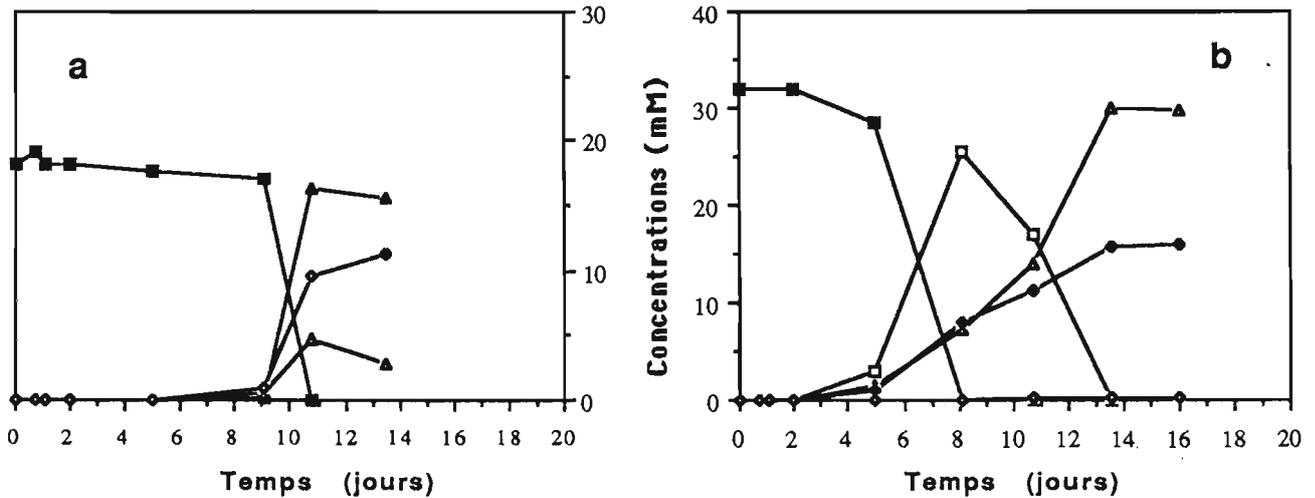


Fig. 4.6 Cinétique de dégradation anaérobie du 1,3-propanediol par la culture mixte indéfinie en l'absence de sulfate (a) et en présence de sulfate (b). La phase gazeuse est constituée de N_2 - CO_2 / 80-20%, tampon bicarbonate, pH non régulé et l'inoculum est de 10%. Légendes : ■, 1,3-propanediol; □, 3-hydroxypropionate; △, acétate; ▲, propionate; ◆, sulfures et ◇, méthane.

2.3. Rôle de la sulfato-réduction et de la méthanogénèse dans la dégradation anaérobie du 1,3-propanediol

Pour connaître le niveau d'implication des bactéries sulfatoréductrices dans le métabolisme du 1,3-propanediol, des expériences d'inhibition sélective de la méthanogénèse et de la sulfatoréduction ont été réalisées (Tableau 4.1). Les inhibitions ont été obtenues, comme précédemment décrit (chapitre 3-1).

Quand le chloroforme est présent, la méthanogénèse est complètement inhibée et provoque une accumulation d'hydrogène. Par contre l'hydrogène est consommé quand on ajoute le sulfate. Ceci suggère qu'en l'absence de sulfate, la dégradation du 1,3-propanediol par la culture mixte utilisée dans nos expériences, fait intervenir l'hydrogène comme intermédiaire, et par conséquent la dégradation du 1,3-propanediol nécessite un accepteur terminal d'électrons.

La quantité de 1,3-propanediol consommée est plus importante en présence de sulfate (Tableau 4.1). De plus, la présence de l'acétate ou du propionate ne gêne en rien la dégradation du 1,3-propanediol, qui est cependant incomplète en présence ou en l'absence de sulfate.

Table 4.1 Effets de l'inhibition de la méthanogénèse, de la sulfatoréduction et l'addition des acides sur la dégradation anaérobie du 1,3-propanediol par une culture mixte indéfinie. L' incubation est effectuée à 35°C pendant 4 semaines.

Substrats	Concentrations(mM)									
	Initiales				Finales					
	1,3-OH	propionate	acétate	sulfate	1,3-OH	propionate	acétate	sulfate	Méthane	Hydrogène
1,3-OH	17,7	0	0	0	11	0,3	0	0	6,4	0
1,3-OH + sul	20,6	0	0	16,3	10,3	0,1	0	11,6	9,2	0
1,3-OH + chl	18,4	0	0	0	12,4	0,3	0,7	0	0	0,9
1,3-OH + sul + chl	18,6	0	0	15,9	9,2	0,2	0,3	6,7	0	0
1,3-OH + C3	17,2	17,3	0	0	6,6	9,1	0	0	25,5	0
1,3-OH + C3 + sul	17,1	17,9	0	15,5	5	0,3	0,8	0,6	30,4	0
1,3-OH + C3 + chl	15	18,6	0	0	9,6	20	0,8	0	0	0,7
1,3-OH +C3 +sul+chl	17,9	15,5	0	15,7	10,2	12,3	7,6	1,7	0	0
1,3-OH + C2	17,6	0	17,6	0	16	0,5	0	0	22,5	0
1,3-OH + C2 + sul	14,1	0	17,8	15,8	9,2	0,2	0	9,2	27,3	0
1,3-OH + C2 + chl	17,3	0	15,2	0	11,2	0,1	18,8	0	0	0,8
1,3-OH +C2 +sul +chl	16,8	0	19,1	15,8	7,6	2,6	20,4	6	0	0

Symboles : 1,3-OH, 1,3-propanediol; C2, acétate; C3, propionate; sul, sulfate; chl, chloroforme.

Il est à noter que le profil de dégradation du 1,3-propanediol est variable d'un essai à un autre; ceci est probablement dû à la composition de la culture bactérienne mixte utilisée.

3. DENOMBREMENT DES GROUPES BACTERIENS IMPLIQUES DANS LE METABOLISME DU GLYCEROL ET DU 1,3 - PROPANEDIOL

Les résultats présentés dans le Tableau 4.2 permettent de tirer les conclusions suivantes:

Substrats	Bactéries viables / ml	Métabolites
-Sulfate		
Glycérol	$2,5 \times 10^9$	Propionate + Acétate + Méthane
1,3-Propanediol	$4,0 \times 10^7$	Propionate + Acétate + Méthane
+Sulfate		
Glycérol	$1,4 \times 10^9$	Acétate + Sulfure *
1,3-Propanediol	$2,5 \times 10^7$	Acétate + Sulfure *
Microflore totale	10^{10}	nd

*, des traces de propionate sont également produites; nd, non déterminé.

Tableau 4.2 Dénombrement de bactéries impliquées dans la fermentation du glycérol et du 1,3-propanediol par la culture mixte indéfinie.

1) Le nombre de bactéries sulfatoréductrices dégradant le glycérol est légèrement inférieur à celui des bactéries fermentatives. L'examen microscopique des derniers tubes positifs des numérations révèle la présence de bactéries appartenant au genre *Propionibacterium*, la présence de vibrios mobiles appartenant au genre *Desulfovibrio*, et des bactéries méthanogènes immobiles appartenant au genre *Methanobacterium*.

2) Les sulfatoréducteurs jouent un rôle important dans la dégradation du 1,3-propanediol. Leur concentration est en effet, du même ordre de grandeur que celle des autres organismes utilisant le 1,3-propanediol. L'examen microscopique révèle la présence de vibrios mobiles, des petits bâtonnets courts immobiles avec des extrémités arrondies appartenant au genre *Pelobacter*, et des bactéries méthanogènes immobiles appartenant au genre *Methanobacterium*. Dans les chapitre 4-3 et 4-5, il sera démontré que certaines bactéries sulfatoréductrices appartenant au genre *Desulfovibrio*, peuvent être impliquées dans la dégradation du 1,3-propanediol par transfert interspécifique d'hydrogène, en association syntrophique avec une bactérie méthanogène hydrogénotrophe, en l'absence de sulfate.

3) L'analyse qualitative de la phase liquide des derniers tubes positifs des dénombrements des bactéries sulfatoréductrices sur glycérol et 1,3-propanediol, a montré l'accumulation d'acétate, de sulfures et de traces de propionate (Tableau 4.2). L'examen microscopique a révélé la prépondérance de formes caractéristiques du genre *Desulfovibrio*. Quatre souches de morphologie identique ont été isolées des derniers tubes positifs de la numération des sulfatoréducteurs sur 1,3-propanediol; elles présentent également la même physiologie. L'une de ces souches, la souche SPSN a été purifiée et caractérisée (chapitre 4-2).

Trois autres souches de morphologie identique ont été isolées des derniers tubes positifs de la numération des sulfatoréducteurs sur glycérol; elles sont physiologiquement identiques. Aucune de ces souches n'a été caractérisée.

Il faut cependant noter qu' aucune bactérie fermentive utilisant le glycérol ou le 1,3-propanediol n'a pu être isolée des derniers tubes positifs. Ces résultats montrent la prédominance des espèces du genre *Desulfovibrio* sur glycérol et 1,3-propanediol en présence de sulfate. Le rapport carbone /soufre utilisé pour les dénombrements des bactéries sulfatoréductrices était de 1,1, ce rapport pouvant influencer le profil de fermentation du glycérol.

4. DISCUSSION

Dans cette étude il a été démontré que la dégradation du glycérol par la culture mixte indéfinie étudiée, est caractérisée par la formation transitoire de 1,3-propanediol suivie de la production de propionate et d'acétate. Ni le lactate (Laroche, 1983), ni l'éthanol et le butyrate (Forsberg, 1987), ni l'acroléine (Rentschler et Tanner, 1951; Serjak *et al.*, 1954; Wilharm et Holz, 1951), ni le succinate ou le pyruvate n'ont été décelés comme produits de dégradation du glycérol. Il

a été également démontré que la voie métabolique de cette dégradation dépend de la quantité de sulfate disponible :

en l'absence de sulfate, ou lorsque le rapport C/S = 6,1 , la quantité de 1,3-propanediol produite à partir du glycérol, représente approximativement, 38 % de ce dernier. Par contre, lorsque le rapport diminue (C/S = 2,1), le 1,3-propanediol ne représente plus que 8 % du glycérol consommé. Ce pourcentage est réduit à 0 %, dans les derniers tubes positifs de numérations. Le rapport C/S utilisé pour le dénombrement des bactéries sulfatoréductrices est voisin de 1. En outre, dans les expériences réalisées avec le glycérol en l'absence et en présence de sulfate, avec un rapport carbone / soufre de 2,1 , les quantités de produits (exprimées en pourcent de glycérol consommé) (Tableau 4.3), sont du même ordre de grandeur que celles rapportées pour *Desulfovibrio carbinolicus* sur glycérol en culture pure, en l'absence ou en présence de sulfate (Nanninga et Gottschal, 1986).

Essai	Produits (mmol % glycérol dégradé)		
	1,3-propanediol	sulfures	% retrouvé
Glycérol	45,0	0,0	45,0
Glycérol + sulfate	8,8	10,7*	8,8

*, Les sulfures sont quantifiés par une méthode de dosage indirecte (voir annexes).

Tableau 4.3 Balance carbonée de la fermentation du glycérol par la culture mixte indéfinie en l'absence et en présence de sulfate (C/S = 2,1).

La production de 1,3-propanediol à partir de la dégradation anaérobie du glycérol, est l'un des moyens permettant à de nombreuses bactéries de résoudre le problème d'excès d'électrons. Elle a été observée chez des bactéries anaérobies non sulfatoréductrices en culture pure telles que *Clostridium pasteurianum* (Nakas *et al.*, 1983), *Clostridium* sp. (Forsberg, 1987), *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus buchneri* (Schutz *et al.*, 1984), ou aérobies telles que *Klebsiella pneumoniae* (Forage *et al.*, 1982); cependant l'efficacité de conversion du glycérol est variable : *C.pasteurianum* convertit le glycérol en 1,3-propanediol avec une efficacité de 15% environ ; *Citrobacter freundii* (Mickelson *et al.*, 1940) et *Klebsiella aerogenes* (Thimann *et al.*, 1955) convertissent le glycérol en 1,3-propanediol avec une efficacité de 60% et 40% respectivement. Contrairement à ces bactéries, les espèces *L.brevis* et *L. buchneri* sont incapables d'utiliser le

glycérol comme source d'énergie et de carbone pour leur croissance, mais elles peuvent le convertir en 1,3-propanediol avec une efficacité de 80% en présence de glucose comme source de carbone. *Clostridium butilycum* (Forsberg, 1987) convertit le glycérol en 1,3-propanediol avec une efficacité de 61% à pH 6,5; aux plus bas pH, cette efficacité diminue considérablement. D'autre part, bien que le produit majeur de la fermentation du glycérol soit l'acétate chez les bactéries homoacétogènes telles que *Acetobacterium* sp. (Emde et Schink, 1987), le 1,3-propanediol constitue chez ces bactéries 10 à 20% des produits totaux de la fermentation lorsque le pH est fixé à 7,2.

Donc l'effet du sulfate sur la dégradation du glycérol par la culture mixte se traduit d'une part, par l'orientation de ce métabolisme vers la production probable de 3-hydroxypropionate, qui peut être converti en acétate, consommé essentiellement par les bactéries méthanogènes dans notre écosystème (chapitre 3-1). Ceci est important dans la mesure où la présence de sulfate limite la production de 1,3-propanediol; ce produit réduit constitue une étape limitante de la digestion anaérobie des déchets vinicoles dans la mesure où il est dégradé par syntrophie.

Cependant, la comparaison entre nos données et celles de la littérature restent difficiles (conditions de culture et environnements différents...); par conséquent, nous ne pouvons pas en tirer de conclusions définitives. Néanmoins, nos résultats sont comparables à ceux rapportés pour *D. carbinolicus* qui oxyde le glycérol en 3-hydroxypropionate en présence de sulfate (chapitre 4-6). Cette espèce est également capable de le dismuter en 1,3-propanediol et 3-hydroxypropionate en l'absence de sulfate (Nanninga et Gottschal, 1986). Le même phénomène de dismutation a été observé chez *D. fructosovorans* (Ollivier *et al.*, 1988).

La production de sulfures qui accompagne la dégradation du 1,3-propanediol d'une part, et la production de 3-hydroxypropionate à partir du 1,3-propanediol en présence de sulfate d'autre part, suggèrent une activité sulfatoréductrice sur ce substrat et donc, l'implication possible de ces bactéries dans ce métabolisme. La production de 3-hydroxypropionate à partir du 1,3-propanediol a été observée chez *D. carbinolicus* et chez *D. fructosovorans* en culture pure, en présence de sulfate (Nanninga et Gottschal, 1987; chapitres 4-2; 4-5). Le sulfate oriente donc non seulement le métabolisme du 1,3-propanediol vers la production de produits facilement dégradables tels que le 3-hydroxypropionate et l'acétate, mais accélère également sa dégradation.

En conclusion, nos résultats montrent que l'implication directe des bactéries sulfatoréductrices dans le métabolisme du glycérol et du 1,3-propanediol dans l'écosystème méthanogène étudié, est possible. Le degré de cette implication dépend de la quantité de sulfate disponible dans le milieu.

Outre l'utilisation du sulfate comme accepteur terminal d'électrons par ces bactéries, composé qui leur offre un moyen efficace pour résoudre le problème d'excès d'électrons de ces substrats réduits, cette implication peut également s'expliquer par l'origine de la culture mixte qui provient d'une lagune recevant des eaux résiduaires de distillerie contenant du glycérol et du sulfate. Il est possible qu'au cours du temps, une sélection de bactéries sulfatoréductrices particulièrement performantes sur ces substrats soit intervenue.

On pourrait penser que le lactate, qui est également présent dans cette eau résiduaire, pourrait être utilisé préférentiellement par rapport au glycérol, mais nos dénombrements sur chacun de ces substrats ont montré que les sulfatoréducteurs utilisant le glycérol sont plus nombreux que ceux qui utilisent le lactate. De plus, l'examen microscopique des derniers tubes positifs des numérations avec lactate en présence de sulfate, ou glycérol en présence de sulfate, a révélé la présence exclusive de deux morphotypes appartenant à deux espèces complètement différentes, aussi bien sur le plan morphologique que nutritionnel (chapitres 3-2 et 4-2). Il sera également montré plus loin le rôle activateur du lactate dans la dégradation du glycérol par les espèces du genre *Desulfovibrio*, en culture pure (chapitre 4-6).

Cependant il est difficile, lorsqu'on travaille avec des cultures mixtes indéfinies, de tirer des conclusions définitives; à ce stade de notre travail, il manque en outre, des données cinétiques sur la sulfatoréduction ou la méthanogénèse pour comprendre le rôle réel et les implications écologiques de ces bactéries sulfatoréductrices dans notre culture mixte indéfinie qui utilise ces substrats. Ceci constitue la suite même de ce travail.

Chapitre 4-2

Isolement et caractérisation d'une nouvelle espèce de bactérie sulfatoréductrice, *Desulfovibrio alcoholovorans* sp. nov., souche SP1SN, dominante sur 1,3-propanediol

1. ISOLEMENT DE LA SOUCHE SPSN

La purification de la souche SPSN a été réalisée à partir du dernier tube positif de dénombrements des bactéries sulfatoréductrices utilisatrices de 1,3-propanediol comme seule source d'énergie et de carbone, en utilisant la méthode de dilution en gélose profonde. Après une période d'incubation d'une semaine, les colonies sélectionnées se sont révélées capables d'utiliser ce substrat. Il est oxydé en acétate et vraisemblablement en CO_2 .

2. MORPHOLOGIE CELLULAIRE

Lorsque la souche SPSN croît sur 1,3-propanediol en présence de sulfate, les cellules se présentent sous la forme de vibrios de grande taille, de $0,7 - 0,9 \mu\text{m}$ de diamètre et $2,8 - 3,2 \mu\text{m}$ de long (Photo 4.1); elles sont isolées ou en paires et deviennent spirilloïdes dans les cultures âgées. Par contre, sur un mélange glycérol + Lactate, en présence de sulfate, les cellules s'allongent et deviennent filamenteuses avec des extrémités arrondies; elles ont une taille de $0,5 - 0,7 \mu\text{m}$ de diamètre et $12 - 16,4 \mu\text{m}$ de long (Photo4.2). L'examen en microscopie électronique de la souche SPSN cultivée sur 1,3-propanediol en présence de sulfate révèle la présence d'un seul flagelle polaire (Photo 4.3). Les cellules sont Gram négatif, et ne produisent pas de spores.

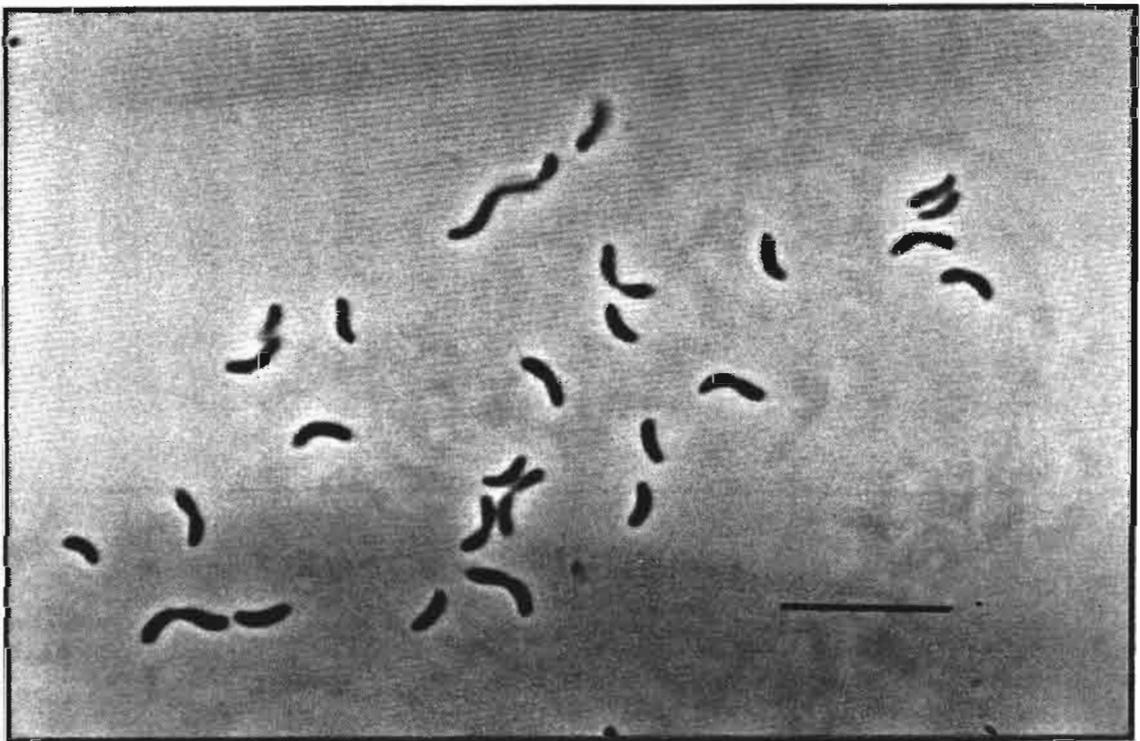


Photo.4.1 Microscopie optique à contraste de phase de la souche SPSN en milieu 1,3-propanediol + sulfate. Barre, $10 \mu\text{m}$.

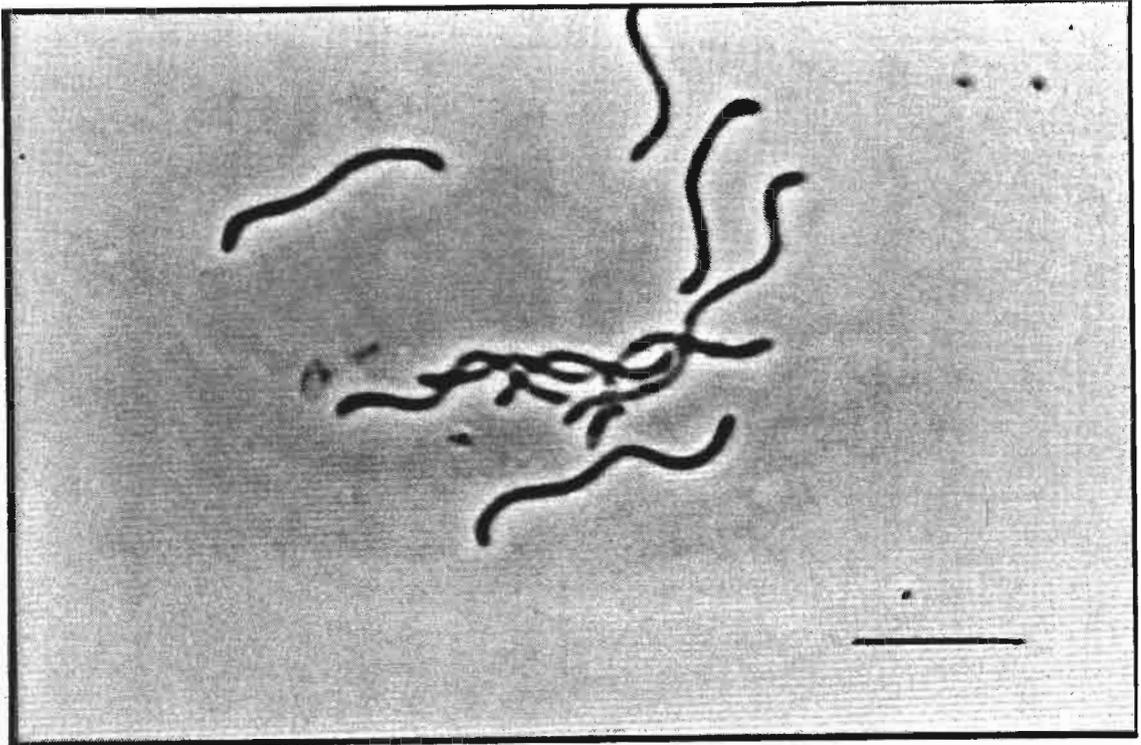


Photo.4.2 Microscopie optique à contraste de phase de la souche SPSN en milieu glycérol + lactate + sulfate. Barre, 10 μm .

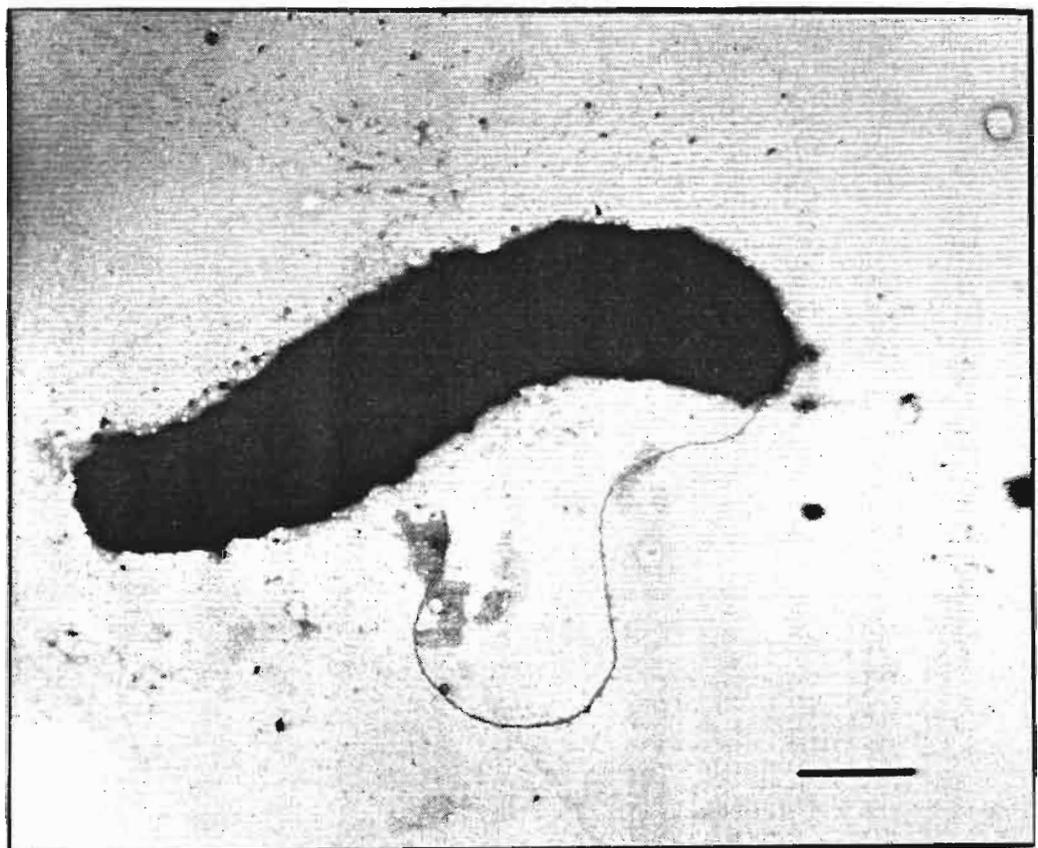


Photo.4.3 Microscopie électronique de la souche SPSN en milieu 1,3-propanediol + sulfate. Noter le flagelle polaire. Barre, 1 μm .

3. ETUDE PHYSIOLOGIQUE

3.1. Effet de la température sur la croissance

En testant différentes températures, nous avons pu établir que l'optimum de température pour la croissance de la souche SPSN sur 1,3-propanediol se situe entre 35 et 37 °C, à un pH de 7,2 (Fig.4.7). A 42 °C, on observe encore une légère croissance tandis qu' à 45°C la souche ne se developpe plus. La température minimale de croissance est légèrement au dessous de 20°C.

3.2. Effet du pH sur la croissance

La croissance de la souche SPSN a été testée à différents pH à 35°C sur 1,3-propanediol comme seule source d'énergie et de carbone , en présence de sulfate (Fig.4.8). La croissance est observée entre pH 5,5 et 8,5. Le pH optimum de croissance est 7,0.

3.3. Effet de la concentration en NaCl sur la croissance

La croissance de la souche SPSN a été observée dans une gamme de concentrations en NaCl allant de 0 à 20 g / l avec un optimum entre 5 et 10 g/l. La croissance est inhibée à environ 20 g / l. Comme le montre la même figure, la croissance se produit en l'absence de NaCl (Fig. 4.9).

3.4. Etude nutritionnelle

La croissance de la souche SPSN ne nécessite aucun besoin nutritionnel particulier : ni les vitamines ni l' extrait de levure ne sont nécessaires à son développement.

Cette bactérie est également capable d'utiliser l'azote atmosphérique comme seule source d'azote.

3.4.1. Donneurs d'électrons

Les études nutritionnelles ont été effectuées à 35°C et à un pH de 7,2.

Parmi les composés organiques testés, la souche SPSN utilise un spectre assez large d'alcools, de diols et d'acides organiques.

Les substrats utilisés par la souche SPSN, sont reportés dans le Tableau 4.4.

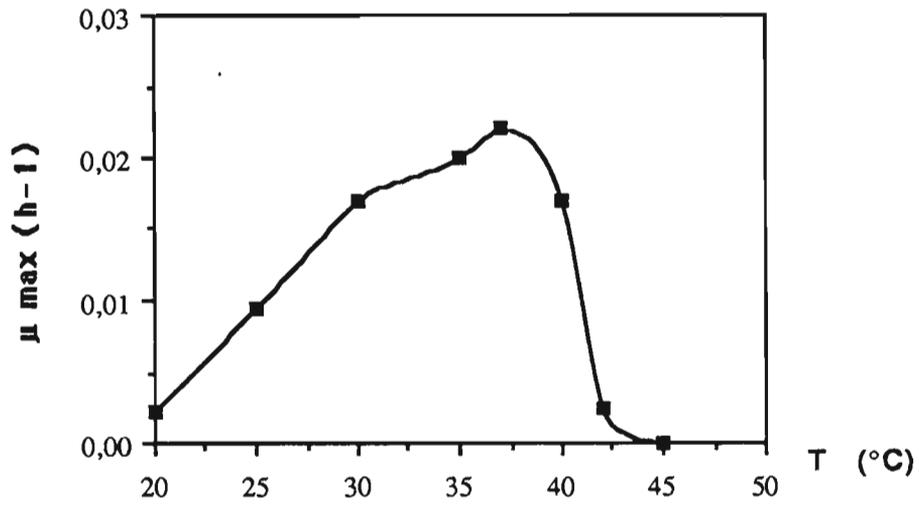


Fig.4.7. Effet de la température sur la croissance de la souche SPSN .

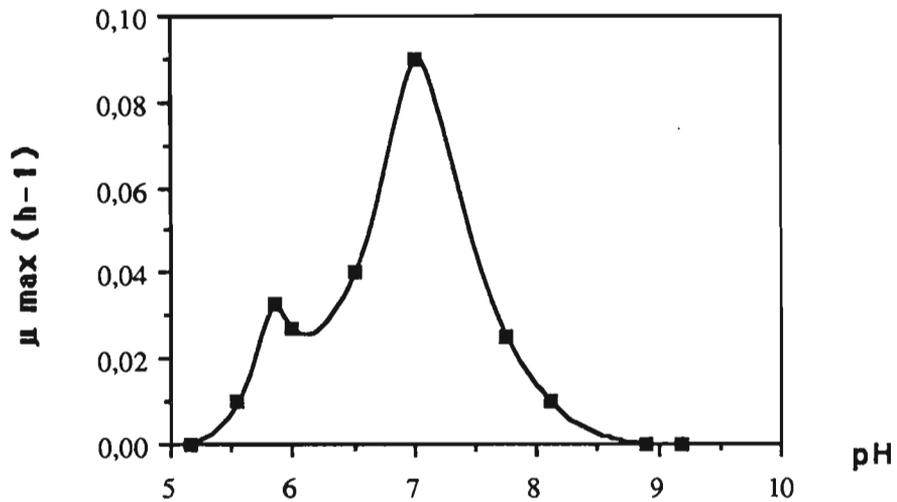


Fig.4.8. Effet du pH sur la croissance de la souche SPSN .

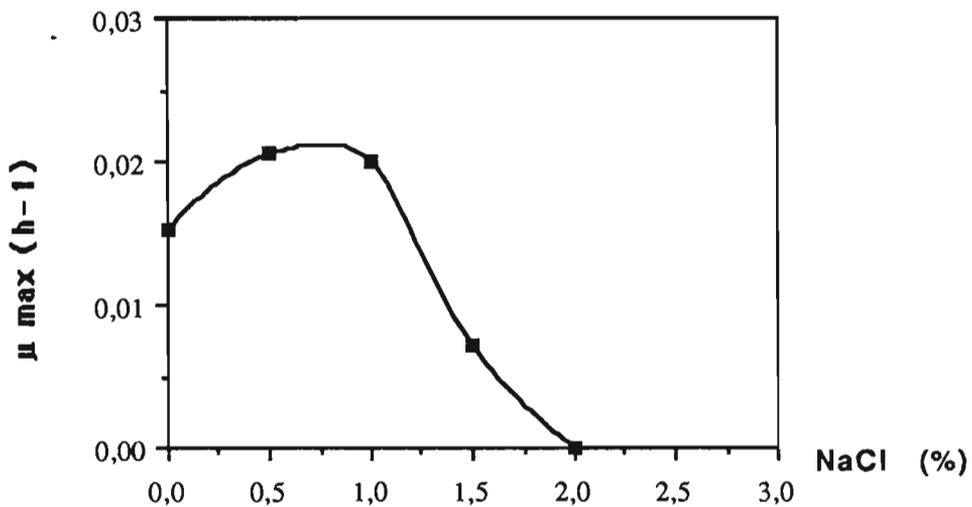


Fig.4.9. Effet de la salinité sur la croissance de la souche SPSN .

Substrates (mM)	DO 580 nm	Volatile fatty acids produced
Glycérol (10)	0,26	Acétate
DHA (10)	0,32	acetate
1,3-propanediol (10)	0,28	Acétate
1,2-propanediol (10)	0,2	Acétate + Propionate
1,4-butanediol (10)	0,16	Succinate
Pentanol-1 (10)	0,14	Valérate
Propanol-1 (10)	0,14	Propionate
Butanol-1 (10)	0,17	Butyrate
Ethanol (10)	0,17	Acétate
Methanol (10)	0,08	CO ₂
Ethylène glycol (10)	0,09	Acétate
Formate (10)	0,07	CO ₂
H ₂ + CO ₂ (3 bars)	0,15	nd
Lactate (10)	0,32	Acétate
Pyruvate (10)	0,26	Acétate
Fumarate (10)	0,35	Acétate
Succinate (10)	0,2	Acétate
Malate (10)	0,28	Acétate
Témoin	0,03	nd

nd, non déterminé.

Le milieu de culture contient 15 mM de sulfate; H₂, formate et méthanol ont été testés en présence de 5 mM d'acétate. Les substrats testés mais non utilisés par la souche (concentrations en mM) : 2,3-butanediol (10); butanol-2 (10); propanol-2 (10); cellobiose (10); glucose (10); fructose (10) inositol (10); saccharose (10); xylose (10); mannose (10); lysine (10); tyrosine (10); arginine (10); phenylalanine (10); tryptophan (10); ornithine (10); alanine (10); oxamate (10); oxalate (10); choline (10); mannitol (10) et ribose (10). La croissance bactérienne a été également estimée par la mesure des sulfures après une période d'incubation de 3 semaines.

Tableau 4.4 Utilisation des différents substrats par la souche SPSN en présence de sulfate

Aucune croissance n'a été observée avec les sucres, les acides aminés, ou les acides gras saturés.

L'utilisation de l'hydrogène moléculaire, du formate et du méthanol requiert de l'acétate comme source de carbone. La croissance sur ces substrats est faible. Par contre, des croissances satisfaisantes ont été obtenues sur glycérol, éthylèneglycol, Dihydroxyacétone, 1,3-propanediol, éthanol, pyruvate, fumarate, succinate, malate et lactate en présence de sulfate. Tous ces substrats sont oxydés par la souche SPSN en acétate et vraisemblablement en gaz carbonique. Le 1,2-propanediol est oxydé en un mélange d'acétate et propionate; le propanol-1, butanol-1 et pentanol-1 sont oxydés respectivement en propionate, butyrate et valérate. Le formate et le méthanol sont oxydés en gaz carbonique. L'un des produits de dégradation du 1,4-butanediol est le succinate.

Le fumarate, le malate et le pyruvate sont fermentés. Le fumarate et le malate sont fermentés en succinate et acétate; le pyruvate est fermenté principalement en acétate (Tableau 4.5).

Substrats ^a	DO 580 nm	Produits de fermentations
Fumarate (10)	0,24	Succinate + Acétate
Malate (10)	0,15	Succinate + Acétate
Pyruvate (10)	0,15	Acétate

a, les chiffres entre parenthèses représentent les concentrations en mM.

Tableau 4.5 Fermentation des différents substrats par la souche SPSN en l'absence de sulfate.

3.4.2. Accepteurs d'électrons

Les essais des accepteurs d'électrons ont été réalisés avec le lactate ou le 1,3-propanediol comme donneurs d'électrons (substrats non fermentescibles par la souche SPSN). La souche SPSN est capable d'utiliser comme accepteur d'électrons le sulfate, le sulfite, le thiosulfate ou le soufre élémentaire. Le nitrate n'est pas réduit. Le fumarate est plutôt fermenté (Tableau 4.6).

Accepteurs ^a	1,3-propanediol ^b	Lactate ^b
	DO 580 nm	DO 580 nm
Sulfate (15)	0, 28	0, 32
Sulfite (5)	0, 20	0, 25
Thiosulfate (5)	0, 18	0, 22
Soufre (en excès)	0, 13	0, 18
Nitrate (5)	0, 03	0, 04
Fumarate (15) ^c	0, 16	0, 15
Témoin	0, 03	0, 04

a, les chiffres entre parenthèses représentent les concentrations en mM; **b**, les donneurs d'électrons ont été utilisés à 10 mM ; **c**, le fumarate est plutôt fermenté.

Tableau 4.6 Différents accepteurs d'électrons testés.

4. ETUDE BIOCHIMIQUE

4.1. Pigments

Quand l'extrait soluble de la souche SPSN est réduit à l'aide du dithionite de sodium, il montre des bandes d'absorption caractéristiques du cytochrome c_3 , avec des absorptions maximums à 418, 523 et 552 nm.

L'extrait oxydé montre le pic de Sauret à 408 nm. L'ascorbate de sodium est incapable de modifier le spectre oxydé (Fig.4.10). Ceci indique que le cytochrome présent possède des centres d'oxydo-réduction de bas potentiel.

De plus, le spectre montre une bande d'absorption à 628 nm caractéristique de la présence de désulfovirdine (Lee et Peck, 1971). Ceci est confirmé par le test positif de fluorescence de la désulfovirdine (Postgate , 1959).

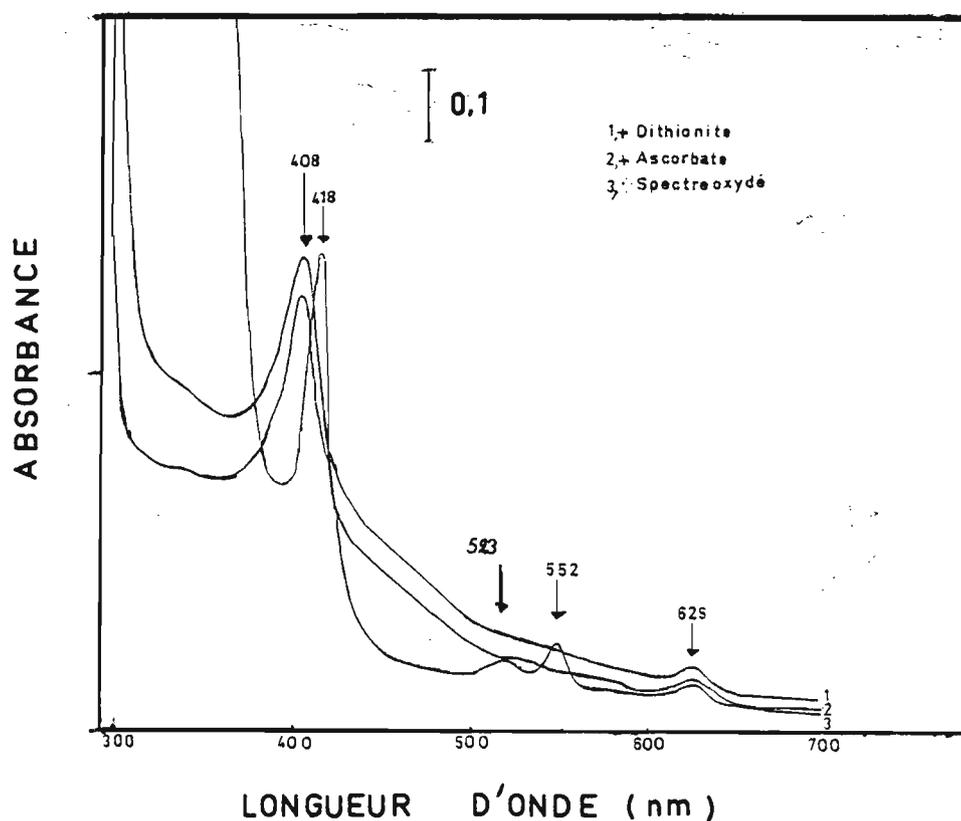


Fig. 4.10 Différence entre spectres réduit et oxydé des extraits cellulaires de la souche SPSN, ayant poussé en milieu 1,3-propanediol (15 mM) + sulfate (10 mM).

4.2. Composition en bases de l'ADN

La composition en base G + C % de l'ADN de la souche SPSN est $64 \pm 0,3$ mol % ; cette valeur représente la moyenne de trois déterminations, en prenant comme référence la composition en G + C (49,858% mol) de l'ADN du virus LAMBDA).

5. DISCUSSION

La souche SPSN est un bâtonnet incurvé, capable de réduire le sulfate, et ne forme pas de spores. Cette bactérie réalise une oxydation incomplète du pyruvate et du lactate en acétate et gaz carbonique. Elle n'oxyde pas l'acétate, le propionate ou le butyrate.

Sur la base de ces caractéristiques, la souche SPSN peut être classée dans le genre *Desulfovibrio* (Pfennig *et al.*, 1981). Comme les autres espèces du même genre, la souche SPSN montre des bandes d'absorption caractéristiques du cytochrome c_3 ainsi que la désulfovirdine

(Postgate, 1956; Widdel et Pfennig, 1984). Notre souche n'appartient pas à l'espèce *Desulfovibrio sapovorans* puisqu'elle n'utilise pas les acides gras saturés. Sur les plans morphologique et physiologique, les caractéristiques de la souche SPSN sont similaires à celles des espèces *Desulfovibrio desulfuricans* et *Desulfovibrio vulgaris* (Widdel et Pfennig, 1984) ou aux espèces nouvellement décrites : *Desulfovibrio fructosovorans* (Ollivier *et al.*, 1988) et *Desulfovibrio carbinolicus* (Nanninga et Gottschal, 1986; 1987). La souche SPSN diffère de *D. desulfuricans* par le fait qu'elle est capable d'oxyder le glycérol et incapable d'utiliser la choline. Elle diffère de *D. vulgaris* par ses capacités à faire fermenter le fumarate et le malate. Le Tableau 4.7 illustre quelques caractéristiques montrant clairement la différence entre notre souche et les espèces *D. fructosovorans* et *D. carbinolicus*. La principale différence entre la souche SPSN et *D. fructosovorans* est que le deuxième organisme est capable d'utiliser le fructose (Cord-Ruwisch *et al.*, 1986; Ollivier *et al.*, 1988). De plus, en présence de sulfate, la souche SPSN diffère de *D. fructosovorans* par le fait qu'elle oxyde le succinate et convertit respectivement le 1,2-propanediol et le 1,3-propanediol en acétate + propionate et acétate, et qu'elle est incapable d'utiliser le fumarate comme accepteur terminal d'électrons. Notre souche est incapable de dismuter le glycérol et de faire fermenter l'éthylène glycol, en l'absence de sulfate. En plus de ces différences, quand la souche SPSN utilise le glycérol en l'absence de sulfate et en présence de *Methanospirillum hungatei* comme accepteur d'hydrogène, elle réalise un transfert interspécifique d'hydrogène complet (chapitre 4-5). Par contre dans les mêmes conditions, *D. fructosovorans* n'effectue qu'un transfert incomplet (chapitre 4-6). Comparée à *D. carbinolicus* en présence de sulfate, la souche SPSN convertit le glycérol et le 1,3-propanediol en acétate, et elle utilise le 1,2-propanediol comme source d'énergie et de carbone. Le glycérol n'est pas dismuté; l'éthylène glycol n'est pas fermenté et les cellules sont mobiles quelque soient les conditions de culture. Il est intéressant de remarquer que *D. fructosovorans* et *D. carbinolicus* fermentent l'éthylène glycol en acétate, éthanol et H₂ sans croissance bactérienne. Du fait que l'éthylène glycol est en général converti par une déshydratase en acétaldéhyde, ceci indique qu'il n'y a pas de phosphorylation liée à la conversion de l'acétaldéhyde en acétate chez les espèces du genre *Desulfovibrio* (Kremer *et al.*, 1988).

En conclusion, ces nombreuses différences semblent justifier la classification de la souche SPSN comme une espèce nouvelle et le nom de *Desulfovibrio alcoholovorans* sp. nov. (DSM 5433) est proposé.

Propriétés	Souche SPSN		<i>D.fructosovorans</i>		<i>D.carbinolicus</i>	
	Croissance	Produits	Croissance	Produits	Croissance	Produits
Donneurs d'électrons						
1,2-Propanediol	+	C ₂	-	nd	-	nd
1,3-Propanediol	+	C ₂	+	3-OHC3	+	3-OHC3
1,4-Butanediol	+	Succinate	+	Succinate	+	Succinate
Ethylèneglycol	(+)	C ₂	+ ^a	C ₂	+ ^a	C ₂
DHA	+	C ₂	+	C ₂	+	C ₂
Succinate	+	C ₂	-	nd	+	C ₂
Fructose	-	nd	+	C ₂	-	nd
Accepteurs d'électrons						
Fumarate	-			+		-
Mobilité	+			+		-
Tailles des cellules						
Longueur (µm)	2,8 - 3,2		2,0 - 4,0 ^b		1,5 - 5,0 ^c	
Diamètre (µm)	0,7 - 0,9		0,5 - 0,7 ^b		0,6 - 1,1 ^c	
GC mole %	64 ± 0,3		64,13		65 ± 1,0	

C₂, acétate; 3-OHC3, 3-hydroxypropionate; nd, non déterminé; (+), utilisation sans croissance bactérienne. a, En l'absence de sulfate, *D.fructosovorans* et *D.carbinolicus* font fermenter l'éthylèneglycol en acétate, éthanol et H₂, sans croissance bactérienne; b, d'après Ollivier *et al.* (1988); c, d'après Nanninga et Gottschal (1987).

Tableau 4.7 Comparaisons de quelques propriétés physiologiques et morphologiques de la souche SPSN, *D.fructosovotans* et *D.carbinolicus*.

Chapitre 4-3

Implication des bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* dans l'oxydation du 1,3-propanediol par transfert interspécifique d'hydrogène dans les milieux pauvres en sulfate

1. ENRICHISSEMENT

L'inoculum qui a servi à l'enrichissement provient d'un fermenteur industriel traitant des déchets de distillerie de cannes à sucre (INRA, Guadeloupe-France). Cet enrichissement a été obtenu par repiquages successifs sur 1,3-propanediol comme seule source de carbone et d'énergie, en inoculant des flacons antibiotique de 60 ml, contenant 20 ml de milieu de Widdel sans sulfate et sous un mélange gazeux N_2-CO_2 / 80-20%, avec 10% (v/v) de boue issue directement du fermenteur. Plusieurs repiquages s'échelonnant sur plusieurs mois, ont été nécessaires pour obtenir un enrichissement métaboliquement stable. La croissance bactérienne a été contrôlée par le virage au jaune du bleu de méthylène, préalablement introduit dans le milieu de culture. La présence de cet indicateur permet la visualisation directe de l'acidification des milieux de culture. Avant chaque transfert, des analyses qualitatives ont montré que l'acétate, le propionate et le méthane s'accumulaient dans l'enrichissement. Des observations microscopiques de cet enrichissement n'ont révélé aucune présence de microorganisme ressemblant aux bactéries méthanogènes acétoclastes connues, mais la présence de trois morphotypes différents (photo 4.4) :

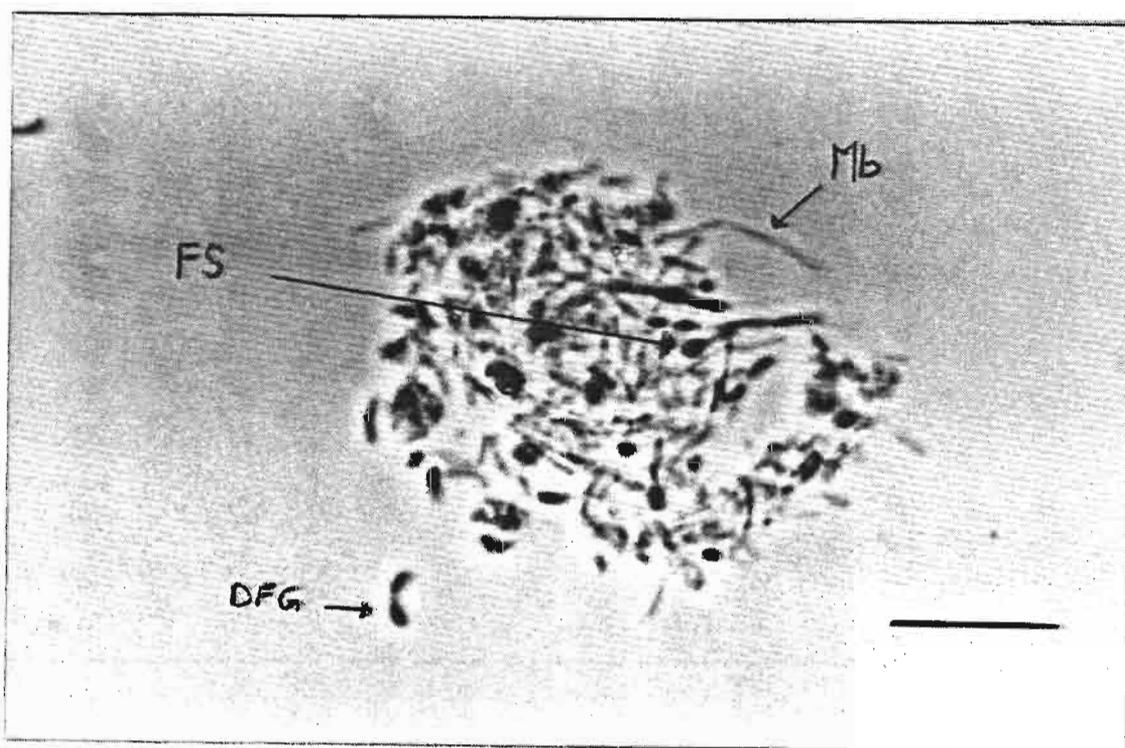


Photo.4.4. Microscopie optique à contraste de phase d'une culture d'enrichissement en milieu 1,3-propanediol. Barre, 10 μ m.

- *Une forme en fuseau sporulée, la souche FS, non encore identifiée,
- *Un bâtonnet de type vibrio très mobile, la souche DFG,
- *Un bâtonnet fluorescent à 420 nm, de type *Methanobacterium*.

2. EFFET DE L'ADDITION D'H₂ SUR LA CROISSANCE DE L'ENRICHISSEMENT

Pour confirmer le caractère syntrophique ou non de cette association bactérienne, un essai de croissance a été réalisé en l'absence ou présence d'hydrogène. L'effet de l'addition d'hydrogène a été étudié de la manière suivante : les tubes de Hungate inoculés (4 tubes) sont incubés à 35°C jusqu'à ce que la croissance soit en phase exponentielle (estimée par la mesure de la DO à 580 nm); dans deux de ces tubes, on ajoute un mélange de H₂-CO₂ / 80 - 20 % à 3 bars, les deux autres tubes constituent les témoins. Comme le montre la figure 4.11, la croissance bactérienne est ralentie.

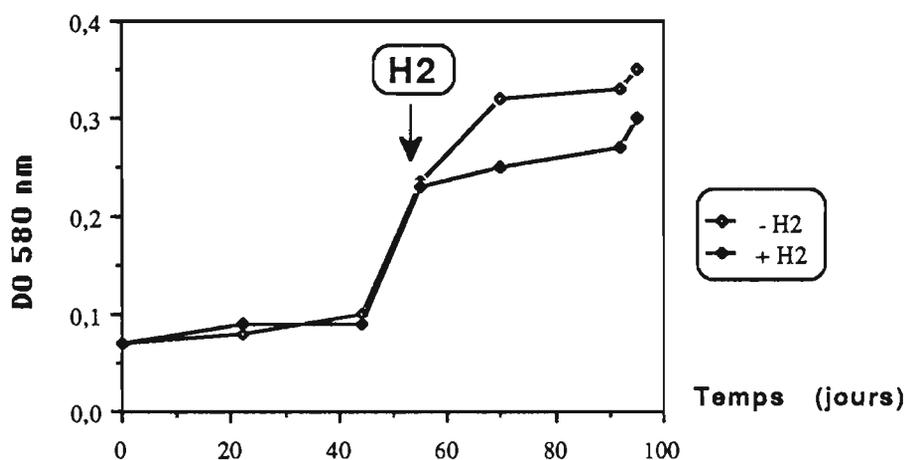


Fig. 4.11 Effet de l'addition de l'hydrogène sur la croissance de la culture d'enrichissement en milieu 1,3-propanediol sans sulfate.

3. EFFET DE L'ADDITION DE SULFATE SUR LE METABOLISME DU 1,3-PROPANEDIOL

L'addition de sulfate à la concentration de 20 mM à ce consortium, entraîne une inhibition de la production de propionate et de méthane, et une production intense de sulfure. La cinétique de dégradation du 1,3-propanediol en l'absence et en présence de sulfate a été étudiée pour cette culture. Comme le montre la Figure 4.12, en l'absence de sulfate, le 1,3-propanediol se dégrade partiellement en 3-hydroxypropionate (qui disparaît rapidement), en propionate, acétate (avec un rapport acétate/propionate de 0,6) et en méthane (Fig.4.12a). En présence de sulfate (Fig.4.12b), le

substrat disparaît dès le 2^{ème} jour, en donnant du 3-hydroxypropionate comme produit majeur et une petite quantité d'acétate. La production de 3-hydroxypropionate et d'acétate est couplée à la production de sulfure, indiquant ainsi que le sulfate est utilisé préférentiellement comme accepteur terminal d'électrons par rapport à la bactérie méthanogène. Ceci montre également qu'il y a une activité sulfatoréductrice sur 1,3-propanediol. Le 3-hydroxypropionate produit disparaît à son tour pour donner de l'acétate avec une production concomitante de sulfure. La production de propionate et de méthane est inexistante.

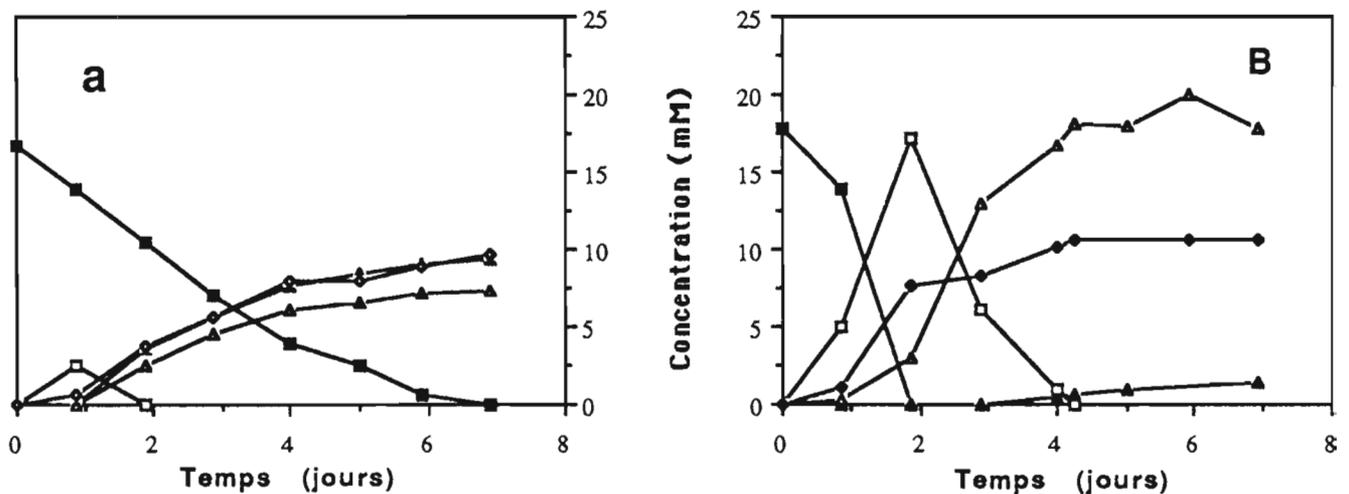


Fig. 4.12 Cinétique de dégradation anaérobie du 1,3-propanediol par la culture d'enrichissement, en l'absence de sulfate (a) et en présence de sulfate (b). Légendes: ■, 1,3-propanediol; □, 3-hydroxypropionate; ▲, propionate; △, acétate; ◆, sulfures; ◇, méthane.

L'examen microscopique de cette culture a révélé la prédominance du vibrio (souche DFG), les deux autres espèces bactériennes étant présentes en très faible proportion.

4. IDENTIFICATION DE LA SOUCHE DFG

4.1. Isolement

L'isolement de la souche DFG a été réalisé après une série d'enrichissements sur 1,3-propanediol en présence de sulfate. L'analyse de la phase liquide montre l'accumulation de l'acétate comme seul acide, et les sulfures. L'examen microscopique montre la prépondérance de vibrios de morphologie identique. La méthode de purification utilisée est identique à celle décrite

pour l'isolement de la souche SPSN (voir chapitre 4-2). Les colonies sont apparues dans la gélose profonde après une période d'incubation d'une semaine. Après repiquage de ces colonies en milieu liquide et après deux à trois jours d'incubation, les cellules étaient capables d'oxyder complètement le 1,3-propanediol en acétate, et vraisemblablement en gaz carbonique.

A partir de cette culture d'enrichissement, deux souches ont été isolées; elles sont morphologiquement et physiologiquement très similaires; la souche DFG a été choisie pour la caractérisation.

4.2. Morphologie cellulaire

En présence de sulfate et 1,3-propanediol comme donneur d'électrons, la souche DFG se présente sous la forme d'un vibrio mobile de 0,7 - 0,9 μm de large et de 2,7 - 3,2 μm de long (Photo 4.5). Les cellules apparaissent isolées ou en paires et deviennent spirilloïdes dans les cultures âgées. L'examen en microscopie électronique révèle la présence d'un seul flagelle polaire (Photo 4.6). Les cellules sont Gram négatif, et les spores n'ont jamais été observées.

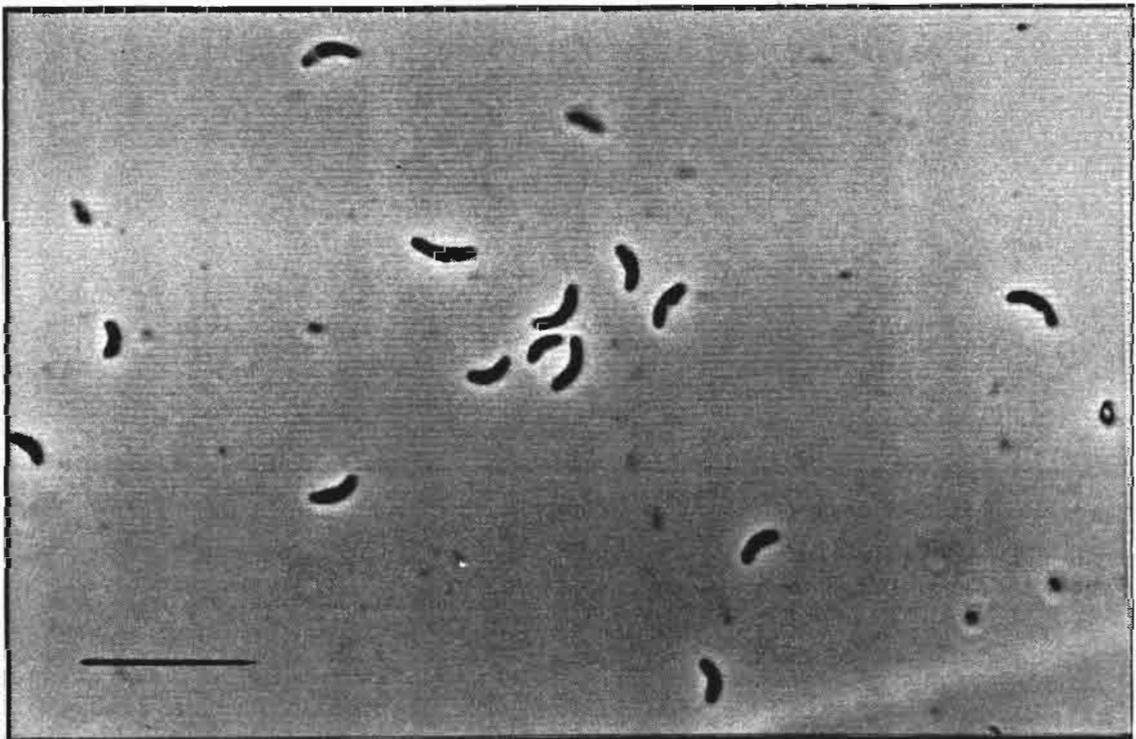


Photo.4.5 Microscopie optique à contraste de phase de la souche DFG en milieu 1,3-propanediol + sulfate. Barre, 10 μm .

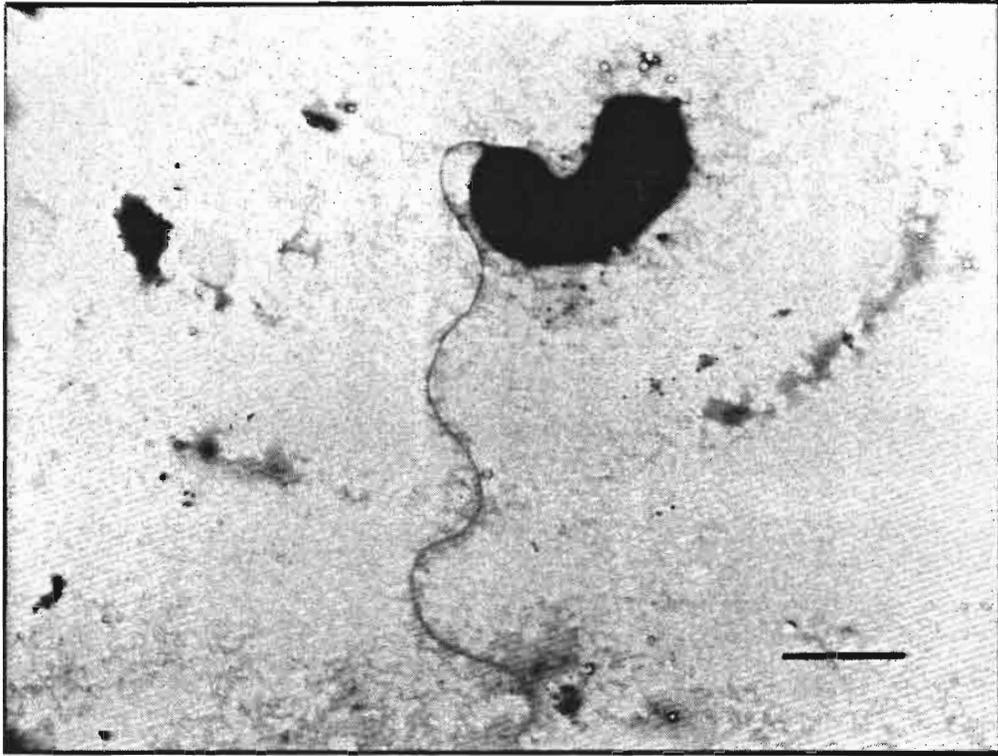


Photo.4.6 Microscopie électronique de la souche DFG en milieu 1,3-propanediol+sulfate. Noter le flagelle polaire. Barre, 1 μm

4.3. Etudes physiologiques

4.3.1. Effet de la température sur la croissance

La souche DFG se développe de façon significative dans une gamme de températures allant de 20°C à 41°C (Fig. 4.14). L'optimum de température se situe entre 37 et 38 °C environ sur 1,3-propanediol en présence de sulfate à pH 7,2. A 42°C , la souche ne se développe plus. La température minimale de croissance est légèrement au dessous de 20°C.

4.3.2. Effet du pH sur la croissance

L'effet du pH a été testé à 35°C sur 1,3-propanediol comme substrat en présence de sulfate (Fig. 4.15.). La croissance est observée entre pH 5,5 et 9,0 . L'optimum de croissance est obtenu à pH 6,75. Aucune croissance n'a été observée à pH 5.5 et 9,0.

4.3.3.Effet de la concentration en NaCl sur la croissance

La figure 4.16, reporte l'effet de la concentration en NaCl sur la croissance de la

souche DFG. Les tests ont été réalisés à 35°C et à pH 7,2 sur 1,3-propanediol en présence de sulfate. La croissance diminue quand la concentration en sel augmente. L'optimum de croissance est obtenu sans addition de NaCl. Elle est inhibée à environ 20 g/l (P/V).

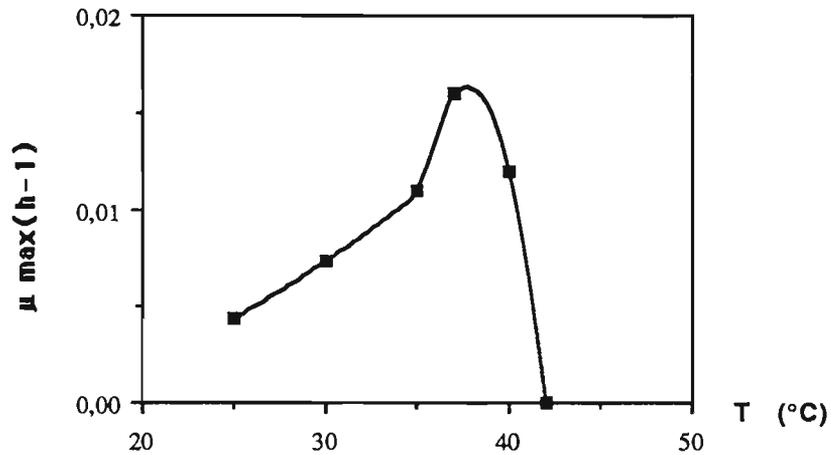


Fig. 4.14 Effet de la température sur la croissance de la souche DFG

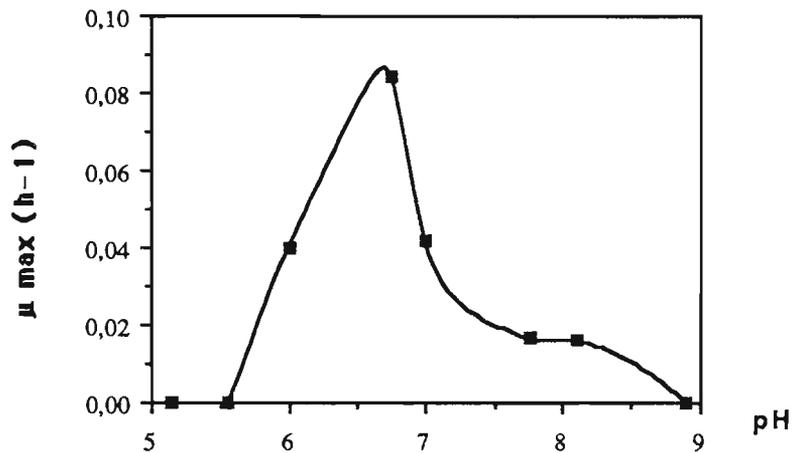
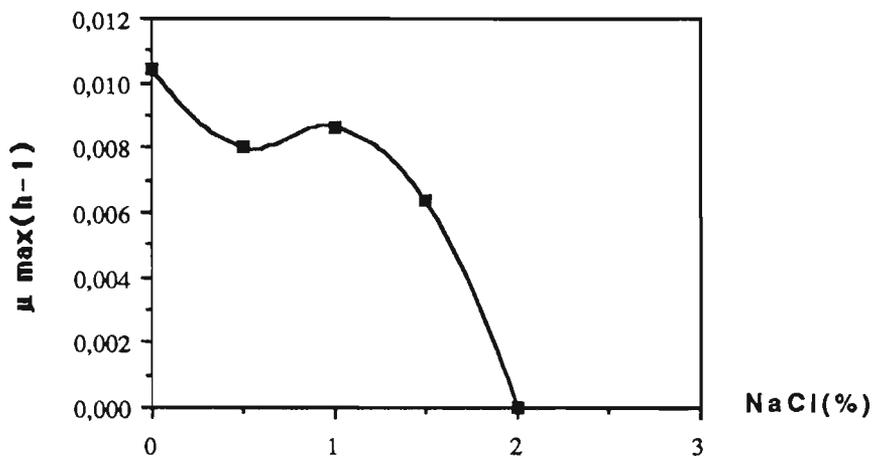


Fig. 4.15 Effet du pH sur la croissance de la souche DFG



4.16 Effet de la salinité sur la croissance de la souche DFG

4.4. Etude nutritionnelle

Les études nutritionnelles ont été effectuées à 35°C et à pH 7,2. Les vitamines ou l'extrait de levure ne sont pas nécessaires au développement de la souche DFG. Elle est capable d'utiliser l'azote atmosphérique comme seule source d'azote.

4.4.1. Donneurs d'électrons

Les substrats utilisés comme donneurs d'électrons pour réduire le sulfate en sulfures sont reportés dans le Tableau 4.8.

Substrates (mM),	DO 580 nm	Volatile fatty acids produced
Glycérol (10)	0,33	Acétate
DHA (10)	0,11	acetate
1,3-propanediol (10)	0,34	Acétate
1,2-propanediol (10)	0,22	Propionate
1,4-butanediol (10)	0,16	Succinate
Pentanol-1 (10)	0,17	Valérate
Propanol-1 (10)	0,2	Propionate
Butanol-1 (10)	0,14	Butyrate
Ethanol (10)	0,18	Acétate
Methanol (10)	0,15	CO ₂
Ethylène glycol (10)	0,07	Acétate
Formate (10)	0,11	CO ₂
H ₂ + CO ₂ (3 bars)	0,2	nd
Lactate (10)	0,19	Acétate
Pyruvate (10)	0,22	Acétate
Fumarate (10)	0,28	Acétate
Succinate (10)	0,18	Acétate
Malate (10)	0,25	Acétate
Témoin	0,04	nd

nd, non déterminé.

Le milieu de culture contient 15 mM de sulfate; H₂, formate et méthanol ont été testés en présence de 5 mM d'acétate. Les substrats testés mais non utilisés par la souche (concentrations en mM) : 2,3-butanediol (10); butanol-2 (10); propanol-2 (10); cellobiose (10); glucose (10); fructose (10) inositol (10); saccharose (10); xylose (10); mannose (10); lysine (10); tyrosine (10); arginine (10); phenylalanine (10); tryptophan (10); ornithine (10); alanine (10); oxamate (10); oxalate (10); choline (10); mannitol (10) et ribose (10). La croissance bactérienne a été également estimée par la mesure des sulfures après une période d'incubation de 3 semaines.

Tableau 4.8 Utilisation des différents substrats comme donneurs d'électrons par la souche DFG en présence de sulfate.

Les sucres, les acides aminés, ou les acides gras saturés ne sont pas utilisés par notre souche. L'utilisation de l'hydrogène moléculaire, du formate et du méthanol requiert de l'acétate comme source de carbone. Une bonne croissance a été obtenue avec les substrats en C₁ suivants : mélange hydrogène - gaz carbonique, méthanol et formate. Par contre la croissance est faible avec l'éthylèneglycol. Des croissances plus importantes ont été obtenues sur glycérol, DHA, 1,3-propanediol, éthanol, pyruvate, fumarate, succinate, malate et lactate en présence de sulfate. Tous ces substrats sont incomplètement oxydés par la souche DFG en acétate et probablement gaz carbonique. L'éthylèneglycol est oxydé en acétate. Le 1,2-propanediol est converti en propionate; propanol-1, butanol-1 et pentanol-1 sont respectivement convertis en propionate, butyrate et valérate. Le formate et le méthanol sont oxydés en CO₂. Le succinate est l'un des produits de la dégradation du 1,4-butanediol par la souche DFG.

Le fumarate, le malate et le pyruvate peuvent être fermentés; le fumarate et le malate sont fermentés en succinate et acétate. Le pyruvate est fermenté principalement en acétate (Tableau 4.9).

Substrats ^a	DO 580 nm	Produits
Fumarate (10)	0,25	Succinate + Acétate
Malate (10)	0,18	Succinate + Acétate
Pyruvate (10)	0,21	Acétate

a, les chiffres entre parenthèses représentent les concentrations en mM.

Tableau 4.9 Fermentation des différents substrats par la souche DFG, en l'absence de sulfate.

4.4.2. Accepteurs d'électrons

Les tests d'accepteurs d'électrons ont été réalisés avec le lactate comme donneur d'électrons (substrat non fermentescible par la souche DFG). L'isolat peut utiliser comme accepteurs d'électrons le sulfate, le sulfite, le thiosulfate, le soufre élémentaire et le fumarate. Le nitrate n'est pas réduit (Tableau 4.10).

Accepteurs ^a	Densité optique à 580 nm ^b
Sulfate (15)	0,30
Sulfite (5)	0,24
Thiosulfate (5)	0,22
Soufre (en excès)	0,15
Nitrate (5)	0,045
Fumarate (15) ^c	0,20
Témoin	0,04

a, Les chiffres entre parenthèses représentent les concentrations en mM; **b**, Les différents accepteurs d'électrons ont été testés avec le glycérol à 10 mM; **c**, Le fumarate est utilisé comme accepteur d'électrons.

Tableau 4.10 Différents accepteurs d'électrons utilisés par la souche DFG.

4.5. Etudes biochimiques

4.5.1. Composition de l'ADN en G+C %

La composition en base G + C % de l'ADN de la souche DFG est $64,5 \pm 0,1$ mol % ; cette valeur représente la moyenne de quatre déterminations, en prenant comme référence la composition en G + C % de l'ADN non méthylé du virus LAMDA (49,858 %).

4.5.2. Pigments

Comme il est reporté dans la figure 4.17, l'extrait soluble de la souche DFG montre des bandes caractéristiques du cytochrome c_3 , avec des maximums d'absorption à 418, 523 et 552 nm. L'extrait oxydé montre le pic de Sauret à 408 nm. L'ascorbate de sodium est incapable de modifier le spectre oxydé. Ceci indique que le cytochrome possède des centres d'oxydoréduction de faible potentiel. De plus, le spectre montre une bande d'absorption à 628 nm, caractéristique de la desulfovirdine (Lee et Peck, 1971). Ceci est confirmé par le test de fluorescence

positif de la désulfovirdine (Postgate, 1959).

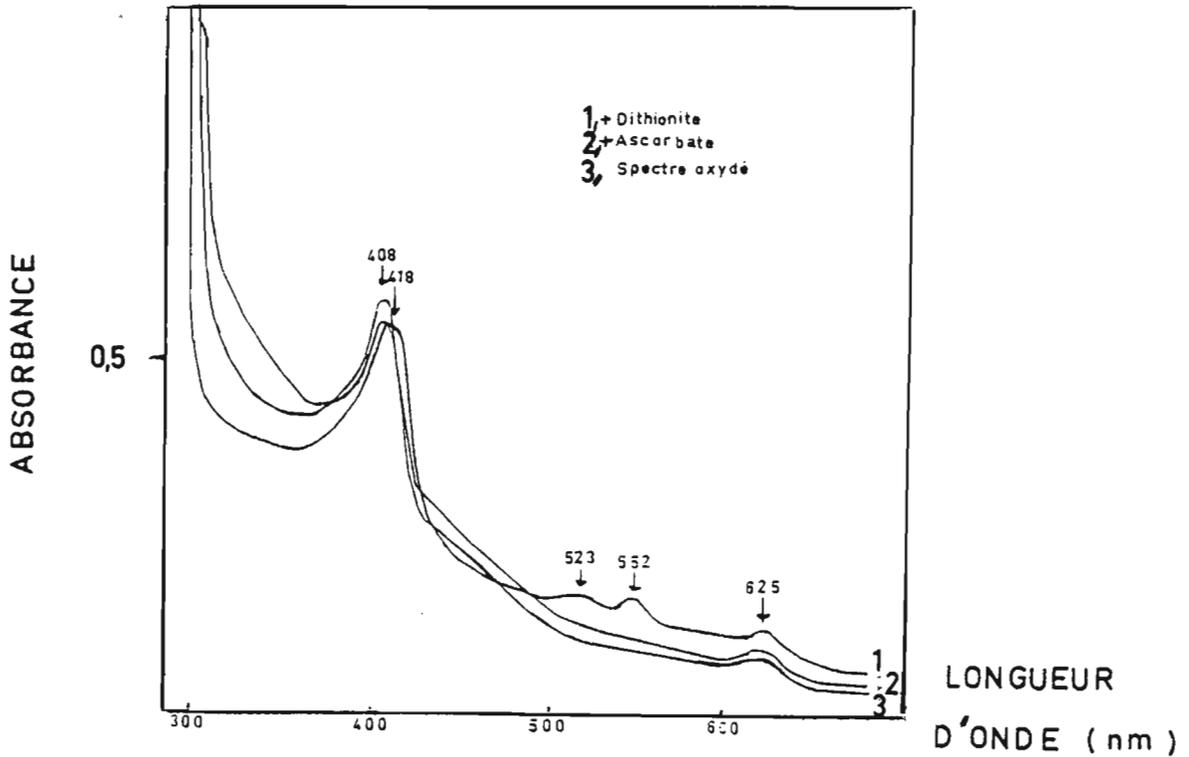


Fig. 4.17 Différences de spectres réduit et oxydé des extraits cellulaires de la souche DFG ayant poussé en milieu 1,3-propanediol + sulfate.

5. DISCUSSION

L'étude taxonomique de la souche DFG montre que c'est un bâtonnet incurvé, capable de réduire le sulfate, et qui ne forme pas de spores. Les colonies formées en milieu gélosé sont de couleur marron caractéristique de la plupart des colonies de sulfatoréducteurs. La souche DFG réalise une oxydation incomplète du pyruvate et du lactate en acétate et gaz carbonique. Elle n'oxyde ni l'acétate, ni le propionate ou le butyrate. Sur la base de ces caractéristiques, la souche DFG peut être classée dans le genre *Desulfovibrio* (Pfennig *et al.*, 1981; Widdel, 1988).

Comme les autres espèces du même genre, la souche DFG montre des bandes d'absorption caractéristiques du cytochrome c_3 et la désulfovirdine (Postgate, 1956; Widdel et Pfennig, 1984). La composition cytosine + guanine de l'ADN est située dans la gamme des espèces du genre *Desulfovibrio*. La souche DFG est capable de faire fermenter le fumarate, le malate et le pyruvate en l'absence de sulfate.

La souche DFG se rapproche de *Desulfovibrio alcoholovorans* (chapitre 4-2), cependant des différences physiologiques sont notées, notamment la conversion du 1,2-propanediol exclusivement en propionate, l'utilisation du fumarate comme accepteur terminal d'électrons, une meilleure utilisation des composés en C₁. La composition en G+C% de l'ADN (64,5±0,1) de la souche DFG étant très proche de celui de *D.alcoholovorans* (64,5±0,3), la souche DFG ne peut être considérée différente de *D.alcoholovorans*.

En l'absence de sulfate, la souche DFG n'utilise ni le 1,2-propanediol, ni le 1,3-propanediol, ni le glycérol en culture pure. Par contre tous ces substrats sont utilisés lorsque la souche DFG est cultivée en association avec *M. hungatei* comme accepteur terminal d'électrons.

La dégradation du 1,3-propanediol a été rapportée pour des bactéries non sulfatoréductrices appartenant au genre *Pelobacter* : *Pelobacter carbinolicus* convertit le 1,3-propanediol en acétate lorsqu'il est cultivé avec une bactérie méthanogène hydrogénotrophe (Dubourguier *et al.*, 1986). Par contre, ces mêmes auteurs n'ont observé aucune croissance en culture pure de cette bactérie avec le 1,3-propanediol comme source d'énergie. En effet, les substrats très réduits comme le 1,3-propanediol, ne sont dégradés qu'en utilisant un accepteur externe d'électrons représenté exclusivement, dans ce cas, par les protons. Ces derniers sont réduits en hydrogène. L'accumulation de cet hydrogène inhibe progressivement leur métabolisme et leur croissance, et ce, tant que l'agent inhibiteur (H₂) n'est pas enlevé par les bactéries hydrogénophiles.

Théoriquement la dégradation du 1,3-propanediol en acétate (éq.3), ou en propionate (éq.4) produit de l'hydrogène :



L'addition d'hydrogène à la culture inhibe donc la dégradation du 1,3-propanediol et par conséquent la croissance bactérienne.

Lorsqu'on inocule le milieu de Widdel contenant du sulfate et du 1,3-propanediol comme seule source d'énergie et de carbone, avec 10% (v/v) de la culture d'enrichissement

d'origine, pasteurisée plusieurs fois (80 °C pendant 10 mn), le 1,3-propanediol est converti exclusivement en propionate; l'acétate et les sulfures ne sont pas produits.

L'examen microscopique révèle la prédominance de la forme sporulée en fuseau, la souche FS. La production de propionate dans la culture d'origine, est due probablement à cette bactérie qui doit réaliser une simple déshydrogénation du 1,3-propanediol par l'acétaldéhyde deshydrogénase (enzyme non spécifique).

Sur la base de ces observations, on peut conclure que la croissance de la souche FS est indépendante de la présence d'un accepteur terminal d'électrons tel que le sulfate ou la bactérie méthanogène. Elle est de type fermentaire. Néanmoins sa présence traduit son rôle écologique, notamment sa participation dans la production de propionate observée dans les écosystèmes anaérobies traitant des eaux résiduaires de production de bioéthanol.

Il a également été montré que le sulfate peut jouer le rôle d'accepteur terminal d'électrons dans la dégradation du 1,3-propanediol par la souche DFG, et modifier la nature des métabolites produits à partir de ce substrat.

Comme conclusion, les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* peuvent utiliser le 1,3-propanediol comme substrat énergétique pour leur croissance en association syntrophique avec une bactérie méthanogène consommatrice d'hydrogène dans les écosystèmes méthanogènes pauvres en sulfate, et ceci de la même manière que la culture *Methanobacillus omelianskii* sur éthanol (Barker, 1956), qui a été démontré par la suite comme étant une association entre deux microorganismes (Bryant *et al.*, 1967) l'organisme "S" et *Methanobacterium* MOH, ou certains *Desulfovibrio* sur lactate et éthanol (Bryant *et al.*, 1977). En outre, des expériences de culture mixte entre *D. alcoholovorans* et *M. hungatei* ont été réalisées sur glycérol, 1,2-propanediol et 1,3-propanediol (chapitre 4-5) et ont montré que tous ces substrats se dégradent aussi par transfert interspécifique d'hydrogène en acides et méthane.

Chapitre 4-4

Compétition entre *Desulfovibrio* souche DFG et *Sporomusa acidovorans* pour le glycérol

Rappelons que *S.acidovorans* est une bactérie homoacétogène isolée d'un enrichissement-sur méthanol (Ollivier *et al.* , 1985), l'inoculum provenait d'un fermenteur traitant une eau résiduaire de distillerie vinicole, dans laquelle le glycérol et le lactate constituaient les substrats carbonés majoritaires. Cette bactérie est capable d'utiliser le glycérol comme source d'énergie (Ollivier *et al.* ,1985). Elle nécessite, comme toutes les bactéries homoacétogènes dégradant le glycérol, la présence de CO₂ comme accepteur terminal d'électrons. Comme on l'a démontré dans le chapitre 4-3, *Desulfovibrio* sp. souche DFG, oxyde une variété d'alcools en présence de sulfate, dont le glycérol. Le CO₂ est largement rencontré dans les milieux anoxiques, et ceci donne un avantage aux bactéries homoacétogènes par rapport aux bactéries fermentatives.

L'objet de ce chapitre est d'examiner la possibilité d'une compétition entre *Desulfovibrio* sp. souche DFG et *S.acidovorans* pour le glycérol.

1. DEGRADATION DU GLYCEROL PAR *S.ACIDOVORANS* EN CULTURE PURE.

Comme le montre la figure 4.17, *S.acidovorans* dégrade le glycérol en acétate. Lorsque 5 mmoles par litre environ de glycérol sont dégradées, le 1,3-propanediol apparaît comme un produit de fermentation supplémentaire. Sa concentration est de 11% environ des produits terminaux. Aucun autre acide ou alcool n'est produit.

2. COMPETITION ENTRE *DESULFOVIBRIO* SP. SOUCHE DFG ET *S.ACIDOVORANS*.

La concentration du glycérol au moment de l'addition de sulfate et de la souche DFG, est de 8 mmoles par litre environ, concentration non limitante en substrat. Lorsqu'on ajoute au milieu de culture de *S.acidovorans* poussant sur glycérol, *Desulfovibrio* sp. souche DFG (10% v/v), et du sulfate (15mM) (Fig.4.18), on constate que : le 1,3-propanediol disparaît, le taux de dégradation du glycérol est plus élevé que celui obtenu avec *S.acidovorans* en culture pure, la dégradation du glycérol et du 1,3-propanediol produit par *S.acidovorans*, s'accompagne d'une production de sulfures et enfin la concentration en acétate continue à augmenter, après l'addition de la sulfatoréductrice.

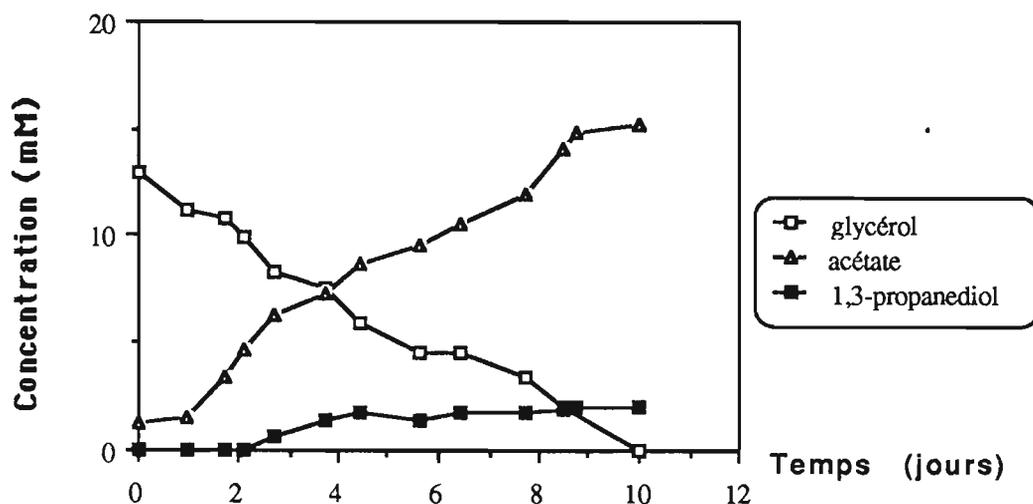


Fig. 4.17 Cinétique de dégradation anaérobie du glycérol par *S. acidovorans* en culture pure.

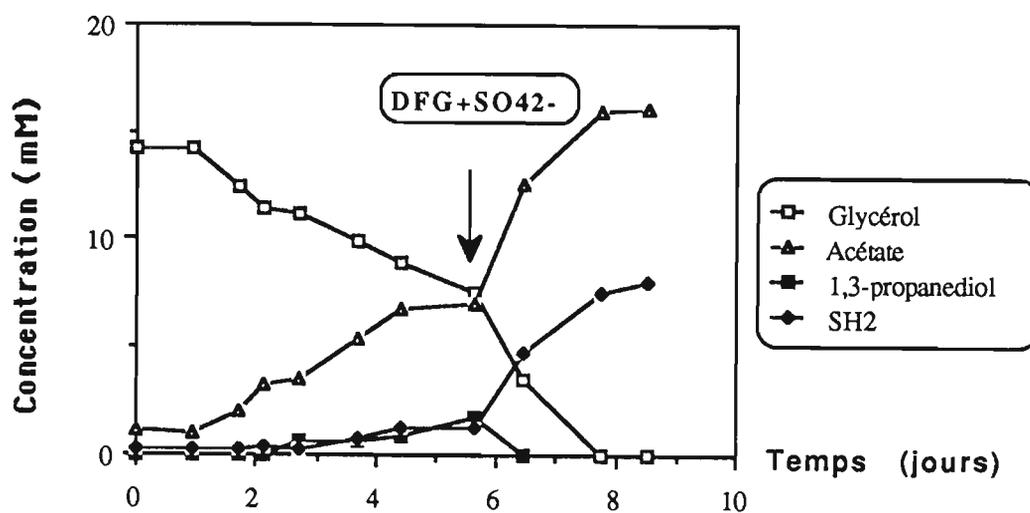


Fig. 4.18 Effet de l'addition de la souche DFG + sulfate sur le métabolisme du glycérol par *S. acidovorans*

De plus, lorsqu'on inocule le milieu de Widdel contenant différentes concentrations en glycérol + sulfate (20mM) avec la souche DFG et *S. acidovorans* (10% v/v), on constate qu'il y a une corrélation entre la concentration du glycérol dégradé et la concentration des sulfures produits (Tableau 4.11).

glycérol dégradé (mM)	Produits (mM)	
	acétate	sulfures
5	4,3	3,1
8	7,5	5,5
20	19,8	14,6

Tableau 4.11 Effet de la sulfato-réduction sur la dégradation du glycérol par l'association *Desulfovibrio* sp. souche DFG et *S.acidovorans*.

L'observation microscopique d'une telle association montre la prédominance de la souche DFG, et la formation de spores chez *S.acidovorans* (Photo 4.7).

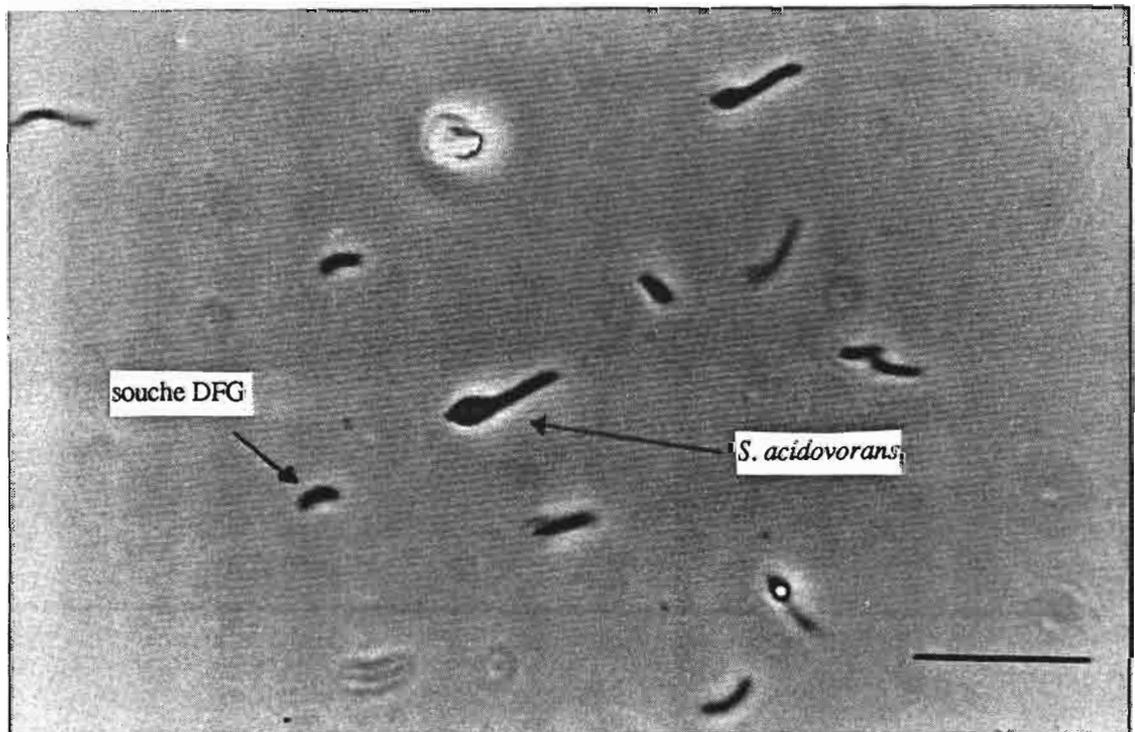


Photo 4.7 Microscopie optique à contraste de phase de l'association *Sporomusa acidovorans* et *Desulfovibrio* sp. souche DFG. Noter la formation de spores chez *S.acidovorans*. Barre 10 μ m.

Ceci peut être dû à des conditions défavorables (manque de substrat par exemple) pour la croissance de *S.acidovorans*. Il est possible que dans ce cas, la formation de spores puisse être un moyen permettant à la bactérie homoacétogène de survivre dans ces conditions.

3. DISCUSSION

S.acidovorans, comme la plupart des bactéries homoacétogènes, dégrade un substrat organique en un mélange d'équivalents réducteurs et CO₂, puis ces équivalents réducteurs sont utilisés pour réduire le CO₂ en acétate. Il a été récemment rapporté qu' *Acetobacterium Woodii* et *Acetobacterium carbinolicum* produisent en plus de l'acétate, 10 à 20% de 1,3-propanediol à partir du glycérol à cause du pH du milieu (Emde et Schink, 1987). En effet, la production de 1,3-propanediol peut être limitée en chémostat en maintenant le pH à 7,2. *S.acidovorans* produit également du 1,3-propanediol vraisemblablement pour des raisons de pH. Il est probable aussi qu'une fraction du glycérol ait été réduite en 1,3-propanediol pour permettre à la bactérie de réoxyder ses équivalents réducteurs et résoudre le problème d'excès d'équivalents réducteurs.

Il a été démontré que *S.acidovorans* réalise un transfert complet d'équivalents réducteurs, en coculture avec *Wolinella succinogenes* sur nitrate ou avec les espèces du genre *Desulfovibrio* en présence de sulfate; par contre, en coculture avec *M.hungatei*, seul un transfert incomplet est réalisé (Cord-Ruwisch, 1986). L'addition d'hydrogène à une culture pure de *S.acidovorans* inhibe complètement la croissance bactérienne et cette inhibition est réversible lorsqu'on enlève l'hydrogène (Cord-Ruwisch, 1986).

D'une manière générale, la compétition pour un substrat organique entre deux microorganismes ayant des affinités différentes pour ce substrat, intervient seulement dans des conditions limitantes en substrat : si le substrat organique est présent en excès, il est possible qu'il y ait une coexistence de ces deux microorganismes. Cette coexistence durera jusqu'à ce que la concentration en substrat devienne limitante pour l'un des microorganismes. Dans ce cas, il y aura une compétition directe pour le substrat. Si le métabolisme de ce substrat fait intervenir un phénomène de production et de consommation d'hydrogène sous forme d'équivalents réducteurs, comme c'est le cas avec les bactéries homoacétogènes et sulfatoréductrices, la compétition pour le substrat deviendra indirecte, en ce sens qu'il y aura compétition pour les faibles concentrations d'hydrogène, et ceci même en présence d'une concentration non limitante en substrat.

A l'heure actuelle, on admet deux mécanismes de conservation d'énergie : la phosphorylation liée au substrat, et la phosphorylation oxydative liée à un transfert d'électrons le long d'une chaîne de transport d'électrons.

L'accélération de la dégradation du glycérol après l'addition de *Desulfovibrio* sp. souche DFG et de sulfate, la proportionalité des quantités de glycérol dégradé et sulfures produits et la concentration d'acétate qui continue à augmenter après l'addition de la souche DFG et du sulfate, montrent clairement que le glycérol est plutôt utilisé par la bactérie sulfatoréductrice (une inhibition directe de la croissance de *S.acidovorans* par les sulfures est exclue (Cord-Rwisch, 1987); par conséquent, il y a probablement eu une compétition directe pour le glycérol. Une compétition indirecte peut être également envisagée par le biais de l'hydrogène : la souche DFG perturberait l'équilibre dynamique entre le pool d'hydrogène externe et les transporteurs d'électrons internes établie par *S.acidovorans*, et qui aurait pour conséquence la diminution ou l'arrêt de synthèse d'ATP. Le seul moyen de conservation de l'énergie restant pour *S.acidovorans* est la phosphorylation au niveau du substrat, qui est apparemment insuffisante pour permettre à cette bactérie d'être compétitive vis à vis de la sulfato-réductrice pour le glycérol.

En conclusion, la capacité des bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* à oxyder efficacement l'hydrogène (Badziong et THauer, 1978; Badziong *et al.*, 1978; Badziong et THauer, 1980; Brandis et Thauer, 1981; Kristiansson *et al.*, 1982) les rend donc compétitives pour des substrats inhabituels tels que le glycérol, vis à vis des bactéries homoacétogènes en culture pure. Dans les écosystèmes méthanogènes traitant les déchets de distillerie vinicole, cette compétition doit être fonction du rapport glycérol/sulfate : tant que la concentration en sulfate n'est pas limitante, la dégradation du glycérol par *S.acidovorans* dans ces écosystèmes est improbable.

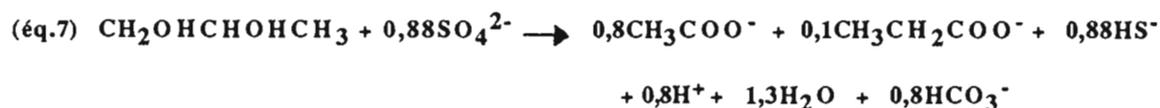
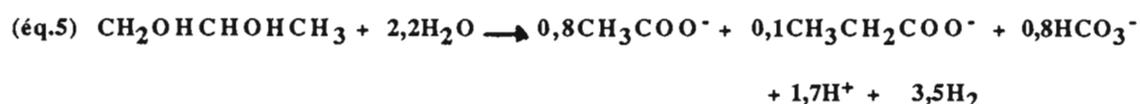
Chapitre 4-5

Dégradation anaérobie des composés réduits tels que le glycérol, le 1,2-propanediol et le 1,3-propanediol par *Desulfovibrio alcoholovorans* en culture pure ou par transfert interspécifique d'hydrogène

1. DEGRADATION ANAEROBIE DU 1,2-PROPANEDIOL

La dégradation de ce composé par *Desulfovibrio alcoholovorans* a été examinée en culture pure, en présence de sulfate et en association syntrophique avec *Methanospirillum hungatei* en l'absence de sulfate.

En présence de sulfate, *D.alcoholovorans* convertit le 1,2-propanediol en un mélange d'acétate et de propionate (Fig.4.19a) et vraisemblablement CO₂. Très peu de sulfures sont produits, en liaison probable avec la quantité de propionate produite (la conversion d'une mole de 1,2-propanediol en une mole de propionate libère théoriquement une mole d'hydrogène (éq. 5). Il faut noter cependant que le rapport acétate/propionate n'est pas constant d'une expérience à l'autre, probablement à cause du pH ou au potentiel rédox des milieux utilisés (voir aussi Tableau 4.12). Outre l'acétate et le propionate, notre souche ne produit aucun autre acide ou solvant tel que le n-propanol. Le taux maximum de croissance de cette culture, calculé à partir de la production de propionate, est d'environ 0,09 h⁻¹. Le rendement de croissance maximum de *D.alcoholovorans* sur 1,2-propanediol est de 10,4 g poids sec par mole de substrat dégradé (Tableau 4.12). Dans nos conditions de culture et en présence de sulfate (Tableau 4.12), *D.alcoholovorans* dégrade le 1,2-propanediol selon les équations 5, 6 et 7 :



En l'absence de sulfate, *M. hungatei* sert d'accepteur terminal des équivalents réducteurs libérés par *D.alcoholovorans* à partir du 1,2-propanediol (Photo 4.8). Dans ce cas, les produits de fermentation sont le propionate et le méthane (Fig.4.19b). Il est à noter la production exclusive de propionate comme acide gras volatil (éqs. 8 et 9). La production d'acétate n'a jamais été observée. La stoechiométrie théorique suivante peut être proposée (éqs. 8,9 et 10)



Comme le montrent ces équations, il faut 4 moles de 1,2-propanediol pour produire une mole de méthane. Le taux de croissance maximum de cette coculture, calculé à partir de la production de propionate, est d'environ $0,005 \text{ h}^{-1}$. Le rendement maximum de croissance de cette coculture, est de seulement 3 g poids sec par mole de substrat dégradé (Tableau 4.12).

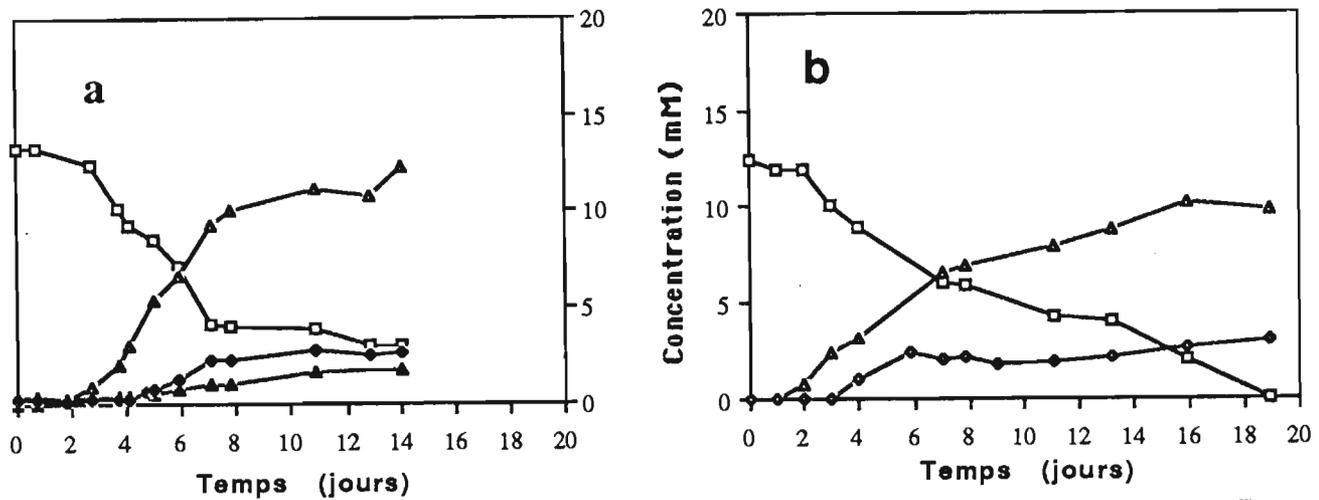


Fig. 4.19 Cinétique de dégradation anaérobie du 1,2-propanediol par *D.alcoholovorans* en culture pure, en présence de sulfate (a) et en association avec *M.hungatei* (b). Légendes : □, 1,2-propanediol; △, propionate; ▲, acétate; ◆, sulfures; ◇, méthane.

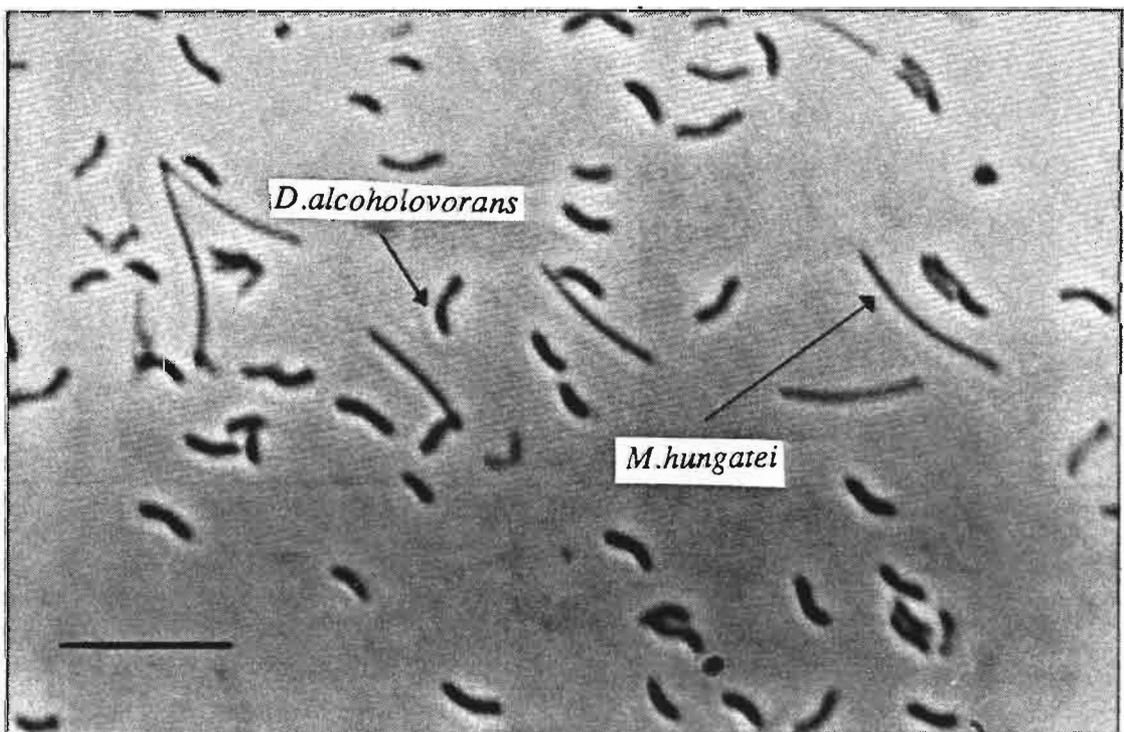


Photo 4.8 Coculture de *D.alcoholovorans* avec *M.hungatei* en milieu 1,2-propanediol. Barre 10 µm.

Tableau 4.12 Rendement et stoechiométrie^a de D. alcoholovorans en culture pure sur 1,2-propanediol, en présence de sulfate (1-4), et en association avec M. hungatei sans sulfate (5-8).

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1,2-OH dégradé	DO 580	Biomasse	Rendement	Acétate ^b assimilé	Acétate	Propionate	SH ₂ (S) ou CH ₄ (M)	e- ^c retrouvé
mM		mg/l	g/mol	mM	mM	mM	mM	%
5	0,13	52,00	10,40	1,07	3,87	0,54	3,70 (S)	96
10	0,18	72,00	7,20	1,48	7,70	1,06	6,88 (S)	90
5	0,030	15,00	3,00	0,31	0,00	4,10	0,60 (M)	81
10	0,055	27,50	2,75	0,57	0,00	10,50	1,50 (M)	102

1,2-OH, 1,2-propanediol

a, le bicarbonate est présent ; b, calculé à partir de la colonne 3 et l'équation suivante :
 $17 \text{ CH}_3\text{COO}^- + 11\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 8 (\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3) + 2\text{HCO}_3^- + 15 \text{ OH}^-$ (Widdel et Pfennig, 1977)
 c, calculé à partir des colonnes 1 , 5, et des produits formés (6 et 7).

2. DEGRADATION ANAEROBIE DU 1,3-PROPANEDIOL

Lorsqu'on cultive *D.alcoholovorans*, en culture pure, en présence de sulfate sur 1,3-propanediol comme source d'énergie et de carbone, seuls l'acétate, le 3-hydroxypropionate, les sulfures (Fig. 4.20a) et probablement le CO₂ sont produits. Le rapport acétate/ 3-hydroxypropionate est environ de 3,4. La quantité maximale de 3-hydroxypropionate produite est approximativement de 1,2 mmoles/l (Fig. 4.20a).

Un taux maximum de croissance moyen de 0,086 h⁻¹ pour *D.alcoholovorans* sur 1,3-propanediol, a été calculé à partir de la disparition du 1,3-propanediol et la production d'acétate. Le rendement maximum de croissance de cette culture sur 1,3-propanediol en présence de sulfate, est de 14,6 g poids sec par mole de substrat dégradé (Tableau 4.13).

Sans sulfate et en présence de *M. hungatei* (Photo 4.9), le 1,3-propanediol est dégradé en un mélange d'acétate et 3-hydroxypropionate (avec un rapport approximatif de 1), de méthane (Fig.4.20b), et vraisemblablement CO₂. le 3-hydroxypropionate est converti à son tour en acétate, méthane et probablement CO₂. Le taux maximum de croissance d'une telle coculture, calculé à partir de la disparition du 1,3-propanediol, est de 0,05 h⁻¹ environ. Le taux maximum de croissance de la même coculture calculé à partir de la disparition du 3-hydroxypropionate endogène, est de 0,048 h⁻¹ environ. Le rendement maximum de croissance de cette coculture est de 12,8g poids sec par mole de substrat dégradé.

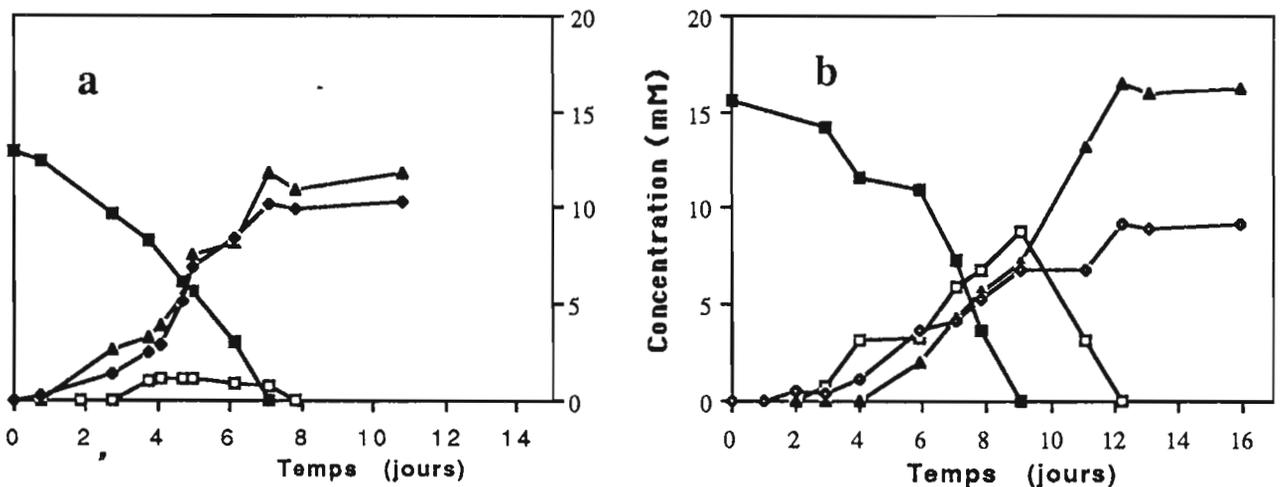
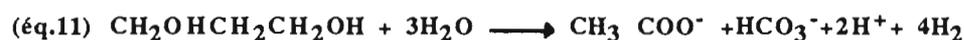


Fig. 4.20 Cinétique de dégradation anaérobie du 1,3-propanediol par *D.alcoholovorans* en culture pure, en présence de sulfate (a) et en association avec *M.hungatei* (b). Légendes : ■, 1,3-propanediol; □, 3-hydroxypropionate; ▲, acétate; ◆, sulfures; ◇, méthane.

Le Tableau 4.13 reporte les stoechiométries de la dégradation du 1,3-propanediol par *D.alcoholovorans* en culture pure avec sulfate ou en coculture avec *M.hungatei*.

En présence de sulfate, la dégradation du 1,3-propanediol correspond aux équations 11, 12 et 13 :



De même, en l'absence de sulfate, la même stoechiométrie (éqs. 14, 15 et 16) peut être proposée pour la coculture avec *M. hungatei* (Tableau 4.13):



Ces équations montrent que La dégradation anaérobie du 1,3-propanediol par *D.alcoholovorans* requiert donc un accepteur terminal d'électrons tel que le sulfate ou une bactérie méthanogène hydrogénotrophe.

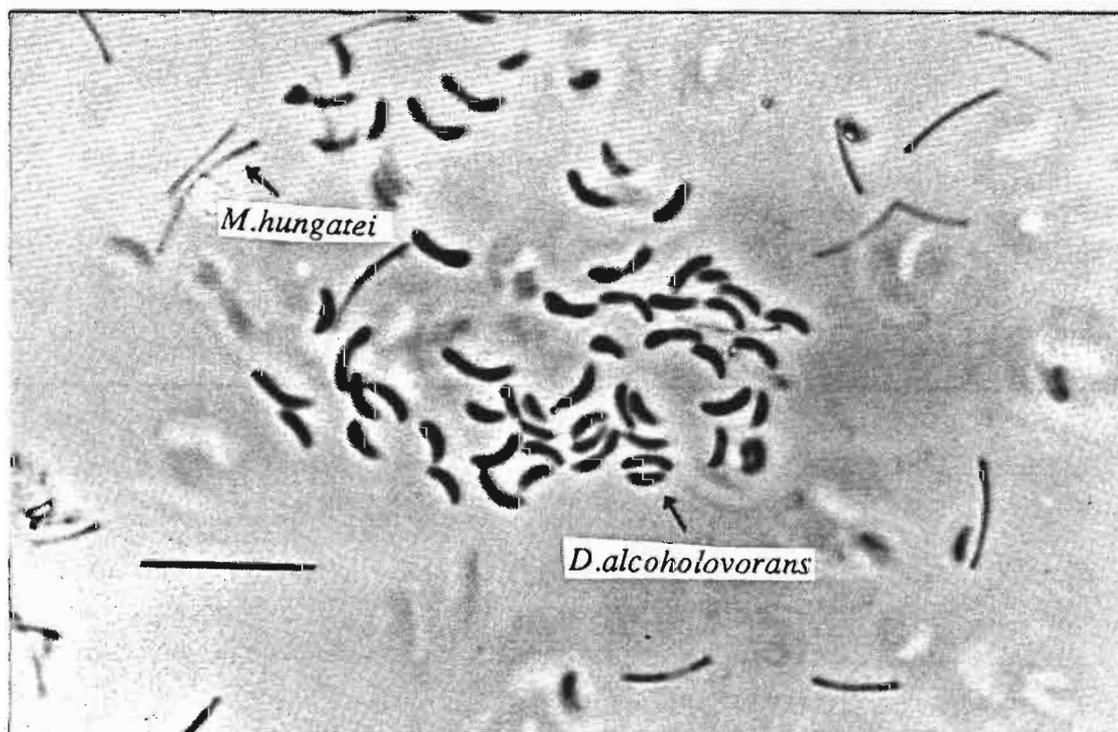


Photo 4.9 Coculture de *D.alcoholovorans* et *M.hungatei* en milieu 1,3-propanediol. Barre, 10 μm .

Tableau 4.13 Rendement et stoechiométrie^a de D. alcoholovorans en culture pure sur 1,3-propanediol, en présence de sulfate (1-4), et en association avec M. hungatei sans sulfate (5-8).

1	2	3	4	5	6	7	8
1,3-OH dégradé	DO 580	Biomasse	Rendement	Acétate ^b assimilé	Acétate	SH ₂ (S) ou CH ₄ (M)	e ⁻ ^c retrouvé
mM		mg/l	g/mol	mM	mM	mM	%
5	0,16	72,73	14,54	1,49	4,60	3,20 (S)	93
10	0,28	127,27	12,73	2,60	7,20	7,10 (S)	85
15	0,37	168,20	11,20	3,46	12,65	12,20 (S)	94
20	0,44	200,00	10,00	4,12	16,00	16,40 (S)	92
5	0,15	64,10	12,82	1,32	3,70	3,20 (M)	83
10	0,24	102,56	10,25	2,11	7,57	7,60 (M)	86
15	0,29	123,93	8,26	2,55	12,94	12,60 (M)	94
20	0,34	145,30	7,26	2,99	17,50	17,80 (M)	96

1,3-OH, 1,3-propanediol; a, b et c voir légendes commentant le Tableau 4.12

3. DEGRADATION DU GLYCEROL

Quelque soit l'accepteur terminal d'électrons, sulfate (Fig.4.21a) ou *M. hungatei* (Fig.4.21b) (Photo 4.10), la dégradation du glycérol par *D.alcoholovorans* aboutit respectivement à la formation d'acétate et de sulfures ou méthane. Aucun autre acide n'est produit. Le taux maximum de croissance de *D.alcoholovorans* en culture pure (calculé à partir de la dégradation du glycérol) est de $0,22 \text{ h}^{-1}$. Celui de la coculture (calculé à partir de la disparition du glycérol) est de $0,047 \text{ h}^{-1}$.

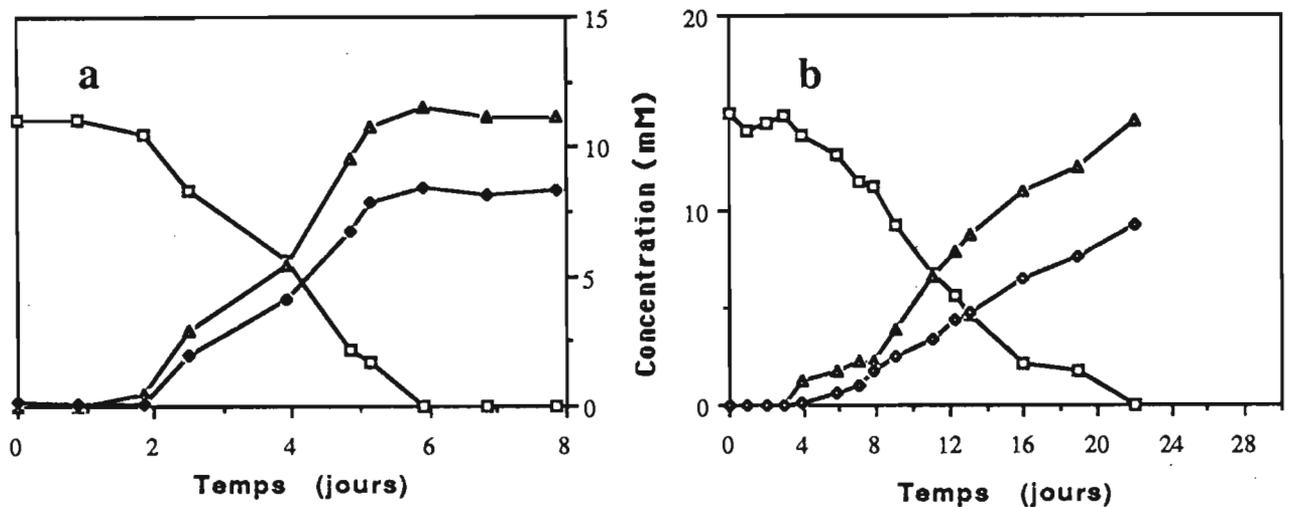
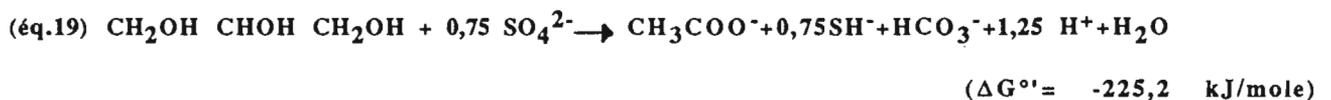
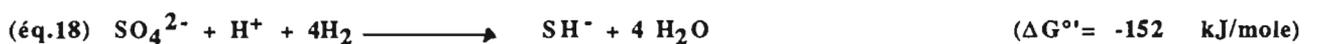
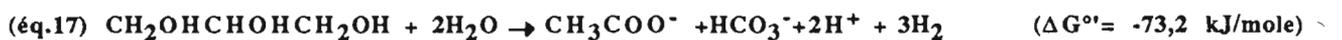
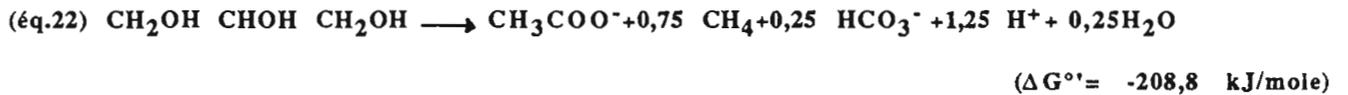
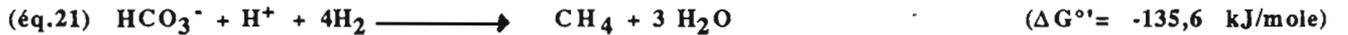
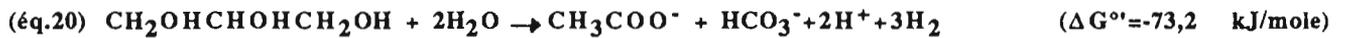


Fig.4.21 Cinétique de dégradation du glycérol par *D.alcoholovorans* en culture pure, en présence de sulfate (a) et en coculture avec *M. hungatei* (b). Légendes : □, glycérol; △, acétate; ◆, sulfures; ◇, méthane.

Le Tableau 4.14 reporte la stoechiométrie de la dissimilation du glycérol par *D.alcoholovorans* en culture pure avec sulfate, et en association syntrophique avec *M.hungatei*. Comme on pourrait s'y attendre, la dégradation du glycérol par *D.alcoholovorans* en culture pure, produit moins de sulfures que celle du 1,3-propanediol par la même souche. De même, la production de méthane par la coculture sur glycérol, est inférieure à celle obtenue lors de la dégradation du 1,3-propanediol. En se basant sur les résultats du Tableau 4.14, les différentes stoechiométries respectives en présence de sulfate (éqs. 17, 18 et 19) et en coculture avec *M. hungatei* (éqs. 20, 21 et 22) peuvent être proposées :





Les rendements maximums de croissance calculés sont respectivement 13,6 et 10,2 g poids sec par mole de substrat dégradé par *D.alcoholovorans* , en présence de sulfate et en coculture avec *M.hungatei* .

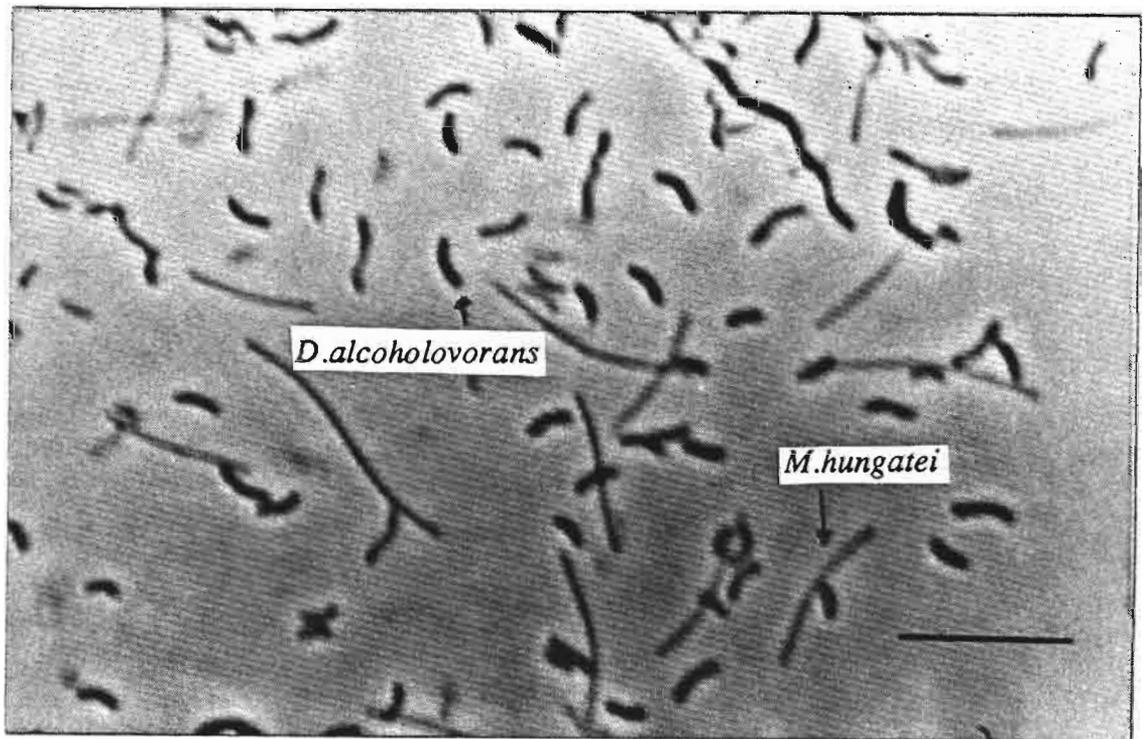


Photo 4.10 Coculture de *D.alcoholovorans* et *M.hungatei* en milieu glycérol. Barre, 10 μm

4. DISCUSSION

La digestion anaérobie du glycérol aboutit souvent à l'accumulation de 1,3-propanediol et de propionate (Schink, 1988; chapitre 4-1). Nous avons isolé des bactéries sulfatoréductrices appartenant au genre *Desulfovibrio* , capables d'oxyder le 1,3-propanediol en présence et en l'absence de sulfate (chapitres 4-2 et 4-3).

Dans ce chapitre, il a été démontré que l'utilisation des composés réduits tels que le glycérol, le 1,2- et le 1,3-propanediol par *D.alcoholovorans* est possible.

Tableau 4.14 Rendement et stoechiométrie ^a de D. alcoholovorans en culture pure sur glycérol, en présence de sulfate (1-4), et en association avec M. hungatei sans sulfate (5-8).

1	2	3	4	5	6	7	8
Glycérol dégradé	DO 580	Biomasse	Rendement	Acétate ^b assimilé	Acétate	SH ₂ (S) ou CH ₄ (M)	e- ^c retrouvé
mM		mg/l	g/mol	mM	mM	mM	%
5	0,16	68,08	13,61	1,40	3,60	2,20 (S)	82
10	0,26	110,63	11,06	2,27	7,90	6,54 (S)	96
15,4	0,46	195,74	12,74	4,03	11,10	9,60 (S)	92
17,8	0,53	225,53	12,65	4,64	13,30	10,50 (S)	92
5	0,13	51,18	10,23	1,05	4,10	2,66 (M)	90
8,80	0,21	82,67	9,40	1,70	7,0	5,30 (M)	91
10,70	0,26	102,36	9,55	2,10	8,40	6,36 (M)	90
19,20	0,45	177,16	9,24	3,65	15,40	12,70 (M)	95

a, b et c voir légendes commentant le Tableau 4.12

En présence de sulfate, *D. alcoholovorans* oxyde 1 mole de 1,3-propanediol en 1 mole d'acétate, et vraisemblablement 1 mole de CO₂; cette réaction produit 1 mole de sulfure à partir de la réduction d'une mole de sulfate. Par contre, 1 mole de glycérol est oxydée en 1 mole d'acétate et vraisemblablement 1 mole de CO₂ avec la réduction de seulement 0,75 mole de sulfate. 1 mole de 1,2-propanediol est convertie en 0,8 moles acétate et 0,1 moles de propionate avec la réduction de 0,9 moles de sulfate. Par contre, 1 mole de ce même substrat produit 1 mole de propionate avec des quantités variables de méthane en présence de *M. hungatei* (Tableau 4.12).

La production exclusive de propionate, lorsqu'on cultive *D. alcoholovorans* avec *M. hungatei*, illustre l'effet de l'accepteur terminal d'électrons sur la nature des produits formés à partir du 1,2-propanediol et la voie métabolique empruntée pour dégrader ce substrat. Il est possible que dans ce cas, *M. hungatei* n'abaissent pas suffisamment la pression partielle d'hydrogène pour permettre un bon transfert d'hydrogène et l'activité des enzymes responsables de la synthèse d'acétate. Ceci est en accord avec les résultats obtenus lors de la fermentation du glutamate par *Acidaminobacter hydrogenoformans* en culture pure ou en association avec *Methanobacterium arboriphilus* (Skrabanja et Stams, 1990).

En présence de sulfate, exceptés l'acétate et le propionate, aucun autre acide ou solvant n'a été produit par *D. alcoholovorans* à partir du 1,2-propanediol.

La production de solvant à partir des diols tels que le 1,2-propanediol et l'éthylène glycol, a été observée chez des bactéries non sulfatoréductrices telles que, *Clostridium glycolicum* (Gaston et Stadtman, 1963) ou *Aerobacter aerogenes* (Abeles et Lee, 1961; Toraya *et al.*, 1979). Ces bactéries convertissent les diols comme l'éthylèneglycol en acide correspondant et l'alcool primaire. Des études enzymologiques ont révélé que le diol est transformé en aldéhyde qui est ensuite convertie en éthanol et acétate (Toraya *et al.*, 1979). Une voie métabolique similaire a été suggérée récemment pour *Pelobacter venetianus* isolée sur polyéthylèneglycol (Schink et Stieb, 1983) et pour *P. carbinolicus* (Schink, 1984). D'autres souches anaérobies non sulfatoréductrices ont été isolées par Schink (1985); elles sont capables d'utiliser le 1,2-propanediol en culture pure. Certaines de ces souches oxydent le 1,2-propanediol en propionate et acétate. D'autres le convertissent en propionate et propanol (des traces de propionaldéhyde ont été détectées par l'auteur). D'autres encore, décrites par le même auteur, convertissent le 1,2-propanediol en quantité égale de propionate et de n-propanol.

La déshydratation des 1,2-diols est également une propriété métabolique de certains *Lactobacillus* (Schütz et Radler, 1984), *Klebsiella* (Toraya *et al.*, 1979), *Acetobacter*

(Kerstens et de Ley, 1963), *Propionibacterium* (Ichikawa *et al.*, 1985), *Acetobacterium* (Eichler et Schink, 1985) et *P. carbinolicus* (Dubourguier *et al.*, 1986). Les cinq premiers organismes possèdent une diol-déshydratase qui est impliquée dans le métabolisme de l'éthylèneglycol et du 1,2-propanediol. La présence de cette enzyme peut expliquer l'utilisation du 1,2-propanediol par *D. alcoholovorans*. Le propionate est probablement produit par une acétaldéhyde déshydrogénase qui est non spécifique (Dubourguier *et al.*, 1986). si c'est le cas, la dégradation de ce substrat se fera par l'intermédiaire de la propionaldéhyde (Eichler et Schink, 1985; Schink, 1985).

La non production du n-propanol par *D. alcoholovorans* à partir du 1,2-propanediol peut s'expliquer par l'absence de la déshydrogénase, responsable de la réduction de la propionaldéhyde en n-propanol; la présence de cet enzyme a été démontrée chez *Propionibacterium freudenreichii* (Hosoi *et al.*, 1978) et *K. pneumoniae* (Toraya *et al.*, 1979).

Dans le métabolisme du 1,3-propanediol, le 3-hydroxypropionate apparait comme un intermédiaire de la dégradation du 1,3-propanediol. Sa concentration est influencée par la nature de l'accepteur terminal d'électrons. Il est possible que notre souche possède une alcool primaire déshydrogénase et une aldéhyde déshydrogénase, lui permettant l'oxydation des 1,3-diols, comme les deux souches de *P. carbinolicus* décrites par Dubourguier et collaborateurs. (1986). Le 1,3-propanediol est dégradé par l'intermédiaire du 3-hydroxypropionate qui est ensuite converti en acétate probablement par l'intermédiaire de la malonylsemialdéhyde (Doelle, 1975). De plus, l'oxydation du 1,3-propanediol par *D. alcoholovorans* produit deux fois plus de sulfures que celle effectuée par *D. fructosovorans* et *D. carbinolicus* (Tableau 4.15).

Souches	1,3-OH. dégradé (mM)	Produits (mM)		
		3-OHC ₃	C ₂	SH ₂
<i>D. carbinolicus</i>	10	9,8	-	4,4
<i>D. fructosovorans</i>	10	9,6	-	4,5
<i>D. alcoholovorans</i>	10	-	9,7	8,7

1,3-OH, 1,3-propanediol; 3-OHC₃, 3-hydroxypropionate; C₂, acétate; SH₂, sulfures.

Tableau 4.15 Produits de la dissimilation du 1,3-propanediol en présence de sulfate (15mM).

Il est important de souligner le fait que le 3-hydroxypropionate constitue seulement un intermédiaire (converti ensuite en acétate) dans le métabolisme du 1,3-propanediol par *D.alcoholovorans*. Par conséquent, Ceci suppose que, contrairement à *D.carbinolicus* et *D.fructosovorans* (Tableau 4.15), notre souche possède probablement les voies et les équipements enzymatiques supplémentaires, pour la synthèse de l'acétate à partir du 3-hydroxypropionate. Chez *D.carbinolicus* et *D.fructosovorans*, l'enzyme responsable de l'attaque de la fonction alcool primaire du 3-hydroxypropionate manquerait ou serait inhibée par le groupement carbonyle comme l'ont observé Kersters et de Ley (1963) chez *Acetobacter* lors de l'inhibition d'une alcool secondaire déshydrogénase par la proximité d'une fonction alcool secondaire d'un groupement carbonyle. Mais puisque les deux souches utilisent le lactate (Nanninga et Gottschal, 1986,1987; Ollivier *et al.*, 1988), cette hypothèse semble improbable.

La stoechiométrie obtenue à partir de la dégradation du 1,3-propanediol par *D.alcoholovorans* et la production d'acétate en présence de sulfate suggèrent que cette souche possède les mêmes voies et enzymes que *Desulfovibrio* souche OttPd1, pour laquelle des activités enzymatiques et une voie hypothétique ont été établies (Oppenberg et Schink, 1989).

En se basant sur notre étude physiologique, nous proposons la même voie que celle avancée par Oppenberg et Schink, en y apportant des modifications pour expliquer les stoechiométries et le rendement de croissance obtenus avec *D.alcoholovorans* d'une part et le métabolisme de *D.fructosovorans* et *D.carbinolicus* sur 1,3-propanediol d'autre part (Fig. 4.22).

Selon cette voie hypothétique, 2 ATP sont synthétisés par mole de 1,3-propanediol oxydée en acétate; ces 2 ATP sont consommés pour activer 1 mole de sulfate. De même, selon cette même voie, chez *D.fructosovorans* et *D.carbinolicus*, 1 mole d'ATP est synthétisée par mole de 1,3-propanediol convertie en 3-hydroxypropionate; cet ATP est consommé pour activer 0,5 moles de sulfate. Ceci laisse entendre que, lors de l'oxydation du 1,3-propanediol en acétate par *D.alcoholovorans*, ou la conversion de ce substrat en 3-hydroxypropionate par *D.fructosovorans* et *D.carbinolicus*, il n'y a pas de gain net d'ATP au niveau du substrat. Il aurait fallu déterminer les rendements de croissance de *D.fructosovorans* et *D.carbinolicus* sur 1,3-propanediol pour vérifier la validité de cette hypothèse.

Dans tous les cas, tous les substrats testés semblent être convertit en acides et les équivalents réducteurs générés lors de cette conversion sont transférés pour réduire le sulfate en sulfures. Ces résultats sont en accord avec la théorie du recyclage d'hydrogène, énoncée pour quelques espèces du genre *Desulfovibrio* (Odom et Peck, 1981b; Peck et Odom, 1984). Ceci a été vérifié dans nos expériences en utilisant *M. hungatei* comme accepteur terminal d'électrons.

Nos résultats montrent que la dégradation anaérobie par *D.alcoholovorans* de ces composés réduits, nécessite la présence d'un accepteur terminal d'électrons. Ceci est en accord avec le concept selon lequel la dégradation anaérobie des produits réduits de fermentation tels que les alcools ou les acides gras, requiert un accepteur terminal d'électrons comme le sulfate (Widdel, 1988), ou une association syntrophique avec un organisme utilisateur d'hydrogène tel que par exemple, une bactérie méthanogène (Bryant *et al.*, 1967; McInerney *et al.*, 1979). Ils sont aussi en accord avec les résultats rapportés par Eichler et Schink (1984) concernant l'oxydation des alcools aliphatiques primaires.

D'une façon générale, quelque soit le substrat testé, la vitesse de fermentation dépend de la nature de l'accepteur terminal d'électrons (Cord-Ruwisch, 1987). En outre, il est important de souligner l'intérêt de remplacer un accepteur terminal d'électrons de haut potentiel ($E^{\circ} \text{APS/AMP+HSO}_3^- = -60 \text{ mV}$, $E^{\circ} \text{HSO}_3^-/\text{HS}^- = -116 \text{ mV}$) par un accepteur de bas potentiel tel qu'une bactérie méthanogène hydrogénotrophe ($E^{\circ} \text{CO}_2 / \text{CH}_4 = -238 \text{ mV}$). C'est en effet, un moyen pratique pour déceler des déviations de voies métaboliques (donc des équipements enzymatiques), qu'on n'aurait pas pu observer en utilisant un accepteur de haut potentiel. Ainsi des transferts interspécifiques d'hydrogène incomplets, par réduction partielle des intermédiaires du métabolisme du 1,2-propanediol et 1,3-propanediol peuvent être mis en évidence.

Le plus haut rendement de croissance (14,5 g/mole) obtenu avec *D.alcoholovorans* en culture pure et en présence de sulfate, l'a été sur 1,3-propanediol. Un rendement intermédiaire (13,6 g/mole) a été obtenu avec le glycérol. Le plus bas rendement (10,4 g/mole) a été obtenu avec le 1,2-propanediol.

La stoechiométrie obtenue sur glycérol et la conversion exclusive du glycérol en acétate, qui sont en accord avec les résultats obtenus sur glycérol pour deux souches marines de *Desulfovibrio*, pour lesquelles les voies et les enzymes impliquées dans la conversion du glycérol ont été déterminées (Kremer et Hansen, 1987), suggèrent que *D.alcoholovorans* possède les mêmes équipements enzymatiques et donc les mêmes voies métaboliques pour oxyder le glycérol en acétate. Par contre, le rendement de croissance obtenu avec le glycérol en présence de sulfate (13,6 g/mole de substrat) est légèrement supérieur à celui rapporté par ces mêmes auteurs pour *Desulfovibrio* sp. souche 20020, et inférieur à celui rapporté pour *Desulfovibrio* sp. souche 20028 Ceci est dû probablement à des énergies de maintenance différentes.

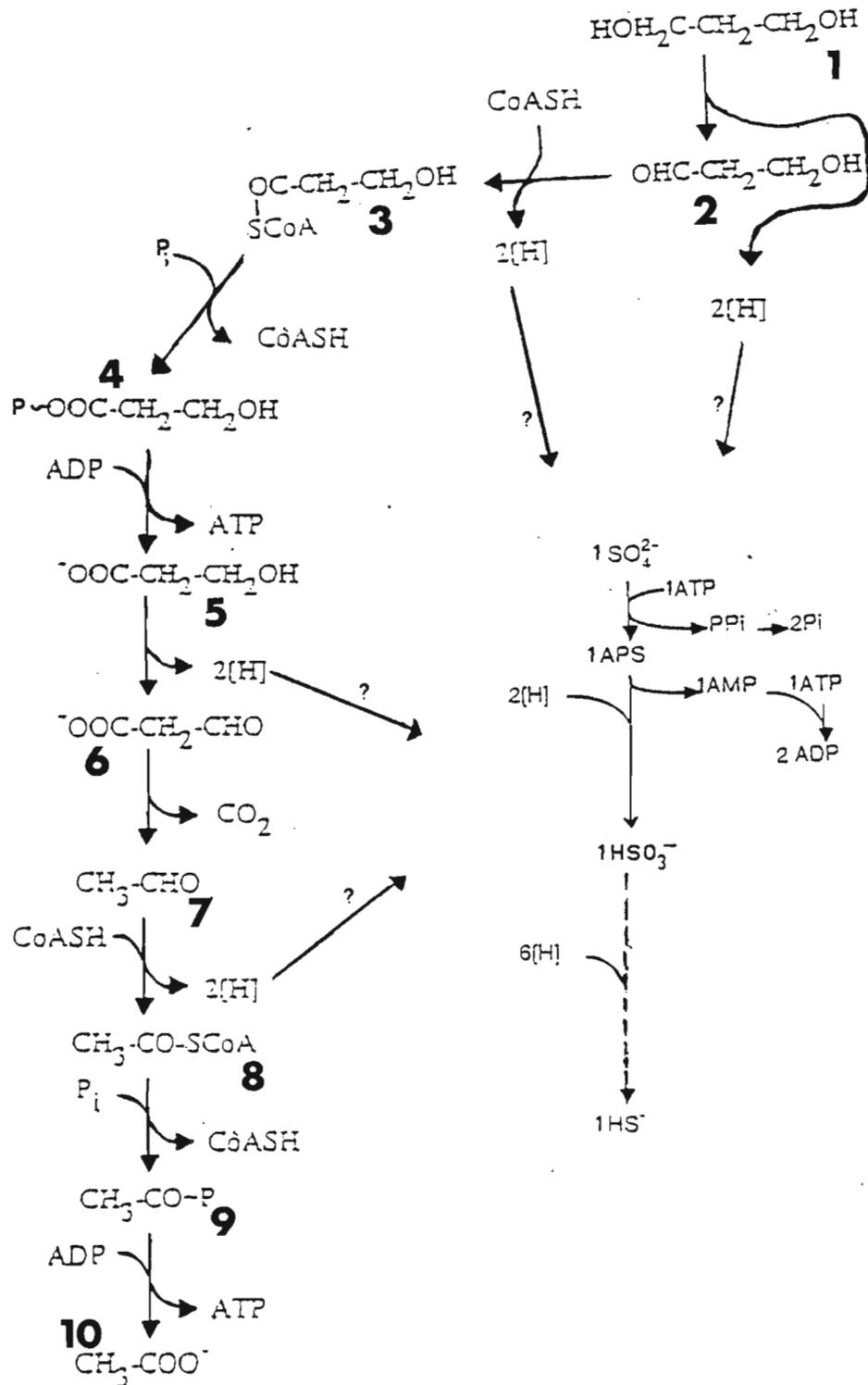


Fig. 4.22 Voie hypothétique de dissimilation du 1,3-propanediol par les espèces du genre *Desulfovibrio*. A comparer avec la voie proposée par Oppenberg et Schink (1989), mentionnée dans le paragraphe 1.2 du chapitre 1-2. Les chiffres correspondent aux noms des composés suivants: 1, 1,3-propanediol; 2, 3-hydroxypropionaldéhyde; 3, 3-hydroxypropionyl-CoA; 4, 3-hydroxypropionate-phosphate; 5, 3-hydroxypropionate; 6, malonate semi-aldéhyde; 7, acétaldéhyde; 8, acétylCoA; 9, acétyl-phosphate; 10, acétate.

Chapitre 4-6

Dissimilation du glycérol par les espèces du genre *Desulfovibrio*

1. INTRODUCTION

Avant d'aborder ce dernier chapitre, il est utile de rappeler ce qui a été rapporté dans la littérature sur la dégradation du glycérol et du 1,3-propanediol par *D.carbinolicus* et *D.fructosovorans*. Ces deux bactéries dissimulent le glycérol en 1,3-propanediol et 3-hydroxypropionate, en l'absence de sulfate (Nanninga et Gottschal, 1986; Ollivier *et al.*, 1988); en présence de sulfate, *D.carbinolicus* oxyde le glycérol en 3-hydroxypropionate (Nanninga et Gottschal, 1986, 1987), par contre *D.fructosovorans* oxyde ce substrat en acétate (Ollivier *et al.*, 1988). Le 1,3-propanediol est converti en 3-hydroxypropionate par les deux espèces (Nanninga et Gottschal, 1987; chapitres 4-2 et 4-5). Il est donc surprenant de constater que la seule différence métabolique qui existe entre les deux souches, est la nature du produit final de conversion du glycérol. Ceci nous amène à poser un certain nombre de questions :

1- Est-ce que le 3-hydroxypropionate constitue un intermédiaire de la conversion du glycérol en acétate par *D.fructosovorans* ?

2- Dans ce cas, *D.carbinolicus* manque-t'il d'équipement enzymatique pour effectuer ce métabolisme ?

3- Si c'est le cas, pourquoi le 1,3-propanediol est seulement converti en 3-hydroxypropionate par *D.fructosovorans* ?

2. DISSIMILATION DU GLYCEROL PAR LES ESPECES DU GENRE *DESULFOVIBRIO* EN PRESENCE DE SULFATE OU EN ASSOCIATION AVEC *METHANOSPIRILLUM HUNGATEI*

Dans le but de répondre à ces questions, nous avons testé la dégradation du glycérol en présence d'un accepteur terminal d'électrons de haut potentiel, le sulfate (adenylylsulfate/ $\text{HSO}_3^- + \text{AMP}$, $E^{\circ} = -60 \text{ mV}$, $\text{HSO}_3^- / \text{HS}^-$, $E^{\circ} = -116 \text{ mV}$) et d'un accepteur terminal d'électrons de plus bas potentiel ($\text{CO}_2 / \text{CH}_4$, $E^{\circ} = -238 \text{ mV}$). Les potentiels rédox des couples H_2 / H^+ et NAD / NADH sont respectivement de -414 mV et -340 mV . Le fumarate aurait pu être choisi (Fumarate $^{2-} / \text{succinate}^{2-}$, $E^{\circ} = +33 \text{ mV}$) comme accepteur terminal d'électrons de haut potentiel, mais il n'est pas utilisé comme tel par *D.carbinolicus* (Nanninga et Gottschal, 1987).

L'emploi de *M.hungatei* a servi à démontrer d'une part, qu'un composé réduit tel que le glycérol peut être utilisé par transfert interspécifique d'hydrogène et à mettre en évidence d'autre part l'existence éventuelle de déviations métaboliques possibles de la dégradation du glycérol par les espèces étudiées. Une autre espèce du genre *Desulfovibrio* capable d'oxyder le glycérol (voir Fig. 4.23), *Desulfovibrio* sp. souche M, a été utilisée comme témoin, pour vérifier l'existence d'un transfert d'hydrogène dans le cas d'associations syntrophiques entre les bactéries sulfatoréductrices et *M.hungatei*.

La souche M oxyde le glycérol en acétate, quelque soit l'accepteur terminal d'électrons. La concentration de sulfures (Fig. 4.23a) ou de méthane (Fig. 4.23b) est plus importante que dans le cas de la conversion du glycérol par *D.carbinolicus*. Un taux maximum de croissance de $0,061 \text{ h}^{-1}$ a été calculé à partir de la disparition du glycérol. Le rendement maximum de croissance de cette espèce, en présence de sulfate et en culture pure, est de 13,9 g poids sec par mole de glycérol dégradé. Le taux maximum de croissance de la coculture est de $0,002 \text{ h}^{-1}$.

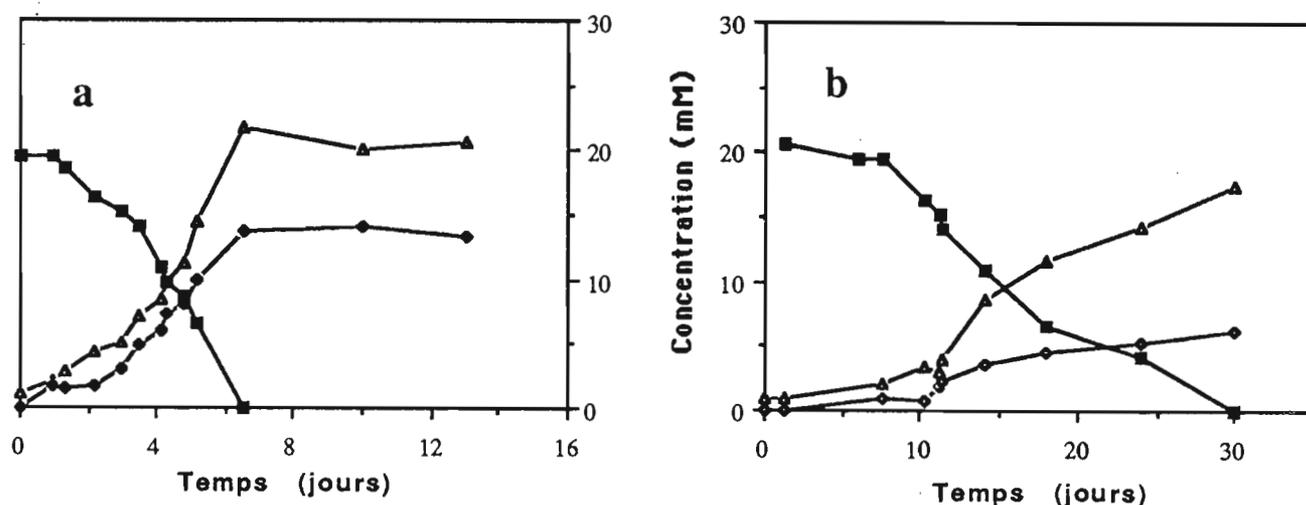


Fig. 4.23 Cinétique de dégradation du glycérol par *Desulfovibrio* sp. souche M en présence de sulfate en culture pure (a), et en association avec *M. hungatei* en l'absence de sulfate (b). Légendes : ■, Glycérol; △, Acétate; ◆, Sulfures; ◇, Méthane.

En présence de sulfate, *D.carbinolicus* convertit le glycérol en 3-hydroxypropionate, avec production de sulfures (Fig. 4.24a).

Un taux maximum de croissance de $0,063 \text{ h}^{-1}$ a été calculé à partir de la disparition du glycérol.

Le rendement maximum de croissance de cette espèce, en présence de sulfate et en culture pure, est de 8,95 g poids sec par mole de glycérol dégradé.

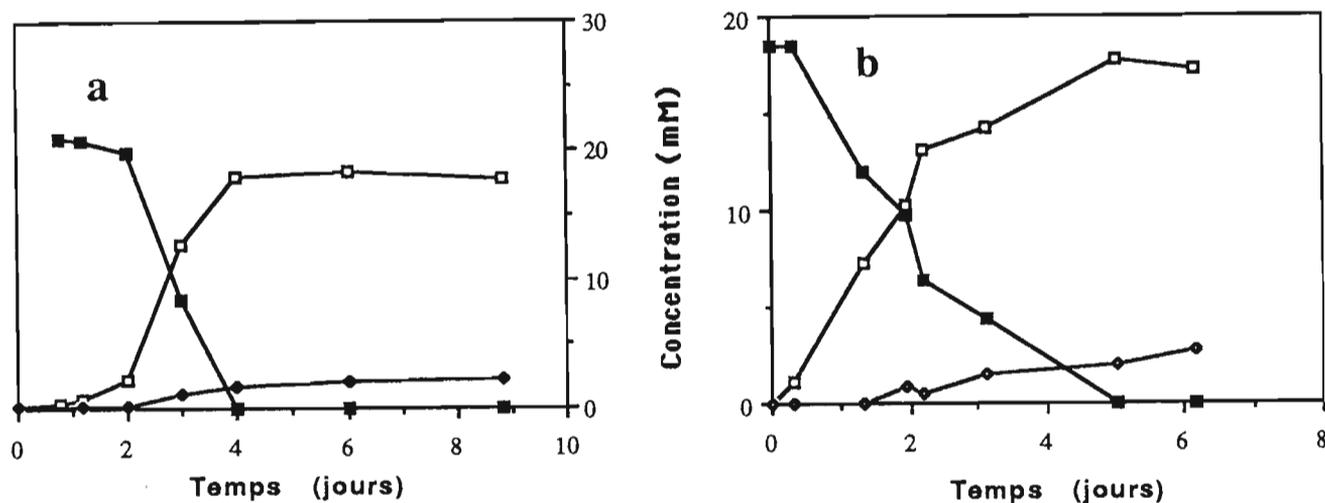
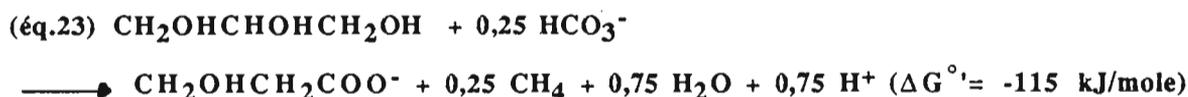


Fig. 4.24 Cinétique de dégradation du glycérol par *Desulfovibrio carbinolicus* en présence de sulfate en culture pure (a), et en association avec *M. hungatei* en l'absence de sulfate (b). Légendes : ■, glycérol; □, 3-hydroxypropionate; ◆, sulfures ◇, méthane.

En présence de *M. hungatei*, le même acide est produit, avec accumulation de méthane (Fig. 4.24b). Le taux maximum de croissance d'une telle coculture est de $0,014 \text{ h}^{-1}$; le rendement maximum de croissance de cette association bactérienne est de $6,00 \text{ g poids sec par mole}$ de glycérol dégradé (Tableau 4.16). Sur la base des résultats du tableau 4.16, la stoechiométrie de dégradation du glycérol par *D. carbinolicus* en association avec *M. hungatei* peut s'écrire selon l'équation suivante :



D. fructosovorans est également capable de transférer ses équivalents réducteurs sous forme d'hydrogène à *M. hungatei*. Par contre, l'acide produit qui est de l'acétate lorsque le sulfate est présent (Fig. 4.25a), est dans ce cas, du 3-hydroxypropionate (Fig. 4.25b).

La production exclusive de 3-hydroxypropionate par la coculture, montre que les voies métaboliques (et donc les activités enzymatiques) utilisées pour dégrader le glycérol par *D. fructosovorans* dépendent de la nature de l'accepteur terminal d'électrons. De petites quantités de 1,3-propanediol ont été également détectées.

La production de 1,3-propanediol n'est pas toujours observée. Lorsqu'on ajoute à cette même coculture du sulfate (20 mM), ni les sulfures ou l'acétate ne sont produits (Fig. 4.25b). Le taux maximum de croissance de *D. fructosovorans* en présence de sulfate en culture pure, calculé à partir de la disparition du glycérol, est de $0,057 \text{ h}^{-1}$; le rendement maximum de croissance

est de 8,88 g poids sec par mole de glycérol dégradé; celui de la coculture est comparable (6,00g poids sec par mole de glycérol dégradé) à celui calculé pour *D.carbinolicus* cultivé dans les mêmes conditions (Tableau 4.16).

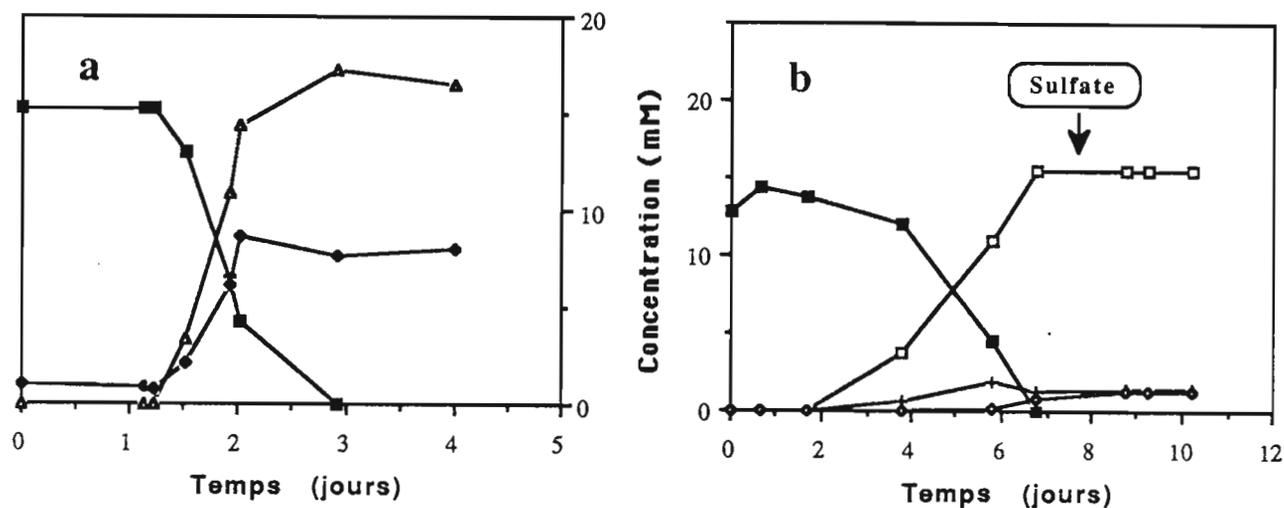
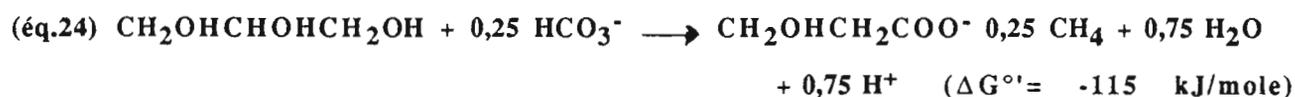


Fig. 4.25 Cinétique de dégradation du glycérol par *Desulfovibrio fructosovorans* en présence de sulfate en culture pure (a), et en association avec *M.hungatei* en l'absence de sulfate (b). Légendes : ■, glycérol; Δ, acétate; □, 3-hydroxypropionate; +, 1,3-propanediol; ◆, sulfures; ◇, Méthane. La flèche correspond à l'addition de sulfate (voir texte)

La stoechiométrie de dégradation du glycérol par *D.fructosovorans* en association avec *M.hungatei* peut s'écrire selon l'équation suivante (voir Tableau 4.16) :



3. EFFET DES REPIQUAGES SUCCESSIFS SUR LE METABOLISME DU GLYCEROL PAR LES ESPECES DU GENRE *DESULFOVIBRIO*

Fortuitement, après plusieurs repiquages, une irrégularité dans le métabolisme du glycérol a été observée chez *D.fructosovorans* et *D.carbinolicus* ; les produits terminaux sont dans les deux cas un mélange d'acétate et de 3-hydroxypropionate (Fig. 4.26).

Tableau 4.16 Stoechiométries ^a et rendements de croissance de D. carbinolicus et de D. fructosovorans sur glycérol en association avec M. hungatei en l'absence de sulfate

1	2	3	4	5	6	7	8
Glycérol dégradé	DO	Matériel cellulaire	Rendement	Matériel cellulaire exprimé en acétate	3-OHC3	CH4	e- c retrouvés
mM	580	mg/l	g/mol	mM	mM	mM	%
<u>D. carbinolicus</u>							
4,17	0,07	25,00	6,00	0,65	3,55	1,10	97
8,60	0,13	46,43	5,40	1,20	7,10	1,90	91
12,12	0,18	64,28	5,18	1,67	10,18	2,32	91
17,20	0,23	82,14	4,78	2,13	14,80	3,45	93
<u>D. fructosovorans</u>							
5,00	0,06	30,00	6,00	0,78	4,36	1,54	101
10,00	0,10	50,00	5,00	1,30	8,65	2,43	95
15,00	0,15	75,00	5,00	1,95	12,40	3,33	91
20,00	0,20	100,00	5,00	2,60	16,10	4,21	88

3-OHC3, 3-hydroxypropionate; a, le bicarbonate est présent

b, calculé à partir de la colonne 3 et l'équation suivante : $17\text{CH}_3\text{COO}^- + 11\text{H}_2\text{O} \rightarrow 8(\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3) + 2\text{HCO}_3^- + 15\text{OH}^-$ ainsi, 0,0206 mol d'acétate sont co sommées pour la synthèse d' 1 mg de matériel cellulaire (Widdel et Pfennig, 1977). c, calculé à partir des colonnes 1, 5, 6 et 7.

De plus, le temps de latence de toutes les souches (*D.fructosovorans*, *D.carbinolicus*, *Desulfovibrio* sp. souche M, *Desulfovibrio alcoholovorans* et *Desulfovibrio* sp. souche DFG) augmente et paradoxalement on assiste même à une perte d'efficacité dans l'utilisation du glycérol (voir paragraphe 3).

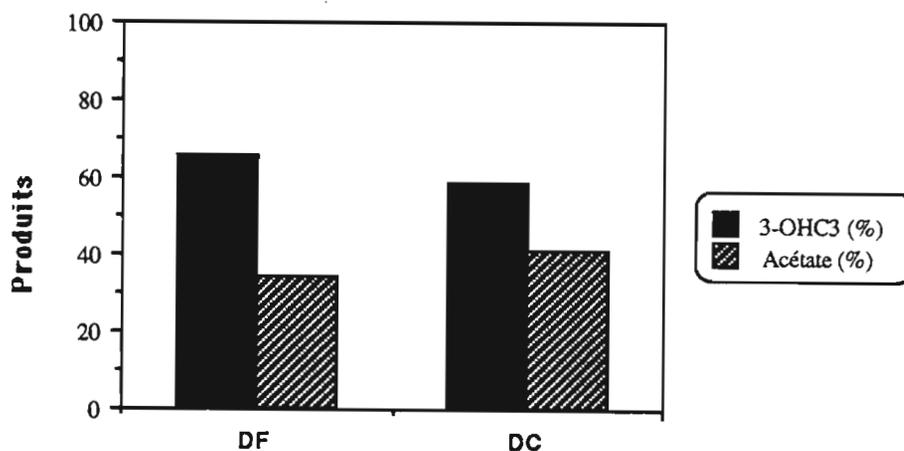
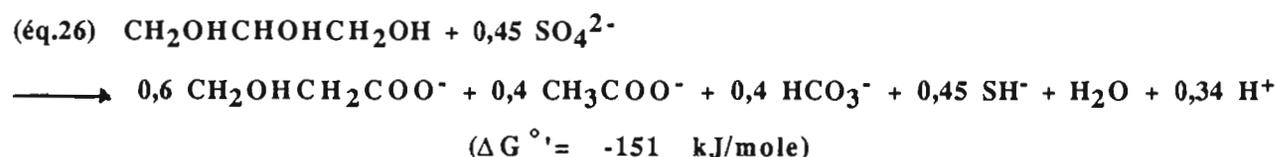
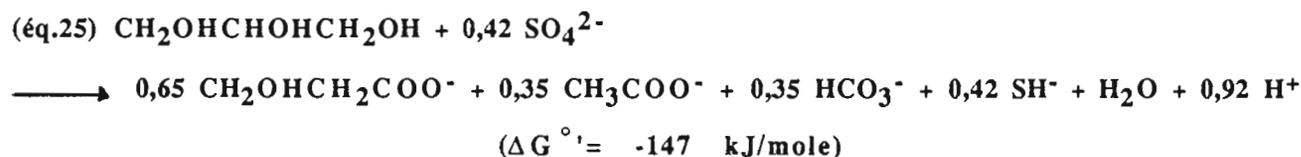


Fig 4.26 Dissimilation du glycérol (10 mM) en présence de sulfate (15 mM) par *D.fructosovorans* (DF) et *D.carbinolicus* (DC). Elle produisent respectivement 4,3 et 4,6 mM environ de sulfures. Les résultats sont la moyenne de 4 déterminations. L'écart entre les différents essais est inférieur à 5%

La dégradation du glycérol, en présence de sulfate par *D.fructosovorans* (éq.25) et par *D.carbinolicus* (éq.26) peut s'écrire selon les équations suivantes :



4. EFFET DU LACTATE SUR LA DISSIMILATION DU GLYCEROL PAR LES ESPECES DU GENRE *DESULFOVIBRIO*

Comme il a été précisé dans le paragraphe 2, au fur et à mesure des repiquages sur glycérol+sulfate, on assiste à une augmentation du temps de latence et même à une perte d'efficacité de conversion de ce substrat. Cette efficacité est restaurée de deux manières :

*lorsqu'on précultive toutes les souches en milieu lactate+sulfate, puis en milieu glycérol+sulfate, le temps de latence est raccourci et l'efficacité est restaurée (Fig. 4.27).

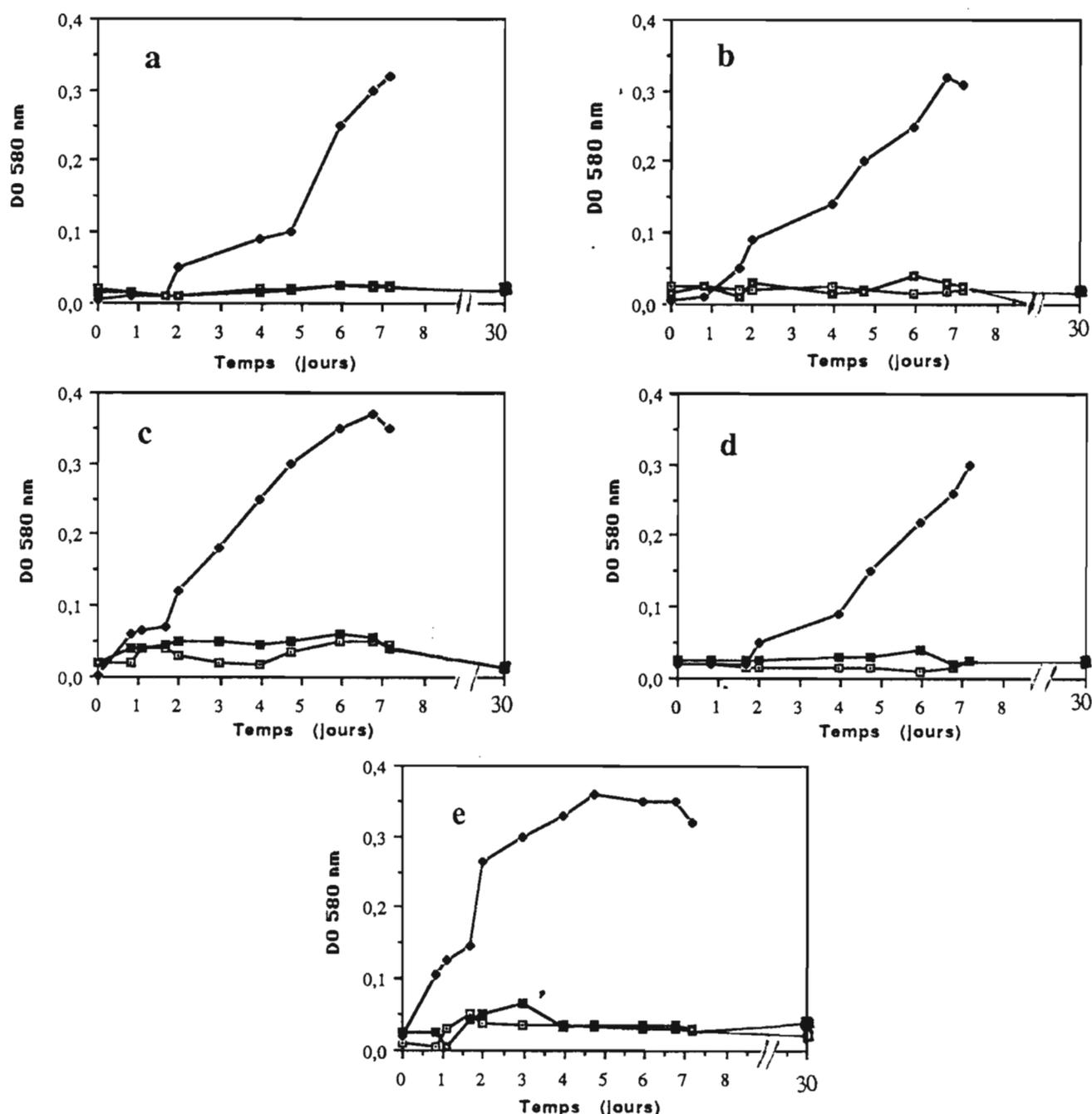


Fig. 4.27 Effet de la précroissance sur lactate + sulfate sur l'utilisation du glycérol en présence de sulfate par *D. carbinolicus* (a), *D. fructosovorans* (b), *Desulfovibrio* sp. souche M (c), *D. alcoholovorans* (d) et *Desulfovibrio* sp. souche DFG (e). Légendes : ■, glycérol; □, glycérol + acétate (5mM); ◆, cellules précultivées en milieu lactate + sulfate et repiquées en milieu glycérol + sulfate.

* lorsqu'on cultive toutes les souches en milieu glycérol+lactate+sulfate, le glycérol se dégrade parallèlement au lactate et sa dégradation s'arrête lorsque le lactate est épuisé.

La Figure 4.28 rapporte la cinétique de dégradation du glycérol et du lactate par *D.alcoholovorans* et *Desulfovibrio* sp.souche DFG.

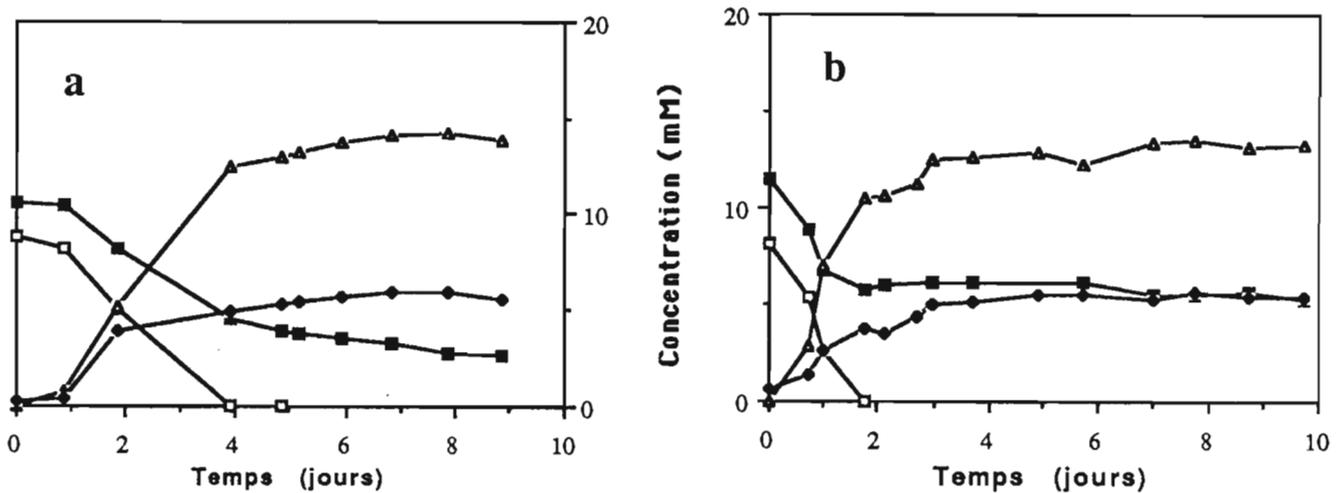


Fig. 4.28 Effet du lactate sur la conversion du glycérol en présence de sulfate par *Desulfovibrio* sp. souche DFG (a) et *Desulfovibrio alcoholovorans* (b). Légendes : ■, glycérol; □, lactate; Δ, acétate; ◆, sulfures.

5. EFFET DU 1,2-PROPANEDIOL SUR LA DISMUTATION DU GLYCEROL PAR *D.FRUCTOSOVORANS* ET *D.CARBINOLICUS*

La concentration en 1,3-propanediol obtenue en présence de 1,2-propanediol est inférieure à celle obtenue pour *D.fructosovorans* et *D.carbinolicus* à partir du glycérol comme seul substrat carboné (Tableau 4.17).

De plus, la production de propionate et de n-propanol est uniquement observée lorsque le 1,2-propanediol est présent dans le milieu de culture contenant du glycérol. Rappelons que *D.fructosovorans* et *D.Carbinolicus* n'utilisent pas le 1,2-propanediol comme source d'énergie (chapitre 4-2; Nanninga et Gottschal, 1987).

Produits	<i>D. fructosovorans</i>		<i>D. carbinolicus</i>	
	-1,2-OH	+1,2-OH	-1,2-OH	+1,2OH
1,3-propanediol	12,8	8,4	11,2	9,0
1,2-propanediol	-	10,4	-	10,2
3-hydroxypropionate	9,4	9,8	10,5	10,3
n-propanol	-	9,2	-	6,8
propionate	-	1,8	-	3,7

1,2-OH, 1,2-propanediol; la concentration initiale du glycérol et du 1,2-propanediol est de 20 mM

Tableau 4.17 Effet du 1,2-propanediol sur la dismutation du glycérol.

6. EFFET DE LA DISMUTATION DU GLYCEROL SUR LA FERMENTATION DU FRUCTOSE PAR *D.FRUCTOSOVORANS*

Comme le montre les résultats reportés dans le Tableau 4.18, la production d'éthanol par *D.fructosovorans* est inhibée lorsque le glycérol est présent dans le milieu de culture contenant du fructose. De plus, en présence de glycérol, la concentration en acétate augmente.

Substrats(mM)	Produits (mM)				
	acétate	succinate	éthanol	1,3-poppanediol	3-hydroxypropionate
Fructose (5)	2,0	4,6	1,5	0,0	0,0
Glycérol (10)	0,0	0,0	0,0	4,6	5,0
Fructose (5) + Glycérol (10)	3,2	4,5	0,0	5,0	5,1

Tableau 4.18 Effet de la dismutation du glycérol sur la fermentation du fructose par *D.fructosovorans*.

6. Discussion

Le glycérol a été récemment identifié comme un substrat pour certaines espèces du genre *Desulfovibrio* (Stams *et al.* 1985, Nanninga et Gottschal, 1986, 1987; Ollivier *et al.*, 1988; Esnault *et al.*, 1988; Qatibi *et al.*, 1990). Il est utilisé en présence de sulfate ou en association avec une bactérie méthanogène (Qatibi et Garcia, 1989; Qatibi *et al.*, 1989).

Quelque soit l'accepteur terminal d'électrons, *D.carbinolicus* d'une part et *Desulfovibrio* sp. souche M ou *D.alcoholovorans* d'autre part (chapitre 4-5) dégradent respectivement le glycérol en 3-hydroxypropionate et acétate. Contrairement aux espèces précédentes, *D.fructosovorans* oxyde le glycérol en acétate en présence de sulfate; par contre, en présence de *M.hungatei*, l'acide produit est le 3-hydroxypropionate, montrant ainsi l'effet de la nature de l'accepteur d'électrons sur la voie empruntée pour dégrader le glycérol (voir discussion, chapitre 4-5). Le 3-hydroxypropionate ne constitue pas un intermédiaire mais un produit final de la dégradation du glycérol; l'addition de sulfate à la coculture (Fig.4.25b) le prouve, en ce sens que *D.fructosovorans* n'utilise pas le 3-hydroxypropionate; la production de cet acide a été également observée lors de la dégradation du 1,3-propanediol en présence de sulfate par *D.fructosovorans*. Une première possibilité est l'absence d'équipement enzymatique nécessaire pour convertir ce substrat en acétate, ou un problème de perméabilité membranaire (Fig.4.25b).

Au fur et à mesure des repiquages sur glycérol+sulfate, *D.fructosovorans* et *D.carbinolicus* finissent par produire un mélange d'acétate et de 3-hydroxypropionate. Le rapport acétate/3-hydroxypropionate est variable d'un test à l'autre et il dépend probablement soit du pH soit du potentiel rédox du milieu. Il est donc probable que les activités enzymatiques impliquées dans la conversion du glycérol en acétate et en 3-hydroxypropionate, soient influencées par les conditions physico-chimiques du milieu.

Dans tous les cas, et quel que soient les conditions, les équipements enzymatiques responsables de la synthèse du 3-hydroxypropionate et de l'acétate existent chez ces deux espèces. De plus, contrairement à ce que l'on observe avec *D.alcoholovorans* sur 1,3-propanediol en présence de sulfate (chapitre 4-5), il est improbable que *D.carbinolicus* et *D.fructosovorans* possèdent l'équipement enzymatique supplémentaire pour convertir le 3-hydroxypropionate en acétate.

Une explication possible de ce changement de métabolisme chez ces deux espèces serait qu'en présence de sulfate, *D.fructosovorans* accumule initialement uniquement de l'acétate

($\Delta G^{\circ} = -225,2$ kJ/mole); la production de 3-hydroxypropionate comme produit supplémentaire peut s'expliquer par un besoin énergétique moins important ($\Delta G^{\circ} = -147$ kJ/mole, voir éq. 25) que celui obtenu en oxydant complètement le glycérol en acétate.

Par contre, la production d'acétate comme produit supplémentaire, en présence de sulfate par *D.carbinolicus* peut s'expliquer par un besoin énergétique plus important ($\Delta G^{\circ} = -151$ kJ/mole, voir éq. 26) que s'il y a eu production que du 3-hydroxypropionate ($\Delta G^{\circ} = -119,2$ kJ/mole) pour utiliser le glycérol.

Ceci se traduit par une meilleure adaptation de *D.fructosovorans* que *D.carbinolicus* sur glycérol.

Le rendement de croissance calculé sur glycérol en présence de sulfate, pour *D.carbinolicus* (8,95 g poids sec /mole) est du même ordre de grandeur que celui calculé pour *D.fructosovorans* (8,88g poids sec/mole). Ces rendements sont plus faibles que ceux calculés pour *Desulfovibrio* sp. souche M (13,9 g poids sec / mole) et *D.alcoholovorans* (13,6 g poids sec / mole, voir chapitre 4-5).

De plus, des rendements de croissances de 6,00 g poids sec/ mole de glycérol dégradée en 3-hydroxypropionate ($\Delta G^{\circ} = -115$ kJ/mole), ont été calculés pour *D.fructosovorans* et *D. carbinolicus* en coculture avec *M.hungatei*

Ceci implique que la dégradation du glycérol en acétate, est plus énergétique que celle produisant du 3-hydroxypropionate.

Néanmoins, au fur et à mesure des repiquages sur glycérol + sulfate, *D.fructosovorans*, *D.carbinolicus*, *Desulfovibrio* sp. souche M, *Desulfovibrio* sp. souche DFG et *D.alcoholovorans* perdent l'efficacité à dégrader le glycérol, même en présence d'acétate comme source de carbone. Comme on l'a démontré, cette activité est restaurée en repiquant toutes ces souches en milieu lactate + sulfate d'abord, puis en milieu glycérol+sulfate (Fig.4.27). De même, lorsqu'on cultive *Desulfovibrio* sp. souche DFG et *D.alcoholovorans* sur glycérol + sulfate, en présence de lactate, le glycérol est dégradé par les deux souches jusqu'à ce que le lactate soit épuisé du milieu de culture (Fig.4.28).

Il est possible qu' une partie de l'énergie libérée lors de la dégradation du lactate ait été utilisée pour renforcer le pool d'ATP dans les cellules, permettant ainsi à ces espèces d'affranchir l'étape d'activation du glycérol en glycérol-3-phosphate (Kremer et Hansen, 1987). Pour confirmer cette hypothèse, il aurait fallu étudier l'évolution du pool d'ATP cellulaire (aisément réalisable en RMN P_{31}) en fonction des repiquages des cellules en milieux lactate+sulfate et glycérol + sulfate.

L'addition de 1,2-propanediol dans le milieu de culture de *D. fructosovorans* et *D. carbinolicus*, contenant du glycérol sans sulfate, provoque l'abaissement de la concentration du 1,3-propanediol. Forage et Foster (1982), ont rapporté que les glycérol et 1,2-propanediol déshydratases sont induites chez *Klebsiella pneumoniae* poussant sur glycérol. Dans le cas de *D. fructosovorans* et *D. carbinolicus*, quand le glycérol et le 1,2-propanediol (non utilisé par *D. fructosovorans* et *D. carbinolicus* comme source d'énergie, Nanninga et Gottschal, 1987, chapitre 4-2)) sont présents, il est possible que les activités déshydratase et déshydrogénase des voies respectives soient induites. Chez *P. freudenreichii* (Hosoi *et al.*, 1978) et *K. pneumoniae* (Toraya *et al.*, 1979), le 1,2-propanediol est déshydraté en propionaldéhyde et, soit réduit en n-propanol par une déshydrogénase à NAD, soit converti par une multitude de voies en propionate (Toraya *et al.*, 1979).

Il est probable qu'un tel processus métabolique soit présent chez *D. fructosovorans* et *D. carbinolicus* et que le 1,2-propanediol ajouté au milieu de culture contenant le glycérol, ait fourni un accepteur d'équivalents réducteurs (acceptés sous forme de NADH, H⁺ par la 3-hydroxypropionaldéhyde pour former le 1,3-propanediol) alternatif pour être métabolisé en propionate et n-propanol. Le même phénomène de "Shunt" a été observé lors de la cofermentation de fructose et de glycérol par *D. fructosovorans*.

Ceci suppose que les équivalents réducteurs, probablement sous forme de NADH, H⁺, ont servi plutôt à réduire la 3-hydroxypropionaldéhyde en 1,3-propanediol (Lin, 1976), que l'acétaldéhyde en éthanol (Cord-Ruwisch, 1987) comme cela a été observé chez *Citrobacter freundii* et *Aerobacter aerogenes* (voir Doelle, 1975).

Quoiqu'aucune détermination d'activité enzymatique n'ait été effectuée, une voie hypothétique de dissimilation du glycérol par *D. fructosovorans* et *D. carbinolicus* est proposée (Fig.4.29).

Cette voie repose uniquement sur nos données physiologiques, et les acquis bibliographiques concernant le métabolisme du glycérol par les bactéries aérobies, chez qui les voies et les enzymes impliquées dans la dégradation du glycérol sont parfaitement connues.

CONCLUSION

L'approche purement microbiologique que j'ai développée en abordant le problème du rôle de la sulfatoréduction dans la digestion anaérobie des déchets de distillation vinicole s'est révélée absolument nécessaire compte tenu du manque d'informations concernant ce type de métabolisme. Ce travail, long et fastidieux en raison des difficultés techniques liées à la culture des bactéries anaérobies strictes (faible taux de croissance, association avec d'autres organismes ...) a contribué à améliorer la connaissance du métabolisme des deux constituants majeurs (lactate et glycérol) de ces déchets. Il concerne deux grandes parties :

La première partie a été consacrée à l'étude de l'importance de chaque groupe bactérien impliqué dans le métabolisme du lactate et ses intermédiaires ainsi que des interrelations existant entre bactéries sulfatoréductrices et méthanogènes. En effet, dans les écosystèmes anaérobies où la charge en matière organique est élevée (comme c'est le cas avec l'écosystème étudié), des concentrations en sulfate même importantes ne sont généralement pas suffisantes pour permettre une oxydation complète de tous les composés carbonés en CO_2 . Dans ce cas, méthanogénèse et sulfatoréduction coexistent et le rapport $\text{CH}_4/\text{H}_2\text{S}$ dépend du rapport entre la quantité de matière organique et la concentration en sulfate. Les BSR sont alors limitées par le sulfate disponible et l'on peut se demander quels sont les substrats qu'elles vont utiliser préférentiellement, et par conséquent quels sont ceux qui restent disponibles pour les méthanogènes. Dans les effluents de distillation vinicole, traités par digestion anaérobie, contrairement à ce qui se passe pour l'hydrogène qui est un substrat commun des bactéries sulfatoréductrices et méthanogènes, le sulfate n'a aucun effet sur la fermentation méthanique de l'acétate; en effet le nombre de BSR poussant sur acétate est largement inférieur à celui estimé pour les bactéries méthanogènes acétoclastes. Par contre, la présence de sulfate accélère la dégradation du propionate en acétate. Le nombre de bactéries syntrophes sur propionate n'a pu être déterminé, mais il est probable qu'il soit moins important que celui déterminé pour les BSR avec le même substrat; ceci pourrait expliquer l'accumulation du propionate souvent observée lors de la digestion anaérobie des effluents vinicoles. Les BSR jouent un rôle significatif dans la dégradation du lactate et sont en compétition avec les bactéries propioniques dont les concentrations sont inférieures à celles des BSR.

Sur les bases de ces résultats, il est possible d'envisager un procédé de digestion anaérobie pour l'optimisation de la fermentation des déchets de distillerie vinicole, impliquant la séparation des phases acidogène et méthanogène.

Les bactéries dominantes dégradant respectivement le lactate et le propionate, ont pu être isolées et caractérisées; elles présentent, par leur métabolisme, leur physiologie ou leur morphologie, une originalité suffisante pour justifier leur description en tant que nouvelle espèce (cas

de *Desulfovibrio minusculus* souche dQ) et sous espèce (cas de *Desulfovibrio elongatus* subspecies *Narbonense* souche DFC3). D'un côté pratique, étant donné que la souche dFC3 ne requiert aucun facteur de croissance, croît sur un milieu strictement minéral contenant une source d'énergie et le sulfate, et oxyde le propionate en acétate qui peut être utilisé comme substrat par les bactéries méthanogènes telles que *Methanosarcina* ou *Methanotrix*, nous permet d'envisager son application dans des cas de digestion anaérobie où le propionate constitue une étape limitante de la méthanisation.

La deuxième partie de ce travail a concerné l'étude du rôle de l'accepteur terminal d'électrons sur la fermentation du glycérol et du 1,3-propanediol, et a abordé le métabolisme de ces composés réduits par les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio*.

les produits de fermentation du glycérol par la culture mixte utilisée pour cette étude, sont le 1,3-propanediol et le propionate. La dégradation anaérobie du glycérol par les bactéries fermentatives pose un problème, à cause de l'état de réduction de ce substrat. Ce problème semble être résolu par les bactéries sulfatoréductrices, qui utilisent le sulfate comme accepteur terminal d'électrons; ainsi, lorsque le rapport carbone/soufre (C/S) est faible, la concentration en 1,3-propanediol formée diminue lors de la dégradation du glycérol par la culture mixte indéfinie.

Il apparaît que les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* jouent un rôle significatif dans la dégradation anaérobie du glycérol; elles sont en compétition avec les bactéries fermentatives, dont les concentrations sont du même ordre. La présence de bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* dans les derniers tubes de numération de bactéries fermentatives sur glycérol peut s'expliquer par la présence, dans les mêmes tubes, de bactéries méthanogènes hydrogénotrophes. En effet, les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* peuvent utiliser le glycérol en association syntrophique avec les bactéries méthanogènes utilisatrices d'hydrogène.

La dégradation anaérobie du 1,3-propanediol est liée à une activité sulfatoréductrice, en ce sens que l'addition de sulfate oriente la dégradation de ce substrat en 3-hydroxypropionate et inhibe la production de propionate par la culture mixte indéfinie. De plus, les bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio* sont capables de dégrader également le 1,2-propanediol en association syntrophique avec une bactérie méthanogène utilisatrice d'hydrogène. Ceci est en accord avec le concept selon lequel la dégradation anaérobie des produits réduits issus de la fermentation classique, tels que les alcools ou les acides gras, requiert habituellement la réduction d'un accepteur terminal d'électrons tel que le sulfate, ou une association syntrophique entre les bactéries utilisant ces produits et, par exemple, une bactérie méthanogène consommatrice des équivalents réducteurs libérés sous forme d'hydrogène pendant la fermentation de ces composés.

Des transferts d'hydrogène incomplets ont été observés à partir de la dégradation du 1,2-propanediol et 1,3-propanediol par *D.alcoholovorans*, cultivée en présence de *Methanospirillum hungatei*.

L'enrichissement sur 1,3-propanediol comme seule source de carbone et d'énergie conduit à l'isolement de bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio*. Par conséquent, ces bactéries peuvent jouer un rôle important dans la dégradation de ce composé en intervenant directement dans ce métabolisme dans les milieux pauvres en sulfate, et ceci de la même manière que l'association syntrophique entre l'organisme "S" et *Methanobacterium* MOH sur éthanol. La production de propionate observée dans la même culture d'enrichissement est probablement due à une simple déshydratation non spécifique du 1,3-propanediol. Néanmoins, la présence du microorganisme responsable (souche FS) traduit son importance écologique, notamment sa participation dans la production de propionate souvent observée dans les écosystèmes méthanogènes traitant des effluents de distilleries vinicoles.

L'accepteur terminal d'électrons semble jouer un rôle important dans la compétition pour le glycérol; ainsi, en présence de sulfate, *Desulfovibrio* sp. souche DFG entre en compétition directe avec *Sporomusa acidovorans* pour ce substrat, et ceci même lorsque la concentration en substrat n'est pas limitante. Ceci se traduit sur le plan écologique par le fait que tant que le sulfate est présent, la dégradation du glycérol par *S.acidovorans* est improbable dans les écosystèmes traitant les déchets de distillation vinicole.

L'isolement et la caractérisation de bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio*, dominantes sur glycérol et 1,3-propanediol, nous a permis de décrire de nouvelles espèces comme *Desulfovibrio alcoholovorans*, par leur physiologie, leur métabolisme et leur performance à dégrader des composés inhabituels tels que le glycérol et le 1,3-propanediol.

La production d'acétate par *D.alcoholovorans* en culture pure à partir du glycérol ou du 1,3-propanediol, est en contradiction avec l'hypothèse selon laquelle le 3-hydroxypropionate serait produit lors de la dégradation du glycérol par la culture mixte indéfinie. De même, en présence de sulfate, le 1,3-propanediol est d'abord dégradé en 3-hydroxypropionate qui est ensuite oxydé en acétate. Ceci montre la complexité de l'écosystème étudié, et illustre les modifications métaboliques qui interviennent selon que les bactéries sont en culture pure ou en culture mixte; c'est par exemple, le cas de *Desulfovibrio fructosovorans* qui produit exclusivement du 3-hydroxypropionate à partir du glycérol lorsqu'elle est cultivée en présence de *Methanospirillum hungatei*.

Contrairement à ce qu'on observe avec *D.alcoholovorans*, le 3-Hydroxypropionate ne peut être converti en acétate chez *D.fructosovorans* et *D.carbinolicus*. Ceci est dû probablement à l'absence d'équipements enzymatiques responsables de la conversion du 3-hydroxypropionate en acétate chez ces espèces.

Après plusieurs repiquages, on constate que *D.carbinolicus* et *D.fructosovorans* convertissent le glycérol en un mélange de 3-hydroxypropionate et d'acétate lorsque le sulfate est présent. La production d'acétate par *D.carbinolicus* et la production de 3-Hydroxypropionate par *D.fructosovorans* en milieu glycérol+sulfate démontrent l'existence de deux voies possibles de dégradation du glycérol chez ces espèces. Ce changement de métabolisme peut s'expliquer par des besoins énergétiques différents chez les deux espèces. Il n'est pas surprenant dans la mesure où il peut expliquer en partie la difficulté que rencontrent toutes les espèces testées (*D.alcoholovorans*, *D.fructosovorans*, *D.carbinolicus*, *Desulfovibrio* sp. souche M et *Desulfovibrio* sp. souche DFG) à utiliser le glycérol après plusieurs repiquages en milieu glycérol+sulfate.

On peut ainsi affirmer, contrairement au lactate (substrat commun des BSR) que le glycérol ne constitue pas un substrat de choix pour ces bactéries.

L'efficacité de la conversion du glycérol peut être restaurée pour toutes les souches en les précultivant d'abord en milieu lactate+sulfate puis en milieu glycérol+sulfate. Ce même phénomène est observé lorsqu'on cultive *D.alcoholovorans* et *Desulfovibrio* sp. souche DFG en milieu glycérol+sulfate contenant le lactate comme source d'énergie supplémentaire. Une corrélation reliant le lactate et le pool d'ATP interne serait une explication satisfaisante, en ce sens que le lactate renforcerait le pool d'ATP, permettant à la bactérie de franchir l'étape d'activation du glycérol en glycérol-3-phosphate, ce qui serait vraisemblablement l'étape limitante dans la conversion du glycérol.

Cet effet du lactate sur la conversion du glycérol renforce l'hypothèse de l'implication directe des BSR du genre *Desulfovibrio* dans le métabolisme du glycérol dans l'écosystème étudié. En effet, le lactate et le glycérol constituent approximativement 60% du carbone total dissous de l'effluent traité, dans lequel, le sulfate est également présent.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdollahi, H., Nedwell, D.B.** (1980) Serological characterization within the genus *Desulfovibrio*. Anton Leeuwenhoek J Microbiol 46 : 73-83
- Abeles, R.H., Brownstein, A.M., Randles, C.H.** (1960) B-hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*. Biochim Biophys Acta 41: 530-531
- Abeles, R.H., Lee, H.A., Jr.** (1961) An intramolecular oxidation-reduction requiring a cobamide coenzyme. J Biol Chem 236: 2347-2350
- Abram, J.W., Nedwell, D.B.** (1978a) Inhibition of methanogenesis by sulfate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. Arch Microbiol 117: 89-92
- Abram, J.W., Nedwell, D.B.** (1978b) Hydrogen as a substrate for methanogenesis and sulfate reduction in anaerobic saltmarsh sediment. Arch Microbiol 117: 93-97
- Akagi, J.M.** (1981) Dissimilatory sulfate-reduction : mechanistic aspects. In : Bothe H and Trebst A (Eds) Biology of inorganic nitrogen and sulfur. Springer Verlag, Berlin pp 169-177
- Aketagawa, J., Kojo, K., Kobayashi, K., Ishimoto, M.** (1985a) Comparative immunological studies of sulfite reductases, hydrogenases, and somatic antigens from strains of the genus *Desulfovibrio*. J Appl Microbiol 31: 347-357
- Aketagawa, J., Kobayashi, K., Ishimoto, M.** (1985b) Purification and properties of thiosulfate reductase from *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki. J Biochem (Tokyo) 97 : 1025-1032
- André, L. Nilsson, A., Adler, L.** (1988) The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansii*. J Gen Microbiol 134 : 669-677
- Andrews, J.F.** (1969) Dynamic model of the anaerobic digestion process. J Sanit Eng Div SA 116-195
- Azova, L.G.** (1967) Utilization of glycerol by some strains of butyric acid bacteria. Dokl Akad Nank SSSR 172 : 1434-1435
- Badziong, W., Thauer, R.K.** (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, R.K., Zeikus, J.G.** (1978) Isolation and characterization of *Desulfovibrio vulgaris*

(Marburg) growing on hydrogen plus sulfate as sole energy source. Arch Microbiol 116 : 41-49

Badziong, W., Thauer, R.K. (1980) Vectorial electron transport in *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source. Arch Microbiol 125 : 167-184

Bak, F., Pfennig, N. (1987) Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov., by disproportionation of inorganic sulfur compounds. Arch Microbiol 147 : 184-189

Balch, W.E., Fox, G.G., Magnum, L.J., Woese, C.R., Wolfe, R.S. (1979) Methanogens : Reevaluation of a unique biological group. Microbiol Rev 43 : 260-296

Balba, M.T., Nedwell, D.B. (1982) Microbial metabolism of acetate, propionate and butyrate in anoxic sediment from the Colne Point saltmarsh, Essex, U.K. J Gen Microbiol 128 : 1415-1422

Banat, M., Lindstrom, E.B., Nedwell, D.B., Balba, M.T. (1981) Evidence for the coexistence of two distinct functional groups of sulfate-reducing bacteria in saltmarsh sediment. Appl Environ Microbiol 42 : 985-992

Barker, H.A. (1956) Biological formation of methane. In "Bacterial fermentations". John Wiley & Sons, Inc. New York p 1-27

Bathia, D., Vieth, W.R., Venkatasubramanian (1985) Steady-state and transient behavior in microbial methanisation I. Experimental results. Biotechnol Bioeng 27 : 1192-1198

Battle, J.L., Joubert, R., Collon, Y., Jouret, C. (1978) Dosage en flux continu du L(-) malate et du L(+) lactate dans les mouts du raisin et les vins. Ann Fals Exp Chim 766 : 223-228

Battle, J.L., Collon, Y. (1979) Dosage enzymatique en flux continu du glycérol dans les vins. Conn Vigne Vin 1 : 45-50 .

Bhat, J.V., Baker, H.A. (1947) *Clostridium lacto-acetophilum* nov. spec., and the role of acetic acid in the butyric acid fermentation of lactate. J Bacteriol 54 : 381-391

Boone, D.R., Bryant, M.P. (1980) Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* gen. nov., sp. nov., from methanogenic ecosystems. Appl Environ Microbiol 40 : 626-632

Bories, A. (1981) Methanisation des eaux résiduaires de distilleries. Trib Cebedeau, 456 : 475-483

Bories, A., Raynal, J., Jover, J.P. (1982) Fixed film reactor with plastic media for methane fermentation of

distilleries . In: Strub A, Chartier P. & Schleser G. (eds) Energy from Biomass Applied Science Publisher, London, pp 567-571

Brandis, A., Thauer, R.K. (1981) Growth of *Desulfovibrio* species on hydrogen and sulfate as sole energy source. J Gen Microbiol 126 : 249-252

Brandis-Heep, A., Gebhardt, N.A., Thauer, R.K., Widdel, F., Pfennig, N. (1983) Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfobacter postgatei* . I. Demonstration of all enzymes required for the operation of the citric acid cycle. Arch Microbiol 136 : 222-229

Braun, M., Stolp, H. (1985) Degradation of methanol by a sulfate-reducing bacterium. Arch Microbiol 142 : 77-80

Brown, A.D. (1978) Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. Adv Microb Physiol 17 : 181-242

Bruschi, M. (1981) The primary structure of the tetrahem cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio desulfuricans* (strain Norway 4). Description of a new class of low potential cytochrome *c* . Biochem Biophys Acta 671 : 219-226

Bruschi, M., Le Gall, J., Hatchikian, E.C., Dubourdiou, E.C. (1969) Cristallisation et propriétés d'un cytochrome intervenant dans la réduction du thiosulfate par *Desulfovibrio gigas* . Bull Soc Franç Physiol Vég 15 : 381-390

Bruschi, M., Hatchikian, E.C., Le Gall, J., Moura, J.J.G., Xavier, A.V. (1976) Purification, characterization and biological activity of three forms of ferredoxin from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas* . Biochem Biophys Acta 449 : 275-284

Bryant, M.P.(1972) Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. Am J clin Nutr., 25 : 1324-1328

Bryant, M.P., Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S. (1967) *Methanobacillus omelianskii* , a symbiotic association of two species of bacteria. Ark Mikrobiol 59 : 20-31

Bryant, M.P., Campbell, L.L., Reddy, C.A., Crabill, M.R. (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

Brysch, K., Schneider, C., Fuchs, G., Widdel, F. (1987) Lithotrophic growth of sulfate-reducing bacteria,

and description of *Desulfobacterium autotrophicum* gen. nov., sp. nov. Arch Microbiol 148 : 264-274

Cammack, R., Rao, K.K., Hall, D.O., Moura, J.J.D., Xavier, A.V., Bruschi, M., Le Gall, J., Deville, A., Gayda, J.P. (1977) Spectroscopic studies of the oxidation-reduction properties of three forms of ferredoxin from *Desulfovibrio gigas*. Biochim Biophys Acta 490 : 311-321

Campbell, L.L., Postgate, J.R. (1965) Classification of the spore-forming sulfate-reducing bacteria. Bacteriol Rev 29 : 359-363

Chambers, L.A., Trudinger, P.A. (1975) Are thiosulfate and trithionate intermediates in dissimilatory sulfate réduction ? J Bacteriol 123 : 36-40

Circle, S.J., Stone, L., Boruf, C.S. (1945) Acrolein determination by means of tryptophan. A colorimetric micromethod. Ind Eng Chem Anal Ed 17 : 259-262

Cohen, A., Van Deursen, A., Van Andel, J.G., Breure, A.M. (1982) Degradation patterns and intermediates in the anaerobic digestion of glucose : Experiments with ¹⁴C-labeled substrates. Anton V Leeuwenhoek 48 : 337-352

Cooper, R.A. (1984) Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. Ann Rev Microbiol 38 : 49-68

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. (1986) Facultative and partial interspecies hydrogen transfer competition for reducing equivalents. Biology of anaerobic bacteria. Dubourguier *et al* (ed) Elsevier Science Publishers BV., Amsterdam, Netherlands, 16-22

Cord-Ruwisch, R., Ollivier, B., Garcia, J.L. (1986) Fructose dégradation by *Desulfovibrio* sp. in pure culture and in coculture with *Methanospirillum hungatei*. Current Microbiol 13 : 285-289

Cord-Ruwisch, R. (1987) Contribution à l'étude du métabolisme de H₂ par les bactéries anaérobies. Thèse d'université, Université d'Aix-Marseille I, Marseille, France

De Man, J.C. (1975) The probability of most probable numbers. Eur J Appl Microbiol 1 : 76-78

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

- De Vries, W., Aleem, M.J.H., Hemrika-Wagner, A., Stouthamer, A.H. (1977) The functioning of cytochrome b in the electron transport to fumarate in *Propionibacterium freudenreichii* and *Propionibacterium pentosaceum*. Arch Microbiol 112 : 271-276
- Doelle, H.W. (1975) Bacterial metabolism. Academic Press, New York, San Francisco, London
- Drake, H.L., AKAGI, J.M. (1977) Bisulfite reductase of *Desulfovibrio vulgaris* : explanation for product formation. J Bacteriol 132 : 139-143
- Dubourguier, H.C., Samain, E., Prensier, G., Albagnac, G. (1986) Characterisation of two strains of *Pelobacter carbinolicus* isolated from anaerobic digesters. Arch Microbiol 145 : 248-253
- Dwyer, D.F., Tiedje, J.M. (1986) Metabolism of polyethylene glycol by two anaerobic bacteria, *Desulfovibrio desulfuricans* and a *Bacteroides* sp. Appl Environ Microbiol 52 : 852-856
- 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
- Emde, R., Schink, B. (1987) Fermentation of triacetin and glycerol by *Acetobacterium* sp. No energy is conserved by acetate excretion. Arch Microbiol 149 : 142-148
- Esnault, G. Caumette, P., Garcia, J.L. (1988) Characterization of *Desulfovibrio giganteus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from a Brackish Coastal Lagoon. System Appl Microbiol 10 : 147-151
- Fauque, G.D. (1985) Relation structure-fonction de différentes protéines d'oxydoréduction isolées de bactéries sulfatoréductrices et méthanigènes, Thèse, Univ. de tech. de Compiègne.
- Fauque, G.D., Czechowski, M.H., Kang, L., Dervartanian, D.V., Le Gall, J. (1986) Purification of Desulfofuscidin from a thermophilic strain of sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio thermophilus*. Abstract Ann Meet Am Soc Microbiol Washington DC K50 p 201
- Forage, R.G., Foster, M.A. (1979) Resolution of the coenzyme B₁₂-dependent dehydratase of *Klebsiella* sp. and *Citrobacter freundii*. Biochem Biophys Acta 569 : 249-258
- Forage, R.G., Foster, M.A. (1982) Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae* : functions of the

coenzyme B₁₂-dependent glycerol and diol dehydratases. *J Bacteriol* 149 : 413-419

Forage, R.G., Lin, E.C.C. (1982) dha System mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *J Bacteriol* 151 : 591-599

Forsberg, C.W. (1987) Production of 1,3-propanediol from Glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Appl Environ Microbiol* 53 : 639-643

Fowler, V.J., Widdel, F. Pfennig, N., Woese, C.R., Stackebrandt, E. (1986) Phylogenetic relationships of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. *System Appl Microbiol* 18 : 32-41

Gebhardt, N.A., Linder, D., Thauer, R.K. (1983) Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfobacter postgatei*. II. Evidence from ¹⁴C-labelling studies for the operation of the citric acid cycle. *Arch Microbiol* 136 : 230-233

Guerlesquin, L.J. Bovier-Lapierre, G., Bruschi, M. (1982) Purification and characterization of cytochrome *c* (Mr 26 000) isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* Norway strain. *Biochem Biophys Res Commun* 105 : 530-538

Gunsalus, I.C. (1947) Products of anaerobic glycerol fermentation by *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 54 : 239-244

Hagemann, M., Erdmann, N., Wittenburg, E. (1987) Synthesis of glycosylglycerol in salt-stressed cells of the Cyanobacterium *Microcystis firoua*. *Arch Microbiol* 148 : 275-279

Hansen, T.A. (1988) Physiology of sulfate-reducing bacteria. *Microbiol Science* 5 : 81-84

Haschke, R.H., Campbell, L.L. (1971) Thiosulfate reductase from *Desulfovibrio vulgaris*. *J Bacteriol* 106 : 603-607

Hatchikian, E.C., Le Gall, J. (1972) Evidence for the presence of a *b*-type cytochrome in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*, and its role in the reduction of fumarate by molecular hydrogen. *Biochem Biophys Acta* 267 : 479-484

Hatchikian, E.C. (1975) Purification and properties of thiosulfate reductase from *Desulfovibrio gigas*. *Arch Microbiol* 105 : 249-256

Hatchikian, E.C., Chaigneau, M., Le Gall, J. (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 Goltzer pp 109-118

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

Hatchikian, E.C., Papavassiliou, P. Bianco, P., Haladjian, J.(1984) Characterization of cytochrome *c* 3 from the thermophilic sulfate reducer *Thermodesulfobacterium commune* . J Bacteriol 159 : 1040-1046

Hermann, M., Popoff, MR., Sebald, M. (1987) *Sporomusa paucivaurans* sp. nov., a methylotrophic bacterium that forms acetic acid from hydrogen and carbon dioxide. Inter J Syst Bacterio 1 37 : 93-101

Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S. (1977) Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl Environ Microbiol 33 : 1225-1228

Hobson, P.N., Mann, S.O. (1961) The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacterium from the rumen of the sheep. J Gen Microbiol 25 : 227-240

Hosoi, N. Morimoto, K. Ozaki, C. Kitamoto, Y., Ichikama, Y. (1978) Enzymes activities involved in the metabolism of 1,2-propanediol by *Propionibacterium freudenreichii* . J Ferment Technol 56 : 566-572

Hungate, R.E. (1960) Microbial ecology of rumen. Bacteriol Rev 24 : 353-364

Hvid-Hansen, N. (1951) Sulfate-reducing and hydrocarbon-producing bacteria in ground-Water. Acta Path Microbiol Scand 29 : 266-289

Ichikawa, Y., Horike, Y., Mori, N., Hosoi, N., Kitamoto, Y. (1985) Purification and properties of propanediol dehydratase from *Propionobacterium freundenreichii* . J Ferm Technol 63 : 135-141

Isa, Z., Grusenmeyer, S., Verstraete, W. (1986a) Sulfate-reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion : technical aspect. Appl Environ Microbiol 51 : 572-579

Isa Z., Grusenmeyer, S., Verstraete, W. (1986b) Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion : microbial aspects. Appl Environ Microbiol 51 : 580-587

Jankowski, G.J., Zobell, C.E. (1944) Hydrocarbon production by sulfate-reducing bacteria. J Bacteriol 47, 447

Jansen, K.J., Fuchs, G., Thauer, R.K. (1985) Autotrophic CO₂ fixation by *Desulfovibrio baarsii* :

- Demonstration of enzyme activities characteristic for the acetyl-CoA pathway. FEMS Microbiol Lett 28 : 311-315
- Jaulmes, P., Espezel, P.** (1935) Ann Fas Fraudes 28, 325
- Jennigs, D.H.** (1984) Polyol metabolism in *fungi*. Adv Microb Physiol 25 : 150-193
- Joergensen, M.H.** (1978) Anaerobic formation of volatile acids in a chemostat. Eur J Appl Microbiol Biotechnol 6 : 181-187
- Jørgensen, B.B.** (1977) The sulfur cycle of a coastal marine sediment. (Limfjorden, Denmark) Limnol Oceanogr 22 : 814-832
- Jørgensen, B.B.** (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulfate reduction. Nature 296 : 643-645
- Joubert, W.A., Britz, T.J.** (1987) Isolation of saccharolytic dissimilatory sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiol Lett 48 : 35-40
- Kaspar, H.F., Wuhrmann, K.** (1978a) Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. Appl Environ Microbiol 36 : 1-7
- Kaspar, H.F., Wuhrmann, K.** (1978b) Product inhibition in sludge digestion. Microbiol Ecol 4 : 241-248
- Keltjens, J.T., van der Drift, C.** (1986) Electron transfer reactions in methanogens. FEMS Microbiol 39 : 259-303
- Kennedy, K.J., Muzar, M., Copp, G.H.** (1985) Stability and performance of mesophilic anaerobic fixed-film reactors during organic overloading. Biotechnol Bioeng 27 : 86-93
- Kerstens, K., De Ley, J.** (1963) The oxidation of glycols by acetic acid bacteria. Biochem Biophys Acta 71 : 311-331
- Kim, J.O., Akagi, J.M.** (1985) Characterization of a trithionate reductase system from *Desulfovibrio vulgaris*. J Bacteriol 163 : 472-475
- Klemp, R., Cypionka, H., Widdel, F., Pfennig, N.** (1985) Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. Arch Microbiol 143 : 203-208

- Kluyver, A.J., Van Niel, C.B.** (1936) Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 2 Orig Reich B*, 94 : 369-403
- Koch, M., Dolfing, J., Wuhrmann, K., Zehnder, A.J.** (1983) Pathways of propionate degradation by enriched methanogenic cultures. *Appl Environ Microbiol* 45 : 1411-1414
- Kremer, D.R., Hansen, T.A.** (1987) Glycerol and dihydroxyacetone dissimilation in *Desulfovibrio* strains. *Arch Microbiol* 147 : 249-256
- Kremer, D.R., Hansen, T.A.** (1988) Pathway of propionate degradation in *Desulfobulbus propionicus*. *FEMS Microbiol Lett* 49 : 273-277
- Kremer, D.R., Nienhuis-Kuiper, H.E., Hansen, T.A.** (1988) Ethanol dissimilation in *Desulfovibrio*. *Arch Microbiol* 150 : 552-557
- Kremer, D.R.** (1989) The role of NADH and NADPH in dissimilation processes in *Desulfovibrio* strains. Thèse de doctorat, Université de Groningen, Pays-Bas
- Kremer, D.R., Nienhuis-Kuiper, H.E., Timmer, C.J., Hansen, T.A.** (1989) Catabolism of malate and related dicarboxylic acids in various *Desulfovibrio* strains and the involvement of an oxygen-labile NADPH dehydrogenase. *Arch Microbiol* 151 : 34-39
- Kristiansson, J.K., Schönheit, P., Thauer, R.K.** (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
- Laanbroek, H.J., Pfennig, N.** (1981) Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and in marine sediments. *Arch Microbiol* 128 : 330-335
- Laroche, M.** (1983) Métabolisme intermédiaire des acides gras volatils en fermentation méthanique. Thèse, Institut National Des Sciences Appliquées, Toulouse, France
- Larsson, C., Gustafsson, L.** (1987) Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. *Arch Microbiol* 147 : 358-363
- Latham, M.J., Wolin, M.J.** (1978) Use of a serum bottle technique to study interactions between strict anaerobes in mixed culture. *Soc Appl Bacteriol Techn Ser GBR* tome II, 113-124

- Lee, J.P., Peck, H.D. (1971) Purification of the enzyme reducing bisulfite to trithionate from *Desulfovibrio gigas* and its identification as desulfovirodin. *Biochem Biophys Res Commun* 45 : 583-589
- Lee, J.P., Yics, Le Gall, J., Peck H.D (1973) Isolation of a new pigment from *Desulfovibrio desulfuricans* (Norway 4) and its role in sulfite reduction. *J Bacteriol* 115 : 529-542
- Le Gall, J., Mazza, G. et Dragoni, N. (1965) Le cytochrome c_3 de *Desulfovibrio gigas* . *Biochem Biophys Acta* 56 : 385-387
- Le Gall, J., Bruschi-Heriaud, M. (1968) Purification and some properties of a new cytochrome from *Desulfovibrio desulfuricans* . In : Structure and function of cytochromes (Okuniki K., Kamen, MD., Siekusu I. eds), Univ. Tokyo, Press and University Park, p 467
- Le Gall, J., Ljungdahl, P.O., Moura, I., Peck H.D. jr., Xavier, A.V., Moura J.J.G., Teixeira, M, Huynh, B.H., Dervartanian, D.V. (1982) The presence of redox-sensitive nickel in the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* . *Biochem Biophys Res Commun.*, 106 : 610-616
- Le Gall, J. (1968) Purification partielle et étude de la NAD : rubrédoxine oxydo-réductase de *Desulfovibrio gigas* . *Ann Inst Pasteur* 114 : 109-115
- Le Gall, J, Fauque, G. (1988) Dissimilatory reduction sulfur compounds. In : Zehnder AJB (Ed) *Biology of anaerobic microorganisms*, chapter 11. John Wiley and Sons, New York, London pp 587-640
- Lin, E.C.C. (1976) Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Ann Rev Microbiol* 30 : 535-578
- Lin, E.C.C. (1977) Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Ann Rev Biochem* 46 : 695- 765
- Lin, E.C.C., Levin, A.P., Magasamik,B. (1960) The effect of aerobic metabolism on the inducible glycerol dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes* . *J Biol Chem* 235 : 1824-1829
- Liu, C-L., Peck, H.D. (1981) Comparative bioenergetics of sulfate reduction in *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* spp. *J Bacteriol* 145 : 966-973
- Liu, C-L., Hart, N., Peck, H.D. (1982) Inorganic pyrophosphate: Energy source for sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfotomaculum*. *Science* 217 : 363-364
- Lovley, D.R.(1985) Minimum threshold of hydrogen metabolism in methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 49 : 1530-1531

- Lovley, D.R., Dwyer, D.F., Klug, M.J.(1982) Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl Environ Microbiol* 43 : 1373-1379
- Lovley, D.R., Klug, M.J.(1983) Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Appl Environ Microbiol* 45 : 187-192
- Lovley, D.R., Klug, M.J. (1986) Model for the distribution of methane production and sulfate reduction in freshwater sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 50 : 11-18
- Lupton, F.S., Conrad, R., Zeikus, J.G. (1984a) Physiological function of hydrogen metabolism during growth of sulfidogenic bacteria on organic substrates. *J Bacteriol* 159 : 843-849
- Lupton, F.S., Conrad, R., Zeikus, J.G. (1984b) CO metabolism of *Desulfovibrio vulgaris* strain Madison : physiological function in the absence and presence of exogenous substrates. *FEMS Microbiol Lett* 23 : 263-268
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.(1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275
- Mackie, R.I., Bryant, M.P. (1981) Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate and CO₂ to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60°C. *Appl Environ Microbiol* 4 : 1363-1373
- Magasanik, B. Brooke, M.S., Karabia, D. (1953) Metabolic pathways of glycerol dissimilation. *J Bacteriol* 66 : 611-619
- Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3 : 2317-2324
- McCarty, P.L. (1964) Anaerobic waste treatment fundamentals part I. *Publ Wks* 95 : 107
- McCarty, P.L. (1977) Energetics and kinetics of anaerobic treatment processes. *Am Chem Soc* 105 : 91-107
- Mc Inerney, M.J., Bryant, M.P., Pfennig, N. (1979) Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch Microbiol* 122 : 129-135
- Mickelson, M.N., Werkman, C.H. (1940) The dissimilation of glycerol by *coli-aerogenes* intermediates. *J Bacteriol* 39 : 709-715

- Miki, K., Lin, E.C.C. (1975) Anaerobic energy-yielding reaction associated with transhydrogenation from glycerol-3-phosphate to fumarate by an *Escherichia coli* system. *J Bacteriol* 124 : 1282-1287
- Mitchell, P. (1961) Coupling phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191 : 144-148
- Möller, B. Ossmer, R., Howard, B.H., Gottschalk, G., Hippe, H. (1984) *Sporomusa*, a new genus of gram negative anaerobic bacteria including *Sporomusa spheroides* sp. nov., and *Sporomusa ovata* sp. nov. *Arch Microbiol* 139 : 388-396
- Möller-Zinkhan, D., Thauer, R.K. (1988) Membrane-bound NADPH dehydrogenase- and ferredoxin : NADPH oxidoreductase activity involved in electron transport during acetate oxidation to CO₂ in *Desulfobacter postgatei*. *Arch Microbiol* 150 : 145-154
- Moore, W.E.C., Johnson, J.L., Holdeman, L.V. (1976) Emendation of *Bacteroidaceae* and *Butyrivibrio* and description of *Desulfomonas*, *Butyrivibrio*, *Clostridium* and *Ruminococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 26 : 238-252
- Moore, W.E.C., Holdeman, L.V. (1984) Genus *Desulfomonas* Moore Johnson and Holdeman 1976, 238 A1. In : Krieg NR, Nolt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore pp 672-673
- Motoyuki, Y., Mikio, K., Yusho, M. (1987) Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm. *Wast Res* 21 : 1547-1556
- Mountfort, D.O., Ascher, R.A., Mays, E.L., Tiedje, J.E. (1980) Carbon and electron flow in mud and sandflat intertidal sediments of Delaware inlet, Nelson, New Zealand. *Appl Environ Microbiol* 39 : 686-694
- Mountfort, D.O., Ascher, R.A. (1981) Role of sulfate reduction versus methanogenesis in terminal carbon flow in polluted intertidal sediment. *Appl Environ Microbiol* 42 : 252-258
- Moura J.J.G., Moura, I., Huynh, B.H., Kruger, H.J., Teixeira, M., Duvarney, R.C., Dervartanian, D.V., Xavier, A.V., Peck H.D., Le Gall, J. (1982) Unambiguous identification of the nickel EPR signal in ⁶¹Ni enriched *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 108 : 1388-1393
- Mucha, H., Lingens, F., Trosch, W. (1988) Conversion of propionate to acetate and methane by syntrophic consortia. *Appl Biotechnol Microbiol* 27 : 581-586
- Nakas, J.P., Chaedle, M.S., Parkinson, C.M., Coonley, C.E., Tannenbaum, S.W. (1983) System development of linked fermentation production of solvents from algal biomass. *Appl Environ Microbiol* 46

:1017-1023

Nanninga, H.J., Gottschal, J.C. (1985) Amino acid fermentation and hydrogen transfer in mixed cultures
FEMS Microbiol Ecol 31 : 261 - 269

Nanninga, H.J., Gottschal, J.C. (1986) Isolation of a sulfate-reducing bacterium growing with methanol.
FEMS Microbiol Ecol 38 : 125-130

Nanninga, H.J., Gottschal, J.C. (1987) Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp. nov. and other sulfate-reducing bacteria isolated from an Anaerobic-Purification Plant. Appl Environ Microbiol 51 : 572-579

Neidhardt, F.C., Magasanik, B. (1956) The effect of glucose on the induced biosynthesis of bacterial enzymes in the presence and absence of inducing agents. Biochem Biophys Acta 21 : 324-334

Neidhardt, F.C., Magasanik, B. (1957) Effect of mixtures of substrates on the biosynthesis of inducible enzymes in *Aerobacter aerogenes*. J Bacteriol 73 : 260-263

Nivière, V. (1989) Etudes biochimiques et physico-chimiques de deux hydrogénases à nickel de bactéries sulfato-réductrices du genre *Desulfovibrio*. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille II, Marseille, France

Norqvist, A., Roffey, R. (1985) Biochemical and immunological study of cell envelope proteins in sulfate-reducing bacteria. Appl Environ Microbiol 50 : 31-37

Noves, A.A., Wakins, W.H. (1985) The occurrence of trimethylene glycol as a by-product in the glycerol manufacture. J Am Chem Soc 107 : 890-891

Nyns, E.J., Naveau, H.P., Chome, R., Bertrand, Y. (1979) Digesters - A Worldwide review Anaerobic digestion, ed by Stafford, Wheatley and Hughes, Applied Science Publishers LTD London

Odom, J.M., Peck, H.D. (1981a) Localization of hydrogenase, reductases and electron transfer components in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. J Bacteriol 147 : 161-169

Odom, J.M., Peck, H.D. (1981b) Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate-reducing bacteria, *Desulfovibrio* sp. FEMS Microbiol Lett 12 : 47-50

Odom, J.M., Peck, H.D. (1984) Hydrogenase, electron transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*. Ann Rev Microbiol 38 : 551-592

- Ollivier, B., Cord-Ruwisch, R., Lombardo, A., Garcia J.L. (1985) Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium. Arch Microbiol 142 : 307-310
- Ollivier, B., Cord-Ruwisch, R., Hatchikian, E.C., Garcia, J.L. (1988) Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. nov. Arch Microbiol 149 : 447-450
- Oppenberg, B., Schink, B. (1989) Anaerobic degradation of 1,3-propanediol by sulfate-reducing and fermenting bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 57 : 205-213
- Pankhania, J.P., Gon, L.A., Hamilton, W.A. (1986) The effect of hydrogen on the growth of *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) on lactate. J Gen Microbiol 132 : 3349-3356
- Peck, H.D. (1962) Comparative metabolism of inorganic sulfur compounds in microorganism. Bacteriol Rev 26 : 67-94
- Peck, H.D., Le Gall, J. (1982) Biochemistry of dissimilatory sulfate reduction. Phil Trans R Soc Lond B 298 : 443-466
- Peck, H.D., Lissolo, T. (1988) Assimilatory sulfate-reducing : enzymology and bioenergetics. In : Cole JA, Ferguson SJ (Eds) The nitrogen and sulfur cycles. Cambridge. University Press, Cambridge
- Peck, H.D., Le Gall, J., Lespinat, P.A., Berlier, Y., Fauque, G. (1987) A direct demonstration of hydrogen cycling employing membrane-inlet mass spectrometry. FEMS Microbiol Lett 40 : 295-299
- Pfennig, N., Biebl, H. (1976) *Desulfomonas acetoxidans* gen. nov., and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. Arch Microbiol 110 : 3-12
- Pfennig, N., Widdel, F., Truper, H.G. (1981) The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 926-940
- Postgate, J.R. (1956) Cytochrome c_3 and desulfovireidin : pigments of the anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* . J Gen Microbiol 14 : 545-572
- Postgate, J.R. (1959) A diagnostic reaction of *Desulfovibrio desulphuricans* . Nature 183 : 481-482
- Postgate, J.R. (1966) Media for sulfur bacteria. Labor Pract 15 : 1239-1244
- Postgate, J.R. (1984a). The sulfate reducing bacteria . 2nd ed, Cambridge University Press, London

- Postgate, J.R.**(1984b) Genus *Desulfovibrio* kluver and Van Niel 1936, 397 . In : Krieg NR, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore pp 666-672
- Postgate, J.R., Campbell, L.L.** (1966) Classification of *Desulfovibrio* species, the non sporulating sulfate-reducing bacteria. *Bacteriol Rev* 30 : 732-738
- Qatibi, A.I., Bories, A.** (1988). Glycerol fermentation and sulfate utilization during the anaerobic digestion process. In : A Tilche & A Rozzi (ed) Fifth Intern. Symp. Anaerobic. Digestion, Monduzzi Editore, Bologna, pp 69-73
- Qatibi, A.I., Garcia, J.L.** (1989) 1,2- and 1,3-propanediol degradation by *Desulfovibrio alcoholovorans* sp., nov., in pure culture or through interspecies transfer. *FEMS Symp. Microbiology and Biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer*, Plenum Publ Corp., New-York (in press)
- Qatibi, A.I., Nivière, V., Garcia, J.L.** (1990) *Desulfovibrio alcoholovorans* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium able to grow on 1,2- and 1,3-propanediol. *Arch Microbiol* (in press)
- Qatibi, A.I. Cayol, J.L., Garcia, J.L.** (1989) Glycerol degradation by *Desulfovibrio* sp., in pure culture and in coculture with *Methanospirillum hungatei* . *FEMS Symp. Microbiology and Biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer*, Plenum Publ Corp., New-York (in press)
- Quastel, J.H., Stephenson, M., Whetham, M.D.** (1925) Some reactions of resting bacteria in relation to anaerobic growth. *Biochem J* 19 : 304-317
- Reed, R.H., Richardson, D.L., Warr, S.R.C., Stewart, W.D.P.** (1984) Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 130 : 1-4
- Reeves, R.E., Guthrie, J.D.** (1975) Acetate kinase (pyrophosphate). A fourth pyrophosphate dependent kinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem Biophys Res Commun* 66 : 1389-1395
- Robbins, J.E.** (1988) A proposed pathway for catabolism of propionate in methanogenic cocultures. *Appl Environ Microbiol* 54 : 1300-1301
- Rozanova, E.P., Khudyakova A.I.** (1974) A new non-spore-forming thermophilic sulfate-reducing organism, *Desulfovibrio thermophilus* sp. nov. *Mikrobiologiya* 43 : 1069-1075 (T 908-912)
- Rozanova, E.P., Nazina, T.N.** (1976) Mesophilic rod-like non-spore-forming bacterium reducing sulfate.

Mikrobiologiya 45 : 825-830 (T, 711-716)

Rožanova, E.P., Pivovarova, T.A. (1988) Reclassification of *Desulfovibrio thermophilus*. Microbiology Engl Tr 57 : 85-89

Rožanova, E., Nazina, T.N., Galuschko, A.S. (1988) Isolation of a new genus of sulfate-reducing bacteria and description of a new species of this genus, *Desulfomicrobium apsheronum* gen. nov., sp. nov. Microbiology Engl Tr 57 : 514-520

Rožanova, E., Galuschko, A.S., Nazina, T.N. (1989) Acetate decomposing sulfidogenic syntrophic association. FEMS Symp. Microbiology and Biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer, Plenum Publ Corp., New-York (in press)

Ruch, F.E., Lengelen, J., Lin, E.C.C. (1974) Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol 119 : 50-56

Ruch, F.E., Lin, E.C.C. (1975) Independent constitutive expression of the aerobic and anaerobic pathways of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol 124 : 348-352

Samain, E. (1987) Microbiologie et biochimie de l'acétogénèse dans les écosystèmes méthaniques. Thèse d'état, Université des sciences et techniques de Lille, France

Samain, E., Dubourguier, H.C., Albagnac, G. (1984) Isolation and characterization of *Desulfobulbus elongatus* sp. nov., from a Mesophilic Industrial Digester. System Appl Microbiol 5 : 391-401

Samain, E., Albagnac, G., Le Gall, J. (1986) Redox studies of the tetraheme cytochrome c 3 isolated from the propionate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium *Desulfobulbus elongatus*. FEBS Lett 204 : 247-250

Sanno, Y., Wilson, T.H., Lin, E.C.C. (1968) Control of permeation to glycerol in glycerol in cells of *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun 32 : 344-349

Schauder, R., Eikmanns, B., Tharser, R.K., Widdel, F., Fuchs, G. (1986) Acetate oxidation to CO₂ in anaerobic bacteria via a novel pathway not involved reactions of the citric acid cycle. Arch Microbiol 145 : 162-172

Schauder, R., Schink, B. (1989) *Anaerovibrio glycerini* sp. nov., an anaerobic bacterium fermenting glycerol to propionate, cell matter, and hydrogen. Arch Microbiol 152 : 473-478

Schauder, R., Widdel, F., Fuchs, G. (1987) Carbon assimilation pathways in sulfate-reducing bacteria II.

Enzymes of a reductive citric acid cycle in the autotrophic *Desulfobacter hydrogenophilus*. Arch Microbiol 148 : 218-225

Schink, B. (1984) Fermentation of 2,3-butanediol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov. and *Pelobacter propionicus* sp. nov., and evidence for propionate formation from C₂-compounds. Arch Microbiol 137 : 33-41

Schink, B. (1985) Fermentation of acetylene by an obligate anaerobe, *Pelobacter acetylenicus* sp. nov., Arch Microbiol 142 : 295-301

Schink, B., Stieb, M. (1983) Fermentation degradation of polyethyleneglycol by strictly anaerobic, Gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. Appl Environ Microbiol 45 : 1905-1913

Schink, B. (1988) Principles and limits of anaerobic degradation : environmental and technological aspects. In: Zehnder AJB (Ed) Biology of anaerobic microorganisms, chapter 14, John Wiley, New York pp 771-846

Schutz, H., Radler, F. (1984) Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1,3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. Syst Appl Microbiol 5 : 169-178

Segretain, C., Moletta, R. (1987) Potentialities of a methanogenic microbial ecosystem adapted to wine distillery wastewaters to degrade volatile fatty acids. Biol wastes 20 : 261-271

Selwyn, S.C., Postgate, J.R. (1959) A search for the Rubentschinkii group of *Desulphovibrio*. Antonie V Leeuwenhoek J Microbiol Serol 25 : 465-472

Serjak, W.C., Day, W.H., Van Lanen, J.M., Boruff, C.S. (1954) Acrolein production by bacteria found in distillery grain mashes. Appl Microbiol 2 : 14-20

Singleton, R. Denis, J., Campbell, L. (1985) Whole cell antigens of members of the sulfate-reducing genus *Desulfovibrio*. Arch Microbiol 141 : 195-197

Skrabanja, A.T.P., Stams, A. (1989) Oxidative propionate formation by anaerobic bacteria. FEMS Symp. Microbiology and Biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer, Plenum Publ Corp., New-York (in press)

Skyring, G.W., Jones, H.E., Goodchild, D. (1977) The taxonomy of some new isolates of dissimilatory sulfate-reducing bacteria. Can J Microbiol 23 : 1415-1425

Slininger, P.J., Bothast, R.J. (1985) Optimizing aerobic conversion of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde.

Appl Environ Microbiol Dec : 1444-1450

Smiley, K.L., Sobolov, M. (1962) Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus*. J Bacteriol 79 : 261-266

Sobolov, M., Smiley, K.L. (1960) Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus*. J Bacteriol 72 : 261-266

Sorensen, J., Chritensen, D., Jorgensen, B.B. (1981) Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate-reducing bacteria in anaerobic marine sediment. Appl Environ Microbiol 42 : 5-11

Sorokin, Y.I. (1966) Role of carbon dioxide and acetate in biosynthesis by sulfate-reducing bacteria. Nature 201 : 551-552

Smith, R.L., Klug, M.J. (1981) Electron donor utilized by sulfate-reducing bacteria in eutrophic lake sediments. Appl Environ Microbiol 42 : 116 - 121

Stams, A.J.M., Veenhuis, H., Weenk, G.H., Hansen, T.A. (1983) Occurrence of polyglucose as a storage polymer in *Desulfovibrio* species and *Desulfobulbus propionicus*. Arch Microbiol 136 : 54-59

Stams, A.J.M., Kremer, D.R., Nicolay, K., Weenk, G.H., Hansen, T.A. (1984) Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. Arch Microbiol 139 : 167-173

Stams, A.J.M. (1985) Ecophysiological aspects of the electron donor metabolism of sulfate-reducing bacteria. PhD Thesis, University of Groningen, The Netherlands

Stams, A., Hansen, T.A., Skyring, G.W. (1985) Utilisation of amino acids as energy substrates by two marine *Desulfovibrio* strains. FEMS Microbiol Lett 31 : 11-15

Stams, A., Hansen, T.A. (1986) Metabolism of L-alanine in *Desulfotomaculum ruminis* and two marine *Desulfovibrio* strains. Arch Microbiol 145 : 277-279

Steenkamp, D.J., Peck, H.D. (1981) Protein translocation associated with nitrite respiration in *Desulfovibrio desulfuricans*. J Biol Chem 256 : 5450-5458

Stetter, K.O., Lauerer, G., Thomm, M., Neuner, A. (1987) Isolation of extremely thermophilic sulfate-reducers : Evidence for a novel branch of Archaeobacteria. Science 236 : 822-824

- Stetter, K.O.** (1988) *Archeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov. : a new taxon of extreme thermophilic archeobacteria. *Syst Appl Microbiol* 10 : 172-173
- Stieb, M., Schink, B.** (1984) A new 3-hydroxybutyrate-fermenting anaerobe, *Ilyobacter polytropus* gen. nov. sp. nov. , possessing various fermentation pathways. *Arch Microbiol* 140 : 139-146
- Stjernholm, R., Wood, H.G.** (1960) Glycerol dissimilation and occurrence of asymmetrical three-carbon intermediate in propionic acid fermentation. *J Biol Chem* 235 : 2757-2761
- Stouthamer, A.H.** (1980) Electron transport linked phosphorylation in anaerobes. In : Gottschalk, G., Pfennig, N., Werner, H. (eds) *Anaerobes and Anaerobic infections*. Fischer, Stuttgart, New York, pp 17-29
- Suh, B., Akagi, J.M.** (1969) Formation of thiosulfate from sulfite by *Desulfovibrio vulgaris* . *J Bacteriol* 99 : 210-215
- Symons, G.B., Buswell, A.M.** (1933) The methane fermentation of carbohydrates. *J Am Chem Soc* 55 : 2028-2036
- Tasaki, M., Kamagata, Y., Nakamura, K., Mikami, E.** (1990) Isolation of propionate-reducing bacterium. *FEMS Symp. Microbiology and Biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer*, Marseille, France, september 12-14 (in press)
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K.** (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* 41 : 100-180
- Thebrath, B., Dilling, W., Cypionka, H.** (1989) Sulfate activation in *Desulfotomaculum* . *Arch Microbiol* 152 : 296-301
- Thiamann, K.V.** (1955) *The life of bacteria*. MacMillan Publishing Co, New York
- Toraya, T., Honda, S., Kuno, S., Fukui, S.** (1978) Coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase : regulation of apoenzyme synthesis in *Klebsiella pneumoniae* (*Aerobacter aerogenes*) ATCC 8724. *J Bacteriol* 135 : 726-729
- Toraya, T., Honda, S., Fukui, S.** (1979) Fermentation of 1,2-propanediol and 1,2-ethanediol by some genera of *Enterobacteriaceae* , involving coenzyme B₁₂- dependent diol dehydratase. *J Bacteriol* 139 : 39-47
- Toraya, T., Kuno, S., Fukui, S.** (1980) Distribution of coenzyme B₁₂- dependant diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae* . *J Bacteriol* 141, 3 : 1349-1442

- Trudinger, P.A.**(1970) Carbon monoxide-reacting pigment from *Desulfotomaculum nigrificans* and its possible relevance to sulfite reduction. J Bacteriol 104 : 158-170
- 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 Microbiol 125 : 35-42
- Ueki, A., Matsuda, K., Ohtsuki, C.** (1986) Sulfate reduction in the anaerobic digestion of animal waste. J Gen Appl Microbiol 32 : 111-123
- Van der Drift, C., Smits, R.A.M., Michiels, G.A.M., Opdecamp, M.J.M.** (1986) Growth of *Bacillus fastidiosus* on glycerol and the enzymes of ammonia assimilation. Arch Microbiol 146 : 292-294
- Voisenet, E.** (1918) Sur une bactérie de l'eau végétant dans les vins amers capable de déshydrater la glycéro-réaction. Ann Inst Pasteur 32 : 476-510
- Widdel, F.** (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. Doctoral thesis, Univ Gottingen, FRG
- Widdel, F.** (1988) Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In : Zehnder AJB (Ed) Biology of anaerobic microorganisms, John Wiley, New York, pp 469-585
- Widdel, F., Pfennig, N.**(1977) A new anaerobic sporing acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum* (emend) *acetoxidans*. Arch Microbiol 112 : 119-122
- Widdel, F., Pfennig, N.** (1981) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. Arch Microbiol 129 : 395-400
- Widdel, F., Pfennig, N.** (1982) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. Arch Microbiol 131 : 360-365
- Widdel, F., Pfennig, N.** (1984) Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In: Krieg NR, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th edn. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 663-679
- Winfrey, M.R., Zeikus, J.G.** (1977) Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments. Appl Environ Microbiol 33 : 275-281

Wolfe, R.S. (1971) Microbial function of methane. *Advances in Microbiol Physiol* 6 : 107-146

Wolfe, R.S., Higgins, I.J. (1979) Microbial biochemistry of methane-a study in contrasts. *Int Rev Biochem* 21 : 268-295

Wright, D.E. (1969) Fermentation of glycerol by rumen micro-organisms. *New Zealand J Agric Rev* 12 : 281-286

Zehnder, A.J.B. (1978) Ecology of methane formation. In : Mitchell (Ed) *Water Pollution Microbiology*. Vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 349-376

Zeikus, J.G., Dawson, M.A., Thomson, T.E., Ingvorsenk., Hatchikian, E.C. (1983) Microbial ecology of volcanic sulphidogenesis : Isolation and characterization of *Thermodesulfobacterium commune*. *J Gen Microbiol* 129 : 115-118

Zellner, G., Messner, P., Kneifel, H., Winter, J. (1989) *Desulfovibrio simplex* spec. nov., a new sulfate-reducing bacterium from a sour whey digester. *Arch Microbiol* 152 : 229-334

Zobell, C.E. (1957) Ecology of sulfate-reducing bacteria, In : *Sulfate-reducing bacteria, their relation to the secondary recovery of oil*, Science symposium, St. Bonaventure College, St Bonaventure, New York, 1-24

ANNEXES

SOLUTION MINERALE SANS SULFATE :

K_2HPO_4 , 0,45 g; KH_2PO_4 , 0,45 g; NH_4Cl , 0,90 g; $NaCl$, 0,90 g; $MgCl_2 \cdot 7H_2O$, 0,09 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,09 g; Cysteine- $HCl \cdot H_2O$, 0,30 g et H_2O distillée, q.s.p.1000 ml.

La cystéine est utilisée comme agent réducteur. Ce milieu sert à stimuler la croissance de la culture mixte indéfinie issue du fermenteur, et épuiser tout le sulfate qui peut être présent dans l'inoculum. Il a servi dans toute l'étude métabolique de la population mixte.

SOLUTION MINERALE DE BASE DE WIDDEL :

Na_2SO_4 , 3,0 g; KH_2PO_4 , 0,2 g; NH_4Cl , 0,3 g; KCl , 0,3 g; $NaCl$, 1,0 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,2 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,4 g et H_2O distillée, q.s.p.1000 ml.

SOLUTION D'OLIGOELEMENTS DE PFENNIG ET WIDDEL :

HCl (25%), 6,5 ml; $FeCl_2 \cdot 6H_2O$, 1500 mg; H_3BO_3 , 6 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 100 mg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 120 mg; $ZnCl_2$, 70 mg; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 25 mg; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 25 mg et H_2O distillée, q.s.p 1000 ml.

On notera la présence d'une grande quantité de fer, nécessaire pour l'activité sulfatoréductrice des BSR (Postgate, 1956; Widdel, 1980). 1 ml de cette solution est utilisé par litre de milieu.

SOLUTION DE VITAMINES DE PFENNIG ET WIDDEL :

Biotine, 10 mg; p-aminobenzoic acid, 50 mg; Vitamine B12, 50 mg; Thiamine, 100 mg et H_2O distillée, q.s.p 100 ml.

Les vitamines sont stérilisées par filtration avec un filtre de 0,22 μ et stockées en anaérobiose à 4°C, à l'abri de la lumière. 0,1 ml sont ajoutés par litre de milieu.

SOLUTION DE SELENITE DE SODIUM :

$NaSeO_3$, 3 mg; $NaOH$, 500 mg et H_2O distillée, 1000 ml

Cette solution est stérilisée par autoclavage (110°C, 45 mn). 1 ml par litre de milieu.

SOLUTIONS DE REDUCTEURS

1- Sulfure de sodium

$Na_2S \cdot 9H_2O$, 12g et H_2O distillée, 100ml

On fait bouillir 100 ml d'eau distillée sous azote, ajouter 1/2 pastille de $NaOH$ (pour conserver un pH basique), on

fait tiédir au bain de glace. Ajouter du Na_2S préalablement lavé de ses impuretés. Pour cela, on pèse 17 à 18 g de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ dans un bécher, on lave à l'eau distillée, puis on sèche les cristaux ainsi débarassés de leurs impuretés sur un mouchoir en papier. On pèse à nouveau, le poids devant être approximativement de 12 g. A ces cristaux (dans un flacon bouché sous azote) on ajoute 100 ml d'eau anaérobie (préparée dans un flacon bouché sous N_2) en utilisant une double aiguille. Cette solution est autoclavée (110 °C, 45 mn). On ajoute 3 ml par litre de milieu.

2- Dithionite

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 3 g et H_2O distillée, 100 ml

Cette solution est préparée en anaérobiose et stérilisée (110 °C , 45 mn). Elle est ajoutée au besoin à raison de 1 ml par litre de milieu.

SOLUTIONS TAMPONS :

1-Tampon Bicarbonate

NaH_2CO_3 , 2,52 g et H_2O distillée, 30 ml

Cette solution est préparée sous un mélange gazeux $\text{N}_2\text{-CO}_2/ 80\text{-}20\%$, puis saturée en atmosphère CO_2 . Le tout est stérilisé par autoclavage. Elle est préparée au moment de la préparation du milieu et ajoutée par transfert direct à l'aide d'une double aiguille (Venoject).

2-Tampon phosphate (pH 7,2)

Solution A (28 ml) : NaH_2PO_4 , 27,8 g (0,2 M) et H_2O distillée, 1000 ml + Solution B : (72 ml)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 53,65 g (0,2 M) et H_2O distillée, 1000 ml + H_2O distillée , 100 ml

3-Hcl-Tris (pH 7,6)

Solution A : Tris, 121g (1M) et H_2O distillée (940 ml) + Solution B : HCl, 1M (60 ml)

COMPOSITION DES MILIEUX DE NUMERATION :

1-Milieus pour numération des bactéries sulfatoréductrices :

Sol° minérale de Widdel, 1000 ml; Sol° d'oligoéléments, 1 ml; Extrait de levure, 0,1 g et Rézasurine (0,2%), 1 ml. Après autoclavage, on ajoute les solutions suivantes : Sol° de Vitamine de Widdel, 1 ml; NaH_2CO_3 , 30 ml et $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (12%), 3 ml.

Les substrats carbonés (glycérol; 1,3-propanediol; lactate; propionate et acétate) sont ajoutés à la concentration finale de 20 mM, sauf pour la numération des bactéries sulfatoréductrices totales. Le même milieu est utilisé pour

l'enrichissement, l'isolement et la caractérisation des bactéries sulfatoréductrices. Sauf pour la souche du genre *Desulfohalobium* où 1 ml de solution de sélénite de sodium est ajouté par litre de milieu.

2-Milieux pour numération des bactéries méthanogènes hydrogénophiles :

Sol° minérale de Widdel(sans sulfate), 1000 ml; Sol ° d'oligoéléments, 1 ml; Extrait de levure, 0,1 g; Cystéine-HCl. H₂O, 0,5 g; Rézasurine(0,2%), 1 ml; acétate, 5 mM (comme source de carbone) et H₂-CO₂/ 80-20%, 3 bars. Après autoclavage, on ajoute les solutions suivantes : Sol° de Vitamine de Widdel, 1 ml; NaH₂CO₃, 30 ml; Na₂S.9H₂O (12%), 3 ml et Jus de rumen à une concentration finale de 5%.

3-Milieux pour numération des bactéries méthanogènes acétoclastes :

Sol° minérale de Widdel(sans sulfate), 1000 ml; Sol d'oligoéléments, 1,0 ml; extrait de levure, 0,1 g; Cystéine-HCl.H₂O, 0,5 g; Rézasurine (0,2%), 1,0 ml et Acétate, 1,2 g. Après autoclavage, on ajoute les solutions suivantes : Sol° de Vitamine de Widdel, 1 ml; NaH₂CO₃, 30 ml; Na₂S, 9H₂O (12%), 3ml et Jus de rumen à une concentration finale de 5%. Le jus de rumen est ajouté après décoloration de la rézasurine. La croissance est estimée par la production de méthane après 4 à 5 semaines d'incubation à 35°C.

4-Milieux pour numération des bactéries fermentatives :

Sol° minérale de Widdel(sans sulfate), 1000 ml; Sol° d'oligoéléments, 1,0 ml; extrait de levure, 0,2g; Rézasurine (0,2%), 1,0 ml . Après autoclavage, on ajoute les solutions suivantes : Sol ° de Vitamine de Widdel, 1 ml; NaH₂CO₃, 30 ml; Na₂S. 9H₂O (12%), 3 ml . Les substrats carbonés (glycérol; 1,3-propanediol; lactate et propionate) sont ajoutés à la concentration finale de 20 mM . La croissance est estimée par le virage au jaune du bleu de méthylène, introduit au préalable dans le milieu .

PREPARATION DES FILTRES POUR LA NUMERATION DES BACTERIES TOTALES. (NUMERATION PAR COMPTAGE BACTERIEN DIRECT)

1-SOLUTIONS : Préparer toutes les solutions dans de l'eau distillée, filtrée sur membrane Millipore 0,45 mm.

Noir Soudan B : dissoudre 10 mg dans 75 ml d'alcool absolu; ajouter ensuite 75 ml d'eau distillée.

Acridine Orange : dissoudre 10 mg dans 100 ml de tampon phosphate 6,6 mM (pH 6,7) ; filtrer le tampon sur membrane Millipore 0,45 µm.

2-TRAITEMENT DES FILTRES :

Placer les filtres Nucléopore 25 mm (en polycarbonate 0,20 µm) au moins 24 h dans la solution de noir Soudan B. Les rincer vigoureusement (avant utilisation) dans de l'eau distillée filtrée.

3-COLORATION :

Placer un porte-filtre puis un filtre sur le verre fritté. Filtrer 5 ml de l'échantion dilué à 10⁻³ -10⁻⁴ avec un vide d'environ 0,15 bar. Couper le vide et ajouter 1 ml de la solution d'acridine orange. Laisser agir pendant 5 mn. Eliminer

le colorant par filtration en rétablissant le vide. Rincer soigneusement l'excès de colorant avec de l'eau distillée filtrée. Enlever le filtre et le faire sécher (à l'abri des poussières) dans une enceinte close.

4-OBSERVATION :

Monter des quartiers de filtre entre lame et lamelle avec 1 goutte d'huile à immersion. Observer au microscope en épifluorescence UV avec l'objectif 40 ou 100 (filtres ZEISS Blau 450-490, réf 48 77 09-9903, BP 450-490, FT 510, LP 520).

METHODE INDIRECTE DE DETERMINATION DES SULFURES DANS LES MILIEUX COMPLEXES

Le principe de cette technique est basé sur l'oxydation complète d'un composé instable (sulfures) en un composé stable (sulfate) par un oxydant puissant tel que le peroxyde d'oxygène :

1-Préparation des solutions étalons

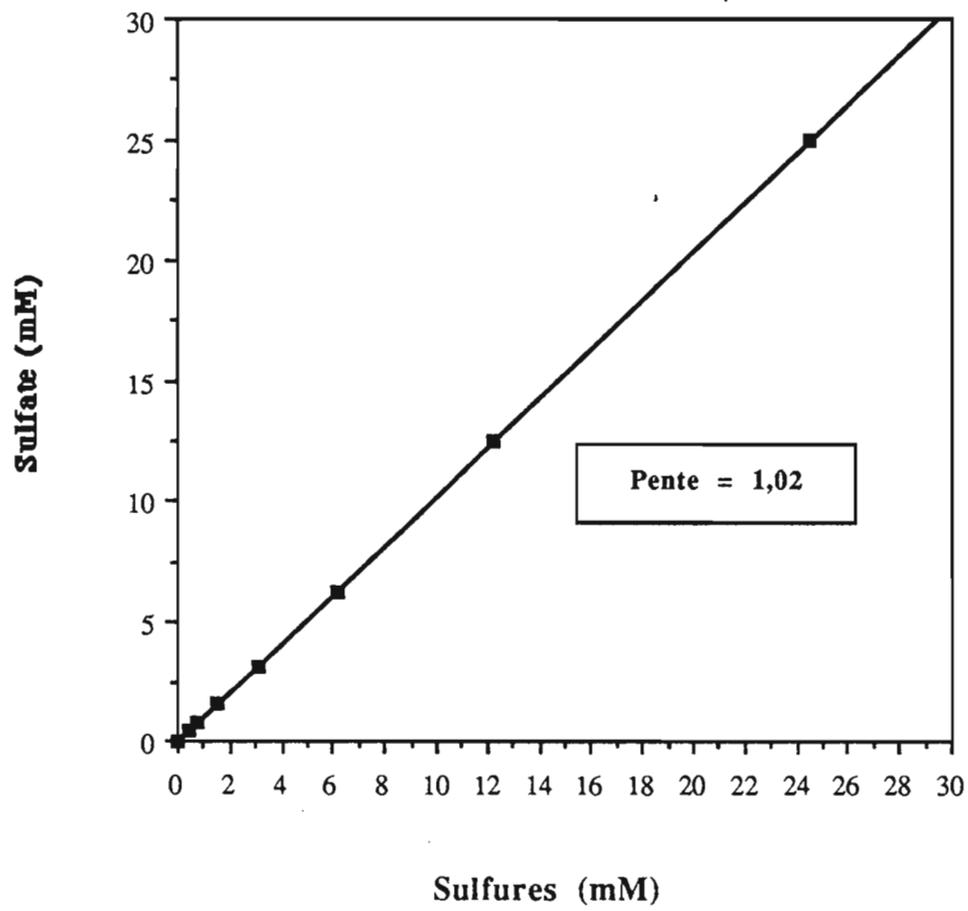
2,5 ml d'eau distillée anaérobie, sous atmosphère d'azote, préparée selon la technique d'Hungate (Hungate,1969; Bryant, 1972) ont été distribués dans des tubes d'Hungate dégazés et scellés avec des septums (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA). Des cristaux lavés de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ont été dissous dans de l'eau distillée anaérobie à une concentration connue et contenant quelques cristaux de soude afin de maintenir un pH basique, à ce pH, les sulfures sous forme H_2S dans l'atmosphère sont négligeables. 2,5 ml de cette solution concentrée ont été transférés dans le premier tube contenant 2,5 ml d'eau en utilisant des seringues purgées à l'azote. De cette manière des dilutions successives ont été réalisées pour avoir différentes concentrations en sulfure.

2-Détermination des sulfures

2-1.Sulfures solubles : On dose d'abord le sulfate existant sous son état oxydé (SO_4^{2-} réel), on traite ensuite l'échantillon au peroxyde d'oxygène (0,1/5 ml V/V) puis on dose le sulfate total (correspond au sulfate réel + le sulfate provenant des sulfures). La différence entre le sulfate total et celui existant réellement donnera la quantité de sulfures solubles. On arrive à doser des concentrations inférieures à 1 mM (voir courbe étalon).

2-1.Sulfures totaux : On remplace 5 % de l'échantillon avec 5 % de l'acide phosphorique (l'acide chlorhydrique dégage du Cl_2 , gaz toxique) puis on traite l'échantillon au peroxyde d'oxygène et on procède comme décrit ci-dessus. Le temps d'analyse dépend de la méthode de dosage du sulfate utilisée. Si le sulfate est dosé par HPLC (comme c'est le cas ici), le temps d'analyse dépend du débit, température, pH, longueur de la colonne ... etc. Le temps d'éluion dans les conditions décrites au chapitre Matériels et méthodes est de 5 mn.

Cette technique peut être applicable pour le dosage des sulfures dans les milieux complexes (couleur, différents métaux comme les ions Fe^{2+} susceptibles de complexer les sulfures).



RESUME

Le processus de sulfato-réduction a été étudié dans des écosystèmes méthanogènes traitant les effluents de distilleries vinicoles riches en lactate, glycérol et sulfate. La quantité de sulfate présente dans ces milieux n'est pas suffisante pour permettre l'oxydation complète de ces composés en CO₂.

Il a été établi que les bactéries sulfatoréductrices jouent un rôle important dans la dégradation anaérobie du lactate, du propionate, du glycérol et du 1,3-propanediol. Par contre, l'acétate ne constitue pas un donneur d'électrons pour ce groupe bactérien.

Ces bactéries ont été dénombrées et leur rôle précisé. Ce travail a permis d'isoler des souches originales par leur morphologie, leur physiologie ou leur métabolisme, et a conduit à la description de 3 nouvelles espèces bactériennes : *Desulfovibrio minusculus*, *Desulfobulbus elongatus* sub. sp. *narbonense* et *Desulfovibrio alcoholovorans*.

Il a été démontré que les substrats réduits tels que le glycérol, le 1,2-propanediol et le 1,3-propanediol peuvent être dégradés par transfert interspèce d'hydrogène. Le métabolisme du glycérol et du 1,3-propanediol a été également étudié chez *Desulfovibrio fructosovorans*, *Desulfovibrio carbinolicus* et *D.alcoholovorans*, et des voies métaboliques hypothétiques pouvant expliquer ce métabolisme ont été proposées.

L'existence de 2 voies métaboliques de dégradation du glycérol chez *D.fructosovorans* et *D.carbinolicus* a été démontrée.

Contrairement au lactate, substrat commun des bactéries sulfato-réductrices du genre *Desulfovibrio*, le glycérol ne constitue pas un substrat de choix pour ce groupe bactérien; néanmoins il a été démontré que le lactate joue un rôle important dans la dégradation anaérobie du glycérol par les espèces du genre *Desulfovibrio*.

Mots clés : *Desulfovibrio*; Dénombrements; Digestion anaérobie; glycérol; Isolement; lactate; Métabolisme du glycérol et des diols; 1,3-propanediol; Sulfato-réduction; transfert interspèce d'hydrogène.