

## LES BACTÉRIES MÉTHANOGENÈS

### THE METHANOGENIC ARCHAEA

par Jean-Louis Garcia (\*)

#### RÉSUMÉ

Les bactéries méthanogènes sont les seules bactéries anaérobies strictes qui produisent du méthane à partir de  $H_2+CO_2$ , formate, acétate, méthanol, méthylamines et alcools secondaires +  $CO_2$ . Leurs caractéristiques spéciales comme la composition en lipides de leur paroi cellulaire et la présence de coenzymes spécifiques ont permis de les classer dans le domaine des *Archaea* en cinq ordres qui regroupent 10 familles, 26 genres et 72 espèces validées. Les bactéries méthanogènes sont très largement distribuées dans la nature en fonction de leur adaptation aux différentes conditions de température, pH et salinité, mais restent cependant confinées aux environnements strictement anaérobies (mares, marais, rizières, lacs, étangs, mers et océans, tractus digestif de l'homme et des animaux, digesteurs méthanogènes, dépôts d'ordures, sources chaudes, tapis d'algues en décomposition). Ces bactéries occupent la position terminale dans la dégradation anaérobie de la matière organique, mais leur activité peut être inhibée par celle des bactéries qui utilisent d'autres accepteurs d'électrons comme les nitrates ou les sulfates. Elles contribuent fortement à l'émission du méthane dans l'atmosphère terrestre où ce gaz joue un rôle analogue à celui du gaz carbonique (effet de serre).

**Mots clés :** bactérie méthanogène, phylogénie, taxonomie, écologie microbienne, habitat, anaérobiose.

#### SUMMARY

*The methanogenic bacteria are strictly anaerobic, obligate methane producers, grouped in the domain Archaea. They are abundant in all type of anoxic environments and share a complex biochemistry of methane synthesis. They can be divided into three main nutritional groups: the majority (80%) are hydrogenotrophic methanogens, oxidizing  $H_2$  and reducing  $CO_2$  to methane; some can oxidize formate. The second group (26%) comprises methylotrophic methanogens, using methyl compounds as methanol, methylamines, or dimethylsulfide. Methanogens of the third group (11%) are acetotrophic bacteria, utilizing acetate to produce methane. The composition and the lipids of the cell walls are unusual. A number of unique coenzymes have been discovered in these microorganisms. Methanogens are classified in five orders, which regroup 10 families, 26 genera, and 72 validated species. They develop in natural anaerobic habitats such as ponds, marshes, swamps, rice soils, lakes, oceans, intestinal tracts of man and animals, sewage digesters, landfills, algal mats, and oil wells. In these environments, which contain complex organic compounds and where light, sulfate, and nitrate are limited, the methanogenic bacteria are linked to other chemo-heterotrophic bacteria in the degradation of organic substrates. The distribution of methanogens in natural environments is highly dependent on their respective adaptation to temperature, pH and salinity ranges. Thermophilic environments, such as hot springs, solfataras, or submarine hydrothermal vents are the sites of active methanogenesis. Biogenic methane is also produced in hypersaline environments. A variety of chemical substances can physiologically inhibit methanogenesis. Methanogens are also greatly implicated in the global production of atmospheric methane which, together with carbon dioxide, is involved in the greenhouse effect.*

**Key words :** methanogens, phylogeny, taxonomy, microbial ecology, habitats, anaerobiosis.

(\*) Directeur du Laboratoire ORSTOM de Microbiologie des Anaérobies, Université de Provence, CESB-ESIL case 925, 163, avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France.

C.R. Acad. Agric. Fr., 1998, 84, n° 4, pp. 23-33. Séance du 3 juin 1998.

Fonds Documentaire ORSTOM



010019338

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : Bx19338 Ex: 1

## INTRODUCTION

Les espèces bactériennes méthanogènes constituent la population terminale de la microflore des biotopes anaérobies; elles sont les seules productrices connues de méthane. De nombreuses revues bibliographiques ont été publiées sur les méthanogènes (1, 6, 10, 27, 33, 34, 38) après que la découverte des propriétés biochimiques et génétiques uniques de ces micro-organismes ait conduit au nouveau concept des archéobactéries à la fin des années soixante-dix. En outre, d'importants facteurs économiques ont placé ces procaryotes au premier plan. Tout d'abord, les crises pétrolières qui se sont succédé depuis 1973 ont suscité un grand intérêt pour les formes alternatives d'énergie comme la récupération du méthane lors de la digestion anaérobie des déchets. Le développement des digesteurs a été rendu possible par la compréhension de l'écologie et de la physiologie des méthanogènes. Dans l'élevage des herbivores, la connaissance des processus de fermentation dans le rumen a démontré une perte nette d'énergie par la méthanogénèse, et des inhibiteurs comme la Rumensine (antibiotique ionophore) ont été développés pour augmenter le rendement en viande. Les compagnies pétrolières tentent de différencier le gaz naturel produit par les méthanogènes de celui qui provient des réactions thermocatalytiques associées à la formation du pétrole. Enfin, les études sur la distribution globale du méthane dans l'atmosphère terrestre sont en augmentation depuis la découverte de son rôle possible dans l'accroissement de l'effet de serre où il s'ajoute à l'accumulation du CO<sub>2</sub>, et de son action réverse sur la dégradation de la couche d'ozone.

### 1. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES

Le développement de nouvelles techniques de laboratoire pour la culture des anaérobies stricts pendant les années soixante-dix, avec notamment la technique de **Hungate** (2, 12, 24), fut une avancée technologique importante qui permit l'isolement et la caractérisation d'un grand nombre de nouvelles espèces de méthanogènes. Ces procédés utilisent des tubes de Hungate, des tubes haute-pression et des flacons antibiotiques avec bouchons de butyl sertis par des capsules d'aluminium, dont on ajuste l'atmosphère sur une rampe de gazage, et une boîte à gants anaérobie pour le transfert des colonies obtenues en roll-tubes. L'isolement des bactéries méthanogènes est un processus fastidieux car elles présentent le plus souvent une croissance lente et sont extrêmement sensibles à l'oxygène, une concentration de 10 ppm étant très souvent létale.

Les bactéries méthanogènes sont physiologiquement unies par la formation de méthane comme produit final de leur métabolisme. Parmi les 78 espèces décrites jusqu'à présent (72 en excluant les synonymes), 80% sont hydrogénotrophes et utilisent H<sub>2</sub> pour réduire le CO<sub>2</sub>; 11% des espèces sont acétoclastes (ou acétotrophes) et produisent le méthane à partir de l'acétate; 26% sont méthylotrophes et peuvent utiliser les composés méthylés comme le méthanol, les méthylamines et le méthyldisulfure; parmi elles, 13 espèces sont méthylotrophes obligatoires; 3% des espèces seulement sont hydrogène-méthylotrophes et utilisent H<sub>2</sub> pour

réduire le méthanol en méthane. Un certain nombre d'espèces appartenant aux autres groupes décrits sont alcoolotrophes et produisent du méthane en présence de  $\text{CO}_2$  et de certains alcools secondaires comme donneurs d'hydrogène. Le monoxyde de carbone peut également être converti en méthane, mais ne constitue pas un substrat important pour les méthanogènes. À l'exclusion des acétoclastes et des méthylotrophes, la plupart des espèces hydrogénotrophes sont capables d'utiliser le formate (43% des espèces de méthanogènes connues). Certains acétotrophes sont incapables d'oxyder  $\text{H}_2$  et les espèces du genre *Methanosarcina* sont les plus versatiles des méthanogènes, mais celles du genre *Methanosaeta* n'utilisent que l'acétate.

La taxonomie des méthanogènes a été profondément révisée à la suite des nouvelles informations issues des études comparatives de leurs caractères distinctifs d'archéobactéries comme les séquences du gène de l'ARN ribosomique 16S, la composition des lipides de leur paroi, les résultats immunologiques. Les caractères phénotypiques sont souvent insuffisants pour distinguer les taxons ou déterminer la phylogénie de ces taxons. Des études additionnelles de taxonomie chimique, moléculaire ou génétique sont souvent indispensables.

Sur le plan morphologique, les méthanogènes présentent une grande variété de formes et tailles: bâtonnets, coques régulières ou irrégulières, longues chaînes de bâtonnets ou de spirilles, sarcines et formes plates inusuelles. La mobilité est parfois présente; certaines espèces peuvent s'agréger en amas. Une espèce de *Methanosarcina* présente des vacuoles de gaz. La coloration de Gram peut être positive ou négative. Il y a une grande différence de composition de la paroi entre les méthanogènes et les eubactéries, et une considérable variabilité parmi les méthanogènes eux-mêmes. On ne trouve pas de muréine, ce peptidoglycan des eubactéries qui est composé d'acide muramique, mais une pseudomuréine ou des sous-unités protéiques selon l'ordre taxonomique (16). Les méthanogènes sont donc insensibles aux antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire telles la pénicilline, la cyclosérine et la valinomycine. Cette particularité a été employée pour faciliter l'isolement de souches pures de méthanogènes en éliminant les contaminants hétérotrophes.

Une autre caractéristique des méthanogènes est la présence d'un transporteur d'électrons de bas potentiel, le facteur  $F_{420}$ , responsable d'une autofluorescence bleu-vert quand les cellules sont exposées à une lumière ultraviolette à une longueur d'onde de 420 nm. Ainsi, les cellules ou les colonies de bactéries méthanogènes peuvent être rapidement repérées sous microscope à épifluorescence (8). Les lipides de la paroi sont également peu courants (19); contrairement aux glyco- et phospholipides des eubactéries qui sont des esters d'acides gras (acide palmitique) du glycérol, les lipides polaires des méthanogènes contiennent des éthers de glycérol avec des chaînes carbonées isoprénoïdes (phytane).

La croissance de la quasi-totalité des méthanogènes est stimulée par l'acétate, et pour quelques espèces par certains acides aminés. De nombreux méthanogènes requièrent des facteurs complexes dans leur milieu de culture tels que l'extrait de levure ou le digestat de caséine, et certaines espèces du rumen exigent un mélange d'acides gras ramifiés. Des vita-

mines comme la riboflavine, l'acide pantothénique, la thiamine, la biotine et l'acide p-aminobenzoïque sont indispensables pour certains méthanogènes. Toutes les espèces utilisent  $\text{NH}_4^+$  comme source d'azote et seules quelques espèces sont capables de fixer l'azote moléculaire. Des métaux comme le nickel, un composant de certains enzymes et coenzymes, le fer et le cobalt sont requis à l'état de trace. Les méthanogènes sont également capables de produire de l'hydrogène sulfuré en présence de soufre élémentaire, par sulforéduction dissimilatrice. Plusieurs coenzymes uniques ont été découverts chez les méthanogènes, dont la plupart sont impliqués dans le processus de méthanogénèse : le méthanofurane, la méthanoptérine, le facteur  $\text{F}_{420}$ , le facteur  $\text{F}_{430}$ , le coenzyme M et le composant B (34). Les coenzymes typiques sont également présents, mais à un niveau inférieur à celui des eubactéries. Des transporteurs d'électrons comme les ménaquinones, les ubiquinones et les cytochromes sont probablement absents de la plupart des méthanogènes, excepté dans le genre *Methanosarcina*.

En 1979, **Balch** et ses collaborateurs ont proposé une révision importante de la taxonomie des méthanogènes (1) ; elle concernait 13 espèces groupées en trois ordres de quatre familles et sept genres. La classification la plus récente (6) définit cinq ordres qui regroupent 10 familles, 26 genres (figure 1) et 72 espèces validées (tableau 1). Le tableau 2 reporte l'énergétique des réactions de méthanogénèse et permet de comprendre la domination des bactéries méthanogènes hydrogénotrophes sur les autres types de métabolisme. En 1990, **Woese** et coll. ont proposé de regrouper les organismes vivants dans des groupements placés au-dessus des règnes, en créant ainsi trois domaines : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (40). Les bactéries méthanogènes appartiennent au domaine des *Archaea* et au règne des euryarchéotes.

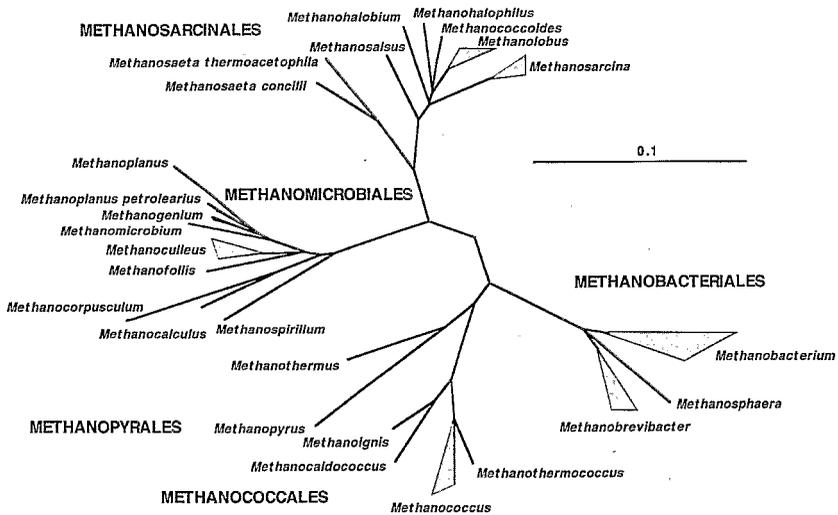


Figure 1 : Arbre phylogénétique non raciné des *Archaea* méthanogènes.  
Figure 1 : Unrooted phylogenetic tree of methanogenic *Archaea*.

**Tableau 1 : Classification des bactéries méthanogènes.**  
**Table 1 : Taxonomy of methanogenic Archaea.**

<p><b>ordre Méthanobactériales</b></p> <p>Famille <i>Methanobacteriaceae</i></p> <p>Genre <b>Methanobacterium</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>formicum</i></li> <li><i>alcaliphilum</i></li> <li><i>bryantii</i></li> <li><i>defluvii</i></li> <li><i>espanolae (espanolense)</i></li> <li><i>ivanovii</i></li> <li>"<i>palustre</i>"</li> <li><i>thermoaggregans</i></li> <li><i>thermoflexum</i></li> <li><i>thermophilum</i></li> <li><i>uliginosum</i></li> </ul> <p><b>Methanothermobacter</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>thermoautotrophicus (=thermoformicum)</i></li> <li><i>(=thermoalcaliphilum)</i></li> <li><i>wolfeii</i></li> </ul> <p><b>Methanobrevibacter</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>ruminantium</i></li> <li><i>arboriphilus</i></li> <li><i>curvatus</i></li> <li><i>cuticularis</i></li> <li><i>oralis</i></li> <li><i>smithii</i></li> </ul> <p><b>Methanosphaera</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>stadimaniae</i></li> <li><i>cuniculi</i></li> </ul>	<p><b>ordre Méthanomicrobiales</b></p> <p>Famille <i>Methanomicrobiaceae</i></p> <p><b>Methanomicrobium</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>mobile</i></li> </ul> <p><b>Methanolacinia</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>paynteri</i></li> </ul> <p><b>Methanogenium</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>cariaci (cariacoense)</i></li> <li><i>frigidum</i></li> <li>"<i>frittonii</i>"</li> <li><i>liminatans</i></li> <li><i>organophilum</i></li> </ul> <p><b>Methanoculleus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>olentangyi (yensis)</i></li> <li><i>(=bourgense)</i></li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>marisnigri (marinigr)</i></li> <li><i>oldenburgensis</i></li> <li><i>thermophilicus</i></li> </ul> <p><b>Methanoplanus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>limicola</i></li> <li><i>endosymbiosus</i></li> <li><i>petrolearius</i></li> </ul> <p><b>Methanofollis</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>tationis (tatioense)</i></li> </ul> <p><b>Methanocalculus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>halotolerans</i></li> </ul>	<p><b>ordre Méthanosarcinales</b></p> <p>Famille <i>Methanosarcinaceae</i></p> <p><b>Methanosarcina</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>barkeri</i></li> <li><i>acetivorans</i></li> <li><i>mazeii (=frisja)</i></li> <li><i>siciliae (siciliensis)</i></li> <li><i>thermophila</i></li> <li><i>vacuolata</i></li> </ul> <p><b>Methanobolus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>tindarius (tindariensis)</i></li> <li><i>bombayensis</i></li> <li><i>oregonensis</i></li> <li><i>taylorii</i></li> <li><i>vulcani</i></li> </ul> <p><b>Methanococcoides</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>methylutens</i></li> <li><i>burtonii</i></li> </ul> <p><b>Methanohalophilus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>mahii</i></li> <li><i>eusalobius</i></li> <li><i>halophilus</i></li> <li><i>portucalensis</i></li> </ul> <p><b>Methanosalsus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>zhilinae</i></li> </ul> <p><b>Methanohalobium</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>evestigatus</i></li> </ul>
<p>Famille <i>Methanothermaceae</i></p> <p><b>Methanothermus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>fervidus</i></li> <li><i>sociabilis</i></li> <li><i>sinense</i></li> </ul>	<p>Famille <i>Methanocorpusculaceae</i></p> <p><b>Methanocorpusculum</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>parvum (=aggregans)</i></li> <li><i>bavaricum</i></li> <li><i>labreanum</i></li> </ul>	<p>Famille <i>Methanosaeetaceae</i></p> <p><b>Methanosaeeta (=Methanothrix)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>concilii</i></li> <li><i>thermoacetophila</i></li> </ul>
<p><b>ordre Méthanococcales</b></p> <p>Famille <i>Methanococcaceae</i></p> <p><b>Methanococcus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>vannielli</i></li> <li>"<i>aeolicus</i>"</li> <li><i>maripaludis (=deltae)</i></li> <li><i>voltaei</i></li> </ul> <p><b>Methanothermococcus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>thermolithotrophicus</i></li> </ul>	<p>Famille <i>Methanospirillaceae</i></p> <p><b>Methanospirillum</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>hungatei</i></li> </ul>	<p><b>ordre Méthanopyrales</b></p> <p>Famille <i>Methanopyraceae</i></p> <p><b>Methanopyrus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>kandleri</i></li> </ul>
<p>Famille <i>Methanocaldococcaceae</i></p> <p><b>Methanocaldococcus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>jannaschii</i></li> </ul> <p><b>Methanoignis</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>igneus</i></li> </ul>		

Tableau 2 : Réactions de méthanogénèse<sup>a</sup>.  
Table 2 : Methanogenic reactions.

Réaction	$\Delta G^{\circ}$ (KJ/mol CH <sub>4</sub> )
4 H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	- 135,6
4 Formate → CH <sub>4</sub> + 3 CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	- 130,1
2 Éthanol + CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + 2 Acétate	- 116,3
Méthanol + H <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	- 112,5
4 Méthanol → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	- 104,9
4 Méthylamine + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 4 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	- 75,0
4 Triméthylamine + 6 H <sub>2</sub> O → 9 CH <sub>4</sub> + 3 CO <sub>2</sub> + 4 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	- 74,3
2 Diméthylsulfide + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> S	- 73,8
2 Diméthylamine + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	- 73,2
4 2-Propanol + CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + 4 Acétone + 2 H <sub>2</sub> O	- 36,5
Acétate → CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub>	- 31,0

<sup>a</sup>: calculées à partir de l'énergie libre de formation des espèces ioniques les plus abondantes à pH neutre. Ainsi, CO<sub>2</sub> est HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup> et le formate est HCOO<sup>-</sup> + H<sup>+</sup>.

## 2. CLASSIFICATION

L'Ordre des **Méthanobactériales** regroupe toutes les méthanogènes qui contiennent une pseudomuréine dans leur paroi. Aucune n'est mobile. Cet ordre contient deux familles (**Méthanobactériacées** et **Méthanothermacées**) et cinq genres morphologiquement très différents (6) (tableau 1) : **Methanobacterium** (11 espèces), **Methanothermobacter** (deux espèces), **Methanobrevibacter** (six espèces) et **Methanosphaera** (deux espèces) rencontrés le plus souvent dans le tractus intestinal de l'homme et des animaux et **Methanothermus** (deux espèces), thermophile extrême que l'on rencontre dans les habitats volcaniques.

L'Ordre des **Méthanococcales** contient deux familles (**Méthanococcacées** et **Méthanothermococcacées**) et quatre genres isolés essentiellement à partir d'environnements marins ou côtiers (6) (tableau 1) : **Methanococcus** (quatre espèces), **Methanothermococcus** (une espèce), **Methanoignis** (une espèce) et **Methanocaldococcus** (une espèce). Toutes ces espèces sont des coques irrégulières, la plupart mobiles par une touffe de flagelles polaires et présentant une paroi protidique.

L'Ordre des **Méthanomicrobiales** contient trois familles (**Méthanomicrobiacées**, **Méthanocorpusculacées** et **Methanospirillacées**) et neuf genres de méthanogènes hydrogénotrophes présentant diverses morphologies: petits bâtonnets, coques très irrégulières, cellules plates, spirilles; la paroi est de nature protidique (6) (tableau 1) : **Methanomicrobium** (une espèce), **Methanolacinia** (une espèce), **Methanogenium** (cinq espèces), **Methanoculleus** (quatre espèces), **Methanoplanus** (trois espèces), **Methanofollis** (une espèce), **Methanocalculus** (une espèce récemment isolée d'un puits de pétrole offshore (26)), **Methanocorpusculum** (quatre espèces) et **Methanospirillum** (une espèce de bâtonnets incurvés formant souvent de long filaments).

L'Ordre des **Méthanosarcinales** regroupe toutes les méthanogènes acétotrophes et/ou méthylotrophes en deux familles (**Méthanosarcinacées** et **Méthanosaetacées**), sept genres et 21 espèces (6) (tableau 1) : **Methanosarcina** (six espèces acétoclastes présentant la morphologie caractéristique en sarcine (amas de cellules)). Les cinq autres genres concernent toutes les méthanogènes méthylotrophes obligatoires. Ce sont des coques irrégulières, non mobiles, utilisant le méthanol et les méthylamines comme substrats; la plupart ont été isolées de biotopes salés et certaines sont hyperhalophiles : **Methanolobus** (cinq espèces), **Methanococcoïdes** (deux espèces), **Methanohalophilus** (quatre espèces), **Methanosalsus** (une espèce) et **Methanohalobium** (une espèce). Le genre **Methanosaeta** (deux espèces) comprend toutes les méthanogènes acétotrophes obligatoires se présentant en longues chaînes dans une gaine protidique; ces filaments peuvent former des agrégats visibles à l'œil nu.

L'Ordre des **Méthanopyrales** comprend une seule famille, les **Méthanopyracées**, avec un seul genre, **Methanopyrus** et une seule espèce hydrogénotrophe et hyperthermophile poussant à 110°C (6) (tableau 1).

### 3. ÉCOLOGIE

La distribution des espèces connues de méthanogènes dans les environnements naturels dépend fortement de leur adaptation aux différentes conditions de température, pH et salinité. La gamme de températures explorée est relativement large, de 4 à 110°C. En dépit du fait que les méthanogènes soient actifs à une température proche de 4°C, on ne connaît qu'une seule méthanogène psychrophile (9). Les espèces thermophiles (22 % des espèces méthanogènes connues) ne sont distribuées que dans sept genres ; les hyperthermophiles appartiennent aux genres *Methanothermus* (35), *Methanococcus* (14) et *Methanopyrus* (20). La plupart des méthanogènes croissent dans une gamme relativement étroite de pH (6,0 à 8,0), et aucun isolat acidophile n'a été décrit jusqu'à présent, bien qu'on ait noté une activité méthanogène dans des environnements acides comme les tourbières (39). Par contre, plusieurs espèces sont alcalophiles, avec un optimum de pH compris entre 8,0 et 9,0. La tolérance au sel est variable selon l'espèce examinée. Ce sont les méthanogènes marins qui sont les plus halophiles, spécialement dans les genres *Methanococcus* et *Methanogenium* et chez les méthylotrophes obligatoires dans lesquelles on rencontre les espèces hyperhalophiles.

Les inhibiteurs métaboliques peuvent jouer un rôle important sur le plan écologique. En effet, plusieurs substances chimiques plus ou moins toxiques peuvent bloquer physiologiquement la méthanogénèse. Comme toutes les bactéries anaérobies strictes, les méthanogènes sont très sensibles à de faibles tensions d'oxygène (moins de 10 ppm), qui provoquent une dissociation irréversible du complexe  $F_{420}$ -hydrogénase, probablement à cause de l'absence d'une superoxyde dismutase protectrice. Les accepteurs terminaux d'électrons minéraux comme les nitrates ou les sulfates peuvent également inhiber la méthanogénèse dans les sédiments ou les digesteurs en orientant le flux d'électrons vers des bactéries ther-

modynamiquement plus efficaces comme les dénitrifiantes ou les sulfatoréductrices (3, 37).

### 3.1. Les interactions méthanogènes

Les bactéries méthanogènes occupent la position terminale dans la dégradation anaérobie de la matière organique, mais peuvent être remplacées dans cette position par les bactéries qui utilisent d'autres accepteurs d'électrons comme les nitrates ou les sulfates. Les biopolymères comme la cellulose peuvent être dégradés en méthane par une succession de réactions dans lesquelles la nature des interactions variera en fonction du type de microorganisme impliqué et de la matière organique dégradée. Les méthanogènes peuvent utiliser  $H_2+CO_2$ , le formate ou l'acétate directement produits par les bactéries fermentatives, ou en association obligatoire, appelée syntrophie, avec les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène, mettant en œuvre un transfert interspèce d'hydrogène.

### 3.2. Les habitats naturels des méthanogènes

Les bactéries méthanogènes sont très largement distribuées dans la nature, mais restent cependant confinées aux environnements strictement anaérobies. Outre les sédiments aquatiques (mares, marais, rizières, lacs, étangs, mers et océans), les autres habitats sont constitués par le tube digestif de l'homme et des animaux (spécialement le rumen des bovidés et l'intestin des termites), les digesteurs méthanogènes, les dépôts d'ordures, le bois en décomposition du cœur des arbres, les sources chaudes, les tapis d'algues en décomposition, les rifts océaniques. Dans ces habitats, les méthanogènes occupent la niche terminale dans le transfert des électrons produits par la dégradation anaérobie de la matière organique.

#### 3.2.1. Le sol et les environnements aquatiques

Les rizières constituent des sols qui sont submergés pendant de longues périodes et dans lesquels les conditions anoxiques qui s'installent rapidement permettent la méthanogénèse. Ces sols, similaires au littoral des lacs, sont caractérisés par la présence de plantes et l'existence de zones aérobie et anaérobie. L'aérenchyme et le système de lacunes intracellulaires du riz permettent le transport du méthane du sédiment dans l'atmosphère (30). En l'absence de plantes, le méthane se dégage exclusivement sous forme de bulles de gaz. Dans les sols plantés, près de 80% du méthane produit n'atteint pas l'atmosphère car il est oxydé dans la rhizosphère du riz. Ces activités oxydantes ont également été détectées dans la zone aérobie de surface (11). Plusieurs souches de *Methanobacterium* et *Methanosarcina* ont été isolées de rizières (15, 31). La méthanogénèse intervient également dans les couches anaérobies des eaux des lacs méromictiques. Les dépôts d'ordures sont des sites d'où ont été isolés des méthanogènes appartenant aux genres *Methanobacterium*, *Methanosarcina* et d'autres coques.

### 3.2.2. Les digesteurs

Il a été démontré par de nombreux auteurs que la population microbienne dominante des digesteurs était constituée par des bactéries anaérobies strictes et que les méthanogènes représentaient de 10 à 50 % de cette population (21). La détection et la quantification des bactéries méthanogènes dans les digesteurs ou les cultures mixtes peuvent être réalisées par des techniques de comptage classiques par dilution (MPN), des techniques ELISA d'enzymes fixées ou des analyses immunologiques. Cette dernière méthode a pu démontrer une diversité d'espèces considérable (jusqu'à 11 espèces différentes dans le même digesteur)(23). Des techniques moléculaires ont été récemment développées pour affiner ces analyses (32).

### 3.2.3. Les environnements extrêmes

Les environnements thermophiles comme les sources chaudes, les solfatares, les puits de pétrole ou les événements hydrothermaux sous-marins sont des sites actifs de méthanogénèse. Peu d'espèces hyperthermophiles ont été décrites jusqu'à ce jour. *Methanothermus* a été isolé de solfatares dans le sud de l'Islande (35). Le méthane qui est détecté au niveau des cheminées sous-marines à de très hautes températures (300-400°C) serait d'origine bactérienne ; *Methanococcus jannaschii* (14) et *Methanopyrus kandleri* (20) ont été effectivement isolés de ces sites.

Du méthane biologique a également été détecté dans les environnements hypersalins. Dans les tapis algaux hypersalés, la production de méthane dépend d'interactions complexes entre la salinité, l'utilisation des méthylamines par les algues pour leur régulation osmotique, et la formation de triméthylamine par fermentation (18). La méthanogénèse peut intervenir dans une large gamme de salinité jusqu'à la saturation et un groupe spécialisé de méthanogènes halophiles, différent des autres groupes connus de méthanogènes par divers caractères morphologiques et physiologiques, occupe cette niche écologique particulière. Ces espèces ont été isolées de lacs salés d'Égypte (*Methanohalophilus zhilinae*) (25), des États-Unis (*Methanohalophilus mahii*) (29) et de Russie (*Methanohalobium evestigatus*) (41).

### 3.2.4. Dans les organismes vivants

Les méthanogènes sont directement impliqués dans les processus de digestion des ruminants et d'autres animaux y compris les insectes. Depuis le travail pionnier de **Hungate** (12), les activités des bactéries méthanogènes sont bien connues dans le rumen et le cœcum, ces structures spécialisées du tube digestif des mammifères herbivores qui abritent une population microbienne anaérobie très active qui dégrade la cellulose. Mais la production de méthane à partir de l'acétate n'est pas très importante comparée à celle des autres environnements, parce que la nutrition de l'animal consiste à absorber, à travers l'épithélium intestinal, les acides gras volatils produits pendant les processus de fermentation. Ainsi, près de 82 % du CH<sub>4</sub> formé dans le rumen proviendrait de la réduction du CO<sub>2</sub> par l'hydrogène, tandis que 18 % proviennent du formate (13). Cependant, des méthanogènes acétoclastes sont présents et produisent

du méthane à partir des méthylamines ou du méthanol. Les espèces dominantes que l'on rencontre dans l'intestin des animaux appartiennent au genre *Methanobrevibacter*, mais *Methanosphaera* et *Methanogenium* peuvent également s'y trouver. Ces mêmes bactéries ont été isolées de la cavité bucale de l'homme associées à la plaque dentaire, sans que l'on puisse établir une relation directe avec la carie dentaire (4).

Les méthanogènes ont été également identifiées dans le tube digestif de différents insectes et plus particulièrement des termites chez lesquels des espèces identiques ont pu être observées au microscope par épifluorescence (22). La contribution des termites à l'enrichissement de l'atmosphère en méthane a longtemps été l'objet de controverses; elle est actuellement estimée de 2 à  $5 \times 10^{12}$  g par an. De récentes études ont démontré que le méthane était principalement émis par les termites humivores qui renferment jusqu'à 10 % de méthanogènes dans la flore de leur panse (7). Les méthanogènes peuvent aussi être associées en tant que symbiontes des protozoaires, en utilisant l'hydrogène produit par le protozoaire lors d'un transfert interspèce d' $H_2$ , qui entraîne le protozoaire à produire plus de substrats énergétiques et oxydés tels que l'acétate (22). *Methanoplanus endosymbiosus* a été isolé d'une amibe sapropele (36). Dans les océans, la production de méthane provient de l'activité de méthanogènes du tractus digestif d'animaux marins comme le plancton, les poissons et également l'estomac des baleines dans lequel la fermentation de la chitine est analogue au processus rencontré dans le rumen.

### 3.2.5. Le méthane atmosphérique

La concentration globale du méthane avoisine les 1,6 ppm dans la troposphère et a été multipliée par deux à trois lors des 100 à 200 dernières années; l'accroissement actuel est de 1 à 2 % par an, soit trois à quatre fois plus vite que celui du gaz carbonique (17). Parce qu'il absorbe dans l'infrarouge, le méthane joue un rôle analogue à celui du gaz carbonique (effet de serre). Le potentiel d'effet de serre du méthane est 30 fois plus important que celui du  $CO_2$ , et sa contribution à l'élévation mondiale de température est estimée à 19 %. En outre, il est détruit dans l'atmosphère par réaction avec les radicaux hydroxyles, avec production d'oxyde de carbone et d'hydrogène. Cependant, il peut réagir avec le chlore ou l'oxyde nitreux qui proviennent respectivement des chlorofluorocarbones et des engrais, et participerait ainsi à la protection de la couche d'ozone de la stratosphère (28). Le temps de résidence du méthane dans l'atmosphère varie de sept à 10 ans.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) BALCH W.E., FOX G.E., MAGRUM L.J., WOESE C.R., WOLFE R.S., 1979. - Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.*, **43**, 260-296.
- (2) BALCH W.E., WOLFE R.S., 1976. - New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethane sulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 781-791.

- (3) BALDERSTON W.L., PAYNE W.J., 1976. - Inhibition of methanogenesis in salt marsh sediments and whole-cell suspensions of methanogenic bacteria by nitrogen oxides. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 264-269.
- (4) BELAY N., JOHNSON R., RAJAGOPAL B.S., CONWAY DE MACARIO E., DANIELS L., 1988. - Methanogenic bacteria from human dental plaque. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 600-603.
- (5) BOONE D.R., MAH R.A., 1989. - Group I. Methanogenic archaeobacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. STALEY J.T., BRYANT M.P., PFENNIG N., HOLT J.G. (eds), Williams & Wilkin Co., Baltimore, London, **Vol.3**, 2173-2216.
- (6) BOONE D.R., WHITMAN W.B., ROUVIERE P., 1993. - Diversity and taxonomy of methanogens. In: *Methanogenesis*. FERRY J.G. (ed), Chapman and Hall Co., New York, 35-80.
- (7) BRAUMAN A., KANE M.D., LABAT M., BREZNAK J.A., 1992. - Genesis of acetate and methane by gut bacteria of nutritionally diverse termites. *Science*, **257**, 1384-1387.
- (8) EDWARDS T., MCBRIDE B.C., 1975. - A new method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.*, **29**, 540-545.
- (9) FRANZMANN P.D., LIU Y., BALKWILL D.L., ALDRICH H.C., CONWAY DE MACARIO E., BOONE D.R., 1997. - *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H<sub>2</sub>-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 1068-1072.
- (10) GARCIA J.L., 1990. - Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**, 297-308.
- (11) HOLZAPFEL-PSCHORN A., CONRAD R., SEILER W., 1985. - Production, oxidation and emission of methane in rice paddies. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **31**, 343-35.
- (12) HUNGATE R.E., 1969. - A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in microbiology*. NORRIS J.R., RIBBONS D.W. (eds), Academic Press, New York, **Vol.3B**, 117-132.
- (13) HUNGATE R.E., SMITH W., BAUCHOP T., YU I., RABINOWITZ J.C., 1970. - Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *J. Bacteriol.*, **102**, 389-397.
- (14) JONES W.J., LEIGH J.A., MAYER F., WOESE C.R., WOLFE R.S., 1983. - *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.*, **136**, 254-261.
- (15) JOULIAN C., OLLIVIER B., PATEL B.K.C., ROGER P.A., 1998. - Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **25**, 135-145.
- (16) KANDLER O., HIPPE H., 1977. - Lack of peptidoglycan in the cell walls of *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.*, **113**, 57-60.
- (17) KHALIL M.A.K., RASMUSSEN R.A., 1983. - Sources, sinks and cycles of atmospheric methane. *J. Geophys. Res.*, **88**, 5131-5144.
- (18) KING G.M., 1988. - Methanogenesis from methylated amines in a hypersaline algal mat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 130-136.
- (19) KOGA Y., NISHIHARA M., MORII H., AKAGAWA-MATSUSHITA M., 1993. - Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. *Microbiol. Rev.*, **57**, 164-182.
- (20) KURR M., HUBER R., KONIG H., JANNASCH H.W., FRICKE H., TRINCONE A., KRISTJANSSON J.K., STETTER K.O., 1991. - *Methanopyrus kandleri*, gen. nov. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch. Microbiol.*, **156**, 239-247.
- (21) LABAT M., GARCIA J.L., 1986. - Study on the development of methanogenic microflora during anaerobic digestion of sugar beet pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 163-168.
- (22) LEE M.J., SCHREURS P.J., MESSER A.C., ZINDER S.H., 1987. - Association of methanogenic bacteria with flagellated protozoa from a termite hindgut. *Curr. Microbiol.*, **15**, 337-341.
- (23) MACARIO A.J.L., CONWAY DE MACARIO E., 1988. - Quantitative immunologic analysis of the methanogenic flora of digestors reveals a considerable diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 79-86.
- (24) MACY J.M., SNELLEN J.E., HUNGATE R.E., 1972. - Use of syringe methods for anaerobiosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, **25**, 131B-132B.
- (25) MATHRANI I.M., BOONE D.R., MAH R.A., FOX G.E., LAU P.P., 1988. - *Methanohalophilus zhilinae* sp. nov., an alkaliphilic, halophilic, methylotrophic methanogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**, 139-142.
- (26) OLLIVIER B., FARDEAU M.L., CAYOL J.L., MAGOT M., PATEL B.K.C., GARCIA J.L., 1998. - Characterization of *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, (*sous presse*).
- (27) OREMLAND R.S., 1988. - Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. ZEHNDER A.J.B. (ed), John Wiley & Sons, New York, 641-705.
- (28) OWENS A.J., STEED J.M., FILKIN D.L., MILLER C., JESSON J.P., 1982. - The potential effects of increased methane on atmospheric ozone. *Geophys. Res. Lett.*, **9**, 1105-1108.
- (29) PATEREK J.R., SMITH P.H., 1988. - *Methanohalophilus mahil* gen. nov. sp. nov., a methylotrophic halophilic methanogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**, 122-123.
- (30) RAIMBAULT M., RINAUDO G., GARCIA J.L., BOUREAU M., 1977. - A device to study metabolic gases in the rice rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, **9**, 193-196.
- (31) RAJAGOPAL B.S., BELAY N., DANIELS L., 1988. - Isolation and characterization of methanogenic bacteria from rice paddies. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **53**, 153-158.
- (32) RASKIN L., STROMLEY J.M., RITTMANN B.E., STAHL D.A., 1994. - Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1232-1240.
- (33) REEVE J.N., 1992. - Molecular biology of methanogens. *Ann. Rev. Microbiol.*, **46**, 165-191.
- (34) ROUVIERE P.E., WOLFE R.S., 1988. - Novel biochemistry of methanogenesis. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7913-7916.
- (35) STETTER K.O., THOMM M., WINTER J., WILDGRUBER G., HUBER H., ZILLIG W., JANE-COVIC D., KONIG H., PALM P., WUNDERL S., 1981. - *Methanothermus fervidus* sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an Icelandic hot spring. *Zentralbl. Mikrobiol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe*, **C2**, 166-178.
- (36) VAN BRUGGEN J.J.A., ZWART K.B., HERMANS J.G.F., VAN HOVE E.M., STUMM C.K., VOGELS G.D., 1986. - Isolation and characterization of *Methanoplanus endosymbiosus* sp. nov., an endosymbiont of the marine saproplastic ciliate *Metopus contortus* Quennerstedt. *Arch. Microbiol.*, **144**, 367-374.
- (37) WARD D.M., WINFREY M.R., 1985. - Interactions between methanogenic and sulfate-reducing bacteria in sediments. *Adv. Aquat. Microbiol.*, **3**, 141-170.
- (38) WHITMAN W.B., BOWEN T.L., BOONE D.R., 1992. - The methanogenic bacteria. In: *The Prokaryotes*. BALOWS A., TRUPER H.G., DWORKIN M., HARDER W., SCHLEIFER K.H. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, **Vol. 1**, 719-767.
- (39) WILLIAMS R.T., CRAWFORD R.L., 1984. - Methane production in Minnesota peatlands. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1268-1271.
- (40) WOESE C.R., KANDLER O., WHEELIS M.L., 1990. - Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576-4579.
- (41) ZHILINA T.N., ZAVARZIN G.A., 1987. - *Methanohalobium evestigatus*, n. gen., n. sp., the extremely halophilic methanogenic Archaeobacterium. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **293**, 464-468.

(Reçu le 30 avril 1998, accepté le 25 mai 1998)



## **FICHE DESCRIPTIVE**

**Auteur(s) : Garcia J.L.**

**Titre original : Les bactéries méthanogènes**

**Revue : C. R. Acad. Agric. Fr. 1998, 84, 23-33.**

**Titre en Français : Les bactéries méthanogènes**

**Mots-clés matières : bactéries méthanogènes, phylogénie, taxonomie, écologie microbienne, habitat, anaérobiose  
(10 au plus)**

**Résumé en Français :  
(150 mots maximum)**

**Plan de classement : Monde végétal et Animal - Fermentations**