

50376
1987
269

50376
1987
269

N° d'ordre : 753

T H E S E

présentée

à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

ERIC SAMAIN



**MICROBIOLOGIE ET BIOCHIMIE DE L'ACETOGENESE
DANS LES ECOSYSTEMES METHANOGENES**

Corrections faites après avis du jury

Présentée le 8 octobre 1987 devant la commission d'examen

Président : B. FOURNET
Rapporteurs : G. ALBAGNAC
J. LEGALL
P. GOUET
Examineurs : C. ROMOND
R. TAILLIEZ

SCD LILLE 1

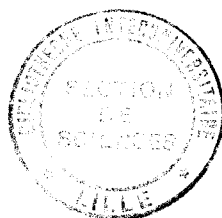


D 030 320335 4

50376
1987
269

50376
1987
269

*Ce travail a été réalisé sous la Direction de Monsieur Guy Albagnac,
Directeur de la Station de Technologie Alimentaire du centre de recherche
de Lille de l'Institut National de la Recherche Agronomique.*



ISSN 0244-7173

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur B. Fournet,

Vous m'avez fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Croyez en ma respectueuse gratitude.

A Monsieur G. Albagnac, Directeur de Recherche à l'INRA,

En m'ayant intégré dans ton laboratoire et en ayant permis mon recrutement à l'INRA, tu m'as donné les moyens de réaliser cette thèse. Pour la sympathie que tu m'as accordée et l'esprit critique dont tu as toujours fait preuve, je te remercie sincèrement.

A Monsieur le Professeur J. LeGall,

Vous m'avez accueilli pendant un an dans votre laboratoire de l'université de Géorgie et m'avez ainsi fait bénéficier de toute votre expérience dans le domaine de la biochimie des bactéries anaérobies. Pour cela et pour l'amitié que vous m'avez témoignée, je vous exprime ma profonde reconnaissance.

A Monsieur P. Gouet, Directeur de Recherche à l'INRA,

Votre connaissance des écosystèmes anaérobies fait autorité. Votre présence dans ce jury est pour moi un grand honneur et je vous en remercie sincèrement.

A Monsieur le Professeur C. Romond,

L'intérêt que vous avez toujours manifesté pour les bactéries sulfatoréductrices et les anaérobies en général, fait que suis heureux que vous ayez accepté de faire partie de ce jury. Soyez en vivement remercié.

A Monsieur le Professeur R. Tailliez,

Pour l'intérêt que vous avez manifesté à ce travail en acceptant de le juger, recevez mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier:

Messieurs H.C. Dubourguier et **J.P. Touzel** pour leur amicale et fructueuse collaboration,

Messieurs P. Debeire, D. Verrier et **J.L. Roustan** pour l'intérêt avec lequel ils ont suivi mes travaux et les nombreux conseils qu'ils m'ont apportés

Monsieur Lepoutre et tout le personnel de la station de technologie alimentaire pour l'aide qu'ils m'ont fourni dans la réalisation de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

I. HISTORIQUE

1. Les premières études sur la fermentation méthanique (1776-1936) p. 4
2. La théorie de Van Niels sur la synthèse du CH_4 par la réduction du CO_2 (1936-1947) p. 9
3. Le schéma de Barker (1947-1967) p. 12
4. Le développement du concept de transfert interspécifique d'hydrogène (1967-1979) p. 14

II. ECOLOGIE DE LA FERMENTATION METHANIQUE

1. Les bactéries hydrolytiques et fermentatives p. 23
2. Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène p. 25
3. Les bactéries méthanogènes p. 26
4. Les bactéries homoacétogènes p. 29
5. Les bactéries sulfatoréductrices p. 33

III. BACTERIES ACETOGENES PRODUCTRICES OBLIGEES D'HYDROGENE

1. Bactéries dégradant l'éthanol p. 38
 - a) L'organisme S p. 38
 - b) *Pelobacter venetianus* et *P. carbinolicus* p. 39
 - c) Bactéries sulfatoréductrices p. 41
2. Bactéries dégradant les acides gras à plus de 3 carbones p. 42
 - a) *Syntrophomonas wolfei* p. 42
 - b) *Clostridium bryantii* p. 44
 - c) Autres organismes non définis taxonomiquement p. 44

3. Bactéries dégradant le propionate	p. 48
4. Bactéries dégradant les composés aromatiques	p. 48
a) Généralités	p. 48
b) Souches décrites	p. 49
g) Voie de dégradation des composés aromatiques	p. 56

IV. BACTERIES SULFATOREDUCTRICES

1. Classification	p. 62
2. Voie de réduction du sulfate	p. 65
3. Protéines d'oxydoréduction	p. 66
4. Métabolisme de l'hydrogène	p. 69

V. BACTERIES PROPIONIQUES ET BUTYRIQUES

1. Bactéries dégradant le lactate	p. 72
2. Bactéries dégradant l'éthanol	p. 75
3. Bactéries dégradant le succinate	p. 76

VI. METABOLISME DES COMPOSES INTERMEDIAIRES DE LA FERMENTATION METHANIQUE

1. Métabolisme de l'éthanol	p. 77
2. Métabolisme du butyrate	p. 79
3. Métabolisme du propionate	p. 81

TRAVAUX PERSONNELS

VII. NUMERATION DES BACTERIES ACETOGENES DANS LES FERMENTEURS DE METHANISATION	p. 87
---	--------------

**VIII. ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE BACTERIE REALISANT UNE
FERMENTATION PROPIONIQUE DE L'ETHANOL**

1. Isolement et caractérisation partielle de la souche X₄. p. 92
2. Caractérisation complémentaire de la souche X₄: p. 99
étude métabolique et taxonomique.

**IX. ETUDE DES BACTERIES ACETOGENES PRODUCTRICES OBLIGEEES D'HYDROGENE
DEGRADANT L'ETHANOL**

1. Isolement et caractérisation des bactéries dominantes p. 103
dans les digesteurs anaérobies
2. Métabolisme de l'éthanol chez *Pelobacter carbinolicus* p. 110

X. ETUDE DE LA DEGRADATION ANAEROBIE DES ACIDES GRAS A LONGUES CHAINES

1. Influence du calcium sur la croissance de cultures p. 117
syntrophes dégradant les acides gras à longues chaînes
2. Description de *Syntrophomonas sapovorans*, une nouvelle p. 121
espèce de bactérie acétogène productrice obligée d'hydrogène
dégradant les acides gras saturés et insaturés.

**XI. CARACTERISATION MICROBIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DE DESULFOBULBUS
ELONGATUS**

1. Isolement et description de *Desulfobulbus elongatus* p. 128
2. Caractérisation d'un cytochrome c₃ isolé de *D. elongatus* p. 139
3. Isolement et caractérisation de la succinate déshydrogénase p. 143
de *D. elongatus*
4. Régulation de l'activité hydrogénasique chez *D. elongatus* p. 148

**XII. PREMIERES ETAPES DU CATABOLISME DES TRIHYDROXYBENZENES CHEZ
PELOBACTER ACIDIGALLICI**

p. 153

CONCLUSIONS GENERALES

APPENDICE TECHNIQUE

I. TECHNIQUES ET MILIEUX DE CULTURE

p. 161

II. TECHNIQUES ANALYTIQUES

p. 164

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION GENERALE

Le méthane est un constituant mineur de l'atmosphère (2 ppm) et il a été estimé qu'il était à plus de 80 % d'origine microbienne. La production terrestre de méthane biologique serait comprise entre 0,5 et 0,8 milliard de tonnes par an et représenterait environ 0,5 % de la biomasse formée par photosynthèse (Ehhalt 1976). Les principales sources de méthane sont les rizières, les marais, les sédiments et le tractus gastrointestinal des animaux. Dans ces écosystèmes, l'absence de lumière, d'oxygène et d'accepteurs exogènes d'électrons (nitrate, sulfate) permettent le développement de flores bactériennes qui réalisent une décomposition complète de la matière organique en CH_4 et CO_2 .

Cette fermentation a été utilisée depuis plus d'un siècle comme technique de dépollution des eaux usées et de valorisation énergétique de certains résidus agricoles et l'on a assisté depuis la dernière crise pétrolière à un renouveau des recherches sur la digestion anaérobie. La Station de Technologie Alimentaire de l'INRA de Lille étudie ainsi, depuis 1977, l'épuration par voie anaérobie des effluents d'industries agro-alimentaires et a lancé, en 1979, un programme de recherche fondamentale sur la microbiologie et la biochimie de la méthanogénèse.

La fermentation méthanique est en effet un processus biologique complexe qui fait intervenir plusieurs groupes trophiques de microorganismes en interaction les uns avec les autres : les matières organiques sont dégradées par une première population bactérienne en molécules simples (acides gras volatils, lactate, alcool); ces composés intermédiaires sont ensuite convertis par un deuxième groupe de bactéries en acétate et hydrogène qui sont les seuls substrats assimilables par les bactéries productrices de méthane.

Depuis mon arrivée à l'INRA en 1980, je me suis intéressé à la dégradation des principaux métabolites intermédiaires produits par les bactéries hydrolytiques et fermentatives. Dans un premier temps, mon rôle

a principalement consisté à numérer et identifier les microorganismes impliqués dans cette étape. Certaines bactéries que nous avons ainsi pu mettre en évidence, présentaient un intérêt de par leur métabolisme, leur physiologie ou leur morphologie et leur étude constitue l'essentiel de ce mémoire.

Avant d'exposer les résultats de nos travaux, nous ferons un bref historique des découvertes qui ont permis, depuis la naissance de la microbiologie au siècle dernier, le développement des concepts modernes de la fermentation méthanique. Nous présenterons ensuite l'état actuel des connaissances sur la microbiologie et la biochimie des bactéries impliquées dans le métabolisme intermédiaire de la méthanogénèse.

Nos études sur les bactéries anaérobies présentes dans les digesteurs anaérobies ont fait l'objet de 10 publications scientifiques dont les 9 dernières sont reproduites dans ce mémoire.

Touzel J.P., Samain E., Albagnac G., Morfaux J.N. (1981) Microbiologie des digesteurs anaérobies de l'épuration des eaux résiduaires. Ind. Alim. Agric., 10, 833-842

Samain E., Albagnac G., Dubourguier H.C., Touzel J.P. (1982) Characterization of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor dependent association with a gram negative homoacetogen. FEMS Microbiol. Lett., 15, 69-74

Samain E., Dubourguier H.C., Albagnac G. (1984) Isolation and characterization of *Desulfobulbus elongatus* sp. nov. from a mesophilic industrial digester. System. Appl. Microbiol., 5, 391 -401.

Roy F., Albagnac G., Samain E. (1985) Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophic cultures degrading long chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 702-705

Samain E., Albagnac G., Dubourguier H.C. (1986) Initial steps of catabolism of trihydroxybenzenes in *Pelobacter acidigallici*. *Arch. Microbiol.*, 144, 242-244

Roy F., Samain E., Dubourguier H.C., Albagnac G. (1986) *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Arch. Microbiol.* 145, 142-147

Dubourguier H.C., Samain E., Prensier G., Albagnac G. (1986) Characterization of two strains of *Pelobacter carbinolicus* isolated from anaerobic digesters. *Arch. Microbiol.*, 145, 248-253

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

Samain E., Dubourguier H.C., Le Gall J., Albagnac G. (1986) Regulation of hydrogenase activity in the propionate oxidizing, sulfate reducing bacterium *Desulfobulbus elongatus*. *Biology of anaerobic bacteria*, Elsevier, Amsterdam, 23-27

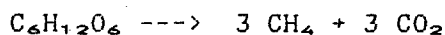
Samain E., Patil D.S., Der Vartanian D.V., Albagnac G., Le Gall J. (1987) Isolation of succinate dehydrogenase from *Desulfobulbus elongatus*, a propionate oxidizing, sulfate reducing bacterium. *FEBS Lett.*, 216, 140-144

GENERALITES

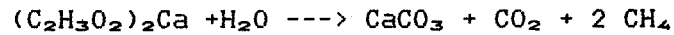
I. HISTORIQUE

1. LES PREMIERES ETUDES SUR LA FERMENTATION METHANIQUE (1776-1936)

En 1776, Volta, observant le dégagement de gaz inflammables à la surface de marais, établissait pour la première fois une relation entre ce phénomène et la présence de matières organiques en décomposition. Ce n'est cependant qu'un siècle plus tard que Béchamp (1868) démontra que le "gaz des marais" était d'origine microbiologique en décrivant un organisme, *Microsymbia cretae*, qui produisait du méthane à partir d'éthanol. Quelques années plus tard, Popoff (1875) étudia, dans le laboratoire de Hoppe-Seyler, la dégradation anaérobie de différentes matières organiques complexes et observa que la décomposition de la cellulose et de la gomme arabique s'accompagnait d'un dégagement de méthane, de gaz carbonique et parfois d'hydrogène. Il suggéra que la fermentation de la cellulose se caractérisait par une formation de CH_4 et de CO_2 et que la présence d'hydrogène n'était due qu'à des fermentations secondaires. Au début des années 1880, Tappeiner (cité par Omelianski 1898) observa que dans le rumen la cellulose était dégradée rapidement en acétate et butyrate et que cette réaction était associée à de fortes productions de CO_2 , d'hydrogène et parfois de méthane. Hoppe-Seyler (1887), reprenant les expériences de Popoff, obtint par contre une méthanisation complète de la cellulose sans production d'hydrogène ni d'acides organiques. Ces résultats, en apparence contradiction avec ceux de Tappeiner, confirmaient à ses yeux l'hypothèse de Popoff et il suggéra que la fermentation anaérobie type de la cellulose se réalisait suivant l'équation:



Quelques années auparavant Herter (Hoppe-Seyler 1876) avait déjà observé dans des boues anaérobies une conversion de l'acide acétique en CH_4 et CO_2 et en 1887 Hoppe-Seyler démontra que lorsque qu'une solution d'acétate de calcium était inoculée avec du limon de rivière, du carbonate de calcium, du CO_2 et du CH_4 étaient produits suivant l'équation suivante :



Il nota également que la quantité de matière introduite sous forme d'acétate de calcium se retrouvait presque intégralement dans les produits de fermentation et que la quantité de "ferment" produit était trop faible pour que l'on puisse conclure avec certitude à son augmentation.

En 1890 Van Senu (cité par Omelianski 1898) fut le premier à suggérer que le méthane n'était qu'un produit secondaire de la fermentation de la cellulose et que celle-ci était dans tous les cas dégradée tout d'abord en acétate, CO_2 et hydrogène. Selon Van Senu, le méthane serait formé dans une deuxième étape par réduction de l'acétate en présence d'hydrogène. Cette hypothèse était cependant loin de prévaloir lorsque, en 1893, Omeliansky chercha à isoler sous la direction de Winogradsky l'organisme responsable de la fermentation de la cellulose. Il réalisa des enrichissements sur un milieu minéral ne contenant que de la cellulose comme source de carbone et obtint après 4 transferts une culture homogène qui était principalement constituée de fins bacilles sporulés et qui décomposait la cellulose en CH_4 , CO_2 et H_2 (Omelianski 1897, 1898). Il constata cependant qu'au cours des transferts ultérieurs la quantité de méthane produite au lieu d'augmenter (ce qui était prévisible d'après la théorie de Hoppe-Seyler) diminuait progressivement jusqu'à disparaître complètement. Omeliansky en conclua que la cellulose pouvait subir deux types de fermentation, une dite de l'hydrogène et une

dite du méthane, et que ces deux fermentations étaient réalisées par deux organismes différents. Il montra par la suite que ces deux fermentations pouvaient être séparées par une combinaison de pasteurisations et d'ensemencements successifs (Omeliansky 1904, 1906) et que les deux ferments étaient des bacilles sporulés très proches morphologiquement l'un de l'autre. Il notait cependant que celui du méthane était un peu plus petit et plus sensible à la température que celui de l'hydrogène.

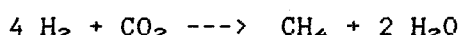
En examinant les bactéries qui se développaient lors de la décomposition anaérobie de feuilles mortes, Mazé (1903) observa un microorganisme d'un aspect mûriforme dont la présence coïncidait toujours avec la production de méthane et qu'il désigna sous le terme de pseudo-sarcine. Il montra que cet organisme était sensible à la température et que son élimination par pasteurisation se traduisait par une disparition de la formation de méthane et par une accumulation d'hydrogène et d'acides acétique et butyrique. Comme ces composés n'étaient pas retrouvés dans les cultures non pasteurisées bien que des ferments butyriques y soient présents, Mazé en déduisit : "...la fermentation forménique se greffe sur les fermentations butyriques et s'alimente aux dépens des produits fournis par ces dernières, y compris probablement l'hydrogène." Afin de vérifier son hypothèse il ensemença un milieu contenant uniquement de l'acétate et du butyrate. Il constata effectivement une formation de méthane et le développement de la pseudo-sarcine et en conclut que cette dernière était l'agent de la fermentation méthanique. Omeliansky (1906) signala également à peu près à la même époque la présence de sarcines dans des cultures méthanogènes et montra qu'elles dégradent le butyrate.

Sönghen (1910) étudia systématiquement la décomposition anaérobie de sels de calcium d'acide gras et établissait les bilans de fermentation du formate, de l'acétate, du butyrate, du caproate et du caprylate. Il

observa de plus que les acides à nombre impair de carbone (propionate, valérate ...) n'étaient pas dégradés. Ce dernier résultat qui peut nous paraître surprenant aujourd'hui, s'explique probablement par l'effet toxique de ces composés aux concentrations utilisées par Söhngen (20 g/l). Tout comme Hope-Seyler (1887) quelques années plus tôt, Söhngen constata que les acides gras étaient dégradés presque stoéchiométriquement en CH_4 et CO_2 et que la croissance bactérienne associée à ces fermentations était extrêmement faible. En utilisant un milieu minéral dépourvu d'azote organique et de faibles inocula, il parvint cependant à éliminer progressivement la plupart des contaminants de ses cultures et à montrer que deux formes bactériennes seulement, une sarcine et un bacille, jouaient un rôle dans la formation du méthane. Les sarcines prédominaient généralement dans les cultures sur acétate tandis que les bacilles qui s'associaient souvent pour former de très longs filaments, se développaient préférentiellement sur butyrate. Il démontra de plus que le bacille du méthane qu'il avait purifié n'était pas sporulé, ne fermentait pas la cellulose et était donc différent de celui que Omeliansky avait observé dans ses enrichissements sur cellulose.

Söhngen étudia également la fermentation de la cellulose et obtint les mêmes résultats que Omelianski. Cependant, constatant qu'il pouvait toujours mettre en évidence par pasteurisation le ferment de l'hydrogène dans des cultures ne produisant que du méthane et du CO_2 , il se demanda si l'absence d'hydrogène dans ces cultures ne pouvait pas s'expliquer par une utilisation de l'hydrogène par les ferments du méthane. Cette hypothèse avait déjà été formulée implicitement par Mazé en 1903 et Söhngen la vérifia expérimentalement en démontrant une consommation d'hydrogène exogène dans une culture méthanogène qui dégradait de la cellulose. A la suite de cette découverte, il regarda si de l'hydrogène pouvait également être utilisé lors de la fermentation méthanique du

butyrate et du formate. Ce faisant, il constata que la quantité d'hydrogène absorbée était supérieure à celle qui aurait juste correspondu à une réduction de ces composés en méthane. Söhngen en déduisit qu'il devait exister dans ses milieux un autre accepteur d'hydrogène et que celui-ci ne pouvait être que le CO_2 . Il rajouta donc de l'hydrogène et du CO_2 dans une culture méthanogène ne contenant pas d'autre source de carbone et observa une formation de méthane suivant l'équation:



Dans les années qui suivirent, Mazé (1915) montra que la pseudo-sarcine qu'il avait décrite pouvait être cultivée sur acétone et Omeliansky (1916) confirma les premières observations de Béchamp en obtenant un enrichissement méthanogène dégradant l'éthanol.

Parallèlement aux recherches fondamentales de microbiologie que nous venons de citer, on observe à la même période un développement d'études plus appliquées visant à utiliser la fermentation méthanique comme technique de dépollution (principalement des eaux urbaines) et éventuellement comme moyen de valorisation énergétique de sous produits agricoles. Après les travaux de Mazé et de Söhngen il devint progressivement de plus en plus évident que les bactéries méthanogènes ne pouvaient utiliser directement les matières organiques complexes, et les technologues qui travaillaient sur les procédés de digestion anaérobie introduisirent le concept d'une fermentation méthanique divisée en deux phases qui allait subsister jusqu'à la fin des années 60. Dans la première phase qualifiée de putride puis d'acidogène, les matières organiques complexes sont décomposées en hydrogène et en acides organiques. Ces composés sont ensuite dégradés en méthane et CO_2 dans la deuxième étape appelée phase inodore ou méthanogène. Ce nouveau concept et son importance sur la stabilité des procédés de digestion anaérobie

furent développés par la suite par Buswell et ses collaborateurs qui étudièrent la traitabilité de nombreux effluents d'origines urbaine, agricole et industrielle et montrèrent que pratiquement tous les composés organiques simples (notamment le propionate et le benzoate) étaient susceptibles d'être dégradés en CH_4 et CO_2 (Tarwin et Buswell 1934).

2. LA THEORIE DE VAN NIELS SUR LA SYNTHÈSE DU METHANE PAR REDUCTION DU CO_2 (1936-1947)

Lorsque Barker (1936a) publia son étude sur la biochimie de la fermentation méthanique, les principaux substrats que l'on supposait pouvoir être utilisés directement par les bactéries méthanogènes, avaient donc été identifiés. Il apparaissait cependant difficile de proposer un mécanisme général pouvant s'appliquer à la fermentation méthanique de molécules aussi différentes que l'hydrogène, l'acétate, le butyrate ou l'éthanol. Selon Buswell et Neave (1930), la formation de CH_4 et de CO_2 s'expliquerait par des réactions d'oxydo-réduction intramoléculaires: au sein d'une même molécule, certains atomes de carbone seraient oxydés en CO_2 tandis que parallèlement les autres atomes seraient réduits en CH_4 . Buswell n'excluait cependant pas dans certains cas, comme celui de la fermentation de l'hydrogène, la possibilité d'une réduction directe du CO_2 en CH_4 . Van Niels se demanda si au contraire ce dernier mécanisme ne pouvait pas être généralisé à toutes les fermentations méthaniques. Le méthane dériverait ainsi dans tous les cas du CO_2 et l'hydrogène nécessaire à cette réduction proviendrait de l'oxydation du composé organique subissant la fermentation méthanique.

Baars en 1930 avait par ailleurs démontré que *Vibrio desulfuricans* oxydait en présence de sulfate l'éthanol en acétate suivant l'équation:



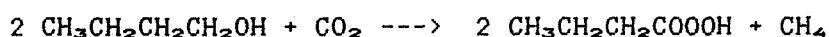
Le sulfate jouait donc dans cette fermentation le même rôle d'accepteur

d'hydrogène que le CO_2 dans l'hypothèse de van Niels. Barker (1936a) remarqua que si une oxydation analogue de l'éthanol était réalisée par une bactérie méthanogène, il observerait une consommation de CO_2 stoechiométriquement liée à une production de méthane et d'acétate et il pourrait ainsi vérifier expérimentalement la théorie de van Niels. Il étudia donc la fermentation méthanique de plusieurs alcools (éthanol, propanol, butanol) en utilisant des milieux de culture minéraux ne contenant que le substrat et du carbonate de calcium comme source de carbone et de l'ammoniaque comme source d'azote. Il parvint à préparer ces milieux de manière parfaitement anaérobie en y ajoutant, après avoir éliminé la majorité de l'oxygène par ébullition, un agent réducteur (le sulfure de sodium). Il put ainsi obtenir assez facilement, malgré l'extrême sensibilité des bactéries méthanogènes à l'oxygène, des enrichissements dégradant les différents alcools en CH_4 et CO_2 . En suivant le déroulement de la fermentation de l'éthanol par un de ces enrichissements, il observa une accumulation transitoire d'acétate dans le milieu. L'examen microscopique de la culture indiquait que la phase de production d'acide correspondait au développement d'un bacille assez fin, tandis que la deuxième étape de consommation de l'acétate permettait la croissance préférentielle de sarcines et de coques. Il était donc probable que les organismes qui se développaient les premiers n'étaient responsables que de la déshydrogénation de l'éthanol en acétate. Barker établissait un bilan complet de fermentation à la fin de la première phase et démontrait que cette déshydrogénation était bien associée à une réduction de CO_2 en CH_4 suivant l'équation:

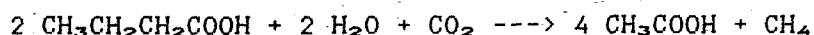


Barker observa également une production transitoire de butyrate et d'acétate dans les enrichissements méthanogènes dégradant le butanol. Il montra que ce dernier était tout d'abord converti en butyrate selon un

mécanisme analogue à celui de la déshydrogénation de l'éthanol:



Le butyrate formé subissait ensuite une seconde oxydation pour donner deux acétates selon l'équation:



La théorie de van Niels qui reste d'ailleurs dans ses grandes lignes encore valable aujourd'hui, était donc pleinement confirmée par les résultats de Barker et celui-ci proposa de la généraliser à la fermentation méthanique de l'acétate. Ce dernier serait donc complètement oxydé en CO_2 , tandis que parallèlement du CO_2 serait réduit en CH_4 .

Les travaux de Barker permirent également d'infirmer l'hypothèse de Fischer et al. (1932) qui voulait que l'acétate soit un intermédiaire dans la fermentation méthanique de l'hydrogène. Ces auteurs avaient en effet observé dans certains environnements méthanogènes une conversion du mélange H_2/CO_2 en acétate et Wieringa (1936) confirma ces résultats en isolant un bacille sporulé qui réduisait le CO_2 en acétate en présence d'hydrogène. Barker, en montrant que lors de la fermentation de l'éthanol du CH_4 était produit à partir de CO_2 sans dégradation d'acétate, prouvait ainsi que ce dernier n'était pas un intermédiaire obligatoire dans la réduction du CO_2 en CH_4 .

Barker (1936b) caractérisa ensuite plus précisément la bactérie méthanogène responsable de la fermentation de l'éthanol. Il montra qu'elle oxydait également le butanol en butyrate et probablement le butyrate en acétate et la décrivit comme une nouvelle espèce, *Methanobacterium omelianskii*. Il parvint à la cultiver en milieu solide et observa des colonies et des poches de gaz jusqu'à la dilution 10^{-7} dans des tubes de gélose profonde inoculés à partir de la culture purifiée par enrichissement. Il isola ainsi, à partir d'une de ces colonies, ce qu'il pensait être une souche pure de *M. omelianskii* et

précisa ses besoins nutritionnels (Barker 1940, 1941). Il testa un grand nombre de substrats et montra qu'elle n'utilisait que certains alcools primaires et secondaires et qu'elle était incapable de fermenter le butyrate comme il l'avait tout d'abord supposé.

Barker (1936b) purifia également par des enrichissements sur acétate et butyrate, trois bactéries méthanogènes de morphologies différentes : une sarcine et un filament semblables à ceux que Söhngen avait déjà observés et qu'il appela *Methanosarcina methanica* et *Methanobacterium soehngenii*, et un coque probablement identique à la pseudo-sarcine de Mazé qu'il dénomma *Methanococcus mazei*. Il décrivit ces trois espèces comme pouvant fermenter l'acétate et le butyrate mais comme étant incapables d'utiliser l'éthanol.

3. LE SCHEMA DE BARKER (1947-1956)

Grâce à l'utilisation de composés marqués avec du carbone 14, Buswell et Sollo (1948) et Stadtman et Barker (1949) démontrèrent que le méthane produit lors de la fermentation de l'acétate par des cultures de *Methanococcus* provenait non pas de la réduction du CO_2 mais du groupement méthyl de l'acétate. Stadtman et Barker (1951a) confirmèrent cette observation avec une culture de *Methanosarcina* et montrèrent de plus que, lors de la fermentation du méthanol, ce dernier était le précurseur direct du méthane. Ces résultats allaient à l'encontre de la théorie de van Niels qui voulait que dans tous les cas le méthane soit formé par réduction du CO_2 .

Il était donc important de vérifier si le mécanisme de dégradation des acides gras volatils autres que l'acétate était bien conforme à la théorie de van Niels comme l'avait en partie démontré Barker en 1936. Stadtman et Barker (1951b) étudièrent donc la fermentation méthanique du propionate, du butyrate, du valérate et du caproate en utilisant des

composés marqués avec du carbone 14. A partir d'enrichissements sur caproate, ils obtinrent après une série d'isolements en gélose profonde, une culture méthanogène hautement purifiée qui décomposait le caproate et le butyrate en acétate et le valérate en acétate et propionate. La bactérie qui prédominait dans cette culture était un petit bacille légèrement incurvé que Stadtman et Barker décrivirent comme une nouvelle espèce de *Methanobacterium*, *M. suboxidans*. Cette bactérie ne fermentait pas l'acide propionique et Stadtman et Barker purifièrent par enrichissements un autre organisme méthanogène qui décomposait cet acide en acétate et CO_2 . La bactérie prépondérante dans cet enrichissement était un court bacille assez épais qu'ils appelèrent *Methanobacterium propionicum*.

Stadtman et Barker démontrèrent ensuite en utilisant du $^{14}\text{CO}_2$ que le méthane produit lors de la fermentation du butyrate et du valérate par *M. suboxidans* et du propionate par *M. propionicum* dérivait uniquement du CO_2 . Examinant la fermentation de $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ valérate par *M. suboxidans*, ils constatèrent la formation de propionate marqué et d'acétate froid. Ce résultat indiquait que, chez cette bactérie, le mécanisme de dégradation des acides gras volatils était probablement identique à celui de la β -oxydation qui venait d'être décrit dans des tissus animaux. Stadtman et Barker observèrent également que la fermentation de $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ propionate par *M. propionicum* conduisait à la formation de CO_2 radioactif et d'acétate froid.

Les dernières expériences de Stadtman et Barker confirmaient donc entièrement la théorie de van Niel. Cependant, dans son énoncé initial, cette théorie ne permettait pas d'expliquer pourquoi le CH_4 formé lors de la fermentation du méthanol et de l'acétate ne dérivait pas du CO_2 . Constatant que *Methanosarcina barkeri* produisait du CH_4 aussi bien à partir d'acétate et de méthanol que du mélange H_2/CO_2 (Schnellen 1947),

Barker (1956) en conclut qu'il était peu probable qu'un même organisme utilise des mécanismes entièrement différents pour des fermentations conduisant toutes à la formation de CH_4 . Il proposa donc un schéma unique dans lequel les différentes voies de synthèse du méthane convergeraient au niveau d'un intermédiaire méthylé commun. Aucun intermédiaire libre (formate, formaldéhyde, méthanol) n'ayant pu être mis en évidence dans la voie de réduction du CO_2 en méthane, il postula l'existence d'un transporteur de groupement monocarboné X qui interviendrait dans les trois premières étapes de la réduction du CO_2 et qui pourrait également accepter des groupements méthyl provenant du méthanol ou de la décarboxylation de l'acétate. La dernière étape de réduction du $\text{CH}_3\text{-X}$ en CH_4 serait ensuite commune quelque soit le substrat (figure n°1). Le schéma de Barker demeure encore valable aujourd'hui dans son principe et plusieurs transporteurs de groupements monocarbonés ont depuis été identifiés (coenzyme M, méthanoptérine). Le lecteur intéressé par ce sujet pourra se référer aux revues récentes de Wolfe (1985) et de Jones et al. (1985,1987).

4. LE DEVELOPPEMENT DU CONCEPT DE TRANSFERT INTERSPECIFIQUE D'HYDROGENE

Parmi le peu de bactéries méthanogènes disponibles en culture pure à la fin des années 50, *Methanobacterium omelianskii* (rebaptisé *Methanobacillus omelianskii* par Barker en 1956) était l'organisme le plus facile à cultiver. C'est probablement pour cette raison que, durant les années 60, la plupart des études sur le métabolisme des méthanogènes furent réalisées sur cette bactérie. En 1943, Barker avait déjà observé que les cellules de *M. omelianskii* réduisaient le CO_2 en CH_4 en présence d'hydrogène et Wolin et al. (1963) démontrèrent que des extraits cellulaires de cette bactérie catalysaient également cette réaction pour

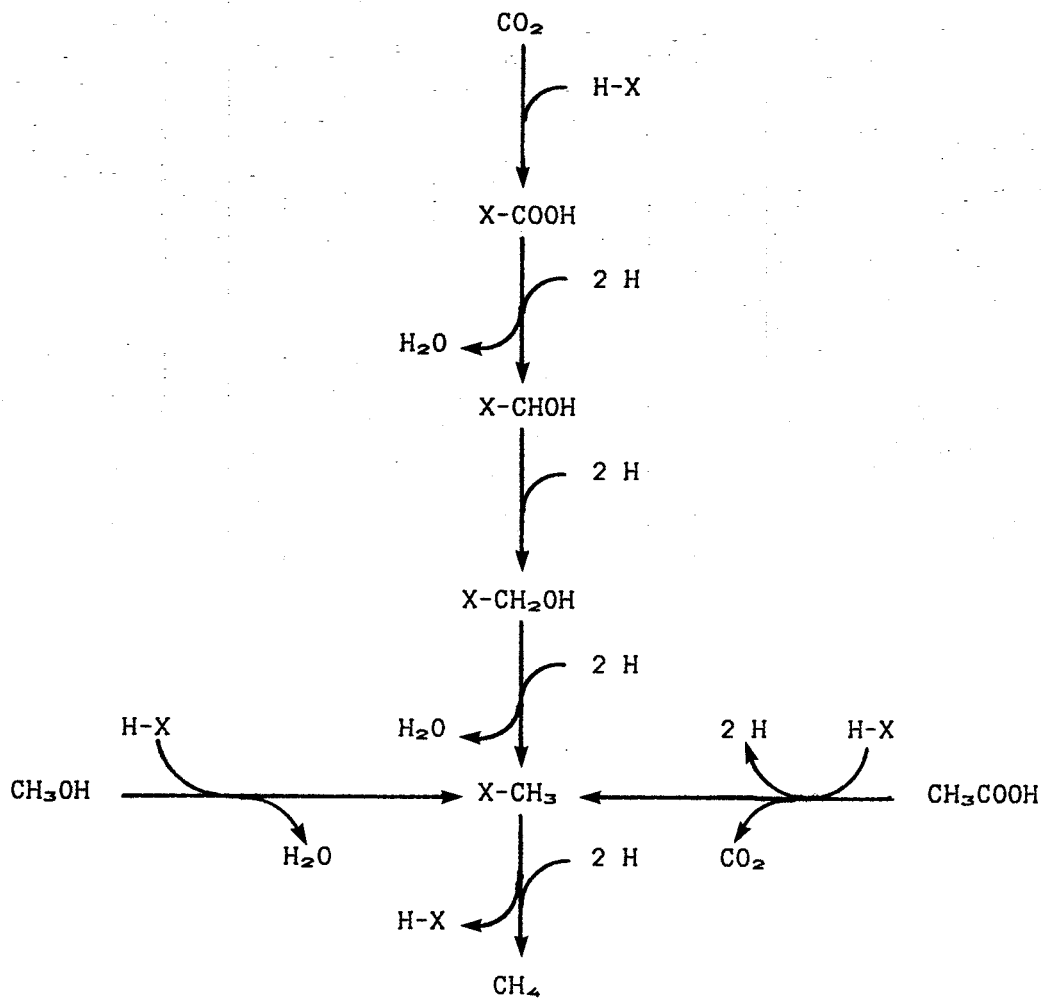
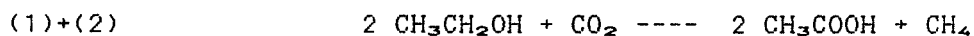
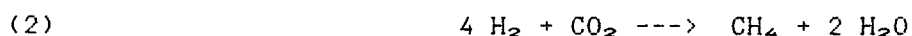
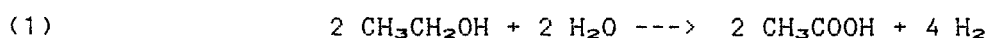


Figure n°1. Schéma de Barker de la méthanogénèse

peu que de l'ATP soit ajouté au mélange réactionnel. Aucune activité n'était par contre détectée dans ces extraits si l'hydrogène était remplacé par de l'éthanol comme source d'électrons. D'autre part, Johns et Barker (1960) avaient montré que des cellules non proliférantes de *M. omelianskii* produisaient, en absence de CO_2 , des traces d'hydrogène à partir d'éthanol. L'ensemble de ces résultats suggérait que l'hydrogène moléculaire jouait un rôle essentiel dans la fermentation méthanique de l'éthanol. Par ailleurs Wolin et Wolfe (cités par Bryant et al. 1967) remarquèrent que les cultures de *M. omelianskii* semblaient contenir deux types de bactéries de morphologies très légèrement différentes et ils tentèrent sans succès de les séparer en utilisant les mêmes techniques de purification que Barker (1940). Bryant et al. (1967) observèrent que l'addition d'hydrogène (0,5 atm) inhibait la dégradation de l'éthanol par *M. omelianskii* et que, après avoir été cultivé sur H_2/CO_2 , ce dernier perdait la capacité de fermenter l'éthanol. D'autre part, après plusieurs transferts dans ces conditions, l'examen microscopique ne révélait plus qu'une seule morphologie. Ces résultats suggéraient que *M. omelianskii* était constitué de deux types de microorganismes: une bactérie méthanogène qui utiliserait l'hydrogène mais pas l'éthanol et un second organisme qui décomposerait l'éthanol en acétate et hydrogène et qui serait inhibé par 0,5 atm d'hydrogène.

Bryant et al. (1967) confirmèrent cette hypothèse en purifiant à partir d'une culture de *M. omelianskii* dégradant l'éthanol, deux bactéries différentes. Sur milieu éthanol en présence d'hydrogène dans la phase gazeuse ils observèrent des colonies jusqu'à la dilution 10^{-7} et purifièrent à partir de ces colonies des souches méthanogènes n'utilisant que l'hydrogène comme donneur d'électrons. Par contre, sur le même milieu mais en absence d'hydrogène ils ne dénombrèrent que 10^5 colonies. Ils repiquèrent quelques-unes de ces colonies en milieu liquide et

observèrent une très faible croissance et une petite production d'hydrogène. La bactérie qui se développait dans ces conditions était un petit bacille légèrement incurvé qu'ils appelèrent l'"organisme S" et qui était vraisemblablement responsable de la dégradation de l'éthanol en acétate et hydrogène. Les très faibles croissances observées s'expliquaient par l'effet inhibiteur de l'hydrogène sur le développement de cette bactérie. Bryant et al. réassocièrent ensuite l'"organisme S" avec une bactérie méthanogène utilisatrice d'hydrogène (soit *M. ruminantium*, soit une des souches qui avaient été isolées à partir de *M. omelianskii* et qui fut décrite plus tard sous le nom de *Methanobacterium bryantii*) et observèrent une bonne croissance des deux bactéries et une complète dégradation de l'éthanol en acétate et CH₄. La bactérie méthanogène utilisait l'hydrogène au fur et à mesure de sa formation par l'"organisme S" et levait ainsi l'inhibition de la croissance de ce dernier. *M. omelianskii* était donc une association syntrophique de deux bactéries et la fermentation méthanique de l'éthanol pouvait être considérée comme la somme de deux équations:



Reddy et al. étudièrent ensuite l'"organisme S" d'un point de vue physiologique (1972a) et métabolique (1972b, 1972c) et montrèrent qu'il pouvait fermenter en culture pure le pyruvate en acétate, éthanol et hydrogène. La croissance sur pyruvate était cependant supérieure quand l'"organisme S" était associé à une bactérie méthanogène utilisatrice d'hydrogène et, dans ce cas, l'acétate et le méthane étaient les seuls produits retrouvés. La présence d'une méthanogène modifiait donc les bilans de fermentation du pyruvate. En culture pure, l'hydrogène

s'accumulant dans le milieu, les électrons provenant de l'oxydation du pyruvate en acétate étaient principalement utilisés pour la formation d'éthanol. Au contraire, en coculture avec une méthanogène, la concentration en hydrogène étant maintenue très faible, la réduction de protons en hydrogène devenait le principal mécanisme de régénération des coenzymes réduits et la production d'éthanol était négligeable.

Hungate (1966) avait observé que dans le rumen les bactéries méthanogènes maintenaient en permanence une très faible pression partielle d'hydrogène (inférieure à 10^{-3} atm) et Wolin suggéra que ces conditions pouvaient influencer sur le métabolisme des bactéries fermentatives et favoriser la formation de produits plus oxydés comme dans le cas de la fermentation du pyruvate par l'"organisme S". Afin de vérifier cette hypothèse, Iannotti et al. (1973) étudièrent en chimostat la fermentation du glucose par *Ruminococcus albus* en présence et en absence de *Vibrio succinogenes*, bactérie utilisant l'hydrogène pour réduire le fumarate en succinate. Alors que *R. albus* dégradait en culture pure le glucose en acétate, éthanol et hydrogène, ils observèrent qu'il produisait en coculture exclusivement de l'acétate et de l'hydrogène.

Les interactions entre bactéries productrices d'hydrogène et méthanogènes utilisatrices d'hydrogène furent ensuite discutées d'un point de vue théorique par Wolin (1974, 1976) et Thauer et al. (1977) en fonction de considérations thermodynamiques et métaboliques. La dégradation de l'éthanol en acétate et hydrogène est thermodynamiquement défavorable dans les conditions standard: à pH 7 avec une pression partielle d'hydrogène ($P[H_2]$) de 1 atm le $\Delta G_o'$ de la réaction est de +2,3 kcal/mole. Par contre, si la concentration en hydrogène est maintenue très faible par l'action des méthanogènes, la réaction devient exergonique (pour une $P[H_2]$ de 10^{-4} atm, $\Delta G_o' = -8,6$ kcal/mole) et la croissance de l'"organisme S" devient possible.

Chez les bactéries fermentatives dégradant les sucres, les pyridines nucléotides réduites lors de la glycolyse sont normalement réoxydées grâce à la synthèse de métabolites réduits (lactate, propionate, éthanol, butyrate...) à partir de pyruvate ou d'acétyl CoA. Chez les organismes possédant l'équipement enzymatique nécessaire à la formation d'hydrogène, ce dernier est principalement produit lors de l'oxydation du pyruvate en acétate par l'intermédiaire de la ferrédoxine. Une partie de l'hydrogène peut cependant être formée à partir de NADH grâce à l'action d'une NADH-ferrédoxine oxydoréductase (Jungermann et al. 1973). Cette dernière réaction est endergonique dans les conditions standard (les potentiels d'oxydo-réduction des couples H^+/H_2 et $NAD^+/NADH$ sont en effet respectivement de -420 et -320 mV) et n'est par conséquent thermodynamiquement possible que si la $P[H_2]$ est suffisamment basse (Figure n°2). Ceci explique qu'en coculture avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène, *Ruminococcus albus* puisse régénérer la majeure partie de ses pyridines nucléotides réduites en produisant de l'hydrogène au lieu de réduire de l'acétyl-CoA en éthanol (figure n°3). Cette déviation du flux d'électrons se traduit également par un meilleur rendement énergétique de la fermentation : l'acétyl-CoA n'étant pas réduit en éthanol peut être décomposé en acétate et permettre ainsi la synthèse d'ATP supplémentaire.

Le fait que *M. omelianskii* soit une association syntrophique de deux bactéries et qu'aucune culture pure dégradant des acides gras volatils de plus de deux carbones n'ait pu être obtenue suggérerait que les bactéries méthanogènes n'étaient capables d'utiliser qu'un nombre très restreint de substrat (acétate et certains composés monocarbonés). La fermentation méthanique ne pouvait donc plus être considérée comme une réaction en deux étapes faisant intervenir deux groupes de microorganismes : les bactéries acidogènes et méthanogènes. Bryant (1976, 1979) définit alors

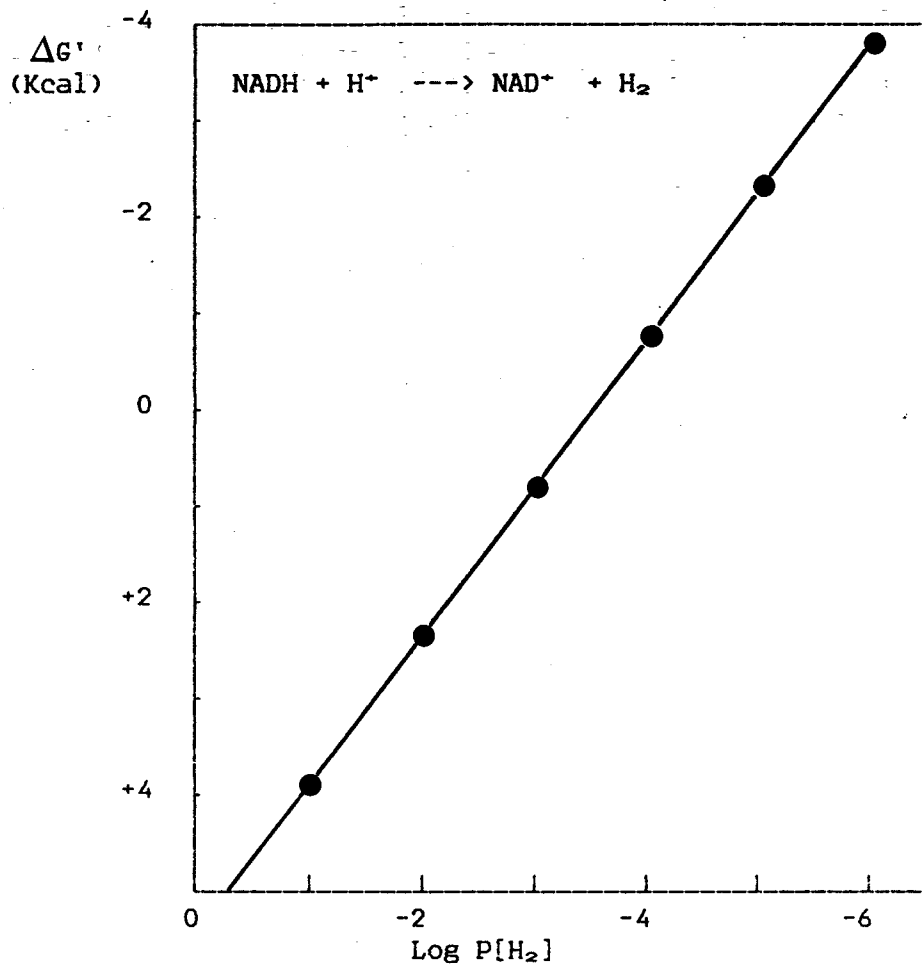
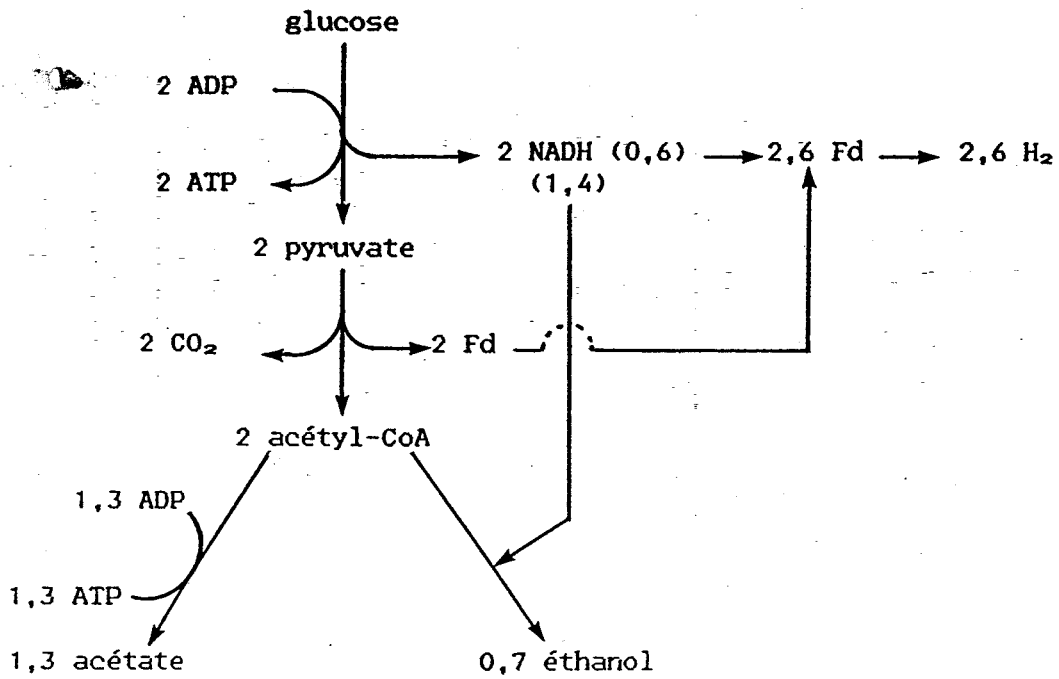


Figure n°2. Influence de la pression partielle d'hydrogène ($P[H_2]$) sur la variation d'énergie libre ($\Delta G'$ à pH 7,0 et à 25 °C) de la réaction de déshydrogénation du NADH couplée à la réduction de protons en hydrogène.

R. albus (mono-culture)

3,3 ATP / mole de glucose

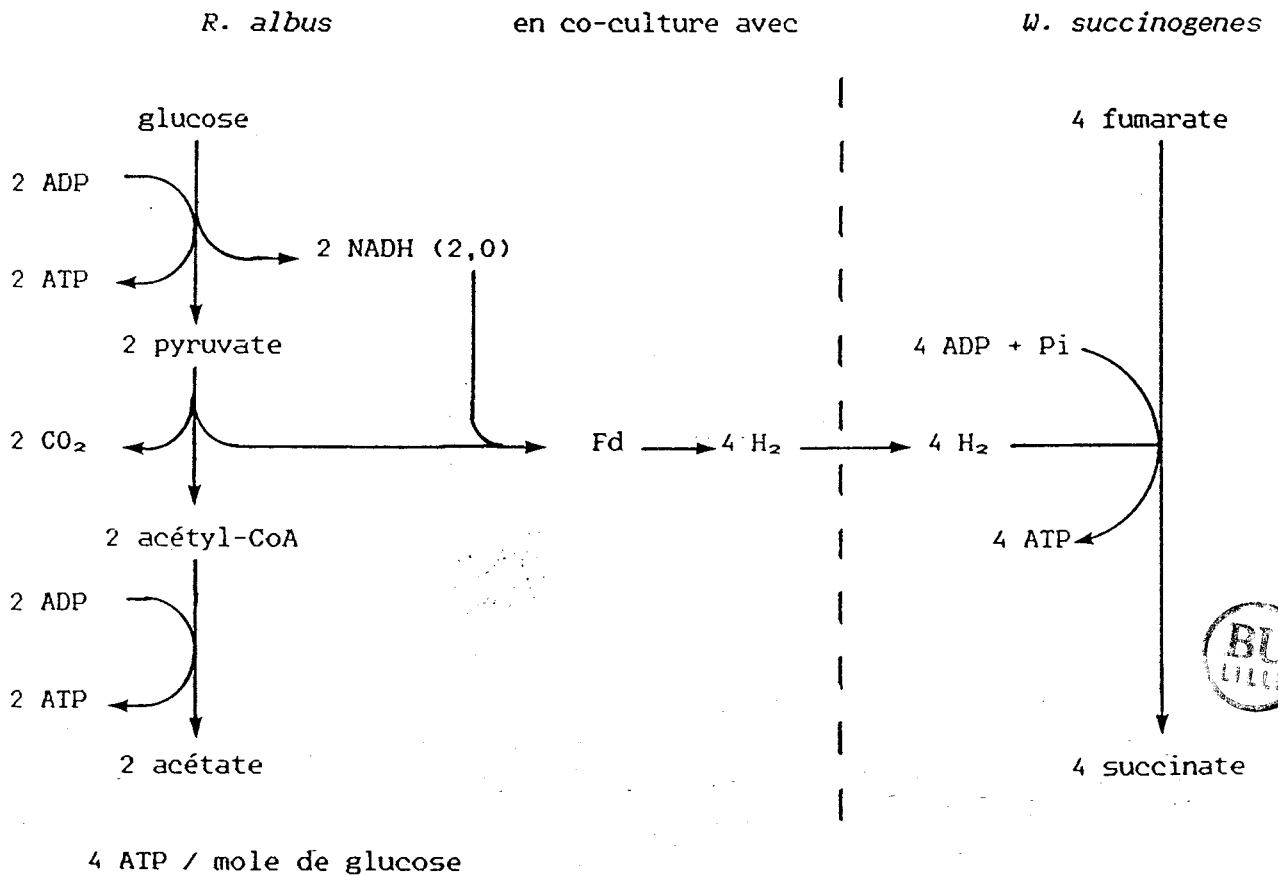


Figure n°3. Transfert interspécifique d'hydrogène entre *Ruminococcus albus* et *Wolinella succinogenes*: influence sur les produits de fermentation et le nombre de moles d'ATP produites par mole de glucose dégradée.

une troisième étape dans laquelle les métabolites produits dans la première phase par les bactéries hydrolytiques et fermentatives (alcools, acides gras volatils à plus de deux carbones, acides organiques...) seraient dégradés en acétate et hydrogène par un groupe particulier de microorganismes appelés bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène. Comme celle de l'"organisme S", la croissance de ces bactéries n'est possible que si la pression partielle d'hydrogène est suffisamment faible. Dans les écosystèmes méthanogènes cette condition est réalisée grâce à l'action des méthanogènes hydrogénophiles qui maintiennent des concentrations en hydrogène inférieures à $1 \mu\text{M}$ (Hungate 1967).

Ce nouveau schéma en trois étapes qui a été repris et complété par de nombreux auteurs (Zeikus 1979, Zehnder 1981, Mc Inerney et al. 1980) est à la base des conceptions modernes sur l'écologie et la physiologie de la fermentation méthanique que nous allons développer maintenant.

II. ECOLOGIE DE LA FERMENTATION METHANIQUE

Dans les écosystèmes anaérobies, la dégradation complète des matières organiques en CH_4 et CO_2 est donc envisagée depuis les travaux de Bryant comme un processus biologique complexe faisant intervenir trois grands groupes trophiques de microorganismes (figure n°4). Par ailleurs, d'autres types de microorganismes comme les bactéries homoacétogènes et sulfatoréductrices peuvent, dans certains cas, jouer un rôle plus ou moins important dans la digestion anaérobie. Dans ce chapitre nous présenterons ces différents groupes trophiques de microorganismes en insistant sur leur signification écologique et sur les relations interspécifiques.

1. LES BACTERIES HYDROLYTIQUES ET FERMENTATIVES

Ces bactéries sont responsables de la dégradation des matières organiques (mono et polysaccharides, protéines, lipides) en molécules simples: acides gras volatils, acides organiques (lactate, succinate), alcools, hydrogène et CO_2 . Ce sont des organismes qui sont morphologiquement et taxonomiquement très divers et qui peuvent être assimilés aux bactéries acidogènes du schéma en deux étapes. Elles ont généralement des taux de croissance élevés et n'ont pas d'exigences très strictes vis à vis du pH et du potentiel rédox du milieu. Dans le cas de la dégradation des sucres, les transferts interspécifiques d'hydrogène entre bactéries fermentatives et méthanogènes font que dans les écosystèmes anaérobies où l'activité des méthanogènes est suffisante pour maintenir une faible $P[\text{H}_2]$, la production de composés réduits comme le lactate, l'éthanol et dans une moindre mesure le propionate et le butyrate, est probablement moins importante que ne laisserait supposer l'examen des bilans de fermentation des bactéries fermentatives en

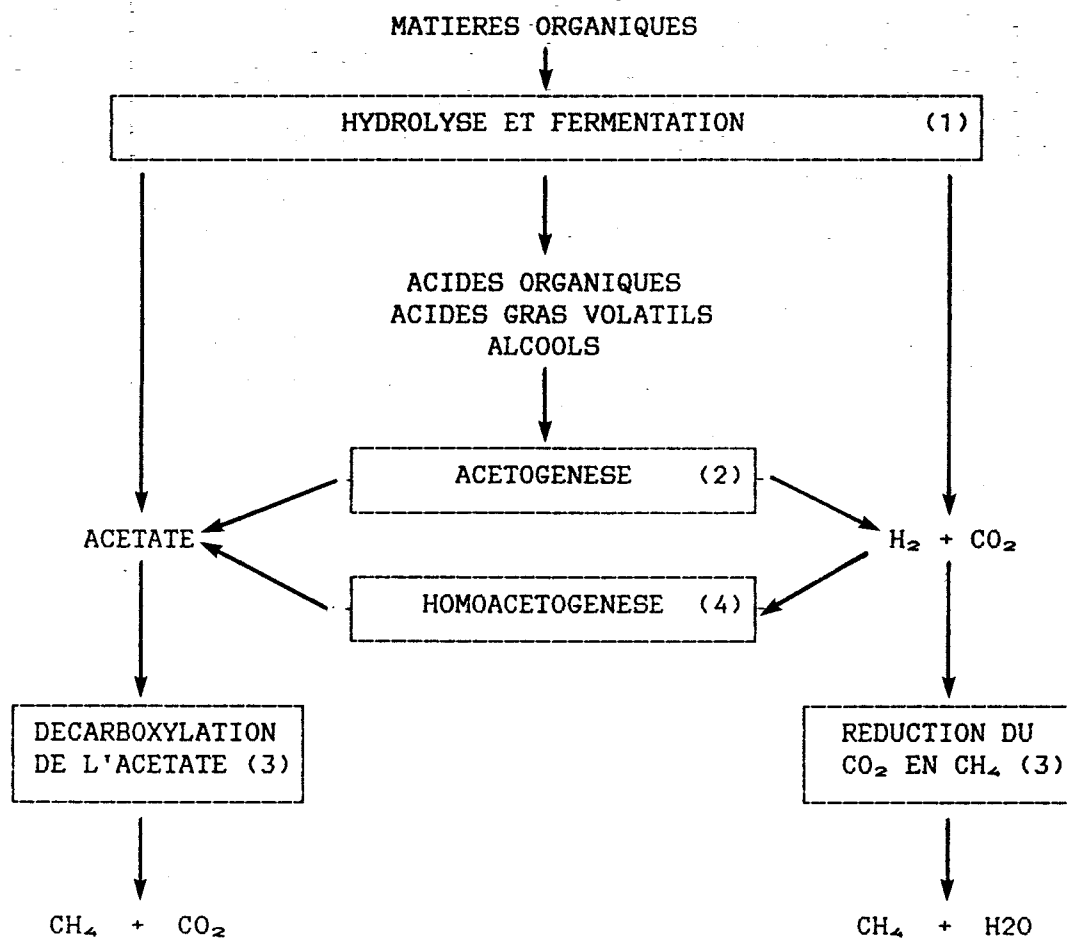


Figure n°4. Schema en 3 étapes de la fermentation méthanique: (1) bactéries hydrolytiques et fermentatives; (2) bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène; (3) bactéries méthanogènes. De l'acétate peut également provenir de la réduction du CO₂ (groupe 4).

culture pure. De nombreuses espèces de bactéries fermentatives sont cependant dépourvues d'hydrogénases (bactéries lactiques et propioniques) ou produisent de l'hydrogène uniquement par la formate hydrogène lyase (entérobactéries) et leur métabolisme n'est par conséquent pas influencé par la $P[H_2]$. Le lactate et l'éthanol sont donc dans certains environnements méthanogènes des intermédiaires importants. Ces composés peuvent être utilisés directement par des bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène mais sont également susceptibles d'être dégradés en propionate ou butyrate par des bactéries fermentatives (voir chapitre V).

2. LES BACTERIES ACETOGENES PRODUCTRICES OBLIGEES D'HYDROGENE

Ces bactéries appelées O.H.P.A. (Obligate Hydrogen Producing Acetogens) ou encore O.P.R. (Obligate Proton Reducers) sont probablement les organismes les plus mal connus bien que leur rôle dans la fermentation méthanique soit fondamental puisqu'elles permettent de transformer les métabolites produits par les bactéries fermentatives en substrats assimilables par les méthanogènes.

Les seules bactéries connues appartenant à ce groupe étaient en 1979 l'"organisme S" et certaines espèces de *Desulfovibrio*. Bryant et al. (1977) avaient en effet montré que ces dernières qui dégradent le lactate et l'éthanol en acétate en réduisant simultanément le sulfate en sulfure d'hydrogène, pouvaient, en absence de sulfate et en association avec des méthanogènes, jouer le même rôle que l'"organisme S". Les deux espèces de *Methanobacterium* décrites par Stadtman et Barber (1951) comme pouvant dégrader le butyrate (*M. suboxydans*) et le propionate (*M. propionicum*) en acétate et méthane étaient donc comme *M. omelianskii* des associations syntrophiques entre des bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène et des méthanogènes. La dégradation de ces composés en

acétate et hydrogène est cependant beaucoup plus défavorable thermodynamiquement que celle du lactate et de l'éthanol (tableau I). Les pressions partielles d'hydrogène qui permettraient la croissance de bactéries dégradant le propionate ou le butyrate doivent donc être extrêmement faibles (figure n°5) et ces conditions rendaient très difficiles leurs isollements. Mc Inerney et al. (1979) réussirent cependant à isoler en coculture avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène un organisme fermentant le butyrate en acétate et hydrogène. La purification de cette coculture fut possible grâce au développement par ces auteurs d'une nouvelle technique qui consistait à introduire dans le milieu gélosé d'isolement une forte concentration de bactéries utilisatrices d'hydrogène. Cette technique permit par la suite la purification de plusieurs autres bactéries acétogènes dont nous donnons la description dans le chapitre III consacré à ces microorganismes.

3. LES BACTERIES METHANOGENES

Elles sont responsables de la fermentation méthanique proprement dite et ne peuvent utiliser que l'acétate et certains composés monocarbonés : H_2/CO_2 , CO, formate, méthanol, méthylamine. Fox et al. (1977) démontrèrent par l'analyse des séquences de l'ARN ribosomal 16 S que ces bactéries constituaient un groupe phylogénétique homogène et différent des autres groupes bactériens. Selon Woese (1978), les méthanogènes appartiendraient avec les thermoacidophiles et certaines halophiles à une troisième lignée d'êtres vivants, les archéobactéries, qui seraient aussi différentes des vraies bactéries (eubactéries) que des eucaryotes. Les archéobactéries se différencient des eubactéries par la nature de leurs lipides membranaires et par la composition de leur paroi qui est dépourvue de peptidoglycanes et d'acide muramique. En se basant sur les homologies entre les séquences de l'ARN ribosomique 16 S, Balch et al.

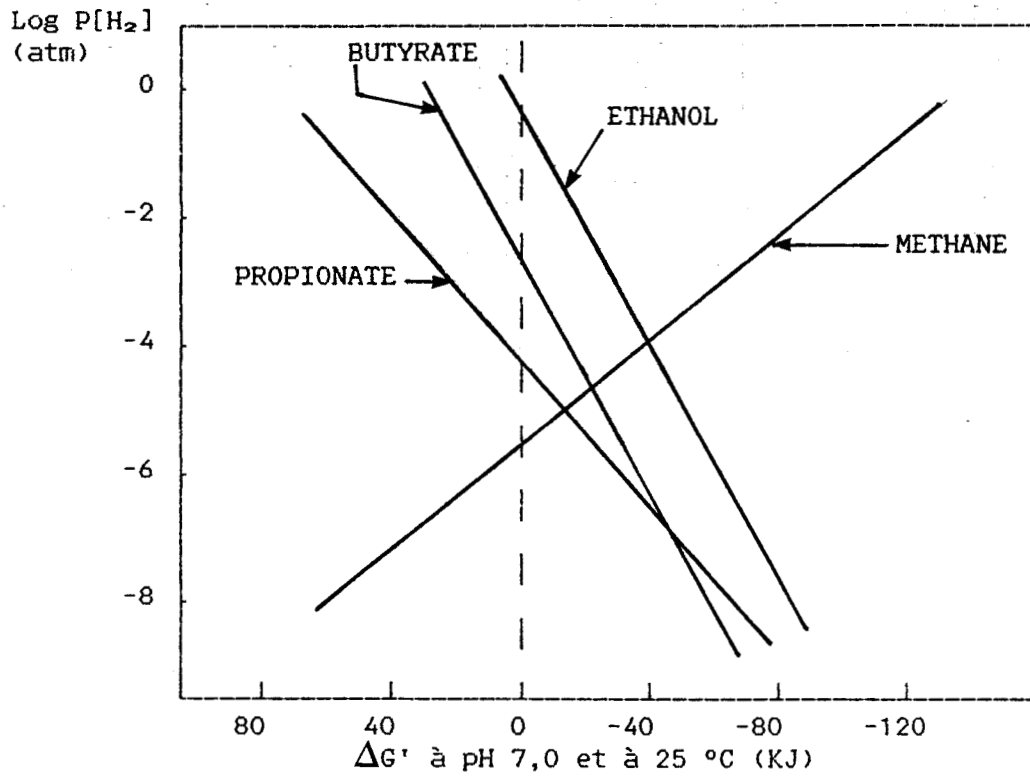


Figure n°5. Influence de la pression partielle d'hydrogène ($P[\text{H}_2]$) sur la variation d'énergie libre des réactions de réduction du CO_2 en CH_4 et de déshydrogénation de l'éthanol, du butyrate et du propionate en acétate.

Tableau I. Variation d'énergie libre des réactions de deshydrogénation des principaux intermédiaires de la fermentation méthanique.

	$\Delta G_o' \text{ (kcal/mole) } ^1$
lactate + 2 H ₂ O ----> acétate + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂	-1
éthanol + 2 H ₂ O ----> acétate + H ⁺ + 2 H ₂	+2,3
butyrate + 2 H ₂ O ----> 2 acétate + H ⁺ + 2 H ₂	+11,5
propionate + 3 H ₂ O ----> acétate + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 3 H ₂	+18,2

¹d'après Thauer et al. 1977.

Tableau II. Variation d'énergie libre des réactions de décarboxylation de l'acétate et de réduction du CO₂ et du sulfate.

	$\Delta G_o' \text{ (kcal/mole) } ^1$
acétate + H ₂ O ----> méthane + CO ₂	-7,5
4 H ₂ + 2 HCO ₃ ⁻ + H ⁺ ----> acétate + 4 H ₂ O	-25
4 H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ ----> méthane + 3 H ₂ O	-32,4
4 H ₂ + SO ₄ ⁻ + H ⁺ ----> HS ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ₂ O	-36,3

¹d'après Thauer et al. 1977.



(1979) établirent une classification des méthanogènes (tableau III). Ils distinguèrent trois ordres, quatre familles, sept genres et treize espèces. Depuis 1979, l'intensification des recherches sur les méthanogènes a conduit à l'isolement de nombreuses nouvelles souches et l'on dénombrait en 1986 plus de 45 espèces différentes (Thomas 1986). Parmi celles-ci, huit seulement (cinq espèces de *Methanosarcina* et trois de *Methanothrix*) sont capables de fermenter l'acétate. Ce dernier représente pourtant dans la plupart des écosystèmes méthanogènes le précurseur majeur du méthane : des études réalisées à l'aide de traceurs radioactifs ont montré que dans les digesteurs anaérobies plus de 70 % du méthane provenait de la décarboxylation de l'acétate (Jeris et Mc Carty 1965, Smith et Mah 1966). Cette réaction est cependant beaucoup moins favorable thermodynamiquement que la réduction du CO_2 en CH_4 (tableau II). Ceci explique que les taux de croissance des méthanogènes soient nettement plus faibles sur acétate que sur hydrogène. Le temps de doublement de *Methanothrix soehngenii* qui est la méthanogène acétoclaste dominante dans les digesteurs anaérobies, est supérieure à trois jours (Zehnder et al. 1980, Huser et al. 1982) alors que celui des méthanogènes hydrogénophiles est d'environ dix heures. La dégradation de l'acétate représente donc un des facteurs limitants de la fermentation méthanique.

4. LES BACTERIES HOMOACETOGENES

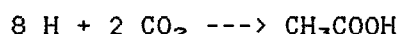
Les méthanogènes ne sont pas les seuls organismes à pouvoir utiliser le CO_2 comme unique accepteur d'électrons. Les bactéries homoacétogènes sont en effet capables de réduire deux molécules de CO_2 en une molécule d'acétate en utilisant de nombreux types de substrats organiques comme source d'électrons : hydrogène et composés à un (CO, formate, méthanol) ou plusieurs atomes de carbone (sucre, lactate, éthanol, glycérol). Historiquement, la première bactérie homoacétogène décrite fut

Tableau III. Classification des méthanogènes (Balch et al. 1979)

ordre	famille	genre	espèce
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>M. formicicum</i>
			<i>M. bryantii</i>
			<i>M. thermoautotrophicum</i>
		<i>Methanobrevibacter</i>	<i>M. ruminantium</i>
			<i>M. arboriphilus</i>
<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococacceae</i>	<i>Methanococcus</i>	<i>M. smithii</i>
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanococcus</i>	<i>M. vannielii</i>
			<i>M. voltae</i>
		<i>Methanogenium</i>	<i>M. mobile</i>
			<i>M. cariaci</i>
		<i>Methanospirillum</i>	<i>M. marisnigri</i>
	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	<i>M. hungatei</i>
			<i>M. barkeri</i>



Clostridium aceticum (Wieringa 1936, 1940). Cette souche qui pouvait être cultivée sur H_2/CO_2 fut perdue et ne fut repurifiée que quarante ans plus tard (Braun et al. 1981, Adamse 1980). Entre temps d'autres espèces homoacétogènes, *Clostridium formicoaceticum* (Andreesen et al. 1970) et *C. thermoaceticum* (Fontaine et al. 1942) avaient été isolées. Ces deux bactéries n'utilisent pas l'hydrogène mais dégradent une mole de glucose en trois moles d'acétate. Le métabolisme de la formation d'acétate à partir de CO_2 a été principalement étudié chez *C. thermoaceticum* (Ljungdahl 1983) et la fermentation homoacétique du glucose peut être considérée comme la somme de deux réactions :



Peu avant le réisolement de *C. aceticum* une nouvelle bactérie homoacétogène capable d'utiliser l'hydrogène, *Acetobacterium woodii*, fut décrite par Balch et al. (1977) et l'on connaît maintenant plus de 12 espèces homoacétogènes appartenant à sept genres différents: *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Acetogenium*, *Sporomusa*, *Peptostreptococcus* et *Butyrivacterium* (tableau IV).

Le rôle des bactéries homoacétogènes dans la fermentation méthanique n'est pas encore très clair. Elles peuvent théoriquement intervenir dans chacune des trois étapes puisqu'elles utilisent certains substrats des bactéries fermentatives (sucres), acétogènes (lactate, éthanol) et méthanogènes (H_2/CO_2). Dans tous les cas, la présence de bactéries homoacétogènes à des concentrations significatives devrait se traduire par une déviation du flux de carbone et d'électrons conduisant à une augmentation du pourcentage de méthane provenant de l'acétate. Le fait que dans la plupart des écosystèmes méthanogènes ce pourcentage soit d'environ 70 % indique donc que la formation d'acétate à partir de CO_2 joue un rôle négligeable dans la fermentation méthanique. Ceci peut

Tableau IV. Principaux substrats utilisés par les bactéries homoacétogènes

bactéries	fructose	glucose	lactate	éthanol	méthanol	H ₂ /CO ₂
<i>Clostridium aceticum</i> ¹	+	-	-	+	+	+
<i>formicoaceticum</i> ²	+	-	+	+	+	-
<i>thermoaceticum</i> ³	+	+	-	nd	nd	-
<i>thermoautotrophicum</i> ⁴	+	+	-	-	+	+
<i>Acetobacterium woodii</i> ⁵	+	+	+	-	+	+
<i>wieringae</i> ⁶	+	-	+	-	+	+
<i>carbinolicum</i> ⁷	+	+	+	+	+	+
<i>Acetogenium kiwii</i> ⁸	+	+	nd	-	-	+
<i>Sporomusa ovata</i> ⁹	-	-	+	+	+	+
<i>sphaeroides</i> ⁹	-	-	+	+	+	+
<i>acidovorans</i> ¹⁰	+	-	-	-	+	+
<i>Peptostreptococcus productus</i> ¹¹	+	+	-	nd	-	+
<i>Eubacterium limosum</i> ¹²	+	+	+	-	+	+
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i> ¹³	+	+	+	-	+	+

Références: ¹ Braun et al. 1981, ² Andreesen et al. 1970, ³ Fontaine et al. 1942, ⁴ Wiegel et al. 1981, ⁵ Balch et al. 1977, ⁶ Braun et Gottschalk 1982, ⁷ Eicher et Schink 1984, ⁸ Leigh et al. 1981, ⁹ Möller et al. 1984, ¹⁰ Olivier et al. 1985, ¹¹ Lorowitz et Bryant 1984, ¹² Sharak Genthner et al. 1981, ¹³ Zeikus et al. 1980.



s'expliquer par des considérations thermodynamiques : la réduction d'une mole de CO_2 en méthane est en effet plus exergonique que la réduction de deux moles de CO_2 en une mole d'acétate (tableau V). Les bactéries homoacétogènes ne sont probablement donc pas compétitives avec les méthanogènes pour l'utilisation de l'hydrogène et leur concentration dans les digesteurs anaérobies seraient inférieures à 10^5 bactéries par ml (Braun et al. 1979). D'autre part des transferts d'hydrogène ont été mis en évidence entre des méthanogènes et certaines espèces homoacétogènes cultivées sur fructose (Winter et Wolfe 1980), éthanol (Eicher et Schink 1984) et méthanol (Cord Ruwisch et Olivier 1986). Lorsque la $P[\text{H}_2]$ est suffisamment basse, les électrons provenant de l'oxydation de ces composés sont alors utilisés préférentiellement pour produire de l'hydrogène plutôt que pour réduire du CO_2 en acétate.

5. LES BACTERIES SULFATOREDUCTRICES

Dans les sédiments et certains effluents d'industries agroalimentaires et chimiques, la concentration en sulfate peut être relativement élevée et la réduction du sulfate en sulfure d'hydrogène joue alors un rôle important dans l'oxydation de la matière organique.

Jusqu'en 1977, toutes les espèces connues de bactéries sulfatoréductrices appartenaient à deux genres, *Desulfovibrio* et *Desulfotomaculum* et les seuls substrats importants d'un point de vue écologique qu'elles utilisaient étaient le lactate, l'éthanol et l'hydrogène (Postgate 1977). Grâce aux travaux de Widdel et Pfennig (Widdel 1980, Pfennig et al. 1981, Widdel et Pfennig 1984) on connaît maintenant de nombreuses nouvelles espèces utilisant d'autres types de substrats : acides gras volatils, acides gras à longues chaînes, composés aromatiques. Selon les espèces ces composés peuvent être soit incomplètement oxydés en acétate soit entièrement oxydés en CO_2 (Pfennig

Tableau V. Substrats utilisés par les bactéries acétogènes fermentant l'éthanol.

Substrats	<i>P. venitianus</i> ¹	<i>P. carbinolicus</i> ²	"Organisme S" ³
éthanol	+(a)	+(a)	+(a)
propanol	nd	+(a)	+(a)
butanol	nd	+(a)	+(a)
pyruvate	-	-	+
1-2 propanediol	+	-	nd
1-2 butanediol	+	-	nd
2-3 butanediol	-	+	nd
acétoïne	+	+	nd
éthylène glycol	-	+	nd
polyéthylène glycol	+	-	nd

(a) croissance possible uniquement en co-culture avec une méthanogène utilisatrice d'hydrogène

nd non déterminé

Références: ¹ Schink et Stieb 1983, ² Schink 1984, ³ Reddy et al. 1972



et al. 1981). Les bactéries sulfatoréductrices utilisent donc la plupart des composés produits lors de la dégradation des matières organiques par les bactéries fermentatives et sont par conséquent en compétition avec les bactéries acétogènes et méthanogènes.

Les relations entre méthanogénèse et sulfatoréduction ont été principalement étudiées dans les sédiments où l'apport en matière organique est généralement faible. Dans les écosystèmes marins, la concentration en sulfate (10-20 mM) n'est pas limitante et la réduction du sulfate est le mécanisme principal permettant l'oxydation complète de la matière organique (Abram et Nedwell 1978, Mountfort et al. 1980). Par contre, dans les sédiments d'eaux douces les concentrations en sulfate sont beaucoup plus faibles et le méthane est le principal produit formé. Cependant, dans ces environnements, l'addition de faibles concentrations de sulfate (0,2 mM) inhibe complètement la méthanogénèse (Winfrey et Zeikus 1977). Cette inhibition peut être levée par l'ajout d'acétate ou d'hydrogène. Ceci suggère que l'effet inhibiteur du sulfate sur la méthanogénèse provient d'une compétition pour l'utilisation de ces composés et non pas d'une toxicité du sulfure d'hydrogène sur la croissance des bactéries méthanogènes comme l'avait proposé Cappenberg (1975). Les bactéries sulfatoréductrices ont en effet des K_s pour l'hydrogène et l'acétate beaucoup plus faibles que ceux des méthanogènes et sont donc plus compétitives lorsque la concentration de ces composés est limitante (Lovley et al. 1982, Schonheit et al. 1982, Ingvorsen et al. 1983, Robinson et Tiedje 1984, Kristjansson et al. 1982).

D'autres études ont cependant montré que la présence de sulfate n'avait aucun effet sur la production de méthane à partir de méthanol et de méthylamines (Oremland et Porcin 1982, Oremland et al. 1982, Windfrey et Ward 1983). Bien que l'utilisation de méthanol par des souches de *Desulfovibrio* et de *Desulfotomaculum* ait été observée (Braun et Stolp

1986, Klemps et al. 1985), il semble que les sulfatoréductrices ne soient pas compétitives vis à vis des méthanogènes pour la dégradation de ces composés. Ceci expliquerait ainsi que de petites productions de méthane soient toujours observées dans les environnements où la méthanogénèse à partir d'acétate et d'hydrogène est complètement inhibée par le sulfate comme dans les sédiments marins.

Dans les écosystèmes anaérobies où la charge en matière organique est élevée (digesteurs anaérobies et certains sédiments fortement pollués), 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 (Mountfort et Ascher 1981). Les bactéries sulfatoréductrices 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 resteront disponibles pour les méthanogènes. Dans les couches de sédiment où la concentration en sulfate est limitante, Mountfort et al. (1980) ont constaté que le méthane provenait principalement de la décarboxylation de l'acétate et que l'hydrogène était utilisé en majorité par les sulfatoréducteurs. Laanbroek et al. (1983) ont étudié la dégradation en chémostat d'un mélange d'acétate et de propionate par deux souches sulfatoréductrices : *Desulfobulbus propionicus* et *Desulfobacter postgatii* qui oxydent respectivement le propionate en acétate et l'acétate en CO_2 . Ils observèrent que lorsque la concentration en sulfate était limitante le propionate était toujours dégradé et que l'acétate s'accumulait. D'autre part Ueki et al. (1986) ont montré que dans des effluents de déjection animale traités par digestion anaérobie, le sulfate n'avait aucun effet sur la fermentation méthanique de l'acétate

mais que, par contre, il accélérerait la dégradation du propionate en acétate qui était alors couplée à une sulfatoréduction. De même Isa et al.

(1986a,1986b) ont observé dans un digesteur anaérobie alimenté avec un milieu synthétique composé d'éthanol et d'acétate que les bactéries sulfatoréductrices se développaient plutôt sur éthanol que sur acétate.

Bien que des études complémentaires soient nécessaires pour mieux comprendre les relations entre sulfatoréduction et méthanogénèse dans les environnements anaérobies où la concentration en matière organique est importante, ces quelques résultats suggèrent que lorsque le sulfate est limitant, les bactéries sulfatoréductrices interviennent préférentiellement aux niveau de l'acétogénèse et de l'utilisation de l'hydrogène.

III. BACTERIES ACETOGENES PRODUCTRICES OBLIGÉES

D'HYDROGENE

On peut distinguer deux types de bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (OHPA):

- celles qui peuvent se développer en culture pure mais dont la croissance, sur certains substrats ou en absence d'accepteur exogène d'électrons, n'est possible qu'en association avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène. C'est le cas de l'"organisme S" qui fermente, en culture pure, le pyruvate en acétate et éthanol mais qui ne dégrade l'éthanol qu'en association syntrophique avec une méthanogène. Les bactéries sulfatoréductrices, qui dégradent en coculture avec des méthanogènes le lactate et l'éthanol en acétate et méthane, rentrent également dans cette catégorie puisqu'elles utilisent ces composés en culture pure en présence de sulfate.

- le second type de bactéries OHPA comprend tous les organismes qui ne peuvent utiliser que les protons comme unique accepteur d'électrons et dont la croissance, quelque soit le substrat, n'est possible que lorsque la pression partielle d'hydrogène est maintenue à un niveau très faible. Ces organismes ne peuvent être isolés qu'en association syntrophique avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène et sont appelées bactéries syntrophes. Les bactéries OHPA dégradant les acides gras à plus de deux carbones ainsi que certains composés aromatiques appartiennent à cette catégorie.

1. BACTERIES DEGRADANT L'ETHANOL

a) L'"organisme S" :

Après son isolement par Bryant et al. (1967) à partir de *Methanobacillus omelianskii*, l'"organisme S" fut caractérisé par Reddy et

al. (1972a). C'est un bacille gram négatif, mobile, non sporulé, de forme légèrement incurvée avec des extrémités arrondies. Ses dimensions moyennes sont de $0,6 \times 4 \mu\text{m}$ et sa température optimale de croissance est comprise entre 32 et 45°C . En association avec une méthanogène utilisatrice d'hydrogène, il dégrade les alcools primaires (éthanol, propanol, butanol, isobutanol) en produisant les acides correspondants et de l'hydrogène. Contrairement à *Methanobacillus omelianskii*, l'"organisme S" n'utilise cependant pas l'isopropanol et le 2-butanol. Récemment, Widdel (1986) a démontré que certaines méthanogènes utilisaient l'isopropanol comme donneur d'électrons et l'oxydaient en acétone. La dégradation des alcools secondaires par *M. omelianskii* pourrait ainsi s'expliquer par une utilisation de ces composés par la méthanogène présente dans cette coculture. En culture pure, l'"organisme S" fermente le pyruvate en acétate, CO_2 et éthanol, et produit également des traces d'hydrogène, d'acétoïne et de 2,3-butanediol.

Bien que le pourcentage de G+C de son ADN (47,27 %) ait été déterminé, l'"organisme S" ne fut pas décrit comme une nouvelle espèce et reste de ce fait encore aujourd'hui taxonomiquement non défini.

b) *Pelobacter venetianus* et *P. carbinolicus*

Schink et Stieb (1983) étudièrent la dégradation anaérobie du polyéthylène glycol (P.E.G.) et isolèrent plusieurs souches fermentant ce polymère en acétate et éthanol. Les seuls autres substrats utilisés par ces isolats sont l'acétoïne, le 1,2-propanediol et le 1,2-butanediol. Ils montrèrent également que, en coculture avec *Methanospirillum hungatei*, ces souches fermentent l'éthanol en acétate et hydrogène et dégradent le P.E.G. en acétate sans formation d'alcool. Ces bactéries ne réduisant pas les sulfates, Schink et Stieb proposèrent de les décrire comme appartenant à une nouvelle espèce, *Pelobacter venetianus*. Schink (1984)

isola ensuite 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.

Les produits de fermentation des substrats utilisés en culture pure ou en association avec *M. hungatei* par *P. venetianus* et *P. carbinolicus* sont résumés dans le tableau V. Ces deux bactéries peuvent donc être considérées, lorsqu'elles sont cultivées sur certains alcools primaires, comme des bactéries OHPA. Les souches types de *P. venetianus* (souche GRA PEG 1, DSM N° 2394) et de *P. carbinolicus* (souche GRA BD 1, DSM N° 2380) sont toutes deux d'origine marine et sont morphologiquement assez similaires. Ce sont de courts bacilles droits (0,5-0,7 x 1,2-3 µm), gram négatif et non sporulés. Les pourcentages de G+C de leur ADN sont pratiquement identiques (52,1 et 52,3 %). Leur temps de doublement minimum (8 h), leur température (33-35° C) et leur pH (7) optimaux de croissance sont également très proches.

L'utilisation du polyéthylène glycol par *P. venetianus* et celle du 2,3-butanediol et de l'éthylène glycol par *P. carbinolicus* apparaissent donc comme les différences principales entre ces deux bactéries qui présentent également de grandes similitudes morphologiques et physiologiques avec l'"organisme S". Chez ce dernier, la plupart des substrats permettant la croissance des souches de *Pelobacter* n'ont cependant pas été testés. *P. venetianus* et *P. carbinolicus* ont été isolés à partir de sédiments marins ou lacustres et nous montrons (chapitre ...) que des organismes de ce type sont présents à de fortes concentrations dans les digesteurs anaérobies, où ils représentent la flore utilisatrice d'éthanol dominante.

c) Bactéries sulfatoréductrices

Dans les milieux pauvres en sulfate, certaines espèces sulfatoréductrices peuvent intervenir comme bactéries OHPA. Ceci fut démontré par Bryant et al. (1977) qui isolèrent, à partir d'un enrichissement méthanogène dégradant l'éthanol, une souche de *Desulfovibrio vulgaris* qui, lorsqu'elle était associée avec une méthanogène, dégradait en absence de sulfate, l'éthanol et le lactate en acétate et hydrogène. Bryant et al. (1977) montrèrent également que les souches types de *D. vulgaris* et de *D. desulfuricans* pouvaient également être cultivées en absence de sulfate, en association syntrophique avec des méthanogènes. Mc Inerney et Bryant (1981) étudièrent la dégradation du lactate par une association bactérienne constituée d'une souche de *Desulfovibrio* et de *Methanosarcina barkeri*. Il observèrent une décomposition complète du lactate en CH_4 et CO_2 mais constatèrent une accumulation transitoire d'acétate, ce dernier n'étant dégradé qu'après complète utilisation du lactate.

Les transferts d'hydrogène entre les *Desulfovibrio* et les méthanogènes ont été étudiés par la suite par Traoré (1981) et Archer et Powell (1985). Traoré compara la dégradation du lactate par deux souches de *Desulfovibrio* (souche Hildenborough et souche Zhilina) associées séparément à *Methanosarcina barkeri*. Il observa que la fermentation du lactate était plus rapide avec la première qu'avec la souche Zhilina, et suggéra que ceci était peut-être lié au fait que la souche Hildenborough était capable de produire de l'hydrogène à des concentrations plus importantes. Archer et Powell (1984) déterminèrent les taux de croissance sur éthanol d'une souche de *Desulfovibrio* associée séparément à huit espèces de méthanogènes. Ils montrèrent que le temps de doublement de la coculture dépendait de ceux des méthanogènes et qu'ils étaient compris entre 6,7 heures (*M. vanniellii*) et 17,7 heures (*M. barkeri*).

Certaines espèces de *Desulfatamaculum* (*D. nigrigicans* mais pas *D. orientis*) dégradent également le lactate et l'éthanol en coculture avec des méthanogènes (Klémpe et al. 1985). Par contre, parmi les nouvelles espèces sulfatoréductrices décrites par Widdel (1980) comme pouvant utiliser les acides gras volatils et certains composés aromatiques, aucune n'est capable de fermenter ces composés en absence de sulfate par transfert interspécifique d'hydrogène avec une méthanogène. La raison pour laquelle ces bactéries sont incapables d'utiliser les protons comme seuls accepteurs d'électrons n'est pas encore connue, et c'est pour tenter d'apporter une réponse à cette question que nous avons étudié le métabolisme et les protéines de transfert d'électrons d'une bactérie sulfatoréductrice, dégradant le propionate, isolée d'un fermenteur de méthanisation, *Desulfobulbus elongatus* (Chapitre XII).

2. BACTERIES DEGRADANT LES ACIDES GRAS VOLATILS A PLUS DE 3 CARBONES

a) *Syntrophomonas wolfei*

La première bactérie OHPA utilisant des acides gras volatils à plus de 3 carbones fut isolée par Mc Inerney et al. (1979) à partir d'un enrichissement méthanogène dégradant le butyrate. Cette bactérie (souche Göttingen) fut tout d'abord obtenue en coculture avec un *Desulfovibrio* (souche G 11). La réduction du sulfate en sulfure est en effet thermodynamiquement plus exergonique que celle du CO_2 en CH_4 et les *Desulfovibrio* qui ont des K_s pour l'hydrogène plus faibles que ceux des méthanogènes, peuvent maintenir des concentrations en H_2 plus favorables au développement de bactéries acétogènes dégradant le butyrate. La souche isolée en coculture avec *Desulfovibrio* put ensuite être cultivée et isolée en absence de sulfate en association avec *Methanospirillum hungatei* mais pas avec *Methanobrevibacter arboriphilicus* ni avec *Methanobacterium bryantii*. *M. hungatei* était la bactérie méthanogène

hydrogénophile dominante dans les enrichissements sur butyrate, et elle apparaît comme la méthanogène la mieux adaptée à l'utilisation de l'hydrogène dans des conditions de croissance lente.

A partir d'écosystèmes différents (digesteurs anaérobies et sédiments), Mc Inerney et al. (1979, 1981) isolèrent ensuite, directement en coculture avec *M. hungatei*, deux autres bactéries qui dégradait le butyrate et qui étaient morphologiquement et physiologiquement similaires à la souche Göttingen. Cette dernière fut donc décrite comme la souche type (DSM N° 2245) d'un nouveau genre et d'une nouvelle espèce, *Syntrophomonas wolfei* (Mc Inerney et al. 1981). C'est un bacille légèrement incurvé ($0,5-1 \times 2-7 \mu\text{m}$), gram négatif, non sporulé et mobile. L'examen en microscopie électronique montre la présence de flagelles (2 à 8) insérés latéralement au niveau de la face concave des cellules. Ces dernières contiennent des inclusions de polyhydroxybutyrate ($46 \mu\text{g}$ par mg de protéine). La souche est sensible à la pénicilline et sa paroi contient des peptidoglycanes. *S. wolfei* utilise tous les acides gras volatils linéaires ayant entre 4 et 8 carbones. Elle dégrade les acides à nombre pair de carbones en acétate et hydrogène et produit du propionate, de l'acétate et de l'hydrogène à partir de valérate et d'heptanoate. Elle fermente également l'isoheptanoate en isovalérate, acétate et hydrogène. Les accepteurs d'électrons usuels tels que sulfate, sulfite, nitrate, fumarate et oxygène ne sont pas utilisés et la formation d'hydrogène est donc le seul moyen, chez *S. wolfei*, pour éliminer les électrons provenant de l'oxydation des acides gras. Mc Inerney et al. (1981) tentèrent, sans succès, d'obtenir des cultures pures de *S. wolfei*, en éliminant l'hydrogène par un moyen physique (recyclage de la phase gazeuse au travers d'une colonne d'oxyde de cuivre). Cette bactérie doit donc obligatoirement, quelque soit le substrat et les conditions de culture, être associée à un organisme utilisateur d'hydrogène.

b) *Clostridium bryantii*

Stieb et Schink (1985) isolèrent, à partir d'enrichissements méthanogènes dégradant le caproate, une bactérie sporulée fermentant ce composé en association avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène. Cette bactérie qui fut décrite comme une nouvelle espèce du genre *Clostridium*, *C. bryantii* fut obtenue en coculture soit avec un *Desulfovibrio* (DSM 3014 A), soit avec *M. hungatei* (DSM 3014 B). *C. bryantii* est un fin bacille légèrement incurvé ($0,4 \times 3-6 \mu\text{m}$) avec des extrémités arrondies. Les cellules sont gram négatives, non mobiles et les spores qui apparaissent après 4 semaines d'incubation sont terminales et déformantes. La souche type peut se développer sur milieu exclusivement minéral sans vitamine, ni azote organique. Elle dégrade tous les acides gras linéaires ayant entre 4 et 11 atomes de carbone et le 2-méthylbutyrate (tableau). Les seuls produits de fermentation sont, comme chez *S. wolfei*, l'acétate et l'hydrogène (plus du propionate lorsque le substrat possède un nombre impair de carbones). Les protons sont les seuls accepteurs d'électrons utilisés et la souche pousse entre pH 6, 5 et 7,5 et à des températures comprises entre 20 et 40° C. Son temps de doublement minimum est du même ordre (72 - 96 h) qu'elle soit associée avec *Desulfovibrio* ou avec *M. hungatei*.

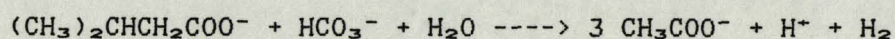
c) Autres organismes non définis taxonomiquement

Une bactérie thermophile, dégradant le butyrate en association avec *Methanobacterium thermoautotrophicum* fut récemment isolée par Henson et Smith (1985) à partir d'un digesteur anaérobie fonctionnant à 55°C. Cette bactérie est un bacille légèrement incurvé, gram négatif, non sporulé. Elle nécessite un facteur de croissance non identifié, présent dans le surnageant de jus de digesteur. Elle pousse à 55° C mais pas à 40°C ni à 70°C. Le butyrate est le seul substrat à avoir été testé et cette souche

se différencie de *S. wolfei* principalement par son optimum de température et l'absence de mobilité.

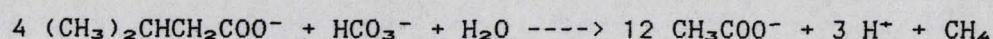
Deux autres bactéries dégradant le butyrate en association avec *M. hungatei* furent isolées à partir d'un enrichissement méthanogène dégradant le 3-chlorobenzoate (Schelton et Tiedje 1984). La première est un fin bacille (0,2-0,3 x 2,4 µm), mobile, gram négatif et non sporulé. La seconde est un bacille plus épais (0,4-0,6 x 3-5 µm), non mobile, gram positif et sporulé. Ces deux organismes fermentent le butyrate, le valérate, la caproate et le 2-méthylbutyrate. La souche sporulée dégrade de plus l'isobutyrate en 2 acétates.

Récemment, Stieb et Schink (1986) isolèrent une bactérie dégradant l'isovalérate (3-méthylbutyrate) en association avec *Desulfovibrio*. Cet organisme est un petit bacille trapu (1-1,25 x 1,75-2,5 µm) avec des extrémités arrondies. Il ne prend pas la coloration de gram mais la nature gram négative de sa paroi ne put être confirmée clairement par microscopie électronique. Il n'est pas mobile et est non sporulé. L'isovalérate est le seul substrat utilisé et est stoechiométriquement dégradé en trois moles d'acétate et une mole d'hydrogène. L'isovalérate ne contenant que 5 carbones, il s'ensuit qu'une molécule de CO₂ est consommée par molécule de substrat dégradé.



Cette réaction est endergonique dans les conditions standards

($\Delta G'^0 = +4,8$ Kcal/mole) et n'est possible que si l'hydrogène est utilisé au fur et à mesure de sa formation. La fermentation acétique de l'isovalérate couplée à la réduction de CO₂ en CH₄ est cependant globalement à peine favorable:



Le G'^0 de cette réaction est en effet de -3,25 Kcal par mole d'isovalérate dégradée. Par comparaison, les $\Delta G'^0$ des réactions de

dégradation du butyrate et du propionate en acétate et CH_4 sont respectivement de -4,7 et de -6,1 Kcal par mole de substrat fermenté (Thauer et al. 1977). Ceci explique, selon Stieb et Schink, que la croissance de la souche dégradant l'isovalérate soit inhibée par de faibles concentrations en acétate. Dans les écosystèmes méthanogènes, la dégradation de l'isovalérate ne serait donc physiologiquement possible que si l'acétate est utilisé en permanence par les bactéries méthanogènes acétoclastes. Les principales activités enzymatiques impliquées dans l'oxydation de l'isovalérate ont été mises en évidence dans des extraits cellulaires (Schink et Stieb 1986) et ont permis de proposer la voie métabolique suivante: l'isovalérate est activé en isovaléryl-CoA, qui après avoir été oxydé en méthylcrotonyl-CoA, est carboxylé en méthylglutaconyl-CoA. Ce dernier est hydraté et coupé en acétyl-CoA et en acétoacétate permettant ainsi la synthèse de trois acétates.

Parmi toutes les bactéries OHPA dont nous venons de donner une description sommaire, aucune n'est capable d'utiliser des acides gras ayant plus de 11 atomes de carbone (tableau VI). La fermentation méthanique d'acides gras à longues chaînes saturées et insaturées a pourtant été observée par de nombreux auteurs (Henkelekian et Mueller 1958, Jeris et Mc Carty 1965, Weng et Jeris 1976), mais la toxicité de ces composés rend difficile l'isolement de bactéries dégradant des acides gras à plus de 10 carbones. En précipitant les acides gras à longues chaînes sous forme de sels de calcium, nous avons cependant pu purifier et caractériser un organisme dégradant l'oléate et le stéarate en association avec *M. hungatei* ou avec *Desulfovibrio* (Chapitre X).

Tableau VI. Acides gras à plus de trois carbones utilisés par les bactéries syntrophes

Substrats	<i>Syntrophomonas wolfei</i> ¹	<i>Clostridium bryantii</i> ²	Souche NSF2 ³	Souche SF1 ³	Souche thermophile ⁴	Souche Gra IVAL ⁵	<i>Syntrophobacter wolnini</i> ⁶
propionate	-	-	-	-	-	-	+
butyrate	+	+	+	+	+	-	-
isobutyrate	-	-	-	+	nd	-	nd
valérate	+	+	+	+	nd	-	nd
2 méthylbutyrate	-	+	+	+	nd	-	nd
3 méthylbutyrate	-	-	-	-	nd	+	nd
caproate	+	+	+	+	nd	-	-
heptanoate	+	+	nd	nd	nd	-	nd
isoheptanoate	+	nd	nd	nd	nd	-	nd
caprylate	+	+	nd	nd	nd	-	nd
pélargonate	-	+	nd	nd	nd	nd	nd
caprinat	-	+	nd	nd	nd	nd	nd
undécanoate	-	+	nd	nd	nd	nd	nd

nd: non déterminé

Références: ¹ Mc Inerney et al 1981, ² Stieb et Schink 1985, ³ Shelton et Tiedje 1984, ⁴ Henson et Smith 1985, ⁵ Stieb et Schink 1986, ⁶ Boone et Bryant 1980.

3. BACTERIES DEGRADANT LE PROPIONATE

La seule bactérie OHPA décrite capable de dégrader le propionate est *Syntrophobacter wolinii* (Boone et Bryant 1980). Elle fut obtenue en association avec *Desulfovibrio* (G 11) mais ne put être isolée en coculture avec *Methanospirillum hungatei*. C'est un bacille (0,6-1 x 1-4,5 μ m), non sporulé et non mobile. Les cellules sont fortement réfractiles et sont souvent associées pour former des filaments ayant jusqu'à 35 μ m de long. Le propionate est le seul substrat utilisé et est dégradé en acétate, CO₂ et hydrogène. Cependant, la souche n'ayant pu être isolée en absence de *Desulfovibrio*, certains substrats qui sont utilisés par la bactérie sulfatoréductrice ne purent donc être testés (éthanol, lactate, pyruvate). Les temps de génération de *S. wolinii* en association avec *M. hungatei* et *Desulfovibrio* sont respectivement de 161 et de 87 heures.

4. BACTERIES DEGRADANT LES COMPOSES AROMATIQUES

a) Généralités

La fermentation méthanique des composés aromatiques a été observée pour la première fois par Tarwin et Buswell (1934) et plus récemment par Nottingham et Hungate (1969), Healy et Young (1979), Healy et al. (1980). Ferry et Wolfe (1977) obtinrent un enrichissement méthanogène qui dégradait le benzoate en accumulant transitoirement de l'acétate. Ils isolèrent, à partir de cet enrichissement, deux souches méthanogènes qui utilisaient l'hydrogène mais étaient incapables de fermenter le benzoate. Ceci suggérait que le benzoate était dégradé, comme le propionate et le butyrate, par des bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène. La variation d'énergie libre ΔG° et le nombre de molécules d'hydrogène théoriquement libérées par molécule de composé aromatique dégradée décroissent en fonction du nombre de groupements hydroxyl fixés sur le noyau aromatique (tableau VII). Les valeurs de ΔG° indiquent que la

croissance de bactéries acétogènes dégradant le benzoate et les composés monohydroxylés n'est possible qu'en association syntrophique avec des bactéries utilisatrices d'hydrogène. Des organismes dégradant le benzoate (Mountfort et Bryant 1982, Mountfort et al. 1984) et certains monohydroxybenzoates (Tschech et Schink 1986) ont été récemment isolés en association avec des souches de *Desulfovibrio*. Par contre, la fermentation acétique des dérivés di- et trihydroxylés du benzène et du benzoate est largement exergonique. La croissance en culture pure de bactéries utilisant ces composés est donc théoriquement possible. Schink et Pfennig (1982) ont décrit un organisme, *Pelobacter acidigallici*, qui réalise une fermentation homoacétique des composés aromatiques trihydroxylés. Tschech et Schink (1985) isolèrent également une bactérie dégradant le résorcinol (1,3-dihydroxybenzène) et le résorcinol en acétate et hydrogène. La croissance de cet organisme est cependant dépendante de la présence d'une bactérie utilisatrice d'hydrogène. Ces auteurs purifièrent également un autre microorganisme capable de fermenter, en culture pure, certains composés dihydroxylés en acétate et butyrate. La fermentation butyrique de ces composés est légèrement plus favorable que la fermentation acétique et n'est, de plus, pas couplée avec une production d'hydrogène (Tableau VIII).

b) Souches décrites

Nous parlerons ici des bactéries isolées sur benzoate et sur différents dérivés mono-, di- et trihydroxylés du benzène et du benzoate (tableau IX). *Pelobacter acidigallici* et les souches butyriques dégradant le résorcinol qui ne sont pas, à proprement parler, des bactéries OHPA, seront cependant traités ici par souci d'homogénéité. Nous donnerons ensuite une description rapide des bactéries qui, sans avoir été isolées, ont été mises en évidence dans des cultures hautement enrichies.

Tableau VII. Equations théoriques des fermentations acétiques des composés aromatiques

		$\Delta G_0'$ (kcal/mole) ¹
	dérivés du benzène	
benzène:	$C_6H_6 + 6 H_2O \rightarrow 3 CH_3COO^- + 3 H^+ + 3 H_2$	+17,28
phenol:	$C_6H_6O + 5 H_2O \rightarrow 3 CH_3COO^- + 3 H^+ + 2 H_2$	+1,56
dihydroxybenzène:	$C_6H_6O_2 + 4 H_2O \rightarrow 3 CH_3COO^- + 3 H^+ + H_2$	-18,69
trihydroxybenzène:	$C_6H_6O_3 + 3 H_2O \rightarrow 3 CH_3COO^- + 3 H^+$	-37,8
	dérivés du benzoate	
benzoate:	$C_7H_5O_2 + 7 H_2O \rightarrow 3 CH_3COO^- + 3 H^+ + HCO_3^- + 3 H_2$	+16,88
hydroxybenzoate:	$C_7H_5O_3 + 6 H_2O \rightarrow 3 CH_3COO^- + 3 H^+ + HCO_3^- + 2 H_2$	+1,28
dihydroxybenzoate:	$C_7H_5O_4 + 5 H_2O \rightarrow 3 CH_3COO^- + 3 H^+ + HCO_3^- + H_2$	-18,61
trihydroxybenzoate:	$C_7H_5O_5 + 4 H_2O \rightarrow 3 CH_3COO^- + 3 H^+ + HCO_3^-$	-38,25

¹ d'après Kaiser et Hanselmann (1982)

Tableau VIII. Equations théoriques des fermentations butyriques des composés aromatiques

		ΔG_0 (kcal/mole) ¹
phénol:	$C_6H_6O + 3 H_2O \rightarrow CH_3COO^- + CH_3CH_2CH_2COO^- + 2 H^+$	-9,94
dihydroxybenzène:	$C_6H_6O_2 + 3 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + 0,5 CH_3CH_2CH_2COO^- + 2,5 H^+$	-24,47
trihydroxybenzène:	$C_6H_6O_3 + H_2 + 3 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + 0,5 CH_3CH_2CH_2COO^- + 2,5 H^+$	-43,8

¹ calculé d'après Kaiser et Hanselmann (1982) et Thauer et al (1977)



Tableau IX. Bactéries dégradant les composés aromatiques

bactérie	substrat utilisé pour l'isolement	produits de fermentation	autres substrats utilisés
<i>Syntrophus buswelli</i> ¹	benzoate	acétate (a) hydrogène	-
Souche BZ-2 ²	benzoate	acétate (a) hydrogène	-
Souche KN032 ³	3-hydroxybenzoate	acétate (a) hydrogène	benzoate
Souche Wo021 ³	2-hydroxybenzoate	acétate (a) hydrogène	benzoate, 3-hydroxybenzoate
Souche KN245 ⁴	résorcinol, β-et δ-résorcinol	acétate (b) butyrate	dihydroxyrésorcinol
Souche Ma266 ⁴	résorcinol, β-et δ-résorcinol	acétate (a) hydrogène	-
<i>Pelobacter acidigallici</i> ⁵	gallate	acétate (b)	trihydroxybenzènes, trihydroxybenzoates
<i>Eubacterium oxidoreductens</i> ⁶	pyrogallol	acétate (b) butyrate	gallate, phloroglucinol, quercétine, crotonate

(a) croissance possible uniquement en association avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène

(b) croissance possible en culture pure

Références: ¹ Mountfort et al. 1984, ² Shelton et Tiedje 1984, ³ Tschech et Schink 1986, ⁴ Tschech et Schink 1985, ⁵ Schink et Pfennig 1982,

⁶ Krumholz et Bryant 1986.



- bactéries isolées sur benzoate

A partir d'un enrichissement méthanogène sur benzoate provenant d'un digesteur anaérobie, Mountfort et Bryant (1982) isolèrent, en coculture avec *Desulfovibrio* (G11), une bactérie produisant trois moles d'acétate et trois moles d'hydrogène par mole de benzoate dégradée. Cette bactérie ne put être purifiée en association avec une méthanogène mais pouvait être cultivée en absence de sulfate en coculture avec *Methanospirillum hungatei*. L'organisme dégradant le benzoate est un court bacille ($0,8 \times 1,2 \mu\text{m}$), gram négatif et non sporulé. Les cellules sont mobiles et possèdent un seul flagelle polaire. Le benzoate est le seul substrat utilisé et les temps de génération de cette bactérie sont de 132 heures en association avec *Desulfovibrio* et de 166 heures en coculture avec *M. hungatei*. Mountfort et al. (1984) décrivent cette bactérie comme une nouvelle espèce de syntrophe, *Syntrophus buswelli* (DSM 2612). Schelton et Tiedje (1984) étudièrent la dégradation du 3-chlorobenzoate et isolèrent, à partir d'un enrichissement dégradant ce composé, deux organismes : une souche (DCB1) réalisant la déchlorination du 3-chlorobenzoate en benzoate et une bactérie (souche BZ2) physiologiquement semblable à *Syntrophus buswelli*.

- bactéries isolées sur monohydroxybenzoate

Tschech et Schink établirent des enrichissements méthanogènes sur différents dérivés monohydroxylés du benzoate. Ils réussirent à isoler, en gélose profonde, en ajoutant une souche de *Desulfovibrio* comme bactérie utilisatrice d'hydrogène, plusieurs syntrophes dégradant le 3-hydroxybenzoate (souches KM032, KM033) et le salicylate (2-hydroxybenzoate (souche Wo021). La souche KM032 est morphologiquement et physiologiquement similaire à la souche KM033. C'est un bacille droit ou légèrement incurvé ($0,8 \times 1,5-3 \mu\text{m}$) gram négatif, non sporulé et non

mobile. Le 3-hydroxybenzoate et le benzoate sont les seuls substrats utilisés et sont dégradés en acétate et hydrogène. Les taux de croissance sont identiques quelque soit la bactérie utilisatrice d'hydrogène employée (*Desulfovibrio* ou *M. hungatei*). Par contre, Tschich et Schink observèrent des temps de génération plus courts et des rendements de croissance plus importants sur 3-hydroxybenzoate que sur benzoate (respectivement 3 et 4 jours de temps de doublement et 8,6 et 5,8 g de cellules par mole de substrat dégradé). La souche Wo 021 isolée sur 2-hydroxybenzoate est un petit bacille avec des extrémités arrondies (0,8-0,9 x 0,8-1,7 μm). Les cellules sont gram négatives, non sporulées et non mobiles. Cette bactérie utilise également le benzoate et le 3-hydroxybenzoate. Les rendements de croissance et les temps de doublement sont proches de ceux de la souche KM032 isolée sur 3-hydroxybenzoate. Les temps de doublement sur salicylate sont de 5,5 jours.

Des cellules concentrées des souches KM032 et Wo021 réalisent une déshydroxylation du 3-hydroxybenzoate en benzoate lorsque les transferts interspécifiques d'hydrogène sont inhibés (soit par omission du sulfate lorsque les cellules sont précultivées en association avec *Desulfovibrio*, soit en ajoutant du BESA dans le cas où les cellules sont obtenues en coculture avec *M. hungatei*). Par contre, dans ces conditions, aucune modification du 2-hydroxybenzoate n'est observée.

- bactéries isolées sur des composés aromatiques dihydroxylés

A partir de sédiments marins, Tschich et Schink (1985) obtinrent deux enrichissements dégradant le β - et le γ - résorcylate (2,4- et 2,6-dihydroxybenzoate) en acétate et CH_4 . Ils isolèrent, de chacun de ces deux enrichissements et en association avec un *Desulfovibrio*, deux souches syntrophes morphologiquement et physiologiquement similaires. Ce sont des bacilles droits (0,8-1 x 2-3,5 μm), gram positifs, mobiles et sporulés.

Les spores sont centrales ou subterminales et sont non déformantes. Les deux souches dégradent le résorcinol et le β - et le γ -résorcylate en acétate et hydrogène. L'extrait de levure stimule leur croissance et aucune de ces deux bactéries ne se développe à des concentrations en NaCl inférieures à 1%.

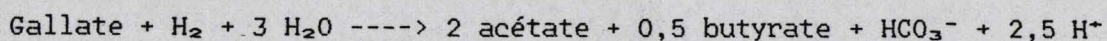
Tschech et Schink (1985) réalisèrent également des enrichissements sur β -et γ -résorcylate en utilisant des inocula provenant de sédiments d'eau douce. Après quatre transferts successifs, ils observèrent un arrêt de la production de méthane et une dégradation de ces composés aromatiques en acétate et butyrate. Ils isolèrent à partir de ces cultures un gros bacille (1,2 x 3-6 μ m) (souche KN245), gram négatif et mobile formant des spores subterminales de forme ellipsoïdale. Cette bactérie était cependant toujours contaminée par un fin spirille très mobile, appartenant au genre *Campylobacter*. Cette dernière ne fermente aucun composé aromatique et le bacille sporulé (souche KN245) est donc responsable de la dégradation du β - et du γ -résorcylate en acétate et butyrate. La souche KN245 utilise également le résorcinol et le dihydroxyrésorcinol. Aucune modification du métabolisme et des produits de fermentation n'est obtenue lorsqu'elle est associée à une bactérie utilisatrice d'hydrogène. Le temps de doublement de la souche KN 245 est de 48 heures et les rendements de croissance sont de 8 g de cellules par mole de substrat dégradé. Lorsque des suspensions de cellules concentrées sont incubées en présence de β - ou de γ -résorcylate, une accumulation transitoire de résorcinol est observée. Ceci suggère une première étape de décarboxylation dans le catabolisme de ces deux dihydroxybenzoates.

- bactéries isolées sur des composés aromatiques trihydroxylés

P. acidigallici fut isolé par Schink et Pfenning (1982) à partir d'un enrichissement dégradant l'acide gallique. La souche type (Ma Gal 2) qui

est d'origine marine, est un petit bacille (0,5-0,7 x 1-2,5 μm) avec des extrémités arrondies. Les cellules sont gram négatives, mobiles et ne forment pas de spores. Le pourcentage de G+C de son ADN est de 51,8 %. *P. acidigalllici* réalise une fermentation homoacétique de tous les dérivés trihydroxylés du benzène et du benzoate et produit trois moles d'acétate par mole de substrat dégradée. Elle ne fermente aucun autre composé aromatique même si elle est associée avec une bactérie utilisatrice d'hydrogène. Son temps de génération est extrêmement court (2 heures) par rapport à ceux des autres bactéries anaérobies dégradant des composés aromatiques. Le rendement de croissance est de 10 g de cellules (poids sec) par mole de substrat dégradée.

Krumbolz et Bryant (1986) dénombrèrent dans le rumen, par la technique du nombre le plus probable en milieu liquide, les bactéries capables de dégrader les composés aromatiques trihydroxylés. Ils comptèrent 10^7 bactéries pouvant décarboxyler le gallate en pyrogallol et $4,3 \times 10^3$ organismes dégradant complètement le gallate et le pyrogallol. Ils isolèrent la bactérie responsable de la fermentation de ces composés et l'appelèrent *E. oxidoreductans*. Ils observèrent cependant que cette bactérie ne dégradait le gallate, le pyrogallol et le phloroglucinol qu'en présence d'hydrogène ou de formate et qu'elle produisait alors un mélange d'acétate et de butyrate. La fermentation butyrique des composés aromatiques trihydroxylés n'est en effet équilibrée que si elle est couplée à l'oxydation d'un donneur d'électrons exogène. Les bilans expérimentaux indiquent qu'une mole d'hydrogène ou de formate est consommée par mole de butyrate formée et l'équation théorique de dégradation du gallate est donc:



$$\text{G}^\circ = 18,4 \text{ Kcal/mole.}$$

Le temps de génération minimum de *E. oxidoreductans* sur gallate plus hydrogène est de 1,8 heure. La souche utilise également le crotonate en absence d'hydrogène et le dismute en acétate et butyrate.

- enrichissements méthanogènes dégradant différents composés aromatiques

Des cultures méthanogènes hautement enrichies dégradant le phénol, le catéchol, l'hydroquinone (Szewzyk et al. 1985), le 4-hydroxybenzoate (Tschech et Schink 1986) et l' α -résorcinol (Tschech et Schink 1985) ont été récemment obtenues (tableau X). En présence de BESA, ces cultures accumulent de l'acétate et sont donc probablement des associations syntrophiques de bactéries acétogènes et de bactéries méthanogènes. Les cultures enrichies sur 4-hydroxybenzoate, catéchol et hydroquinone utilisent toutes le phénol et la culture obtenue sur catéchol fermente également les dérivés carboxylés du catéchol et le 4-hydroxybenzoate.

c) Voie de dégradation des composés aromatiques

L'examen des substrats utilisés par les bactéries isolées ou enrichies sur différents composés aromatiques montre que le benzoate, le phénol, le catéchol et le phloroglucinol jouent un rôle central dans le métabolisme de ces bactéries. Nous discutons ici des premières étapes qui conduisent, par des réactions de déshydroxylation, de décarboxylation ou d'isomérisation, à une modification de la structure des composés aromatiques sans coupure du noyau benzénique. Nous montrons ainsi que l'on peut distinguer quatre voies de dégradation différentes des composés aromatiques.

- voie du benzoate

Le fait que les bactéries isolées sur 2- et 3-hydroxybenzoate utilisent également le benzoate suggère une relation entre les voies de

Tableau X. Dégradation de composés aromatiques par des enrichissements méthanogènes

Substrat utilisé pour l'enrichissement	nom de la culture	intermédiaires mis évidence	autres substrats fermentés
phénol	Phe Ko ¹	acétate, hydrogène	catechol
4-hydroxybenzoate	KNPOB ²	acétate, hydrogène phénol	phénol
catéchol	Bre Ko ¹	acétate, hydrogène phénol	3,4- et 2,3-dihydroxybenzoate 4-hydroxybenzoate, phénol
hydroquinone	HQ Gö ¹	acétate, hydrogène phénol	phénol
α résorcinol	Gö 35 ³	hydrogène	-

Références: ¹ Szewzyk et al. 1985, ² Tschetch et Schink 1986, ³ Tschetch et Schink 1985.



dégradation de ces trois composés. D'autre part, le benzoate a pu être mis en évidence comme intermédiaire lors de la dégradation du 3-hydroxybenzoate mais pas du 2-hydroxybenzoate. Tschech et Schink (1986) proposèrent, sur la base de ces observations, un schéma (figure n°6) dans lequel le 3-hydroxybenzoate subirait une déshydroxylation réductive en benzoate et où les voies de dégradation du 2-hydroxybenzoate et du benzoate convergeraient après l'étape de réduction du noyau aromatique. Le groupement hydroxyl du 2-hydroxybenzoate serait conservé parce qu'il est en bonne position pour permettre une β oxydation.

- voie du phénol

La formation de phénol est observée de manière transitoire lors de la dégradation par des enrichissements méthanogènes du catéchol, de l'hydroquinone et du 4-hydroxybenzoate (Szewzyk et al. 1985, Tschech et Schink 1986). Par ailleurs, les cultures enrichies sur catéchol et hydroquinone utilisent respectivement les 3,4- et 2,3-dihydroxybenzoate et le 3,6-dihydroxybenzoate. Ces résultats indiquent que le phénol est un intermédiaire commun dans la dégradation de tous ces composés (figure n°7).

- voie du résorcinol

A part l'acétate, aucun intermédiaire n'a pu être mis en évidence durant la dégradation du résorcinol et de l' α -résorcylate. Les bactéries isolées sur β - ou sur γ -résorcinol utilisent le résorcinol. Tschech et Schink (1985) ont montré que des suspensions de cellules concentrées de la souche KM032 décarboxyleraient ces acides en résorcinol et ont proposé un schéma commun pour la dégradation de ces trois composés (figure n°8). Les deux groupements hydroxyl du résorcinol sont bien positionnés pour permettre une β oxydation et sont conservés durant les étapes de

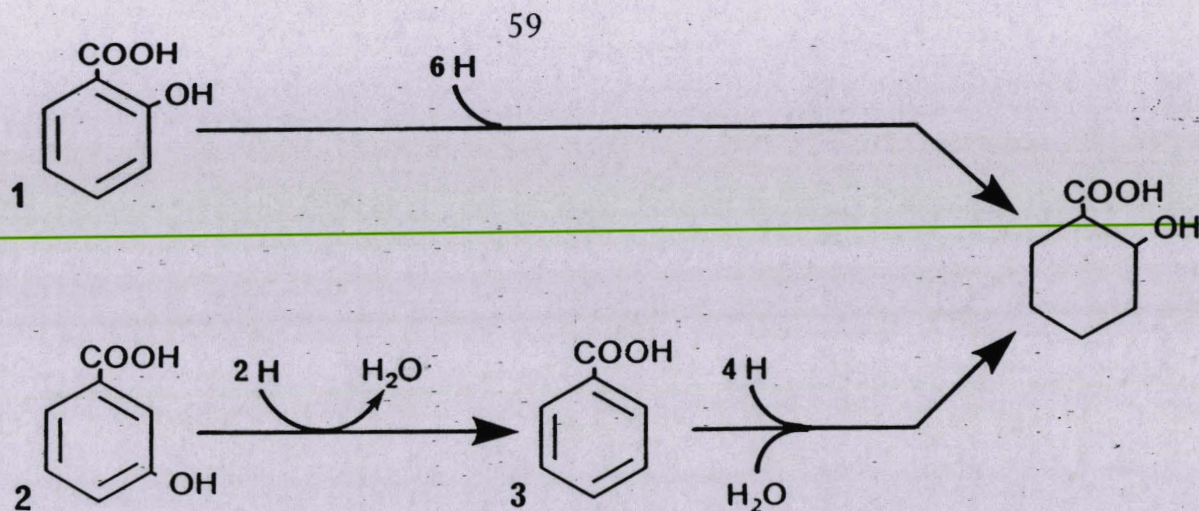


Figure n°6. Premières étapes de dégradation du 2-hydroxybenzoate (1) et du 3-hydroxybenzoate (2) par la voie du benzoate (3).

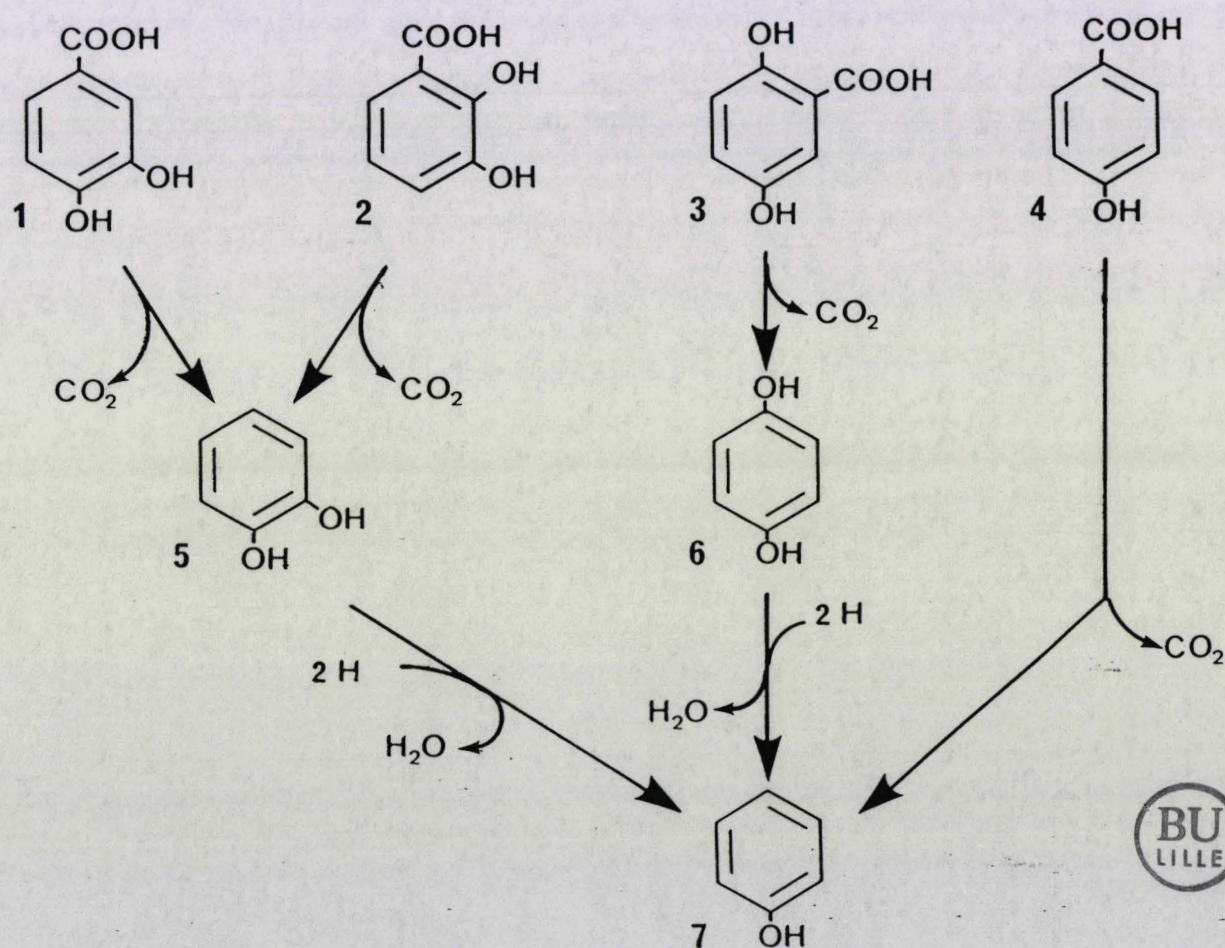


Figure n°7. Premières étapes de dégradation du 3,4-dihydroxybenzoate (1), du 2,3-dihydroxybenzoate (2), du 3,6-dihydroxybenzoate (3), du 4-hydroxybenzoate (4), du catéchol (5) et de l'hydroquinone (6) par la voie du phénol (7).

réduction ultérieure. Aucune décarboxylation de l' α -résorcinol n'a pu être observée et celui-ci aurait sans doute une voie de dégradation différente.

- Voie du phloroglucinol

P. acidigallici utilise tous les composés aromatiques trihydroxylés. Schink et Pfennig (1982) ont mis en évidence chez cette bactérie une activité phloroglucinol réductase. Le phloroglucinol, dont les trois groupements hydroxyl sont convenablement situés pour permettre, après réduction du noyau aromatique, une β oxydation, serait donc l'intermédiaire commun dans les voies de dégradation de tous les dérivés trihydroxylés du benzène et du benzoate (figure n°9). Dans le chapitre X, nous avons confirmé cette hypothèse en montrant que *P. acidigallici* décarboxylait les trihydroxybenzoates et réalisait une paratrans-hydroxylation du pyrogallol en phloroglucinol.

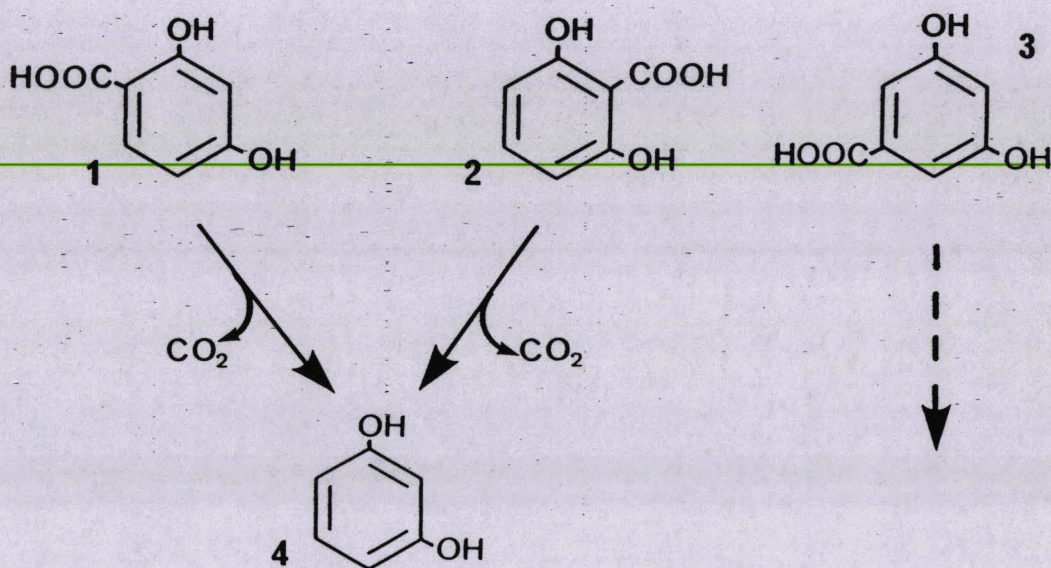


Figure n°8. Dégradation du résorcinol (4) et de ses dérivés carboxylés, β résorcylate (1), résorcylate (2), α résorcylate (3).

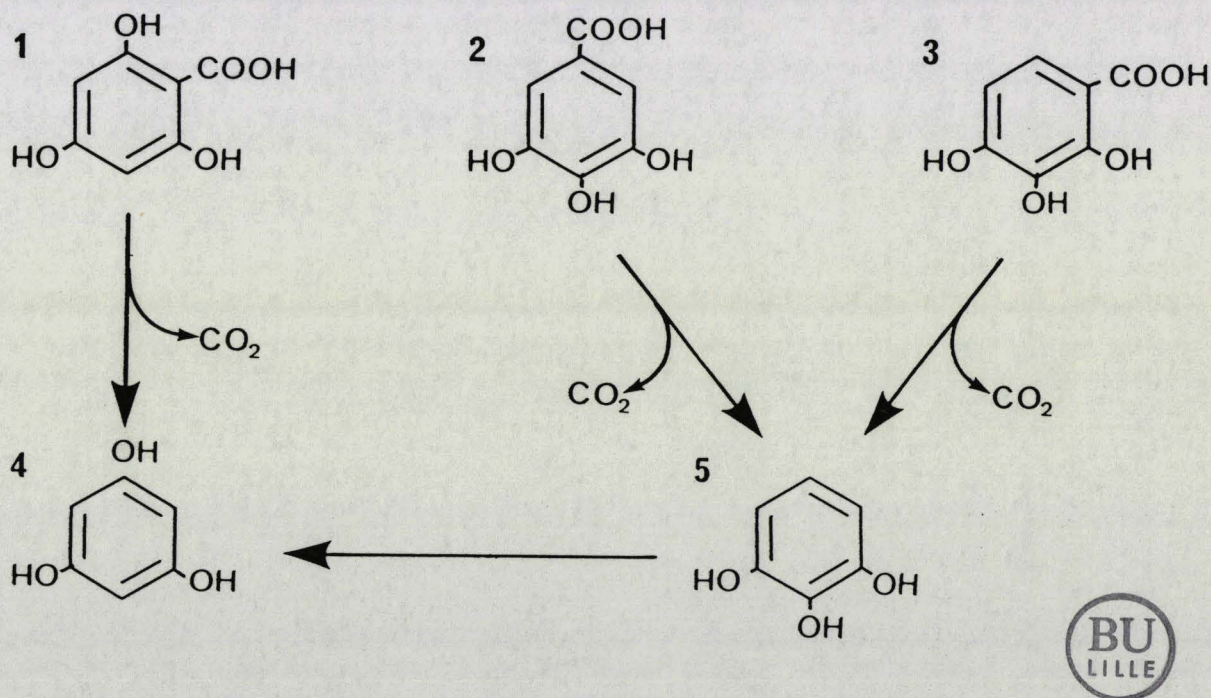


Figure n°9. Premières étapes de dégradation du 2,4,6-trihydroxybenzoate (1), du gallate (2), du 2,3,4-trihydroxybenzoate (3) et du pyrogallol (4) par la voie du phloroglucinol (5).

IV. BACTERIES SULFATOREDUCTRICES

1. CLASSIFICATION

Les sulfatoréducteurs constituent un groupe de bactéries morphologiquement et physiologiquement très diverses qui ont en commun la faculté d'utiliser le sulfate comme accepteur d'électrons. Dans la dernière édition du Bergey's manual, Widdel et Pfennig (1984) proposèrent une classification de ces microorganismes sur la base de leur morphologie et définirent huit genres (tableau XI).

D'un point de vue physiologique et métabolique on peut distinguer deux types de bactéries sulfatoréductrices : celles qui oxydent incomplètement les substrats carbonés en acétate et celles qui dégradent ces composés complètement en CO_2 et qui peuvent utiliser l'acétate comme seule source d'électrons (Pfennig et al. 1981). Cette classification physiologique (tableau XII) ne recoupe pas exactement celle qui est basée sur la morphologie et il existe des espèces de *Desulfovibrio* et de *Desulfotomaculum* qui dégradent le lactate en acétate et d'autres qui utilisent l'acétate. Chez *Desulfatobacter postgatei*, l'oxydation de l'acétate en CO_2 est réalisée par une voie métabolique analogue au cycle de Krebs (Brandis-Heep et al. 1983, Gebbard et al. 1983).

Les principaux substrats utilisés par les différentes espèces sulfatoréductrices sont résumés dans le tableau XII. Certaines souches peuvent également dégrader d'autres substrats tels que des alcools (propanol, butanol, isobutanol, éthylène glycol), des acides gras volatils (formate, isobutyrate), des acides organiques (malate, fumarate, succinate), des acides aminés, des composés aromatiques (phenylacétate, 2-hydroxybenzoate), la choline, l'acide nicotinique, l'oxalate et l'oxamate. Récemment Bak et Widdel (1987a, 1987b) ont décrit un nouveau genre, *Desulfobacterium*, comprenant deux espèces, *D. indolicum* et *D. phenolicum*,

Tableau XI. Classification des bactéries sulfatoréductrices¹

genre	morphologie
<i>Desulfovibrio</i>	vibrio, spirille, bacille incurvé
<i>Desulfomonas</i>	bacille droit non mobile
<i>Desulfococcus</i>	coque
<i>Desulfofacter</i>	bacille de forme ellipsoïdale
<i>Desulfobulbus</i>	bacille en forme de citron
<i>Desulfotomaculum</i>	bacille sporulé
<i>Desulfosarcina</i>	sarcine, coques en paquet
<i>Desulfonema</i>	filament

¹ d'après Widdel et Pfennig 1986



Tableau XII. Substrats utilisés par les bactéries sulfatoréductrices

bactéries	H ₂	lactate	éthanol	acétate	propionate	acides gras ¹	benzoate
1. incomplète oxydation des substrats en acétate							
<i>Desulfovibrio africanus</i>	(1)	+	+	-	-	-	-
" <i>baculatus</i>	(1)	+	+	-	-	-	-
" <i>desulfuricans</i>	(1)	+	+	-	-	-	-
" <i>gigas</i>	(1)	+	+	-	-	-	-
" <i>saalexigens</i>	(1)	+	+	-	-	-	-
" <i>vulgaris</i>	(1)	+	+	-	-	-	-
" <i>sapovorans</i>	-	+	-	-	-	4-18	-
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	+	+	+	-	-	-	-
" <i>orientis</i>	+	+	-	-	-	-	-
" <i>ruminis</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	+	+	+	-	+	-	-
<i>Desulfomonas pigra</i>	nd	+	v	-	-	-	-
2. complète oxydation des substrats en CO ₂							
<i>Desulfobacter postgatei</i>	-	v	v	+	-	-	-
<i>Desulfococcus multivorans</i>	-	+	+	+	+	4-14	+
<i>Desulfonema limicola</i>	+	+	-	+	+	4-12	-
" <i>magnum</i>	-	-	-	+	+	4-10	+
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	+	+	+	+	+	4-14	+
<i>Desulfotomaculum acetooxidans</i>	-	-	+	+	-	4	-
<i>Desulfovibrio baarsii</i>	-	-	-	+	-	4-18	-

¹ les chiffres indiqués correspondent au nombre d'atome de carbone des acides gras utilisés
nd: non déterminé; v: variable suivant les souches; (1) utilisé par la majorité des souches.

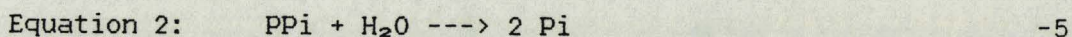
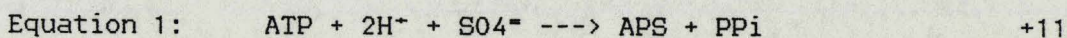
dégradant respectivement l'indole et le phénol.

La plupart des sulfatoréducteurs utilisent également le sulfite et le thiosulfate comme accepteurs d'électrons et certaines espèces réduisent le nitrate et le nitrite en ammoniacque, le fumarate en succinate et le soufre en sulfate. Klemps et al. (1985) ont montré que *Desulfatomaaculum ruminis* et *D. orientis* réduisaient, en absence de sulfate, le CO_2 en produisant de l'acétate.

2. VOIE DE REDUCTION DU SULFATE

Huit électrons sont utilisés pour réduire complètement le sulfate en sulfure. Le potentiel rédox du couple $\text{HSO}_4^-/\text{HSO}_3^-$ est très négatif ($E'^0 = -516 \text{ mV}$) et le sulfate doit tout d'abord être activé en adénosine phosphosulfate (APS). Cette réaction, catalysée par une ATP sulfurylase, libère du pyrophosphate (équation 1) et n'est favorable thermodynamiquement que si ce dernier est hydrolysé en phosphate inorganique sous l'action d'une pyrophosphatase (équation 2):

G'^0 (Kcal/mole)



La première étape de réduction est la transformation de l'APS en sulfite et AMP et 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. Le premier fait intervenir une réduction directe du sulfite en sulfure sans libération d'intermédiaire libre. 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

Desulfovibrio et le pigment P582 et la desulfofusicidine qui ont été trouvés respectivement chez les *Desulfotomacula* (Trudinger 1970) et chez *Thermodesulfobacterium* (Hatchikian et Zeikus 1983). Ces enzymes produisent cependant du trithionate ($S_3O_6^{2-}$) et du thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) de manière irréversible et Akagi et ses collaborateurs (Drake et Akagi 1977, Agaki 1981) ont proposé un mécanisme cyclique dans lequel ces deux composés seraient produits comme intermédiaires (figure n°10). Des thiosulfate réductases ont été purifiées chez plusieurs souches de *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.

3. PROTEINES D'OXYDOREDUCTION

- Cytochromes

Il existe chez les *Desulfovibrio* 3 types de cytochrome c. Le cytochrome c_3 fut découvert par Postgate (1956). Il a un potentiel redox beaucoup plus bas (environ -300 mV) que ceux des cytochromes c de mitochondries, contient quatre hèmes par molécule et a un poids moléculaire d'environ 14.000. Il a été trouvé chez toutes les espèces de *Desulfovibrio* et sa présence est considérée comme un critère taxonomique (Postgate 1979). Le cytochrome c_3 est localisé dans l'espace périplasmique (Le Gall et al. 1965) et est un cofacteur spécifique de l'hydrogénase. Un autre cytochrome c_3 d'un poids moléculaire de 26.000 et contenant huit hèmes par molécule a été purifié chez *Desulfovibrio gigas*, *D. vulgaris* et *D. desulfuricans* (Bruschi et al. 1969, Guerlesquin et al. 1982). Le cytochrome c_{553} a été isolé pour la première fois à partir

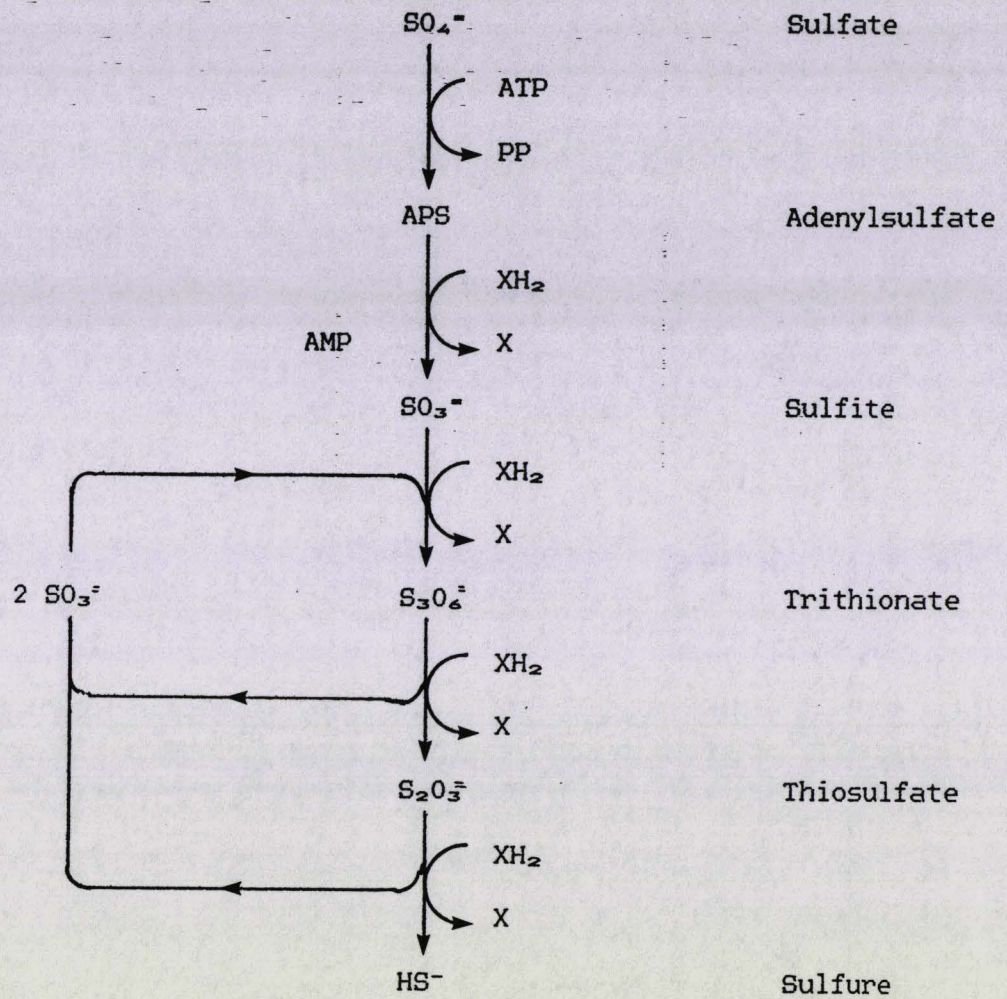


Figure n°10. Réduction du sulfate en sulfure par la voie du trithionate

d'extraits de *D. vulgaris* par Le Gall et Brushi (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; il pourrait intervenir comme cofacteur de la formate déshydrogénase.

La plupart des cytochromes isolés de bactéries sulfatoréductrices l'ont été chez des souches de *Desulfovibrio* et nous décrivons dans le chapitre XI un cytochrome c_3 à haut potentiel que nous avons purifié à partir d'extraits d'une bactérie du genre *Desulfobulbus*.

- Ferrédoxines et flavodoxines

Les flavodoxines et les ferrédoxines sont des protéines cytoplasmiques qui interviennent comme cofacteur de la pyruvate deshydrogénase (Fauque 1985). Les ferrédoxines sont des protéines de faible poids moléculaire possédant des centres fer-soufre. 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 ($E'o = -400$ mV) nettement plus bas que celui de la ferrédoxine II ($E'o = -130$ mV) (Cammack et al. 1977). Des flavodoxines ont été mises en évidence chez certaines souches 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 ($E'o = -440$ mV) et une forme semiquinone-quinone ($E'o = -130$ mV).

- hydrogénases

Même lorsqu'ils sont cultivés en absence d'hydrogène, les *Desulfovibrio* contiennent de fortes activités hydrogénasiques. Celles-ci peuvent être localisées dans le périplasma et le cytoplasme ou être associées à la membrane. Des hydrogénases ont été purifiées chez de nombreuses souches de *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).

- Autres protéines d'oxydoréduction:

D'autres protéines d'oxydoréduction telles que la rubrédoxine, la désulforédoxine et des protéines contenant du cobalt ont été purifiées chez différentes souches de *Desulfovibrio*. Des 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 déshydrogénase de *Desulfobulbus elongatus* (chapitre XI.). Les membranes des bactéries sulfatoréductrices contiennent également des ménaquinones (Widdel 1986).

4. METABOLISME DE L'HYDROGENE

Les *Desulfovibrio* peuvent se développer en utilisant l'hydrogène comme seule source d'électrons (Badziong et al. 1978, Brandis et Thauer 1981). Les activités hydrogénasiques étant principalement localisées dans le périplasma, 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 sont transférés ensuite au travers de la membrane pour réduire, dans le cytoplasme, le sulfate en sulfure. Ces transferts d'électrons ont pour conséquence la création d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane et permettent la synthèse d'ATP

grâce à l'ATPase membranaire (figure n°11). Les *Desulfovibrio* peuvent, soit consommer de l'hydrogène, soit en produire et possèdent des hydrogénases périplasmiques et cytoplasmiques. Partant de ces observations, Odom et Peck (1981a, 1981b) ont proposé un mécanisme de recyclage de l'hydrogène qui permettrait d'expliquer le métabolisme énergétique des sulfatoréductrices poussant sur lactate. Dans cette hypothèse, le lactate serait oxydé en acétate dans le cytoplasme en produisant de l'hydrogène par 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, les électrons seraient ensuite transférés dans le cytoplasme pour réduire le sulfate en permettant la formation d'un gradient de protons (figure n°12). Ce schéma expliquerait que les *Desulfovibrio* puissent pousser en absence de sulfate en association avec des méthanogènes. Dans ce cas, seule l'hydrogénase interne interviendrait. Ce modèle ne semble cependant pas pouvoir s'appliquer à toutes les bactéries sulfatoréductrices. Certaines des nouvelles espèces décrites par Widdel (1980) sont en effet incapables d'utiliser l'hydrogène et nous avons montré que chez *Desulfobulbus*, l'activité hydrogénasique était réprimée lorsque les cellules étaient incubées en présence de lactate et de sulfate (chapitre XI).

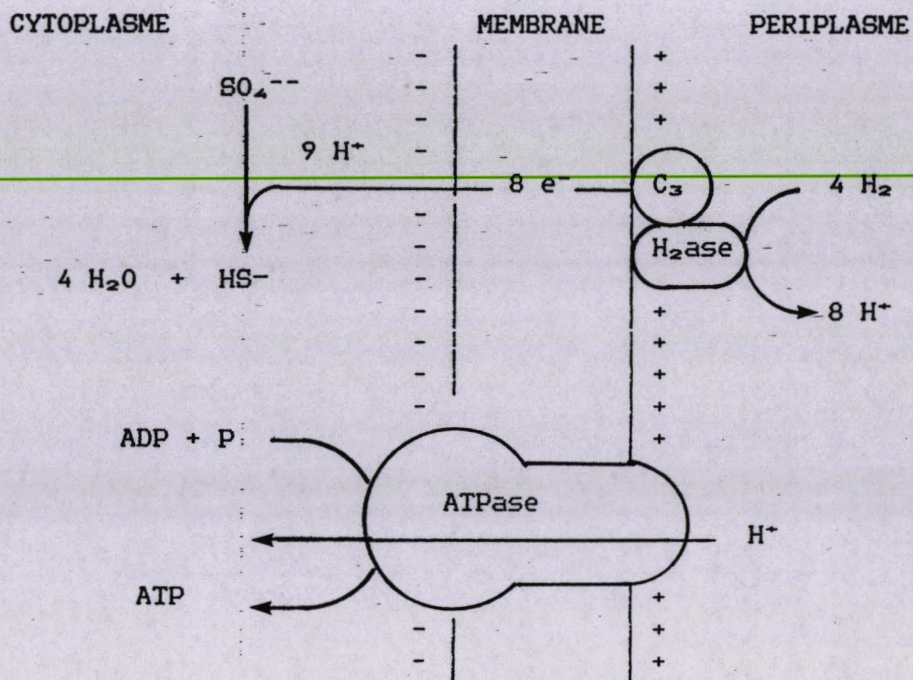


Figure n°11. Conservation de l'énergie chez les *Desulfovibrio* poussant sur hydrogène

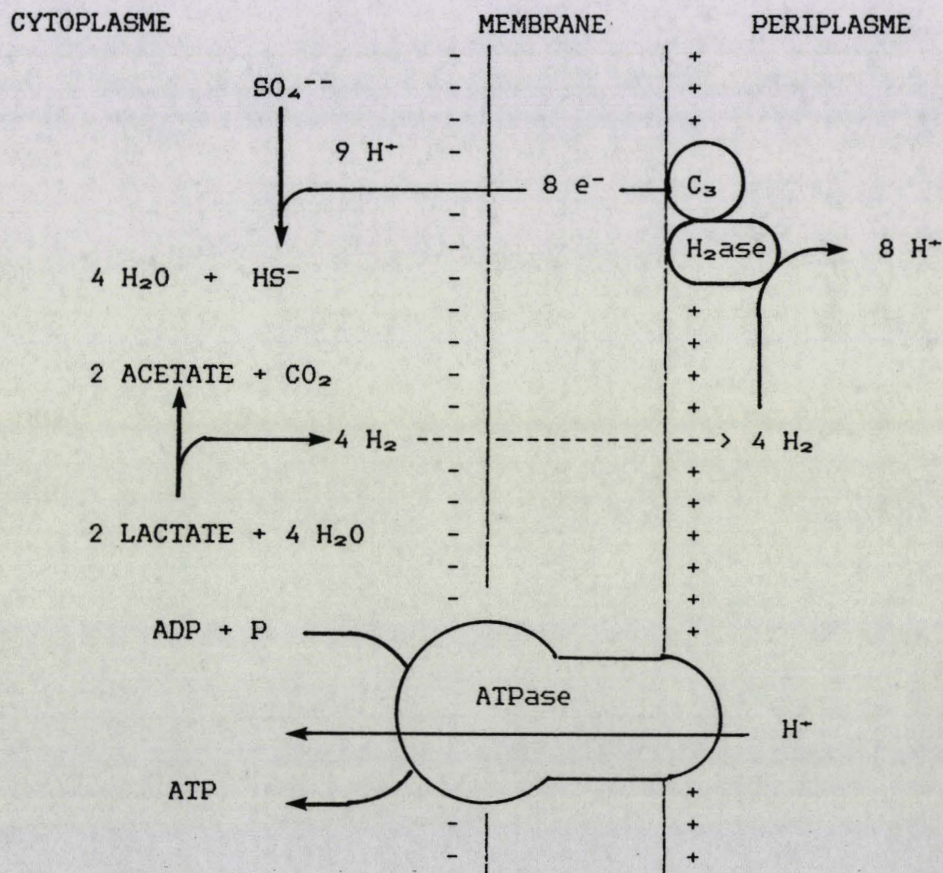


Figure n°12. Conservation de l'énergie chez les *Desulfovibrio* poussant sur lactate: théorie du recyclage de l'hydrogène.

V. BACTERIES PROPIONIQUES ET BUTYRIQUES

Le propionate et le butyrate peuvent être produits à partir de différents composés organiques simples ou complexes. Dans ce chapitre, nous nous limiterons à l'étude bibliographique des bactéries propioniques et butyriques utilisant certains des métabolites intermédiaires de la fermentation méthanique: l'éthanol, le lactate et le succinate.

1. DEGRADATION DU LACTATE

De nombreuses espèces anaérobies utilisent le lactate en absence d'accepteur exogène d'électrons et l'on peut distinguer plusieurs types de fermentations.

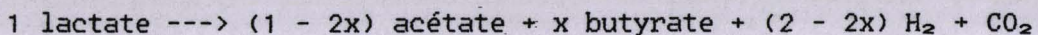
- Fermentation propionique

La fermentation du lactate en acétate et propionate est observée chez les espèces du genre *Propionibacterium*, chez *Clostridium propionicum* et chez certaines espèces gram négatives appartenant aux genres *Veillonella*, *Selenomonas* (Buchanan et Gibbons 1974), *Pectinatus* (Lee et al. 1977) et *Propionispira* (Schink et al. 1982). Ces bactéries produisent une mole d'acétate et deux moles de propionate pour trois moles de lactate dégradées. Deux voies métaboliques différentes (voir chapitre VI) permettent la formation de propionate : la voie du succinate qui a été mise en évidence chez les *Propionibactériaceae* et la voie de l'acrylate qui est utilisée par *Clostridium propionicum*.

- Fermentation butyrique

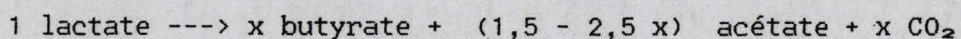
Plusieurs espèces de *Clostridium* (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* et *C. lactoacetophilum*) fermentent le lactate en acétate, butyrate et hydrogène. La croissance de ces bactéries est favorisée par la présence d'acétate (Baht et Barker 1947). Les coenzymes réduits (NADH et

ferrédoxine) lors de l'oxydation du lactate en acétyl-CoA, peuvent être régénérés soit grâce à la réduction de protons en hydrogène, soit grâce à la condensation et à la réduction de 2 acétyl-CoA en butyrate. L'importance respective de ces deux mécanismes détermine les quantités d'acétate et de butyrate produits et la fermentation butyrique du lactate peut être représentée par l'équation :



Chez les clostridia, les déshydrogénases intervenant dans la synthèse du butyrate, et la lactate déshydrogénase sont NAD⁺ dépendantes tandis que la ferrédoxine est le cofacteur de la pyruvate déshydrogénase et de l'hydrogénase. Le facteur x que nous avons défini dans l'équation ci-dessus correspond à la quantité de NADH réoxydée grâce à la libération d'hydrogène via la ferrédoxine-NADH oxydoréductase (Jungermann et al. 1973, Thauer et al. 1977). L'activité de cette enzyme détermine ainsi le rapport entre les différents produits de fermentation figure n°13).

Eubacterium limosum, anciennement appelé *Butyribacterium rettgeri*, réalise une fermentation butyrique du lactate différente. Cette bactérie ne produit que des traces d'hydrogène et forme moins d'une mole de CO₂ par mole de lactate dégradée. Grâce à l'utilisation d'éléments marqués, il a été montré que du CO₂ était incorporé dans l'acétate et le butyrate produits lors de la dégradation du lactate (Barker et al. 1945, Pine et Barker 1954). *E. limosum* réalise également une fermentation homoacétique à partir du mélange H₂:CO₂ et est donc capable de réduire le CO₂ en acétate (Sharak Gentner et al. 1981). Cette réaction permet la régénération d'une partie des coenzymes réduits (figure n°13) et la fermentation butyrique du lactate peut s'écrire :



La valeur de x est comprise, suivant les conditions de culture, entre 0,3 et 0,75 (Samain, 1983). Par mole de lactate dégradée, $(1 - 2x)$ mole

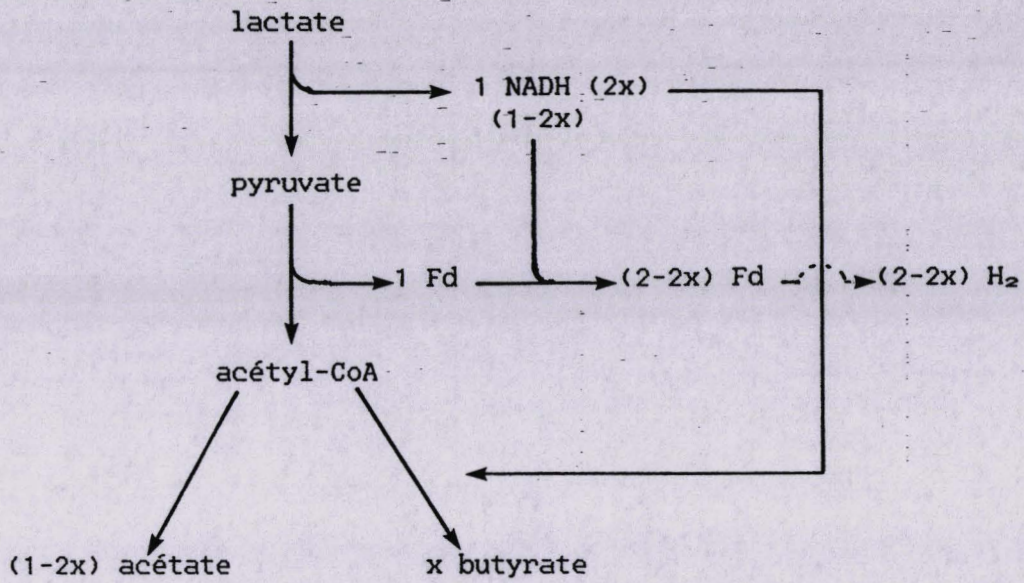
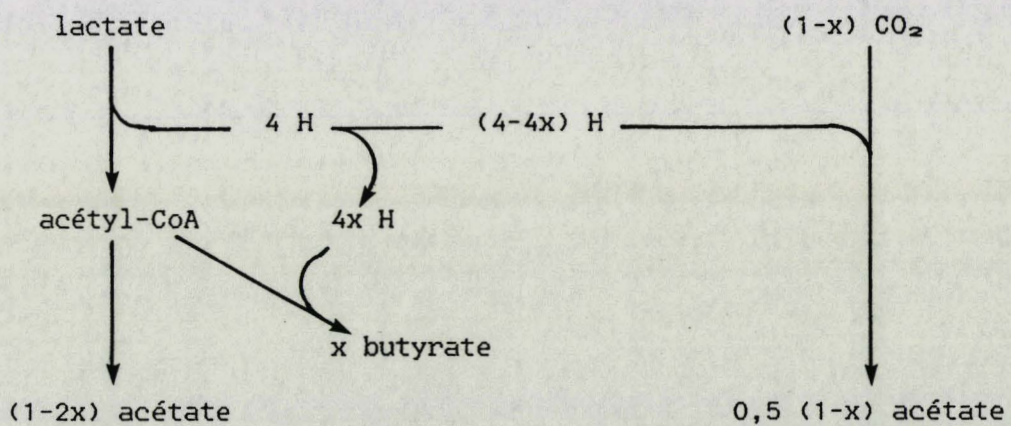
(A) *Clostridium butyricum*(B) *Eubacterium limosum*

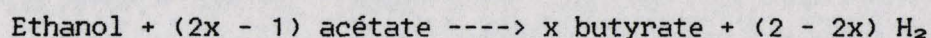
Figure n°13. Fermentation butyrique du lactate chez *Clostridium butyricum* (A) et chez *Eubacterium limosum* (B).

d'acétate provient de l'acétyl-CoA tandis que $(0,5 - x)$ mole d'acétate est formée à partir de CO_2 .

2. DEGRADATION DE L'ETHANOL

- Fermentation butyrique

Clostridium kluyveri fut isolé par Barker (1937) comme un contaminant de *Methanobacillus omelianski*. Il fermentait l'éthanol en butyrate mais ne se développait qu'en présence de larges quantités d'extrait de levure. Borstein et Barker (1948) montrèrent que l'acétate ou le propionate pouvaient remplacer l'extrait de levure et qu'ils étaient consommés, durant la fermentation de l'éthanol, pour former respectivement du butyrate et du valérate. Par mole d'éthanol dégradée, on observe la formation de 0,3 mole d'hydrogène et la fermentation butyrique de l'éthanol peut être représentée par l'équation :



$$x = 0,85.$$

- Fermentation propionique

La formation de propionate à partir d'éthanol fut observée pour la première fois dans des cinétiques de dégradation du saccharose par une population mixte provenant d'un digesteur anaérobie (Samain 1980). L'éthanol qui était produit à partir des sucres dans une première phase, était ensuite converti en acétate et propionate dans une seconde étape. La bactérie (souche X_4) responsable de cette réaction fut isolée et caractérisée (chapitre VIII). Laanbroek et al. (1982) montrèrent que *Desulfobulbus propionicus* réalisait une fermentation propionique de l'éthanol lorsqu'il était cultivé en absence de sulfate, et Schink (1984) isola sur 2,3-butanediol une espèce de *Pelobacter*, *P. propionicus* qui fermentait l'éthanol, le lactate, le pyruvate, le butanediol et l'acétoïne

en acétate et propionate. *P. propionicus* est un bacille gram négatif, non sporulé et non mobile. Il n'utilise aucun sucre et la teneur en G+C de l'ADN de la souche type (DSM 3799) est de 57,4 %. Dans le chapitre n°VIII, nous comparons la souche X₄ et *P. propionicus* d'un point de vue physiologique, morphologique et taxonomique.

3. FERMENTATION PROPIONIQUE DU SUCCINATE

Dans les écosystèmes anaérobies, on observe une conversion rapide du succinate en propionate (Wolfe 1979). Certaines espèces productrices de succinate, *Selenomonas ruminantium* (Scheifinger et Wolin 1973) et *Veillonella alcalescens* (Yousten et Delwiche 1961) sont capables de décarboxyler le succinate mais cette réaction n'est pas, chez ces bactéries, liée à une synthèse d'ATP et ne permet donc pas une croissance bactérienne.

Schink et Pfennig (1982) décrivent par contre une bactérie, *Propionigenium modestum*, qui utilise le succinate comme seule source d'énergie. Cette bactérie décarboxyle le succinate en propionate et fermente le fumarate, le malate et le pyruvate en acétate et propionate. *P. modestum* est un petit bacille gram négatif, non mobile et non sporulé. Le pourcentage de G+C de l'ADN de la souche type (DSM 2376, souche Gra suc 2) est de 33,9 %. Hilpert et al. (1984) montrèrent que chez *P. modestum*, le succinate est dégradé en propionate via le succinyl-CoA, le méthylmalonyl-CoA et le propionyl-CoA. Ils mirent en évidence une méthylmalonyl-CoA décarboxylase membranaire et montrèrent que la décarboxylation du méthylmalonyl-CoA était couplée à l'excrétion de Na⁺ au travers de la membrane, et que ce mécanisme permettait la synthèse d'ATP via une ATPase membranaire Na⁺ dépendante.

VI. METABOLISME DES COMPOSES INTERMEDIAIRES

DE LA FERMENTATION METHANIQUE

Dans ce chapitre, nous présentons les voies métaboliques utilisées par les bactéries anaérobies pour la dégradation (ou la synthèse) de l'éthanol, du propionate et du butyrate.

1. METABOLISME DE L'ETHANOL

La voie métabolique permettant l'oxydation de l'éthanol en acétate a été principalement étudiée chez *Clostridium kluyveri* (figure n°14). Cette bactérie contient une alcool et une acétaldéhyde déshydrogénases NAD⁺ dépendantes. Ces activités sont présentes dans la fraction particulaire mais peuvent être solubilisées à faibles forces ioniques (Hillmer et Gottschalk 1974). Contrairement à ce que l'on observe chez les levures et les bactéries aérobies acétiques où l'acétaldéhyde est directement oxydé en acétate, l'acétaldéhyde déshydrogénase de *Clostridium kluyveri* est coenzyme A dépendante (Burton et Stadtman 1953) et permet donc la formation d'acétyl-CoA. Ce dernier est converti en acétate via l'acétyl-P par la phosphotransacétylase et l'acétate kinase. L'oxydation de l'éthanol en acétate permet donc chez *C. kluyveri* la synthèse d'ATP par une phosphorylation liée au substrat. Chez l'"organisme S", l'alcool déshydrogénase est NAD⁺ dépendante et la ferrédoxine est le cofacteur de l'acétaldéhyde déshydrogénase (Reddy et al. 1972b, 1972c). La formation d'hydrogène à partir de NADH est réalisée grâce à l'action d'une NADH - ferrédoxine oxydoréductase. Comme les alcool déshydrogénases des bactéries acétiques, l'enzyme de l'"organisme S" n'est pas spécifique de l'éthanol et oxyde également le propanol, le butanol et l'isobutanol. Utilisant les mêmes techniques que Burton et Stadtman (1953), Reddy et al. (1972c) ne parvinrent pas à démontrer une dépendance de l'acétaldéhyde

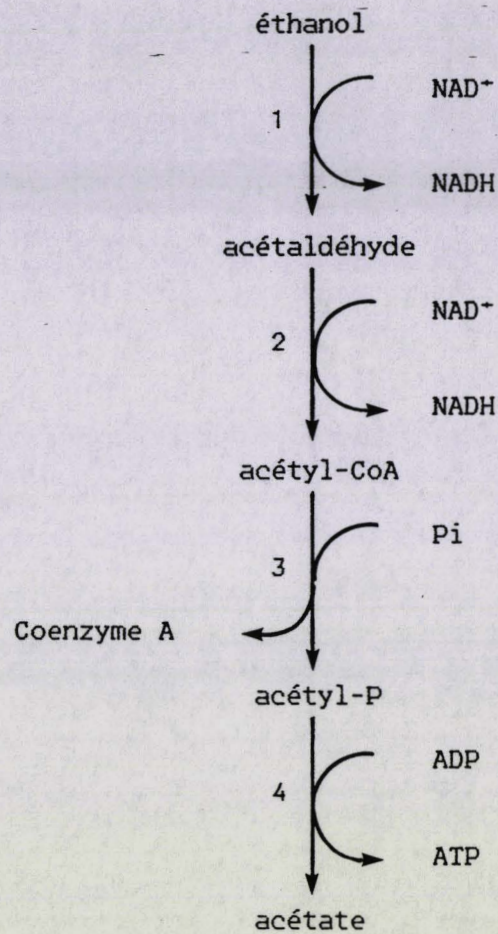


Figure n°14. Oxydation de l'éthanol en acétate chez *Clostridium kluyveri*:
 1 alcool déshydrogénase, 2 acétaldéhyde déshydrogénase Coenzyme A
 dépendante, 3 phosphotransacétylase, 4 acétate kinase.

déshydrogénase vis à vis du coenzyme A. Les extraits de l'"organisme S" contiennent cependant une acétate kinase et une phosphotransacétylase et la formation d'acétyl-CoA à partir d'acétyldéhyde et de coenzyme A est apparemment la seule possibilité permettant la synthèse d'une liaison riche en énergie susceptible de former de l'ATP. Selon Eicher et Schink (1984) l'acétaldéhyde déshydrogénase de *Pelobacter carbinolicus* est coenzyme A dépendante, et dans le chapitre n°IX, nous montrons que dans les extraits cellulaires de cette bactérie, le coenzyme A stimule la formation d'hydrogène à partir d'acétaldéhyde.

Les enzymes responsables de l'oxydation des alcools chez les bactéries sulfatoréductrices ont été très peu étudiées et leur activité serait difficile à mettre en évidence (Stams 1985). De même, les cofacteurs des enzymes impliquées dans la fermentation propionique de l'éthanol ne sont pas connus.

2. METABOLISME DU BUTYRATE

Chez les anarérobies, le métabolisme du butyrate a été étudié principalement chez les bactéries productrices de butyrate du genre *Clostridium* (Doelle 1975). La première étape est la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA (figure n°15). Ce dernier est ensuite transformé en butyryl-CoA par deux réactions de réduction et une de déshydratation. Les deux déshydrogénases, β -hydroxybutyryl-CoA et butyryl-CoA déshydrogénases, sont chez les *Clostridia* NAD⁺ dépendantes. Généralement, la formation de butyrate à partir du butyryl-CoA est couplée à l'activation d'acétate en acétyl-CoA par une CoA transférase. Le butyryl-CoA peut également être converti en butyryl-P par une phosphotransbutyrylase (Valentine et Wolfe 1960) puis en butyrate par une butyrate kinase (Twarog et Wolfe 1962).

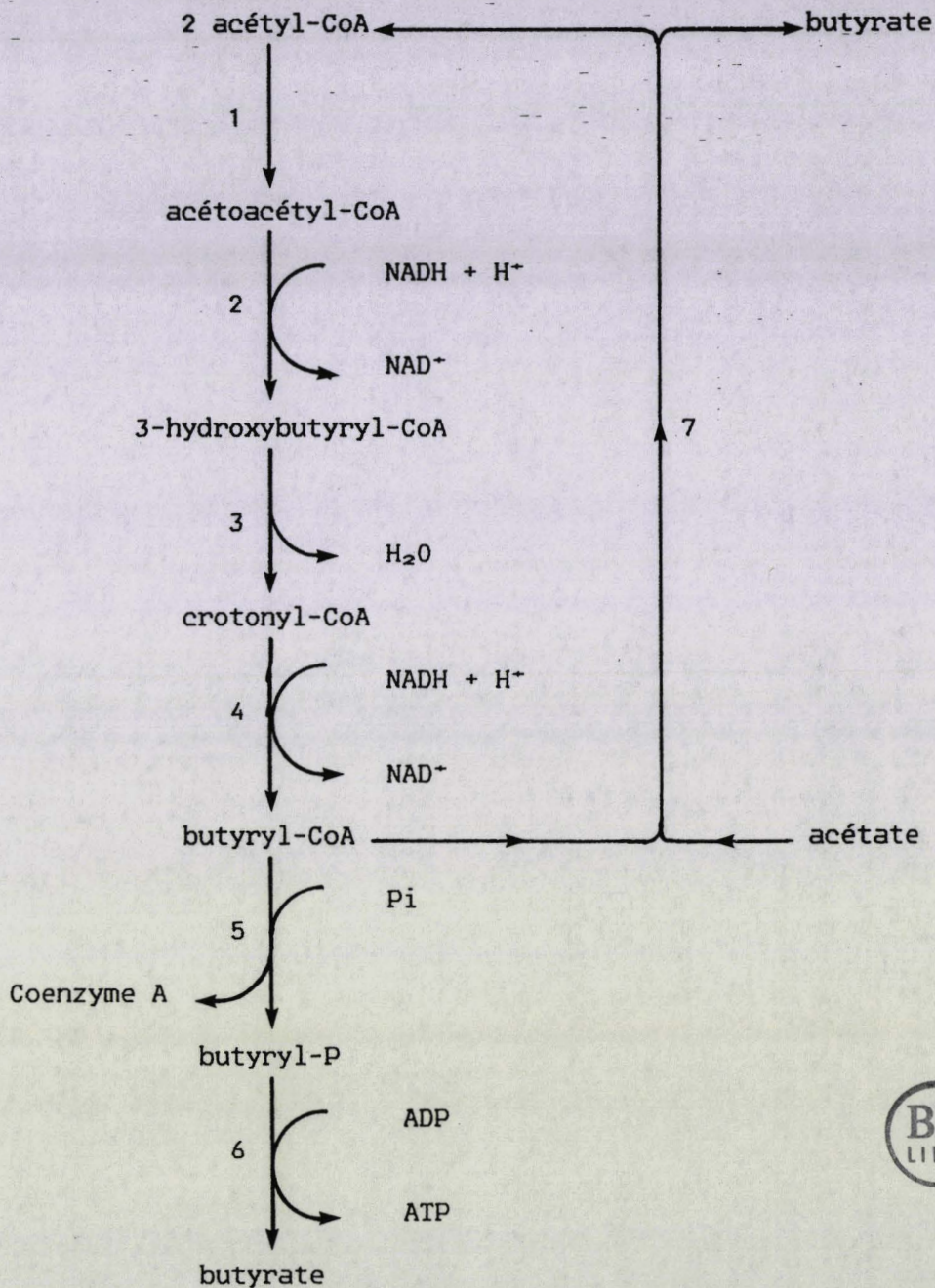


Figure n°15. Voie de synthèse du butyrate chez les *Clostridia*.

1 acétyl-CoA acétyl transférase, 2 3-hydroxybutyl-CoA déshydrogénase, 3 énoyl-CoA hydratase, 4 butyryl-CoA déshydrogénase, 5 phosphotransbutyrylase, 6 butyrate kinase, 7 Coenzyme A transférase.

L'existence d'une phosphorylation oxydative liée à une de ces réactions de déshydrogénation n'a pu être démontrée et l'ATP est produit uniquement au niveau de l'acétate ou de la butyrate kinase. Les bactéries syntrophes acétogènes (*Syntrophomonas wolfei*) qui réalisent une β -oxydation des acides gras à plus de trois carbones, utilisent probablement une voie métabolique similaire à celle de la formation du butyrate chez les *Clostridia*. La déshydrogénation du butyryl-CoA en crotonyl-CoA ($E'^0 = -15 \text{ mV}$) couplée à la réduction de protons en hydrogène ($E'^0 = -420 \text{ mV}$) est cependant très défavorable thermodynamiquement même si la pression d'hydrogène est très faible (pour une concentration en hydrogène de $0,1 \mu\text{M}$, $E' = -200 \text{ mV}$). Thauer et Morris (1984) suggérèrent que l'oxydation endergonique du butyryl-CoA devait être couplée, pour être possible thermodynamiquement, à une consommation d'ATP par un mécanisme de translocation membranaire de protons et d'électrons (figure n°16). L'ATP consommé et celui nécessaire à la croissance seraient produits au niveau de l'acétate kinase.

3. METABOLISME DU PROPIONATE

Deux voies métaboliques permettent la synthèse de propionate chez les bactéries propioniques.

- Voie du succinate (figure n°17)

Chez les bactéries du genre *Propionibacterium*, la formation de propionate passe par l'intermédiaire de composés symétriques à quatre carbones (fumarate et succinate). Une transcarboxylase contenant de la biotine catalyse le transfert d'un CO_2 entre le pyruvate et le méthylmalonyl-CoA pour former de l'oxaloacétate et du propionyl-CoA. L'oxaloacétate est réduit en malate qui est lui-même déshydraté en fumarate. La réduction du fumarate en succinate est catalysée par un

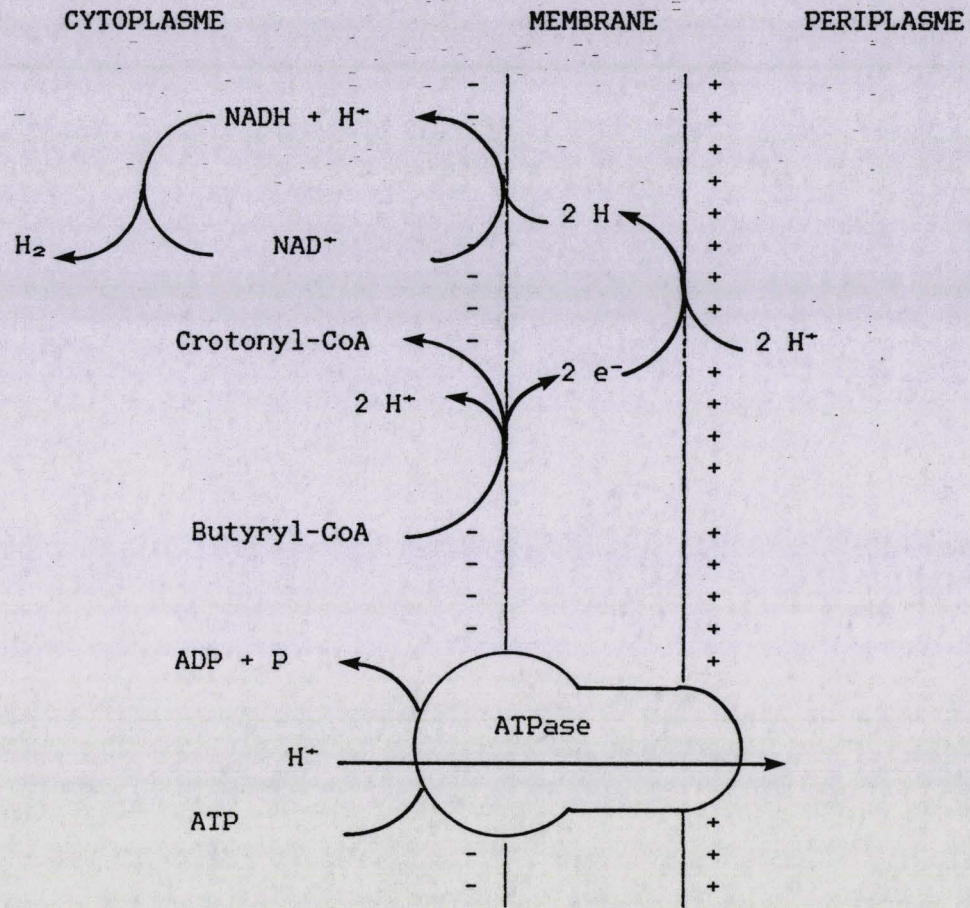


Figure n° 16. Mécanisme hypothétique qui permettrait, chez *Syntrophomonas wolfei*, l'oxydation endergonique du butyryl-CoA grâce à un transfert trans-membranaire d'électrons couplé à l'hydrolyse d'ATP.

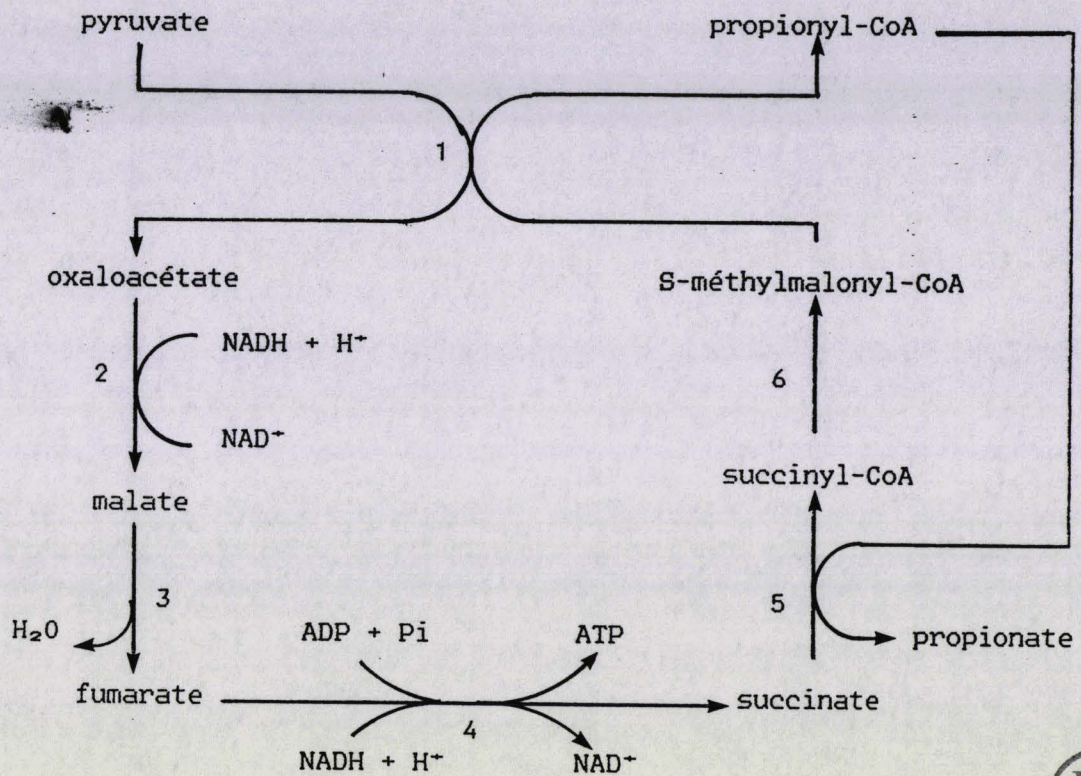


Figure n°17. Formation du propionate par la voie du succinate.

- 1 méthylmalonyl-CoA pyruvate transcarboxylase, 2 malate déshydrogénase, 3 fumarase, 4 succinate déshydrogénase, 5 Coenzyme A transférase, 6 méthylmalonyl-CoA isomérase et méthylmalonyl-CoA racémase.

complexe enzymatique membranaire et est couplée à la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative. Le succinate est activé en succinyl-CoA grâce à un transfert du CoA provenant du propionyl-CoA. Le succinyl-CoA est ensuite isomérisé en R-méthylmalonyl-CoA sous l'action d'une méthylmalonyl-CoA isomérase dont le cofacteur est la vitamine B12. La méthylmalonyl-CoA mutase catalyse la conversion de la forme R du méthylmalonyl-CoA en la forme S qui est le substrat spécifique de la pyruvate méthylmalonyl-CoA transcarboxylase.

Desulfobulbus propionicus (Stams et al. 1984) utilise également la voie du succinate pour produire ou dégrader le propionate. Chez cette bactérie, le succinate n'est pas activé en succinyl-CoA par une Coenzyme A transférase mais par une succinyl-CoA synthase ATP dépendante. De même le propionate est produit à partir de propionyl-CoA par l'intermédiaire de propionyl-P sous l'action d'une phosphotranspropionylase et d'une propionate kinase.

Koch et al. (1983) ont étudié la dégradation de [2-¹⁴C] et de [3-¹⁴C] propionate par un enrichissement méthanogène et ont observé, dans chaque cas, la formation d'acétate uniformément marqué. Ceci suggère que la dégradation du propionate chez les bactéries syntrophes passe par l'intermédiaire d'un composé symétrique et ces bactéries pourraient donc utiliser la voie du succinate.

- Voie de l'acrylate (figure n°18)

Clostridium propionicum utilise une voie différente pour produire le propionate. Des suspensions de cellules concentrées de cette bactérie convertissent l'acrylate en acétate et propionate (Cardon et Barker 1946) et il a été suggéré que la fermentation propionique du lactate passerait par l'intermédiaire du lactoyl-CoA, de l'acryloyl-CoA et du propionyl-CoA (Doelle 1974). Le lactoyl-CoA est produit à partir du lactate sous

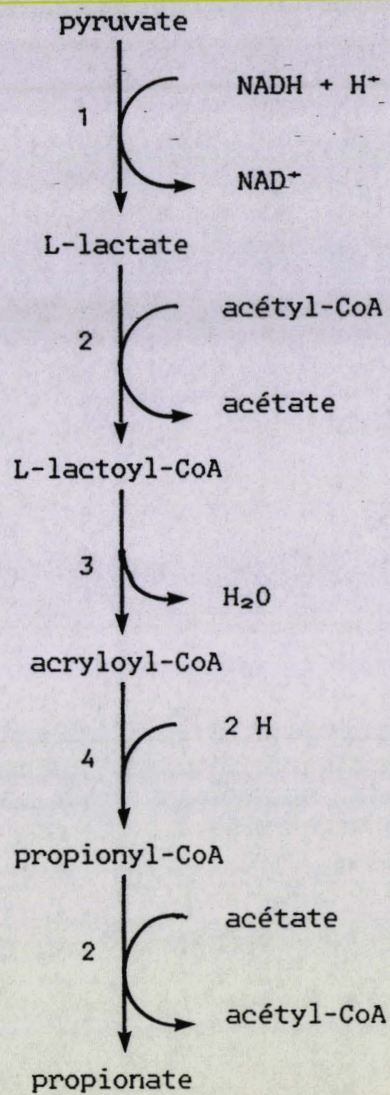


Figure n°18. Formation du propionate par la voie de l'acrylate.

1 lactate déshydrogénase, 2 Coenzyme A transférase, 3 lactoyl-CoA déshydratase, 4 acyl-CoA déshydrogénase.

l'action d'une CoA transférase et est déshydraté en acryloyl-CoA par une lactoyl-CoA déshydratase. La seule réaction de réduction est l'hydrogénation de l'acryloyl-CoA en propionyl-CoA et est catalysée par une acyl-CoA déshydrogénase NAD^+ indépendante. Pour l'instant, il n'a pas été possible de démontrer si cette réaction était couplée ou non avec une synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative. Cette voie est utilisée également par *Megasphaera elsdenii*, par *Bacteroides rumicola* par la souche X₄ qui fermente l'éthanol en propionate (chapitre n°VII).

TRAVAUX PERSONNELS

VII. NUMERATION DES BACTERIES ACETOGENES DANS LES FERMENTEURS DE METHANISATION

1. INTRODUCTION

Dans les digesteurs anaérobies traitant des effluents d'industries agroalimentaires de nature glucidique, les principaux métabolites intermédiaires sont le lactate, l'éthanol, le propionate et le butyrate. Notre premier travail a donc consisté en collaboration avec H.C. Dubourguier et J.P. Touzel à numérer et identifier les bactéries responsables de la dégradation de ces composés afin de répondre aux question suivantes:

- quelles sont les bactéries O.H.P.A. présentes dans la flore dominante de ce type d'écosystème anaérobie ?
- les bacteries syntrophes que l'on trouve dans ces digesteurs sont-elles identiques aux quelques espèces décrites dans la littérature ?
- les sulfatoréducteurs jouent-ils un rôle en tant que bactéries O.H.P.A. ?
- les bactéries propioniques et butyriques utilisant le lactate et l'éthanol sont-elles compétitives par rapport aux bactéries acétogènes ?

2. MATERIELS ET METHODES

Les numérations ont été réalisées en milieu liquide par la technique du nombre le plus probable. Les bactéries O.H.P.A. sont en effet difficiles à cultiver en milieu solide et cette technique présente l'avantage de respecter les transferts interspécifiques d'hydrogène. Dans les digesteurs, les bactéries sont généralement associées en amas ou en granules et les prélèvements ont été tout d'abord homogénéisés par un ultra disperseur (Polytron) dans une chambre anaérobie où sont également effectuées les dilutions sérielles. Le milieu minéral de base a été utilisé pour toutes les numérations et a été supplémenté avec de l'extrait de levure (0,5 g/l) et de la trypticase (0,5 g/l). Les concentrations en éthanol, lactate, propionate et butyrate étaient de 20 mM et pour chaque substrat trois tubes de chaque dilution ont étéensemencés. Pour la recherche des sulfatoréducteurs, la même procédure a été utilisée et les milieux ont été supplémentés avec du sulfate de sodium (20 mM).

La quantification et l'identification présumptive des bactéries se font d'après l'analyse des produits de fermentation (acides gras volatils, méthane, sulfure) et l'examen microscopique. La flore totale a été estimée par comptage en épifluorescence au microscope après filtration sur support Nucléopore (0,22 μ m) et coloration à l'acrydine orange.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Deux séries de numération à six semaines d'intervalle ont été réalisées sur deux digesteurs anaérobies de conception technique différente. Le premier qui est un lit de boue (digesteur A), est un pilote de laboratoire de 5 m³ alimenté avec des eaux résiduaires d'amidonneries. Le second (digesteur B) est une unité industrielle traitant des effluents de conserveries de légumes et utilise le procédé "contact" (réacteur infiniment mélangé). Les concentrations en matières volatiles en suspension dans les digesteurs A et B sont respectivement de 60 et 7 g/l.

Grâce à l'utilisation de milieux sélectifs par leurs sources de carbone et d'énergie et, par leurs accepteurs d'électrons, nous avons pu numérer:

- les bactéries syntrophes dégradant le propionate, le butyrate et l'éthanol;
- les sulfatoréducteurs utilisant le propionate, le butyrate, le lactate et l'éthanol;
- les bactéries productrices de propionate ou de butyrate fermentant le lactate et l'éthanol;
- les méthanogènes hydrogénophiles et acétoclastes;

Les résultats présentés dans le tableau XIII permettent de tirer les conclusions suivantes.

a) Le niveau des bactéries sulfatoréductrices sur éthanol, propionate et butyrate est très largement inférieur à celui des syntrophes.

b) Les sulfatoréducteurs jouent un rôle important dans la dégradation du lactate. Leur concentration est en effet du même ordre que celle des

Tableau XIII. Numérations dans deux digesteurs anaérobies des groupes trophiques impliqués dans la dégradation du lactate, de l'éthanol du propionate et du butyrate.

substrat	produits de fermentation	concentration ¹	
		digesteur A	digesteur B
1. numération en absence de sulfate			
lactate	acétate + propionate	2,1 x 10 ⁹	1,2 x 10 ⁸
	mélange d'AGV (C ₂ à C ₆)	2,0 x 10 ⁷	< 10 ⁵
éthanol	acétate + propionate	1,1 x 10 ⁷	< 10 ⁵
	acétate + méthane	1,1 x 10 ⁹	1,2 x 10 ⁸
propionate	acétate + butyrate + méthane	2,7 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁶
butyrate	acétate + méthane	1,1 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁷
H ₂ /CO ₂	méthane	2,4 x 10 ⁹	4,0 x 10 ⁷
acétate	méthane	2,0 x 10 ⁹	1,4 x 10 ⁷
2. numération en présence de sulfate			
lactate	acétate + sulfure	5,1 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸
éthanol	acétate + sulfure	1,3 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁵
	acétate + méthane	> 10 ⁹	> 10 ⁸
propionate	acétate + sulfure	3,8 x 10 ⁷	4,0 x 10 ⁵
	acétate + butyrate + méthane	> 10 ⁸	> 10 ⁶
butyrate	acétate + sulfure	1,3 x 10 ⁷	4,0 x 10 ⁵
	acétate + méthane	> 10 ⁸	> 10 ⁷

¹ Les valeurs représentent la moyenne entre les résultats de deux numérations réalisées à six semaines d'intervalle.



autres organismes utilisant le lactate et ils interviennent probablement comme bactéries O.H.P.A.

c) Les fermentations propioniques et butyriques de l'éthanol n'ont qu'une importance secondaire dans la dégradation de l'éthanol qui est principalement dégradé par des bactéries O.H.P.A. non sulfatoréductrices.

d) Le métabolisme du propionate apparaît plus complexe qu'une simple et directe oxydation en acétate et CO_2 . Dans les plus fortes dilutions dégradant le propionate, on observe en effet la formation du butyrate en quantité significative. Ceci confirme les observations de Moletta et al. (1985) qui montraient une accumulation transitoire de butyrate dans des cinétiques de dégradation du propionate par des boues de digesteurs.

e) on observe une fermentation propionique du lactate à des niveaux élevés (10^6 à 10^8). L'examen microscopique des plus fortes dilutions révèle la présence de bactéries du genre *Propionibacterium*. Dans les dilutions plus faibles (10^6 à 10^7), le lactate est décomposé en un mélange d'acide gras volatils ayant entre 2 et 6 atomes de carbone. Cette fermentation est caractéristique de *Megasphaera elsdenii* qui serait donc sous dominante par rapport aux *Propionibacteria*.

f) La concentration des bactéries méthanogènes est légèrement supérieure à celle des syntrophes. Les examens microscopiques indiquent que les bactéries hydrogénophiles dominantes sont morphologiquement semblables à *Methanospirillum hungatei* et à *Methanobrevibacter* AZ, et que la principale méthanogène acétoclaste est *Methanothrix soehngenii*.

VIII. ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE BACTERIE REALISANT UNE FERMENTATION PROPIONIQUE DE L'ETHANOL.

1. ISOLEMENT ET CARACTERISATION PARTIELLE

Les résultats des numérations indiquent que les bactéries dégradant l'éthanol en acétate et propionate sont présentes dans les digesteurs à des concentrations 100 fois inférieures à celles des bactéries O.H.P.A et qu'elles ne sont apparemment donc pas compétitives avec ces dernières dans les écosystèmes où la concentration en éthanol est limitante. Cependant, le fait que des bactéries propioniques se soient développées dans les faibles dilutions démontre que ces organismes peuvent jouer un rôle important quand la concentration en substrat est élevée.

Lorsque nous avons mis en évidence pour la première fois une conversion de l'éthanol en propionate (Samain 1980), ce type de fermentation n'avait jamais été décrit et nous présentons ici l'isolement et la caractérisation partielle d'une bactérie anaérobie propionique dégradant l'éthanol et le propanol.

Characterization of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor-dependent association with a Gram-negative homoacetogen

E. Samain, G. Albagnac, H.C. Dubourguier and J.P. Touzel

Station de Technologie Alimentaire, Institut National de la Recherche Agronomique, 369, Rue Jules Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

Received 2 March 1982

Accepted 13 April 1982

1. INTRODUCTION

During mesophilic methanogenesis of sugars, lactate and ethanol are commonly found as intermediates produced by hydrolytic and fermentative bacteria [1]. Under anaerobiosis, various bacterial species utilize ethanol as sole energy source for their growth concurrently with volatile fatty acid production. According to this production, several patterns of fermentation were distinguished including (a) the production of butyric, valeric and caproic acids which is characteristic of *Clostridium kluyveri*. This micro-organism utilizes ethanol and condenses it with short volatile fatty acids (C_2 to C_4) into acids with two more carbons [2]; (b) the ethanol oxidation to acetate with concurrent reduction of CO_2 to methane which was first described by Barker [3]. The responsible micro-organism, *Methanobacillus omelianskii*, has later been shown to be a syntrophic association of two strains [4]: the 'S organism' which oxidizes ethanol to acetate and reduces protons to H_2 , and a H_2 -utilizing methanogenic bacterium *Methanobacterium* strain MoH, i.e. *Methanobacterium bryantii*. Growth of the acetogenic bacterium was inhibited by low partial pressure of hydrogen and occurred only when an H_2 utilizer was present. In low sulfate media, hydrogenase-forming strains of

Desulfovibrio or *Desulfotomaculum* performed the same type of syntrophic association with methanogens [5]. In this report, we provide the first documentation for the fermentation of ethanol into propionate and acetate and show that the responsible anaerobe requires a growth factor produced by a H_2 -oxidizing species. These findings were presented in preliminary form at the 2nd International Symposium on Anaerobic Digestion (poster session, Travemunde, Germany, Sept. 81).

2. MATERIAL AND METHODS

Inoculum was a bench scale anaerobic digester adapted to vegetable canning wastewaters [6]. In all experiments, incubation temperature was 35°C. Kinetics were performed on a gyro-rotary shaker (New Brunswick). The anaerobic technique of Hungate modified by Miller and Wollin [7] was used. CBBM was the basal medium [8] but the concentration of $KHCO_3$ was modified to obtain pH 7.3 under either N_2CO_2 (85:15, v/v) or CO_2 (100%). For isolation and characterization, CBBM was supplemented either with 0.05% (w/v) yeast extract (BCY medium) or with 0.05% yeast extract and 5% rumen fluid (BCR medium). All energy sources were sterilized separately and added

aseptically to BCY or BCR. Antibiotics were sterilized separately by filtration through a 0.22 μm membrane filter (Millipore) and added to the medium at the following final concentrations: Ampicillin (100 mg/l), neomycin (50 mg/l), vancomycin (100 mg/l), bacitracin (30 mg/l), D-cycloserine (10 mg/l). All cultures were performed in 23-ml serum bottles sealed with butyl stoppers and aluminium caps.

Gas, alcohols and volatile acids were routinely determined by gas chromatography, and lactate, succinate, formate by high-pressure liquid chromatography. To determine CO_2 consumption, sealed cultures were alkalized by injection (5%, v/v) of 10 N NaOH. Samples were analyzed in an infrared analyzer (Horiba-Pir 2000, Oceanography International Co.). Growth was determined by measuring the increase of absorbance at 580 nm. The anaerobic culture tubes were directly inserted in the cell holder of a Jean and Constant Spectrophotometer (Prolabo, Paris). The purity of the isolated strains was checked with a Nachet photomicroscope with Nomarsky optics.

3. RESULTS

3.1. Enrichment and isolation

Three different enrichments (7 days) were made from the same anaerobic digester and were transferred every week. The fermentation patterns observed were dependent on the cultural conditions (Table 1). The highest concentrations of ethanol and yeast extract resulted in a *Clostridium*

kluveri-type fermentation (ME_1). However, at low ethanol and yeast extract levels, quite different fermentations were observed. A propionate-acetate fermentation (ME_3) was obtained with low inoculum size and CO_2 ; whereas, with a large inoculum and N_2CO_2 , methane and acetate were the end products (ME_2).

The propionate enrichment was maintained by weekly transfer on the same medium. However, without yeast extract in the medium or after heat shock for 10 min at 80°C, both growth and metabolic activity were stopped.

Serial dilutions from the ME_3 enrichment were inoculated into roll tubes. On BCY medium and BCY medium with ethanol, white irregular colonies were observed at the 10^{-8} dilution. Yellowish regular colonies were observed at the 10^{-4} dilution only on BCY medium with ethanol. They grew among a lawn of the bacteria found at 10^{-8} . Purification of the predominant colonies resulted in a pure strain X-8. This strain did not utilize ethanol on BCY medium but grew on yeast extract. We attempted to purify the yellowish regular colonies (strain X-4). On BCY medium with ethanol these colonies were found either on a preincubated lawn of strain X-8 or as small contaminating colonies that surrounded strain X-8 (Fig. 1). In this case, the size of X-4 colonies decreased concurrently with their distance to X-8 colonies. The isolation of pure strain X-4 was also achieved on BCR medium where the strain grew well alone. These facts clearly indicated that strain X-4 required a growth factor produced by the strain X-8 or which was present in the rumen

Table 1

Fermentation patterns of 3 ethanol enrichments obtained from an anaerobic digester (incubation time: 7 days)

Enrichment No.	Cultural conditions				Fermentation end products
	Ethanol (mM)	Yeast extract (g/l)	Gas phase	Inoculum %	
ME_1	100	1	N_2/CO_2	2	butyrate + caproate
ME_2	30	0.2	N_2/CO_2	20	acetate + CH_4
ME_3	30	0.2	CO_2	2	acetate + propionate

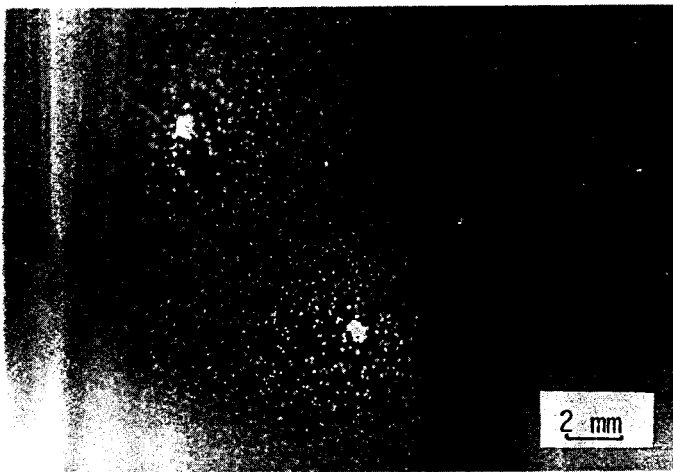


Fig. 1. Small colonies of strain X-4 appear surrounding a colony of strain X-8 on BCY medium + ethanol in roll tubes (10-day-old culture). Scale line = 2 mm.

fluid. In contrast to X-8, strain X-4 fermented ethanol to acetate and propionate.

3.2. Cell morphology and growth properties

The two strains X-4 and X-8 were morphologically similar: they stained Gram-negative and were asporogenous, obligate anaerobic rods. The X-4 rods appeared singly or in short chains. The average size of individual cells was $0.6 \times 1.4 \mu\text{m}$

(Fig. 2). Motility was not observed in wet mounts. The X-8 rods appeared singly or in pairs ($0.8 \times 3 \mu\text{m}$, Fig. 3) and they were motile. Strain X-4 was resistant to ampicillin, neomycin, D-cycloserine, and sensitive to vancomycin and bacitracin; whereas strain X-8 was only resistant to ampicillin and D-cycloserine. None of the two strains fermented lactate, fumarate, methanol or butanol. Strain X-8 fermented either glucose, pyruvate or $\text{H}_2\text{-CO}_2$ and acetate was the only end product

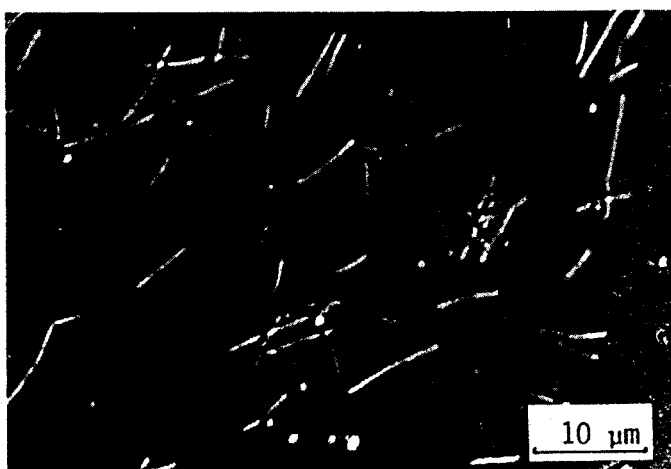


Fig. 2. Morphology of strain X-4 (Nomarsky optics). Scale line = $10 \mu\text{m}$.

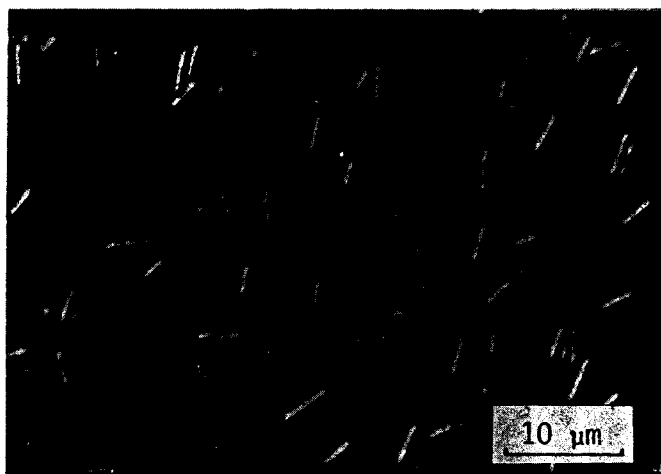
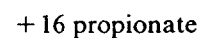
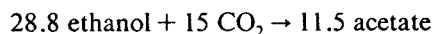
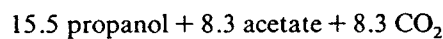


Fig. 3. Morphology of strain X-8 (Nomarsky optics). Scale line=10 μ m.

detected in all cases. In addition to ethanol, strain X-4 grew in pyruvate, xylose and propanol-acetate mixture (Table 2). Acetate and propionate were the only end products detected. Kinetic study showed that the consumption of ethanol and CO_2 was directly correlated to synthesis of acetate and propionate. Propanol was utilized concurrently with a consumption of acetate. At the end of fermentation time courses, the following catabo-

lic reaction stoichiometries were observed.



Growth factor requirement of strain X-4 was demonstrated by growth kinetics (Fig. 4). On BCY

Table 2

Fermentation substrates for strains X-4 and X-8 incubated during 4 days

Substrates (mM)	Fermentation parameters				
	Strain X-4			Strain X-8	
	Growth (ΔA_{580})	Products (mM)		Growth (ΔA_{580})	Products (mM) Acetate
		Acetate	Propionate		
Glucose (16)	0	—	—	1.04	47.8
Xylose (20)	0.20	11.0	9.6	0	—
H_2 - CO_2 ^a	0	—	—	0.15	15.7
Pyruvate (50)	0.29	34.8	15.4	0.38	35.7
Ethanol (30)	0.21	11.5	16.9	0	—
Propanol (30)	0.07	0	6.7	0	—
Propanol (30) + Acetate (30)	0.14	-8.3	22.0	0	—

^a 80:20 (v/v) mixture under 2 atm.

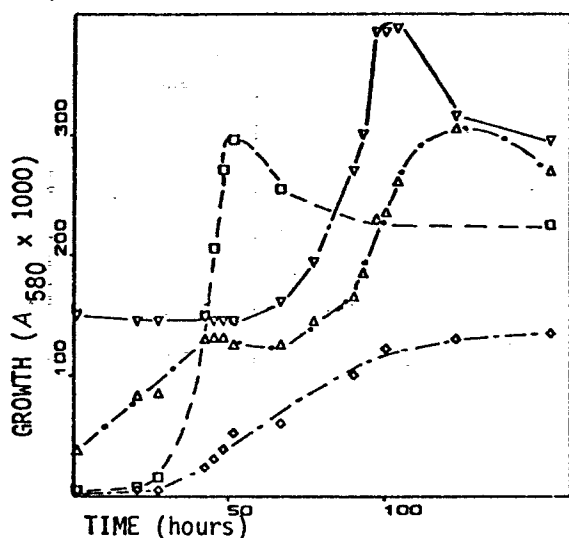


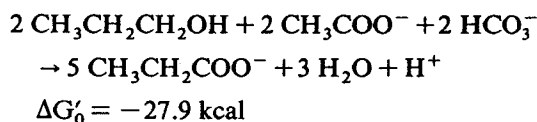
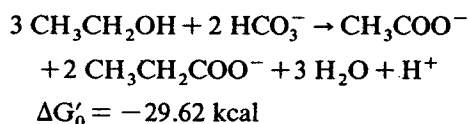
Fig. 4. Growth kinetics of strain X-4 grown alone or in association with strain X-8. $\diamond$ — $\cdots$ — $\diamond$, X-4 in BCY medium + ethanol; $\square$ — $\cdots$ — $\square$, X-4 in BCR medium + ethanol; $\triangle$ — $\cdots$ — $\triangle$, X-4 and X-8 in BCY medium + ethanol; ∇ — $\cdots$ — ∇ , X-4 in a 3-day-old culture of X-8 in BCY medium + ethanol.

medium + ethanol, the growth of X-4 alone was very weak. When X-4 and X-8 were inoculated simultaneously, a two-phase growth was observed. Comparison with the initial absorbance of the pre-incubated X-8 on BCY medium + ethanol suggests that the first step is due to the strain X-8 growing during 45 h, the second to strain X-4 growing from the 65th hour. Thus, the strain provided a growth factor required by strain X-4. This growth factor was also provided by rumen fluid because strain X-4 grew well on BCR medium + ethanol. The doubling time was 5.7 h. Increasing the concentration of rumen fluid (10, 20, 40 or 100%) did not increase maximal observed growth rate.

4. DISCUSSION

Propionic fermentation of ethanol and propanol have never been previously described although the standard free-energy changes could

support bacterial growth [9]:



Ethanol and propanol are oxidized to acetate ($\Delta G'_0 = +2.3 \text{ kcal}$) and propionate ($\Delta G'_0 = +2.87 \text{ kcal}$), respectively. The electrons generated are then utilized for the carboxylation and the reduction of acetate into propionate. The existence of this unknown pathway is confirmed by experimental CO_2 and acetate consumption during propanol conversion. The $\Delta G'_0$ (-18.26 kcal) could theoretically support an ATP synthesis. In propionic acid bacteria, the ATP synthesis via electron transfer phosphorylation has been demonstrated in the succinate pathway and postulated in the acrylate pathway [9]. Ethanol oxidation to acetate is an endergonic reaction. However, in *Clostridium kluyveri* this reaction which produces ATP is possible because it is coupled with an exergonic synthesis of butyrate [10]. Such mechanisms could be involved in the newly isolated propionic acid bacterium.

The reality of a nutrient or metabolic interaction between strains X-4 and X-8 was demonstrated by enrichments and first attempts of isolation on a medium without rumen fluid. As we were only able to isolate strain X-4 on a medium supplemented with rumen fluid, a nutrient regulation must be involved. Direct isolations on such a medium should have masked this interaction. Many anaerobic bacteria isolated from anaerobic ecosystems (digesters, rumen) require various known [11] or unknown [12] growth factors. Strain X-4 is a particular example where the unknown growth factor is supplied by another bacterium i.e. strain X-8 in their natural ecosystem. Further studies are underway for the identification of this growth factor.

The two strains have different metabolic patterns, such as energy sources and fermentation products. Strain X-8 is a Gram-negative, asporoge-

nous, homoacetogenic bacterium. All other homoacetogenic bacteria, including *Clostridium aceticum* [13,14], *Acetobacterium woodii* [15] and *Butyrivacterium methylotrophicum* [16] are Gram-positive rods. In this respect, strain X-8 appears as an unusual hydrogen oxidizer. Regarding its energy sources and fermentation pattern, the newly isolated strain X-4 appears to be an unusual bacterium. Furthermore, the main features of X-4 and X-8 viz. Gram-negative, asporogenous rods, suggest that these rods should be tentatively related to Bacteroidaceae [17]. The proper taxonomic position of these strains awaits further characterization.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. J.C. Zeikus for critical helpful comments on this paper. He mentioned that Dr. B. Schink has isolated an organism which has a fermentation pattern similar to that of strain X-4, but which does not require a growth factor.

REFERENCES

- [1] Morfaux, J.N., Touzel, J.P. and Albagnac, G. (1982) in Anaerobic Digestion (Hughes, D.E., Stafford, D.A., Wheatley, B.I., Baader, W., Lettinga, G., Nyns, E.J., Verstraete, W. and Wentworth, R.L., Eds.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- [2] Bornstein, R.T. and Barker, H.A. (1948) J. Biol. Chem. 172, 659-669.
- [3] Barker, H.A. (1941) J. Biol. Chem. 137, 153-167.
- [4] Bryant, M.P., Wolin, E.A., Wolin, M.J. and Wolfe, R.S. (1967) Arch. Microbiol. 59, 20-31.
- [5] Bryant, M.P., Campbell, L.L., Reddy, C.A. and Crabill, M.R. (1977) Appl. Environ. Microbiol. 33, 1162-1169.
- [6] Morfaux, J.N., Albagnac, G. and Touzel, J.P. (1981) Sci. Alim. 1, 293-314.
- [7] Miller, T.L. and Wolin, M.J. (1973) Appl. Microbiol. 27, 985-987.
- [8] Zeikus, J.G. and Wolfe, R.S. (1972) J. Bacteriol. 109, 707-713.
- [9] Thauer, R.K., Jungermann, K. and Decker, K. (1977) Bacteriol. Rev. 41, 100-160.
- [10] Thauer, R.K., Jungermann, K., Rupprecht, E. and Decker, K. (1968) Eur. J. Biochem. 4, 173-180.
- [11] Miura, H., Horiguchi, M. and Matsumoto, T. (1980) Appl. Environ. Microbiol. 40, 294-300.
- [12] Balch, W.E., Fox, G.E., Magrom, L.J., Woese, C.R. and Wolfe, R.S. (1979) Microbiol. Rev. 43, 260-296.
- [13] Wieringa, K.T. (1940) Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 6, 251-262.
- [14] Adamse, A.D. (1980) Antonie van Leeuwenhoek 46, 523-531.
- [15] Balch, W.E., Scherberth, S., Tanner, R.S. and Wolfe, R.S. (1977) Int. J. Syst. Bacteriol. 27, 355-361.
- [16] Zeikus, J.G., Lynd, L.H., Thompson, T.E., Krzycki, J.A., Weimer, P.J. and Hegge, P.W. (1980) Curr. Microbiol. 3, 381-386.
- [17] Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

2. CARACTERISATION COMPLEMENTAIRE DE LA SOUCHE X₄: ETUDE METABOLIQUE ET TAXONOMIQUE

Schink (1984) isola, à partir d'un enrichissement sur 2,3-butanediol, une nouvelle espèce de *Pelobacter*, *P. propionicus*, qui réalise le même type de fermentation propionique de l'éthanol que la souche X₄. Ces deux bactéries présentent cependant de nombreuses différences morphologiques et nutritionnelles et avec J.P. Touzel nous avons caractérisé plus en détail la souche X₄ afin de préciser sa position taxonomique par rapport à *P. propionicus* et aux autres bactéries propioniques.

Les substrats utilisés par la souche X₄, *P. propionicus* et *Clostridium propionicum* sont comparés dans le tableau XIV. La souche X₄ dégrade après 3 ou 4 jours d'adaptation le glucose. Elle fermente comme *C. propionicum* certains acides aminés mais n'utilise pas, contrairement à *P. propionicus*, l'acétoïne et le 2,3-butanediol. Sur glucose les cellules de la souche X₄ forment en fin de croissance des spores sphériques terminales. En microscopie électronique, l'examen de coupes ultra-fines a permis de confirmer l'existence de spores et l'observation de colorations négatives a montré la présence sur certaines cellules d'un flagelle inséré latéralement.

Des suspensions concentrées de cellules de la souche X₄ catalysent la dismutation de l'acrylate en acétate et propionate (figure n°19) et les extraits cellulaires contiennent une L-lactate déshydrogénase. Ces deux résultats suggèrent que cette bactérie utilise, comme *C. propionicum*, la voie de l'acrylate pour la synthèse du propionate.

En tant que bactérie anaérobie stricte sporulée et non sulfatoréductrice, la souche X₄ appartient au genre *Clostridium*. De par son métabolisme et de par les substrats qu'elle utilise, elle s'apparente



beaucoup à *C. propionicum*. Nous avons de plus montré que cette dernière bactérie fermente l'éthanol. Ces deux organismes se différencient cependant par leurs morphologies et par l'utilisation du glucose, du xylose et du D-lactate. Les teneurs en G+C de l'ADN des deux souches sont significativement différent et le pourcentage d'homologie ADN/ADN n'est que de 18 % (J.P. Touzel communication personnelle). Nous proposons la création d'une nouvelle espèce de *Clostridium*, *C. neopropionicum*, dont X₄ serait la souche type (DSM n°3847).

Tableau XIV. Comparaison de la souche X₄ avec *Pelebacter propionicus* et *Clostridium propionicum*.

	Souche X ₄ (DSM n°3847)	<i>C. propionicum</i> (DSM n°1882)	<i>P. propionicus</i> (DSM n°2379)
morphologie			
mobilité	+	+	-
spore	+	+	-
gram	-	-	-
% de G+C	34,24 ± 0,47	38,13 ± 0,85	57,4 ± 1
substrats			
glucose	+	-	-
xylose	+	-	-
éthanol	+	+	+
propanol	+	nd	+
β-alanine	+	+	-
thréonine	+	+	-
cystéine	+	+	-
alanine	+	+	-
sérine	+	+	-
acétoïne	-	-	+
2,3-butanediol	-	-	+
L-lactate	+	+	+
D-lactate	-	+	+
pyruvate	+	+	+
acrylate	+	+	-



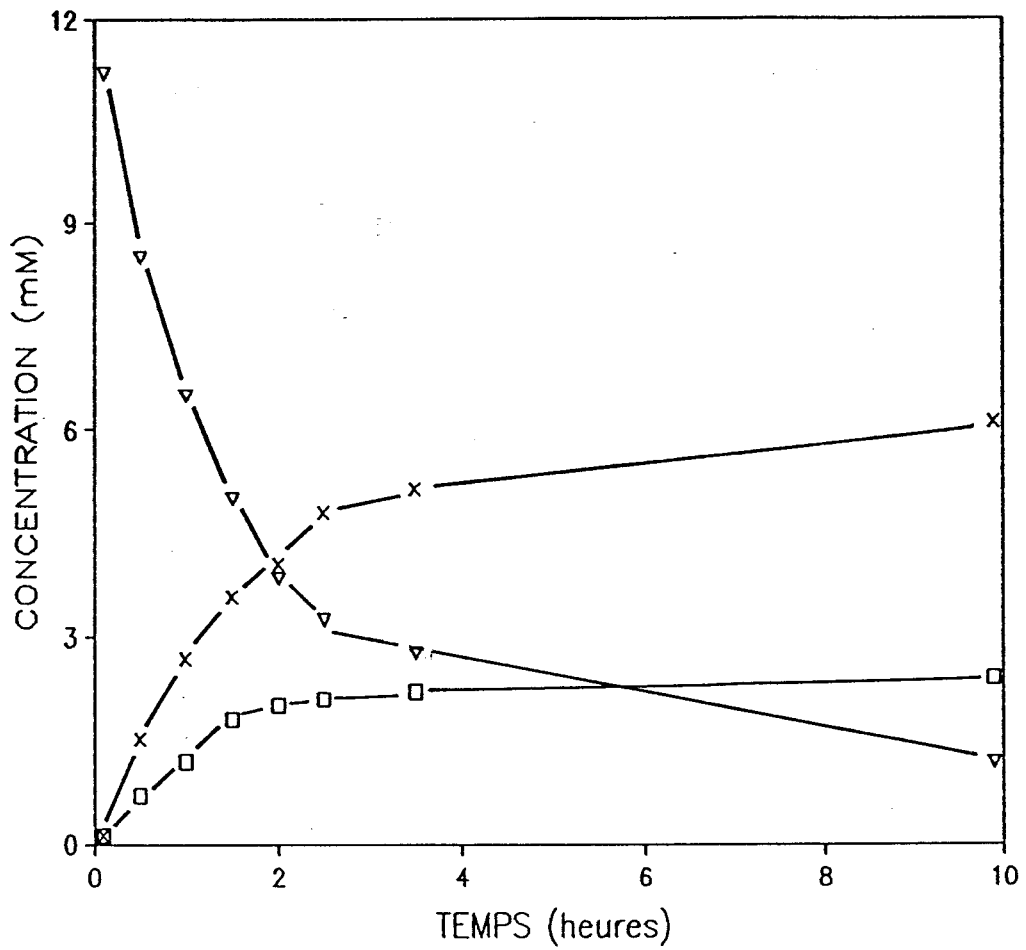


Figure n° 19. Cinétique de dégradation de l'acrylate par une suspension concentrée de cellules de la souche X₂ (125 mg de protéine par litre). (▽) acrylate, (□) acétate, (x) propionate.

IX. BACTERIES ACETOGENES PRODUCTRICES OBLIGEEES D'HYDROGENE DEGRADANT L'ETHANOL

1. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES DOMINANTES DANS LES DIGESTEURS

La flore dominante responsable de la dégradation de l'éthanol dans les deux digesteurs étudiés au chapitre VII est constituée de bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène. A partir d'enrichissements méthanogènes sur éthanol, nous avons isolé des souches de *Desulfovibrio* dégradant, en association avec une méthanogène, ce composé en acétate et méthane (chapitre VIII). Les numérations sur éthanol en présence de sulfate indiquent cependant que les bactéries sulfatoréductrices ne sont pas les organismes O.H.P.A. dominant dans les fermenteurs de méthanisation. La technique d'enrichissement peut donc conduire à la sélection de bactéries non représentatives de la flore dominante. A partir des plus fortes dilutions des numérations, nous avons isolé en coculture avec *Methanobrevibacter* AZ deux souches O.H.P.A. qui sont par contre représentatives de la population responsable de la dégradation de l'éthanol.

Dans ce chapitre nous avons caractérisé avec H.C Dubourguier ces deux souches d'un point de vue morphologique, physiologique et cinétique, et les avons identifiées à *Pelobacter carbinolicus*.

Characterization of two strains of *Pelobacter carbinolicus* isolated from anaerobic digesters

Henri-Charles Dubourguier¹, Eric Samain¹, Gérard Prensier², and Guy Albagnac¹

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Technologie Alimentaire, BP 39, F-59651 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 42, Certia, F-59651 Villeneuve d'Ascq, France

Abstract. In anaerobic industrial digesters treating wastewaters from food industry, the sludges showed high capacities to degrade ethanol. The main syntrophic ethanol-degrading organisms were characterized as *Pelobacter carbinolicus*. During acetoin degradation, butanediol isomers were shown to be transiently produced. In coculture with *Methanobrevibacter arboriphilus*, the strains oxidized not only primary monoalcohols but also 1,2- and 1,3-diols. Ecological importance as well as metabolic pathways of diol degradation are discussed.

Key words: *Pelobacter carbinolicus* – Diol catabolism – Anaerobic digestion – Acetogenesis – Syntrophy

Kinetic studies on intermediary metabolism of methanogenesis so far only took into account either the substrate behaviour (cellulose) or acidic intermediates such as propionate, butyrate or acetate since these are often considered as the limiting steps of anaerobic digestion (Kaspar and Wuhrmann 1978a; Mackie and Bryant 1981; Cohen et al. 1982). However, also ethanol degradation was reported in digesting sludge (Kaspar and Wuhrmann 1978b) and the various ethanol degradation pathways on anaerobic environment have been recently reviewed (Schink et al. 1985). This paper reports on ethanol degradation by anaerobic sludges from digesters treating easily fermentable carbohydrates and on the characterization of the main ethanol oxidizing species, namely *Pelobacter carbinolicus*.

Materials and methods

Strains

The strains RE 1 et BE 4 were isolated during this work from an upflow sludge bed digester and an industrial anaerobic contact digester, respectively. *Methanobrevibacter arboriphilus* AZ (DSM 744) was purchased from the German collection. *Pelobacter carbinolicus* strain GraBd1 was a gift from Dr. B. Schink.

Media and growth conditions

Modified CBBM medium and all cultivation procedures were essentially the same as described earlier (Samain et al. 1984), except that the media were reduced only with cysteine.

Offprint request to: H. C. Dubourguier

Enumerations of methanogens and ethanol oxidizers were carried out by the three tube most probable number method (MPN) with the following substrates: H_2/CO_2 , acetate, ethanol and lactate with and without sulfate. Total flora was estimated by the acridine orange method (Hobbie et al. 1977).

Growth was followed in 20 ml anaerobic tubes at 640 nm. All tests for characterization in liquid medium were carried out at least in duplicates.

Purity of the strains was routinely checked microscopically and also by growth tests in anaerobic Brain Heart Infusion Broth (Difco) or CBBM medium supplemented with glucose ($5\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Analytical methods

Sulfide formation from sulfate was checked by adding 1 ml of a $FeCl_3$ (1M) solution to 1 ml of culture. Alcohols, volatile fatty acids and gases were assayed by gas chromatography as previously described (Touzel et al. 1985). Acetate, acetoin and the meso- and DL-butanediol isomers were analysed on the same gas chromatograph but with a column temperature of 120°C , and identified by mass spectrometry. Crotonic acid and β -hydroxybutyric acid were routinely analysed by high pressure liquid chromatography under previously described conditions (Le Ruyet et al. 1984). Their elution volumes were 22.8 ml and 6.6 ml, respectively. The identification of β -hydroxybutyric acid was confirmed by UV spectroscopy after purification and sulfuric acid dehydration (Mc Inerney et al. 1981). Pure β -hydroxybutyric acid and crotonic acid were used as controls.

The DNA base composition was determined by the thermal denaturation method according to de Ley (1970) after extraction by a standard procedure (Marmur 1961). Electron microscopy was performed after fixation and staining of fresh cells as previously described (Samain et al. 1984).

All chemicals were reagent grade and purchased from Jansen, Fluka and Sigma.

Results

Ethanol degradation by anaerobic sludges

A 5 m^3 -upflow sludge bed reactor (UASB) and a 5000 m^3 -anaerobic contact (AC) digester were treating waste waters from corn starch industry and vegetable canning industry, respectively. These waste waters contained mainly easily fermentable carbohydrates, lactate and only minor amounts

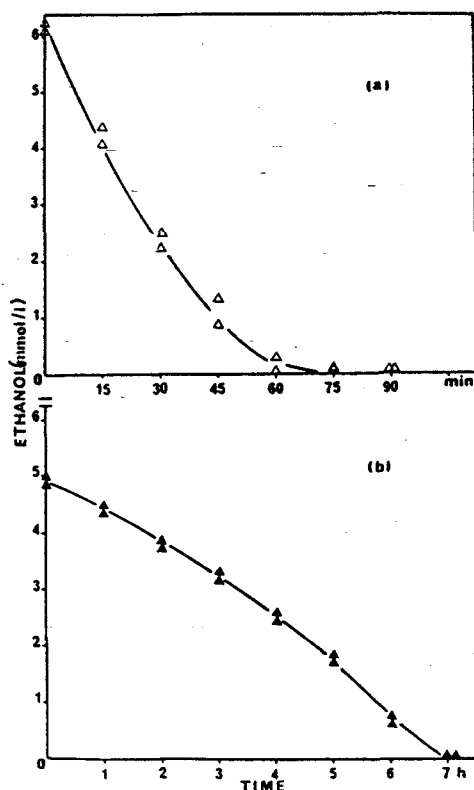


Fig. 1. Kinetics of ethanol degradation by two sludges from a an upflow anaerobic sludge bed reactor b an anaerobic contact digester. Experiments were done at 35°C in anaerobic flasks containing 10 ml of sludge under nitrogen. Ethanol degradation in the liquid phase was followed by gas chromatography at times indicated

of sulfate, i.e. less than 1 mM. The volatile suspended solids (VSS) contents, determined by standard methods, were $60 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ and $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, respectively. After sampling under nitrogen, 10 ml of sludge were placed into anaerobic flasks. Ethanol was added to a final concentration of 5 to 6 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Experiments were performed in duplicates. Surprisingly, the two different sludges showed an immediate and rapid ethanol consumption (Fig. 1) without any fatty acid accumulation. The ethanol degradation rates were $0.60 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and $7.32 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively, for the AC digester and the UASB reactor. Specific activities were 85 and $122 \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ VSS} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively, which represented 20–30% of acetate degradation rates (results not shown).

Enumerations of ethanol- and lactate-degrading organisms

In the sludge bed reactor, 10^{10} bacterial cells per ml were counted by the acridine orange method (Table 1). The prevailing acetoclastic methanogen was a long filamentous non-fluorescent rod similar to *Methanothrix* sp. Although they were not growing in MPN tubes, *Methanosarcina* cells were observed by microscopic examination. The major hydrogen-oxidizing organism was a long, motile fluorescent rod similar to *Methanospirillum hungatei*. In low-sulfate enumeration tubes, 2.0×10^9 cells per ml performing acetogenesis from ethanol were counted. In the last positive tubes, the fermentation products were only methane and carbon dioxide after 10 weeks of incubation. The prevalent

Table 1. Numeration of bacterial trophic groups involved in ethanol and lactate degradation in anaerobic digestors

Substrate	Bacterial counts (viable cells per ml)		Type of fermentation ^a
	Upflow sludge bed reactor	Anaerobic contact digester	
Glucose	1.1×10^9 n.o.	2.0×10^8 2.3×10^8	P HL
Lactate	3.0×10^9	4.0×10^7	P
Ethanol	2.0×10^9 2.0×10^7	2.3×10^7 10^5	AM P
Lactate + SO_4	1.1×10^9	2.0×10^8	ASR
Ethanol + SO_4	2.0×10^7	2.3×10^5	ASR
Acetate	2.5×10^9	4.0×10^6	M
H_2/CO_2	2.5×10^9	4.0×10^7	M

All substrates were added at 24 mM concentration. Sulfate concentration was 15 mM. Incubations were done at 35°C during 10 weeks

^a P = propionic; HL = homolactic; AM = acetic with methanogenesis; ASR = acetic with sulfate reduction; M = methanogenic; n.o. = not observed

organisms were short fat rods besides *Methanothrix*-like filaments and *Methanospirillum* sp. Propionate-producing organisms were detected up to the 10^7 dilution. In high-sulfate media, similar results were obtained except that 2.0×10^7 ethanol utilizing sulfate reducers per ml were counted. The sole fermentation products were sulfide and acetate thus demonstrating complete inhibition of methanogenesis and propionate production. In low-sulfate media, Propionibacteriaceae were identified as the main lactate degraders by their morphology and their fermentation patterns. In contrast, in high-sulfate media, *Desulfovibrio* sp. were counted in the last positive tubes and acetate was the sole product. Glucose was fermented to acetate and propionate by Propionibacteriaceae.

All these trophic groups were also present in the AC digester. However, total numbers were ten to a hundredfold lower and the prevailing hydrogen-oxidizing methanogen was a straight, short, nonmotile fluorescing rod similar to *Methanobacterium formicicum*. Glucose was fermented to lactate by fat rods without production of ethanol or hydrogen. Thus, these rods were probably homofermentative Lactobacilli. Besides lactate, minor amounts of acetate and propionate were observed in the same dilution tubes together with irregular short rods resembling Propionibacteriaceae. These last organisms were dominant in the last positive tubes on lactate.

Purification of the ethanol-degrading acetogens

Purification of the ethanol-degrading hydrogen-producing organisms was achieved from the last positive tubes by repeated serial dilutions in ethanol deep agar inoculated with *Methanobrevibacter* strain AZ. Under these conditions, lense-shaped yellowish colonies surrounded by small colonies of *Methanobrevibacter* developed within 2 weeks. These co-cultures did not grow in Brain Heart Infusion Broth. Pure strains RE1 and BE4 were isolated from these co-

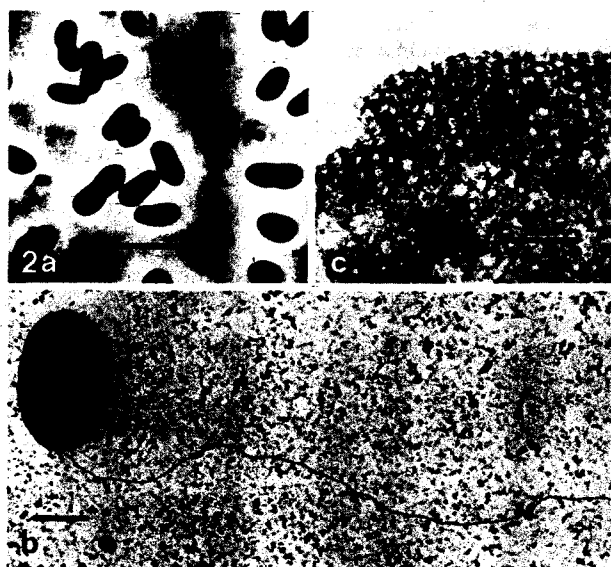


Fig. 2. a Phase contrast micrograph of strain RE1 growing on acetoin Bar equals 5 μ m. b Electron micrographs of negatively stained cells of strain RE1. b Bar equals 0.5 μ m. c Bar equals 0.1 μ m

cultures by further serial dilutions in deep agar with acetoin as sole substrate.

Cell characteristics

Cells of strains RE1 and BE4 were almost identical, i.e. short rods often in pairs (Fig. 2a) staining Gram negative. A weak motility was occasionally observed in young cultures. It was lost early and could not be reproduced reliably. Negatively stained young cells showed a single polar flagellum (Fig. 2b). In addition, the S-layer was made of a regular hexagonal arrangement with a center to center spacing of 22 nm (Fig. 2c). Ultrathin sections showed that both the multilayered cell wall (Fig. 3a) and cell division (Fig. 3b–d) were typical of Gram-negative bacteria. Spore formation was never detected. The guanine plus cytosine contents of the DNA of strains RE1 and BE4 were 53.6 and $53.2 \pm 0.6\%$, respectively.

Growth characteristics

Although they were strict anaerobes, strains RE1 and BE4 were not extremely oxygen-sensitive. Shaking of serial dilutions of a 2 days old culture during 3 h in aerobic CBBM media did not hinder further growth under standard conditions. The pH range of growth of the two strains was 6.3 to 7.6 with an optimum at pH 7.0. Growth occurred between 20°C and 37°C with an optimum at 35°C. B vitamins were required for growth. Ammonium salts were the sole nitrogen source. In addition, yeast extract (DIFCO) or rumen fluid (5%, w/v) enhanced growth whereas amino acids (vitamin-free Casamino acid DIFCO) did not.

In pure culture, strain RE1 disproportionated acetoin and ethylene glycol to acetate and ethanol (Table 2). A weak but significant growth was also observed on 2,3-butanediol and 1,2-propanediol. Strain BE4 used neither ethylene glycol nor 1,2-propanediol. During growth with acetoin, ethanol was not the only reduced end-product (Fig. 4). In our

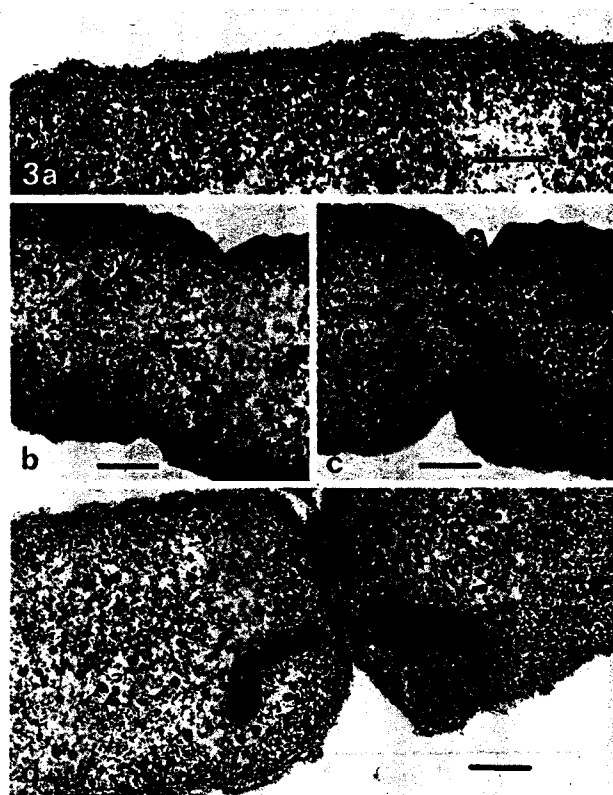


Fig. 3a–d. Electron micrographs of thin sections of strain RE1. a Bar equals 0.1 μ m. b–d Bar equals 0.2 μ m

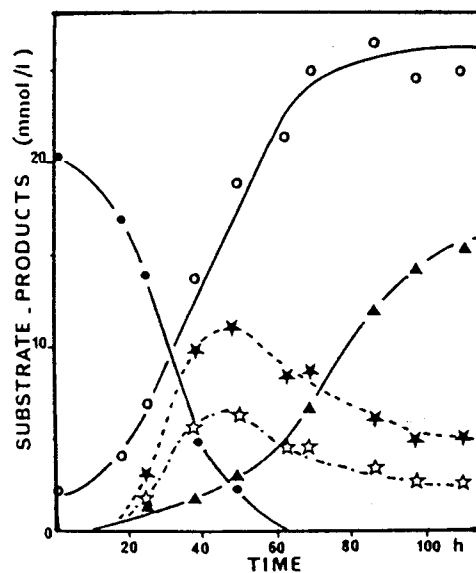


Fig. 4. Kinetics of acetoin degradation by strain RE1. (●) Acetoin; (□) meso-2,3-butanediol; (■) optically active 2,3-butanediol; (▲) ethanol; (○) acetate

chromatographic conditions, two peaks of transient metabolites were found in the culture medium. GC-MS showed that both compounds were 2,3-butanediols. According to Manius et al. (1971), the major intermediary product was identified as the optically active forms of 2,3-butanediol, the

minor one being the meso-isomer. In addition, traces of 2-butoxy-ethanol, i.e. ethylene glycol monobutyl ether, were evidenced by GC-MS.

In coculture with *Methanobrevibacter arboriphilus* AZ, growth of both strains was also supported by a number of alcohols (Table 2). Primary alcohols up to pentanol were oxidized to the corresponding volatile fatty acids. But on pentanol and isopentanol, growth and production of acid were weak. Secondary alcohols neither supported growth nor were oxidized.

Some diols were oxidized by the cocultures but the final products depended on the position of the secondary alcohol group (Table 3). 1,3-propanediol and 2,3-butanediol led only to acetate whereas the main products of 1,2-propanediol and 1,3-butanediol fermentation were propionate and β -hydroxybutyrate, respectively. Trace amounts of crotonic acid were also observed during degradation of 1,3-butanediol. Further comparison of our strains with *Pelobacter carbinolicus* GraBd1 showed that the later was similarly able to oxidize all these diols in coculture with *Methanobrevibacter* AZ.

Table 2. Substrates tested for growth of ethanol-degrading strains RE1 and BE4

Substrates (20 mM)	Strain RE1		Strain BE4	
	Alone	+ AZ	Alone	+ AZ
Ethanol	0	0.330	0	0.270
Propanol 1	0	0.230	0	0.190
Butanol 1	0	0.140	0	0.100
Isobutanol	0	0.205	0	0.150
Pentanol	0	0.050	0	0.080
Isopentanol	0	0.070	0	0.080
Propanediol 1-2 ^a	0.06	0.164	0	0
Propanediol 1-3 ^a	0	0.520	0	0.460
Butanediol 1-3 ^a	0	0.155	0	0.190
Butanediol 2-3 ^a	0.06	0.490	0.040	0.550
Acetoin	0.200	0.520	0.190	0.420
Ethylene glycol	0.150	0.390	0	0

Growth is indicated as O.D. (640 nm) in 20 ml anaerobic tubes

^a In presence of 5 mM acetate

Substrates not utilized: Methanol, propanol 2, butanol 2, butanediol 1-2, butanediol 1-4, polyethylene glycols. H₂/CO₂ + acetate, formate, acetate, propionate, butyrate, pyruvate, succinate, lactate, fumarate, malate, glucose, fructose, xylose, amino acids, peptone, yeast extract. Urea, gelatine or esculin not hydrolysed. No catalase activity. Sulfate, thiosulfate, sulfite or nitrate are not reduced

Table 3
End-products of alcohol fermentations by strain RE1 in pure and mixed cultures with *Methanobrevibacter* AZ

Substrate	Acetate	Ethanol	Propionate	β -Hydroxybutyrate	CH ₄	H ₂
Pure culture						
acetoin	119.0	73.0	—	—	—	7.8
ethylene glycol	50.2	43.9	—	—	—	11.7
Mixed cultures						
acetoin	182.0	—	—	—	43.7	—
ethylene glycol	95.9	—	—	—	27.1	—
ethanol	92.15	—	—	—	48.6	—
1,2-propanediol	16.5	—	85.6	—	44.0	—
1,3-propanediol	91.5	—	—	—	94.8	—
1,3-butanediol	7.2	—	—	85.0	43.4	—
2,3-butanediol	175.0	—	—	—	72.8	—

Experiments were performed in 20 ml tubes, at least in duplicates. All substrates were added at 20 mM concentration. Tubes were incubated at 35°C during 3 days. Results are expressed as mmol per 100 mmol substrate degraded

Discussion

The sludges from the two investigated plants showed a high capacity to degrade ethanol, specific activities being similar to that observed by Kaspar and Wuhrman (1978 b) in sewage sludge. Nevertheless, these activities are at least one third of the acetate catabolizing ones (results not shown). Both digesters showed similar bacterial equilibria: the differences in cell counts could be explained by the design of the processes since UASB reactors are more efficient than anaerobic contact processes for bacterial biomass retention (Pette and Versprille 1982; Lettinga et al. 1982). In addition, sludges from the vegetable cannery contained significant amounts of poorly biodegradable organic matter ($1-2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$).

In low-sulfate waste waters, sulfate reducing bacteria could be involved in ethanol or lactate degradation by interspecies transfer of hydrogen (Bryant et al. 1977). In the present work, this is only true for lactate-utilizing *Desulfovibrio* sp. which compete successfully with the Propionibacteriaceae. In the case of ethanol, acetogenesis is performed by syntrophic ethanol oxidizers. Thus, the presence of high numbers of these last organisms remains unclear since ethanol is generally considered as an unimportant intermediate in anaerobic digesters. Since homolactic bacteria were the prevalent glucose fermenting organisms, the main pathway of ethanol formation results probably from a metabolic shift induced by substrate limitation (Stouthamer 1978). But one must consider acetoin and 2,3-butanediol as alternative substrates because they can be produced by some lactic bacteria and Enterobacteriaceae. However, the latter family was not found at numbers higher than 10^5 cells per ml in these digesters (results not shown).

Besides acetogenesis from ethanol, enumerations showed a propionic fermentation in lower dilutions in contrast with fresh water sediments where these two trophic groups were in the same order (Schink 1984, Schink et al. 1985). Propionigenic ethanol-fermenters are known (Samain et al. 1982; Schink 1984) and in anaerobic sludge they can compete for ethanol degradation with syntrophic associations if ethanol is provided at high concentrations. However, considering their low numbers, they do not contribute significantly to propionate formation in carbohydrate-fed digesters.

Our two new isolates clearly belong to the genus *Pelobacter* (Schink and Pfennig 1982). In spite of some nutritional differences with the type strain GraBd1, the strains RE1 and BE4 have to be assigned to the species *P. carbinolicus* (Schink 1984). In addition, the previously

described strains all required salts for their optimal growth in connection with their marine origin (Eichler and Schink 1985). On the contrary, the two new strains do not present such requirements. Consequently, the two strains have been deposited to the German collection (strain RE 1: DSM 2909; strain BE4: DSM 2984).

The fermentation of ethylene-glycol, 2,3-butanediol and acetoin by *P. carbinolicus* proceeds via acetaldehyde as a common intermediate (Eichler and Schink 1985). However, kinetic data of acetoin degradation by our strain showed in the phase of growth a preferential utilization of electrons for acetoin reduction rather than for ethanol production. In addition, formation of optically active 2,3-butanediols with less meso-2,3-butanediol suggests the presence of a D(-)-butanediol-dehydrogenase (Höhn-Bentz and Radler 1978).

In coculture with a methanogen, differences in utilization of monoalcohols are in good agreement with those reported on the "S" organism (Reddy et al. 1972a) and with the data on its alcohol dehydrogenase specificity (Reddy et al. 1972b). Dehydration of 1,2-diols is a common metabolic property of *Lactobacillus* (Schütz and Radler 1984), *Klebsiella* (Toraya et al. 1979), *Acetobacter* (Kerstens and de Ley 1963), *Propionibacterium* (Ichikawa et al. 1985), *Acetobacterium* and *P. carbinolicus* (Eichler and Schink 1985). In the first five organisms, a diol dehydratase is involved in ethylene glycol and 1,2-propanediol catabolism. The lack of this common enzyme could explain the inability of strain BE4 to use 1,2-diols. Propionate is probably produced by the acetaldehyde dehydrogenase which is known to be non-specific.

In contrast, 1,3-diol oxidation proceeds via the primary alcohol dehydrogenase and the aldehyde dehydrogenase. Quasi stoichiometric conversion of 1,3-butanediol to β -hydroxybutyrate indicates that our strains grow well with these enzymatic activities. But the secondary alcohol group is not attacked either due to lack of a secondary alcohol dehydrogenase or due to inhibition of this enzyme by a carbonyl group as in *Acetobacter* (Kerstens and de Ley 1963). As the strains do not oxidize propanol-2 or butanol-2, the later hypothesis appears unlikely. Similarly, 1,3-propanediol is first oxidized to 3-hydroxypropionate which can be then converted to acetate via malonyl semialdehyde as in *Clostridium kluyveri* (Doelle 1975).

References

- Bryant MP, Campbell LL, Reddy CA, Crabill MR (1977) Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H_2 -utilizing methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 33:1162–1169
- Cohen A, Deursen van A, Andel van JG, Breure AM (1982) Degradation patterns and intermediates in the anaerobic digestion of glucose: experiments with ^{14}C -labeled substrates. *Antonie van Leeuwenhoek Microbiol Serol* 48:337–352
- de Ley J (1970) Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of desoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 101:738–754
- Doelle HW (1975) *Bacterial metabolism*. Academic Press, New York San Francisco London
- Eichler B, Schink B (1985) Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes. *Arch Microbiol* 143:60–66
- Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol* 33:1225–1228
- Höhn-Bentz H, Radler F (1978) Bacterial 2,3-butanediol dehydrogenases. *Arch Microbiol* 116:197–203
- Ichikawa Y, Horike Y, Mori N, Hosoi N, Kitamoto Y (1985) Purification and properties of propanediol dehydratase from *Propionibacterium freundenreichii*. *J Ferm Technol* 63:135–141
- Kaspar HF, Wuhrmann K (1978a) Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. *Appl Environ Microbiol* 36:1–7
- Kaspar HF, Wuhrmann K (1978b) Product inhibition in sludge digestion. *Microb Ecol* 4:241–248
- Kerstens K, de Ley J (1963) The oxidation of glycols by acetic acid bacteria. *Biochim Biophys Acta* 71:311–331
- Le Ruyet P, Dubourguier HC, Albagnac G (1984) Thermophilic fermentation of cellulose and xylan by methanogenic enrichment cultures: preliminary characterization of the main species. *System Appl Microbiol* 5:247–253
- Lettinga G, Roersma R, Grin P, de Zeeuw W, Pol LH, Velsen van L, Hobma S, Zeeman G (1982) Anaerobic treatment of sewage and low strength waste waters. In: Hughes DE, Stafford DA, Wheatley BI, Baader W, Lettinga G, Nyns EJ, Verstraete W, Wentworth RL (eds) *Anaerobic digestion 1981*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam New York Oxford, pp 271–291
- Mackie RI, Bryant MP (1981) Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate and CO_2 to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60°C. *Appl Environ Microbiol* 41:1363–1373
- Manius G, Mahn FP, Venturella VS, Senkowski BS (1971) Separation and quantitation of the meso and racemic forms of 2,3-butanediol by gas liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* 9:367–369
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganism. *J Mol Biol* 3:208–218
- Mc Inerney MJ, Bryant MP, Hespell RB, Costerton JW (1981) *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 41:1029–1039
- Pette KC, Versprille AI (1982) Application of the UASB concept for waste water treatment. In: Hughes DE, Stafford DA, Wheatley BI, Baader W, Lettinga G, Nyns EJ, Verstraete W, Wentworth RL (eds) *Anaerobic digestion 1981*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam New York Oxford, pp 121–133
- Reddy CA, Bryant MP, Wolin MJ (1972a) Characteristics of S organism isolated from *Methanobacillus omelianskii*. *J Bacteriol* 109:539–545
- Reddy CA, Bryant MP, Wolin MJ (1972b) Ferredoxin- and nicotinamide adenine dinucleotide-dependent H_2 production from ethanol and formate in extracts of S organism isolated from *Methanobacillus omelianskii*. *J Bacteriol* 110:126–132
- Samain E, Albagnac G, Dubourguier HC, Touzel JP (1982) Characterization of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth-dependent association with a gram negative homoacetogen. *FEMS Microbiol Lett* 15:69–74
- Samain E, Dubourguier HC, Albagnac G (1984) Isolation and characterization of *Desulfovibrio elongatus* sp. nov. from a mesophilic industrial digester. *System Appl Microbiol* 5:391–401
- Schink B (1984) Fermentation of 2,3-butanediol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov. and *Pelobacter propionicus* sp. nov. and evidence for propionate formation from C_2 compounds. *Arch Microbiol* 137:33–41
- Schink B, Pfennig N (1982) Fermentation of trihydroxybenzenes by *Pelobacter acidigallici* gen. nov. sp. nov., a new strictly anaerobic non spore-forming bacterium. *Arch Microbiol* 133:195–201
- Schink B, Phelps TJ, Eichler B, Zeikus JG (1985) Comparison of ethanol degradation pathways in anaerobic freshwater environments. *J Gen Microbiol* 131:651–660
- Schütz H, Radler F (1984) Propanediol-1,2-dehydratase and metabolism of glycerol of *Lactobacillus brevis*. *Arch Microbiol* 139:366–370

Stouthamer AH (1978) Energy yielding pathways. In: Gunsalus IC, Ornston CN, Sokatch TR (eds) *The bacteria*, vol 4. Academic Press, New York San Francisco London, pp 389–462

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

Touzel JP, Petroff D, Albagnac G (1985) Isolation and characterization of a new thermophilic *Methanosarcina*, the strain CHTI 55. *System Appl Microbiol* 6:66–71

Received February 29, 1986/Accepted April 22, 1986

2. METABOLISME DE L'ETHANOL CHEZ PELOBACTER CARBINOLICUS (SOUCHE RE)

a) introduction

P. carbinolicus est physiologiquement très proche de l'"organisme S" et la voie métabolique de la dégradation de l'éthanol en acétate et hydrogène a été surtout étudiée chez cette dernière bactérie (Reddy et al. 1972b, 1972c). La formation d'acétyl-CoA à partir d'acétaldéhyde est théoriquement chez l'"organisme S" le seul mécanisme permettant la synthèse d'une liaison riche en énergie et donc d'ATP. Reddy et al. (1972c) ne purent cependant mettre en évidence aucun effet du coenzyme A sur l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase.

Nous montrons ici que les activités enzymatiques présentes dans les extraits cellulaires de *P. carbinolicus* (souche RE) sont similaires à celles observées dans ceux de l'"organisme S". En déterminant l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase en mesurant la production d'hydrogène, nous démontrons de plus que cette enzyme est bien coenzyme A dépendante.

b) matériel et méthodes

- préparation des extraits cellulaires

La souche RE a été cultivée sur éthylène glycol en flacon de 10 l. Les cellules sont récoltées par centrifugation (9000 x g) et sont cassées à la presse de French à 20000 psi. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (30000 x g) et le surnageant qui est conservé à +4°C en anaérobiose est utilisé pour les essais enzymatiques.

- dosage de l'alcool déshydrogénase

L'activité est mesurée spectrophotométriquement en suivant l'augmentation de l'absorbance à 340 nm causée par la réduction du NAD⁺. Le mélange réactionnel contient : tampon bicine (pH 8,5), 50 mM; NAD⁺, 1 mM; éthanol,

10 mM; acétaldéhyde déshydrogénase 5 unités/ml. La réaction est démarrée par l'addition de l'éthanol.

- Dosage de l'acétaldéhyde déshydrogénase.

Cette activité a été mesurée par deux techniques différentes.

1) Soit spectrophotométriquement en mesurant la diminution de l'absorbance à 600 nm causée par la réduction du 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP) en présence de phénazine méthosulfate (PMS). Le mélange réactionnel contient : tampon bicine (pH 8,5), 50 mM; acétaldéhyde, 10 mM; DCPIP, 50 μ M; PMS, 50 μ M. La réaction est démarrée par l'addition de l'acétaldéhyde.

2) Soit par chromatographie en phase gazeuse en mesurant la formation d'hydrogène à partir d'acétaldéhyde en présence d'un transporteur artificiel d'électrons (méthylviologen) permettant le transfert des électrons entre l'acétaldéhyde déshydrogénase et l'hydrogénase. La réaction est réalisée dans des flacons anaérobies de 15 ml contenant 3 ml de milieu réactionnel sous atmosphère d'azote. La production d'hydrogène est suivie en prélevant régulièrement 0,5 ml de la phase gazeuse au travers du bouchon en caoutchouc butyl. Le mélange réactionnel contient : tampon Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM; acétaldéhyde, 10 mM; méthylviologen, 2,5 mM. Les concentrations de coenzyme A ajoutées sont indiquées dans les résultats. La réaction est démarrée par l'addition de l'extrait.

- Dosage de l'hydrogénase.

L'activité est mesurée spectrophotométriquement en suivant l'augmentation de l'absorbance à 550 nm causée par la réduction du benzylviologen. La réaction est effectuée dans des cuvettes anaérobies sous atmosphère d'hydrogène. Le mélange réactionnel contient : tampon Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM; benzylviologen, 1 mM. la réaction est démarrée par l'addition de l'extrait.

- Dosage de l'acétate kinase (Nakajima et al. 1978).

L'activité est mesurée spectrophotométriquement à 340 nm en couplant la formation d'ADP avec l'oxydation du NADH en présence de phosphoénolpyruvate sous l'action d'une pyruvate kinase et d'une L-lactate déshydrogénase. Le milieu réactionnel contient : tampon Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM; acétate de sodium, 10 mM; ATP, 5 mM; $MgCl_2$, 4mM; phosphoénolpyruvate, 4 mM; NADH, 0,4 mM; pyruvate kinase, 0,8 unité/ml; L-lactate déshydrogénase, 3 unités/ml. La réaction est démarrée par l'addition de l'extrait.

- Dosage de la phosphotransacétylase.

L'activité est mesurée spectrophotométriquement à 233 nm en suivant l'augmentation de l'absorbance causée par la formation d'acétyl-CoA à partir d'acétyl phosphate et de coenzyme A. Le mélange réactionnel contient : tampon Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM; acétyl phosphate, 3 mM; coenzyme A, 1 mM. La réaction est démarrée par l'addition de l'extrait.

c) Résultats et discussion

Toutes les activités enzymatiques impliquées dans la dégradation de l'éthanol en acétate et hydrogène ont pu être mises en évidence dans les extraits cellulaires de la souche RE (tableau XV). L'alcool déshydrogénase est NAD^+ dépendante. Par contre l'hydrogénase et l'acétaldéhyde déshydrogénase sont NAD^+ indépendante et leurs activités ont été déterminées avec des accepteurs d'électrons artificiels. La ferrédoxine est probablement, comme chez l'"organisme S", le cofacteur de ces deux enzymes. Aucun effet activateur du coenzyme A sur l'acétaldéhyde déshydrogénase n'a pu être détecté en déterminant son activité spectrophotométriquement avec le benzylviologen ou le DCPIP. Par contre, en mesurant par chromatographie en phase gazeuse la production

d'hydrogène à partir d'acétaldéhyde, on observe une augmentation de la quantité et de la vitesse de production d'hydrogène en fonction de la concentration initiale en coenzyme A (figure n°20). L'activité résiduelle obtenue en absence de coenzyme A explique que la dépendance de l'acétaldéhyde déshydrogénase n'ait pu être mise en évidence spectrophotométriquement. Cette activité résiduelle relativement élevée pourrait être due à la présence de faibles concentrations de coenzyme A apportées par l'extrait. Les fortes activités de l'acétate kinase et de la phosphotransacétylase détectées dans les extraits permettraient de plus une régénération du coenzyme A à partir d'acétyl-CoA.

Ces résultats démontrent que l'acétaldéhyde déshydrogénase est bien chez *P. carbinolicus* coenzyme A dépendante et que l'ATP est produit chez cette bactérie au niveau de l'acétate kinase.

Tableau XV. Activités enzymatiques présentes dans les extraits cellulaires de *Pelobacter carbinolicus* souche RE.

enzyme	activité ($\mu\text{mole} \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de protéine)
alcool deshydrogénase	0,81
acétaldéhyde deshydrogénase ¹	0,27
acétaldéhyde deshydrogénase ²	0,13
hydrogénase	1,17
phosphotransacétylase	5,26
acétate kinase	0,76

¹déterminée en mesurant la réduction du DCPIP

²déterminée en mesurant la production d'hydrogène



d'hydrogène à partir d'acétaldéhyde, on observe une augmentation de la quantité et de la vitesse de production d'hydrogène en fonction de la concentration initiale en coenzyme A (figure n°20). L'activité résiduelle obtenue en absence de coenzyme A explique que la dépendance de l'acétaldéhyde déshydrogénase n'ait pu être mise en évidence spectrophotométriquement. Cette activité résiduelle relativement élevée pourrait être due à la présence de faibles concentrations de coenzyme A apportées par l'extrait. Les fortes activités de l'acétate kinase et de la phosphotransacétylase détectées dans les extraits permettraient de plus une régénération du coenzyme A à partir d'acétyl-CoA.

Ces résultats démontrent que l'acétaldéhyde déshydrogénase est bien chez *P. carbinolicus* coenzyme A dépendante et que l'ATP est produit chez cette bactérie au niveau de l'acétate kinase.

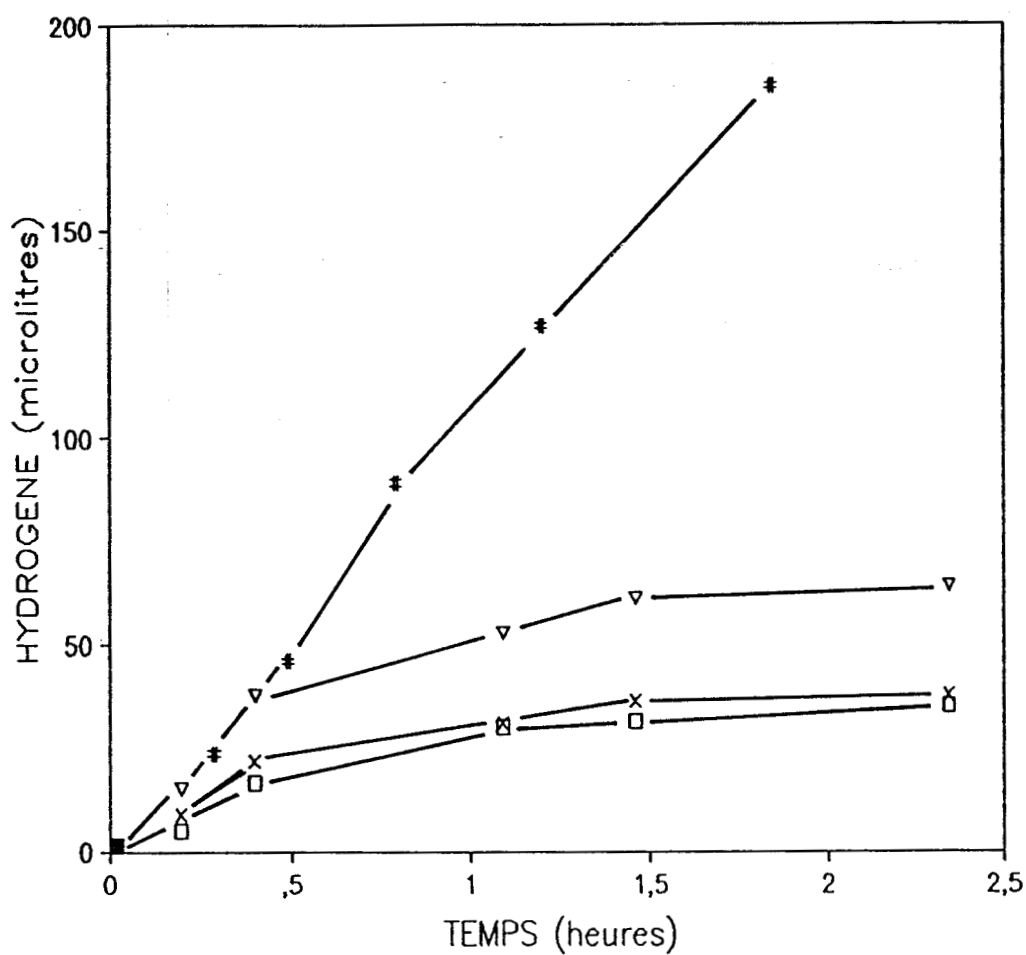


Figure n° 20. Influence de la concentration en Coenzyme A sur la production d'hydrogène à partir d'acétaldéhyde en présence de méthylviologen et d'extrait cellulaires (0,58 mg de protéine) de *Felobacter carbinolicus* souche RE. Concentration en Coenzyme A: (□) 0 mM; (×) 0,5 mM; (▽) 1 mM; (*) 2 mM.

XI. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE BACTERIES ACETOGENES DEGRADANT LES ACIDES GRAS A PLUS DE 4 CARBONES

A partir des dernières dilutions des numérations dégradant le butyrate, nous avons isolé en coculture avec *Methanospirillum hungatei* une souche dégradant cet acide en acétate et hydrogène. Cette souche était morphologiquement et physiologiquement très proche de *Syntrophomonas wolfei* et nous n'avons pas, pour cette raison, poursuivi sa caractérisation. Ce résultat indique que la flore dominante responsable de la dégradation du butyrate est constituée dans les fermenteurs de méthanisation de bactéries similaires à *S. wolfei*.

Dans le cadre de sa thèse de docteur ingénieur, F. Roy (1985) a étudié la digestion anaérobie d'effluents industriels de nature lipidique et principalement constitués de di- et de triglycérides. Dans les écosystèmes anaérobies, ces composés sont hydrolysés rapidement par des bactéries lipolytiques en glycérol et en acides gras à longues chaînes (AGLC). Nous nous sommes donc intéressés avec F. Roy à la dégradation anaérobie des acides gras à longues chaînes qui constitue l'étape limitante de la méthanisation de ce type d'effluents.

Les acides gras à plus de 10 atomes de carbones sont cependant très inhibiteurs pour les bactéries et nous avons tout d'abord cherché à limiter leur toxicité en les précipitant sous forme de sels de calcium. Nous avons pu ainsi obtenir, en réalisant des enrichissements sur oléate et stéarate, deux cultures dégradant les acides gras à longues chaînes en acétate et méthane et nous présentons en premier lieu l'étude de l'influence de la concentration en calcium sur la croissance de ces deux cultures.

A la suite de ce travail, nous avons isolé, à partir de l'enrichissement sur oléate, une bactérie dégradant en coculture avec *Methanospirillum hungatei* ou avec *Desulfovibrio* (souche G11) l'oléate et tous les acides gras linéaires ayant entre 4 et 18 atomes de carbone. Nous présentons dans la deuxième partie de ce chapitre la caractérisation de cette bactérie que nous avons décrite comme une nouvelle espèce de *Syntrophomonas*, *S. sapovorans*.

Influence of Calcium Addition on Growth of Highly Purified Syntrophic Cultures Degrading Long-Chain Fatty Acids

FRANCIS ROY,¹* GUY ALBAGNAC,² AND ERIC SAMAIN²

Anjou Recherche, Chemin de la Digue, 78600 Maisons Laffitte,¹ and Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Technologie Alimentaire 369, Rue Jules Guesde, 59650 Villeneuve D'Ascq,² France

Received 17 October 1984/Accepted 19 December 1984

Two highly purified syntrophic associations resulting in acetogenesis from stearate (SM) and oleate (OM) were obtained from the sludges of a sewage digester. In both cases, *Methanospirillum hungatei* together with short, motile, gram-negative, nonfluorescent rods morphologically similar to *Syntrophomonas wolfei* were identified by microscopic examination. Besides growing on volatile fatty acids (butyrate through caproate), both cultures grew on oleate (C_{18:1}) and numerous even-numbered, saturated long-chain fatty acids (LCFA [decanoate through stearate]). In addition, during growth on LCFA, supplementation of the culture media with calcium chloride was an absolute requirement. The sole difference between the associations was observed when SM and OM cultures were transferred from a stearate to an oleate medium. The SM culture needed 10 days before starting to degrade oleate, whereas the OM culture grew immediately, but the OM culture also grew immediately when transferred to stearate medium. Saturated LCFA degradation occurred in the presence of equinormal amounts of calcium (fatty acid/Ca ratio, 2). On the other hand, OM degradation only took place in the presence of an equimolar amount of calcium (fatty acid/Ca ratio, 1). These observations are discussed by considering the solubility constants of LCFA as calcium salts and the toxicity of the free acids against microorganisms.

In methanogenic environments, long-chain fatty acids (LCFA) can be completely degraded to methane and carbon dioxide (6, 9, 12, 25). However, these compounds exhibit acute toxicity against anaerobes when their concentrations exceed a few millimoles per liter, so on a technological level, methanogenesis from LCFA is only possible in continuously fed digestors (17) in which the dilution rate is kept sufficiently low to allow the complete degradation of these compounds. The toxicity of LCFA against pure or mixed cultures appears more pronounced as the compounds become longer and more unsaturated (2, 3, 16). In addition, the sensitivity of bacteria is related to their cell wall structure, with gram-positive species and methanogens being more easily inhibited than gram-negative organisms (8, 20, 23). Fortunately, the addition of calcium reverses the inhibition of bacterial growth in batch cultures, mainly by forming insoluble salts and increasing interfacial tension (4-6).

In sewage digestors, LCFA degradation first proceeds via a β -oxidation mechanism (12, 25) leading to acetate with reductive methane. Modern concepts of anaerobic microbiology indicate that this acetogenesis is carried out by syntrophic associations of obligate hydrogen-producing bacteria and hydrogenophilic methanogens (14). In such low-sulfate media, several syntrophic associations between *Desulfovibrio* sp. and methanogens can result in an acetogenic fermentation of lactate and ethanol. However, there is no report of a syntrophic association involving a hydrogen scavenger and one of the LCFA-degrading sulfate reducers isolated so far (18), i.e., *Desulfonema magnum*, *Desulfonema limicola*, and *Desulfosarcina variabilis*. Until recently, *Syntrophomonas wolfei* (13) was the sole pure obligate hydrogen-producing bacteria that was known to oxidize fatty acids, but two other bacteria have been isolated (22),

one of them morphologically similar to *S. wolfei* and the other spore forming. However, their activities are restricted to short, saturated substrates (butyrate through caproate or octanoate).

We report in this paper the establishment of highly purified syntrophic associations degrading LCFA to acetate and reductive methane. The positive effect of calcium salt additions upon LCFA oxidation in batch cultures was demonstrated.

MATERIALS AND METHODS

Sources of microorganisms. *Methanospirillum hungatei* (DSM 864) and *S. wolfei* Göttingen strain (DSM 2245B) were obtained from the German Culture Collection.

Media and conditions for growth. The anaerobic technique of Hungate as modified by Miller and Wolin (15) was used for enrichments and routine subcultures. The basal medium containing minerals and vitamins (21, 24) was buffered with PIPES [piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)] (50 mM) and was further supplemented with yeast extract (0.3 g/liter) and rumen fluid (5%, vol/vol). Sterile stock solutions (10%, vol/vol) of fatty acid sodium salts were added aseptically to the autoclaved medium, and the subsequent addition of calcium chloride resulted in the formation of a heavy and fluffy precipitate, unless precise equimolar amounts (15 mM) of calcium and LCFA were used. Incubations were run at 35°C and pH 7.1 under an N₂/CO₂ (85:15) gas phase.

Enrichments were established by 10 successive transfers (5%, vol/vol) at 2-week intervals.

Dilution shake cultures were incubated in glass tubes (9 by 160 mm), in the presence of 0.6% agar. The media were inoculated inside an anaerobic glove box (FORMA 1020) with the simultaneous addition of an active, growing culture of *M. hungatei* (10%, vol/vol).

Analytical methods. Growth was estimated by monitoring acetate and methane production. Gas and volatile fatty acids

* Corresponding author.

† Present address: Institut de la Recherche Agronomique Station de Technologie Alimentaire, Villeneuve D'Ascq, France.

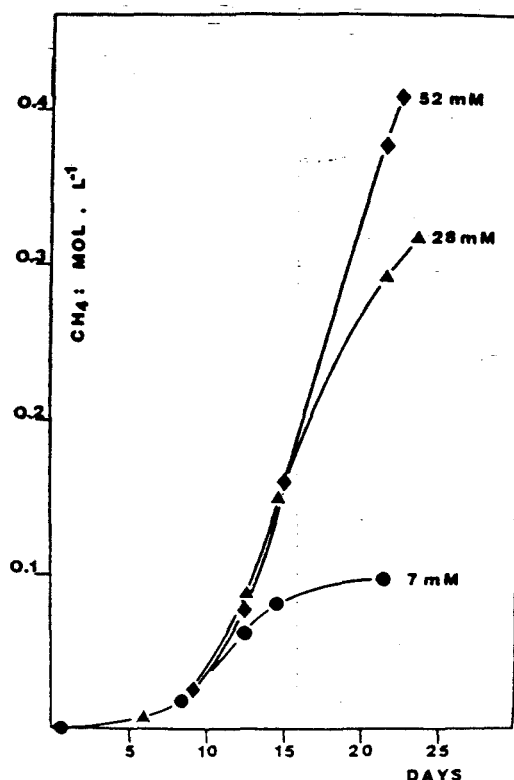


FIG. 1. Methane production from stearate by an enrichment culture in the presence of equimolar amounts of calcium. Control values were subtracted.

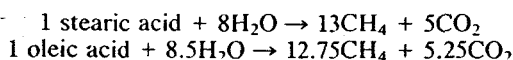
were determined by gas chromatography as previously described (24).

LCFA butyl esters were separated and quantified by using a stainless-steel column (1.8 m by 2 mm) packed with 28% diethylene glycol succinate on silanized Chromosorb W-AW (80-100 mesh).

Calcium was determined by atomic absorption on a PYE-UNICAM SP9 spectrophotometer, and *O*-phosphate was determined by the ascorbic acid method. Carbonates were assayed on an Oceanography International infrared carbon analyzer.

RESULTS

Establishment of highly purified acetogenic cultures degrading stearate and oleate. Two anaerobic media, one with stearate (10 mM) and one with oleate (10 mM) as main carbon and energy sources, were inoculated with sludges from a sewage digester in Marquette-Lez-Lille, France. In batch cultures, fatty acid degradation never occurred in the absence of calcium. Equimolar additions of calcium chloride allowed good growth even when stearate and oleate concentrations up to 50 mM were reached (Fig. 1). Methane and carbon dioxide were the only end products evidenced, but a transient accumulation of acetate was sometimes observed. Experimental values were close to those of theoretical stoichiometries:

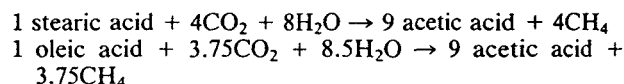


Microscopic examination of wet mounts revealed the presence of acetoclastic methanogens morphologically similar to *Methanosarcina mazei* (24) in the stearate enrichment culture. On the other hand, *Methanothrix*-like filamentous

organisms were observed to be the prevailing methanogens in the oleate culture. After 10 successive transfers, both enrichment cultures were diluted based on the most-probable-number technique and incubated in the presence of *M. hungatei*. After 2 months, the highest dilutions permitting significant growth were 10^9 and 10^7 , from the stearate and the oleate enrichment cultures, respectively. Control cultures minus LCFA did not show growth at these dilutions.

In the last tube showing positive degradation of stearate, no acetoclastic methanogens were observed. The prevailing organisms were *M. hungatei*, identified by its morphology and its autofluorescence under epi-illumination, and short, curved, motile, gram-negative, nonfluorescent rods. This culture, named SM, degraded stearate to acetate and reductive methane and was used for further studies. Similar morphologies were also observed by Lorowitz and Bryant (personal communication) in enrichment cultures degrading stearate. On the other hand, filamentous methanogens were still present in the tube corresponding to the 10^7 dilution of the oleate enrichment culture. This culture was further purified by the dilution agar shake culture technique. Incubation was performed for 6 weeks in the presence of *M. hungatei*. Clearing zones with diffuse centers were observed up to the 10^7 dilution. Careful examination showed that this center was made of numerous tiny, round colonies. One of these colonies, which degraded oleate to acetate and methane, was transferred in liquid medium inside the anaerobic glove box (OM culture). Besides *M. hungatei*, the OM culture also contained short, curved rods very close in morphology to those observed in the SM culture.

These cultures, OM and SM, did not contain acetophilic methanogens and degraded oleate and stearate by the following stoichiometries:



Growth properties of SM and OM cultures. Optimal conditions for growth of these two highly purified cultures were a pH of 7.1 and a temperature of 35 to 40°C. Both cultures degraded the following compounds without any lag: butyrate, valerate, caproate, and even saturated fatty acids (decanoate through octadecanoate). No growth was observed on glucose, acetate, propionate, heptanoate, octanoate, and triglycerides. Cultivation on valerate resulted in the accumulation of acetate and propionate in the medium. When transferred from saturated fatty acids to oleate medium, SM and OM cultures exhibited quite different behaviors. The latter grew immediately on this unsaturated fatty acid; however, the SM culture degraded oleate after a 10-day lag. No hydrogen sulfide was observed when the medium was supplemented with sulfate (20 mM); furthermore, bromoethanesulfonic acid (1 mM) inhibited both methanogenesis and fatty acid degradation.

Effect of calcium on the growth of SM and OM cultures. As already observed for the first enrichment and purification steps, no growth of SM and OM cultures on 15 mM LCFA concentrations occurred unless the medium was supplemented with calcium chloride. Saturated fatty acids with even numbers of carbons from decanoate to stearate were degraded when the ratio of fatty acid (millimoles added) to calcium (millimoles added) (FA/Ca) was maintained at less than 2. With these substrates, LCFA toxicity could be reversed by equinormal addition of calcium, and a shorter doubling time (Table 1) was observed on dodecanoate (lauric acid). No calcium requirement was evidenced during growth

TABLE 1. Doubling time of the OM culture growing on various fatty acids^a

Substrate ^b	Calcium concn (mM) added	Doubling time (h)
Butyric acid (C ₄)	0	27
Lauric acid (C ₁₂)	15	30
Myristic acid (C ₁₄)	15	30
Oleic acid (C _{18:1})	15	40
Stearic acid (C ₁₈)	15	45

^a Growth was estimated on the logarithmic sequence of CH₄ production.^b Concentration, 4 g of substrate per liter.

on short-chain fatty acids ranging from butyrate to caproate. This was checked by two successive transfers to avoid a possible contamination by residual LCFA or calcium present in the initial culture. Surprisingly, acetogenesis from oleate (Fig. 2) required at least an equimolar addition of calcium (FA/Ca, 1). Chemical analyses of stearate and oleate precipitates were undertaken to check a possible concurrent precipitation of calcium inorganic salts. Both precipitates were composed mainly of the fatty acids associated with calcium and phosphate; only trace amounts of carbonate were evidenced. Typical contents per 100 mg (dry weight) were as follows: 93 mg of stearate, 6 mg of Ca, and 1 mg of PO₄ (FA/Ca, 2); and 88 mg of oleate, 10 mg of Ca, and 2 mg of PO₄ (FA/Ca, 1). Despite quite different FA/Ca ratios, chemical analyses indicated only minor differences between the precipitates. Consequently, the concentrations of soluble calcium in the stearate and oleate media were 0.1 mM (FA/Ca, 2) and 3 mM (FA/Ca, 1), respectively, and in all cases more than 50% of the total phosphate ions remained in the culture supernatant. Concentrations of residual LCFA in the culture supernatant were smaller than the detection threshold of the gas-chromatographic technique.

DISCUSSION

Without calcium chloride addition, the high toxicity of LCFA with more than seven carbon atoms resulted in a

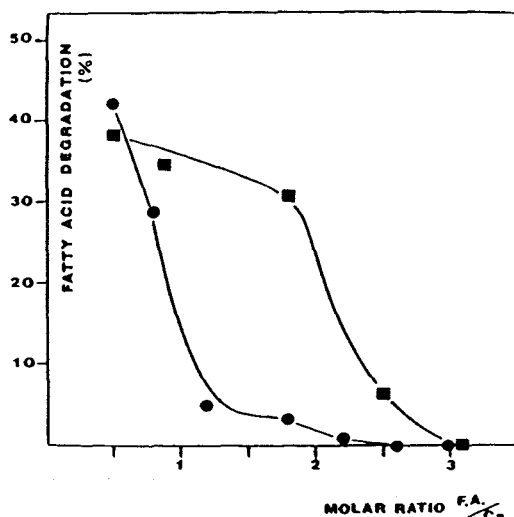


FIG. 2. Degradation of 10 mmol of oleate (●) and stearate (■) per liter by the OM consortium for various FA/Ca molar ratios. The extent of LCFA degradation was calculated from acetate and reductive methane productions after 9 days of incubation. Control values were subtracted. Percents degradation were calculated from acetate production based on the stoichiometries indicated in the text.

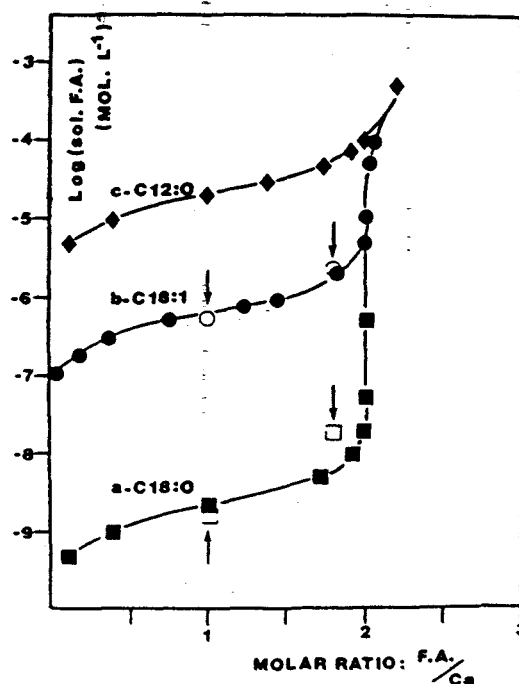


FIG. 3. Theoretical LCFA concentration in the culture supernatant (sol. F.A.) as a function of the molar ratio of total LCFA to calcium (FA/Ca), the total LCFA concentration being 15 mM. Values were calculated by the following equation:

$$FA/Ca = 2 / \left(1 + \frac{2 K_{sp} - SFA^3}{SFA^2 \times FA} \right)$$

where K_{sp} is the solubility product constant of the fatty acid calcium salts and SFA is the LCFA concentration in the culture supernatant. Arrows indicate actual values calculated from experimental determination of calcium in the supernatant.

complete inhibition of the growth of SM and OM cultures. After calcium addition, chemical analyses indicated very low precipitation of phosphate and carbonate; on a dry-weight basis, more than 95% of the precipitates were fatty acid calcium salt. Thus, calcium effect can be discussed by considering the solubility product constant (K_{sp}) of LCFA calcium salts. The theoretical concentrations of LCFA remaining in solution as a function of the FA/Ca ratio (Fig. 3) were calculated from the K_{sp} values reported in the literature (11). Actual concentrations were calculated from the results of calcium determination in the culture supernatant (plotted on Fig. 3). Stearate in the supernatant lies between 10^{-4} and 10^{-8} mol/liter for FA/Ca ratios ranging from 2.04 to 1.92 (Fig. 3a). Since experimentally no inhibition was evidenced with FA/Ca ratios lower than 2 and total inhibition was observed with FA/Ca ratios slightly higher than 2, even a careful adjustment of this ratio does not allow an experimental determination of an inhibition threshold. In the presence of stoichiometric amounts of calcium (FA/Ca, 2), the actual oleate and tetradecanoate concentrations in the supernatant were almost identical (2.3 μ M) and 130 times higher than the soluble stearate concentration (18 nM). Under such experimental conditions, inhibition of bacterial growth was observed only with oleate. This observation confirmed the results of previous works (3, 16, 17, 20) reporting a higher toxicity of unsaturated LCFA. In our experimental conditions (substrate, 15 mM), the soluble oleate concentration has to be maintained below 0.7 μ M by at least an equimolar addition of calcium salt.

Stability of morphology and immediate degradation of various saturated fatty acids indicate that SM and OM cultures have quite a wide range of substrates for growth. However, they appear dependent on lipolytic bacteria (10) such as *Anaerovibrio lipolytica* (7) for the splitting of acylglycerol. The acetate-to-methane ratios obtained after degradation of even numbered fatty acids are in good agreement with the stoichiometric balance of the β -oxidation mechanism. This is confirmed by the formation of propionate and acetate from valerate. From the present results, it is clear that the two purified cultures are syntrophic associations of LCFA-degrading acetogens together with *M. hungatei*. The stearate and the oleate organisms look very similar to *S. wolfei* (13), but they can be easily distinguished from this obligate hydrogen-producing bacteria, which is unable to perform acetogenesis from LCFA even in the presence of equimolar amounts of calcium (data not shown). Up to now only a minor difference was evidenced between SM and OM cultures when stearate-grown cells were transferred to oleate. Finally, further purification and characterization of the two organisms are being achieved to describe their taxonomic position and their physiological properties.

LITERATURE CITED

- Boone, D. R., and M. P. Bryant. 1980. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 626-632.
- Canas Rodriguez, A., and H. W. Smith. 1966. The identification of the antimicrobial factors of the stomach contents of sucking rabbits. *Biochem. J.* 100:79-82.
- Demeyer, D. I., and H. K. Henderickx. 1967. The effect of C_{18} unsaturated fatty acids on methane production in vitro by mixed rumen bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 137:484-497.
- El Hag, G. A., and T. B. Miller. 1972. Evaluation of whisky distillery by products. VI. The reduction of digestibility of malt distillers grains by fatty acids and the interaction with calcium and other reversal agents. *J. Sci. Food Agric.* 23:247-258.
- Galbraith, H., T. B. Miller, A. M. Paton, and J. K. Thompson. 1971. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergo calciferol and cholesterol. *J. Appl. Bacteriol.* 34:803-813.
- Hanaki, K., T. Matsuo, and M. Nagase. 1981. Mechanism of inhibition caused by long chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnol. Bioeng.* 23:1591-1610.
- Henderson, C. 1971. A study of the lipase produced by *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 65:81-89.
- Henderson, C. 1973. The effects of fatty acids on pure culture of rumen bacteria. *J. Agric. Sci.* 81:107-112.
- Heukelekian, H., and P. Mueller. 1958. Transformation of some lipids in anaerobic sludge digestion. *Sewage Ind. Wastes* 30: 1108-1120.
- Hobson, P. N., and S. O. Mann. 1961. The isolation of glycerol fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.* 25:227-240.
- Irani, R. R., and E. F. Callis. 1960. Metal complexing by phosphorus compound solubilities of calcium soap of linear carboxylic acids. *J. Phys. Chem.* 64:1741-1743.
- Jeris, J. S., and P. L. McCarty. 1965. The biochemistry of methane fermentation using ^{14}C tracers. *J. Water Pollut. Control Fed.* 27:178-192.
- McInerney, M. J., M. P. Bryant, R. B. Hespell, and J. W. Costerton. 1981. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic syntrophic fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:1029-1039.
- McInerney, M. J., M. P. Bryant, and N. Pfennig. 1979. Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch. Microbiol.* 122:129-135.
- Miller, T. L., and M. J. Wolin. 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* 27:985-987.
- Nieman, C. 1954. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 18:147-163.
- Novak, J. T., and D. A. Carlson. 1970. The kinetics of anaerobic long chain fatty acid degradation. *J. Water Pollut. Control Fed.* 42:1932-1943.
- Pfennig, N., F. Widdel, and H. G. Trupper. 1981. The dissimilatory sulfate reducing bacteria, p. 926-940. In M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trupper, A. T. Balous, and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes—1981*. Springer-Verlag KG, Berlin.
- Polan, C. E., J. J. McNeill, and S. B. Tove. 1964. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 88:1056-1064.
- Prins, R. A., C. J. Van Nevel, and D. J. Demeyer. 1972. Pure culture studies of inhibitors for methanogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 38:281-287.
- Samain, E., G. Albagnac, H. C. Dubourguier, and J. P. Touzel. 1982. Characterization of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor dependent association with a gram negative homoacetogen. *FEMS Lett.* 15:69-74.
- Shelton, D. R., and J. M. Tiedje. 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:840-848.
- Sheu, C. W., and E. Freese. 1972. Effects of fatty acids on growth and envelope proteins of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 111:516-524.
- Touzel, J. P., and G. Albagnac. 1983. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC₃. *FEMS Lett.* 16:241-245.
- Weng, C. N., and J. S. Jeris. 1976. Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Water Res.* 10:9-18.

Syntrophomonas sapovorans sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids

Francis Roy, Eric Samain, Henri Charles Dubourguier, and Guy Albagnac

Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Technologie Alimentaire, 369, Rue Jules Guesde,
F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

Abstract. An anaerobic obligately syntrophic fatty acid degrading acetogenic bacterium (Strain OM) was isolated on calcium laurate medium from an oleate enrichment. This organism is a short slightly curved Gram-negative rod which can only use protons as electron acceptor. It ferments all linear saturated fatty acids with 4 to 18 carbon atoms in co-culture with a hydrogen-utilizing partner. Some mono- and di-unsaturated long chain fatty acids (oleate, elaidate and linolenate) are also oxidized. Calcium is required for batch cultivation of the syntrophic association on fatty acids with a chain length longer than 8 carbon atoms. In spite of some important morphological and nutritional analogies with *Syntrophomonas wolfei*, the strain OM must be considered as a different species mainly because of its broader substrate range. The description of strain OM as type strain of a new species, *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., is proposed.

Key words: *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov. — Fatty acid degradation — Interspecies hydrogen transfer — Syntrophic association — Methanogenesis

In methanogenic environments, long chain fatty acids (LCFA) are completely degraded to methane and carbon dioxide (Heukelekian and Mueller 1958). Studies with labelled compounds have shown that methanogenic fermentation of LCFA by anaerobic sludge proceeds via a β -oxidation mechanism leading to acetate and methane formed by reduction of CO_2 by the hydrogen co-product (Jeris and McCarty 1965; Weng and Jeris 1976). Two obligate proton-reducing acetogenic species performing a β -oxidation of fatty acid have been described: *Syntrophomonas wolfei* (McInerney et al. 1981) and *Clostridium bryantii* (Stieb and Schink 1985). In addition a thermophilic strain (Henson and Smith 1985) and two bacteria isolated from a methanogenic consortium degrading 3-chlorobenzoate (Shelton and Tiedje 1984) have recently been characterized. However, none of these organisms ferments LCFA containing more than 11 carbon atoms. Although several sulfate reducers are able to degrade LCFA up to 18 carbon atoms (Pfennig et al. 1981), there is no evidence for interspecies hydrogen transfer between one of these sulfate reducers and a methanogen (Widdel 1980).

Recently, using calcium to prevent the acute toxicity of LCFA, we obtained a highly purified culture degrading

oleate to acetate and methane (Roy et al. 1985). This culture was a syntrophic association of *Methanospirillum hungatei* together with an obligately proton reducing acetogenic bacterium. We now report the isolation and the characterization of the latter organism.

Material and Methods

Sources of microorganisms

Methanospirillum hungatei strain JF-1 (DSM no 864) was obtained from the German Culture Collection. *Desulfovibrio vulgaris*, Madison strain, was a gift of J. G. Zeikus.

Media and condition of cultivation

The anaerobic techniques of Hungate as modified by Miller and Wolin (1974) were used for preparation of media and cultures of organisms. The basal medium contained minerals, B-vitamins, yeast extract (0.3 g/l) and rumen fluid (5% v/v) as previously described (Roy et al., 1985). It was buffered with 50 mM Pipes- KHCO_3 (1,4-piperazine bis (ethane-sulfonate)-carbonate buffer) pH 7.1 under a $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (85:15) gas phase and reduced by cysteine-HCl (0.25 g/l) and $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0.25 g/l). Substrates and calcium chloride were added aseptically to the autoclaved media from anaerobic stock solutions. Unless otherwise precised equimolar amounts of calcium and LCFA were used and all incubations were run at 35°C. Isolations were performed by repeated application of the dilution shake culture technique using the basal medium supplemented with agar (6 g/l), sodium laurate (15 mM) and calcium chloride (15 mM). The isolation media were inoculated simultaneously with the dilutions and an actively growing culture of *M. hungatei* or *D. vulgaris* (10% v/v). When the sulfate reducer was used as the hydrogen scavenger the medium was supplemented with 20 mM Na_2SO_4 .

Culture purity was checked by microscopic examination and by inoculating a brain heart infusion medium supplemented either with glucose (5 g/l) or acetoin (5 g/l).

Enumerations were carried out by the three tubes most probable number method with the following substrates: $\text{H}_2:\text{CO}_2$, acetate, propionate, butyrate, oleate. The three last substrates were tested with and without sulfate.

Analytical techniques

Growth on volatile or long chain fatty acids was followed by measuring the increase of absorbance at 580 nm or by monitoring acetate and methane production. Methane,

Offprint requests to: E. Samain

Abbreviation. LCFA, long chain fatty acids

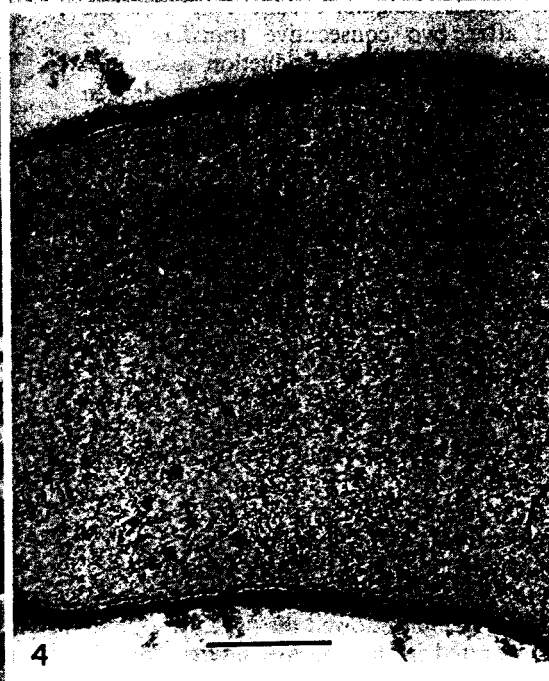


Fig. 1. Phase contrast photomicrograph of strain OM in association with *Methanospirillum hungatei* on butyrate medium. Bar equals 5 μ m

Fig. 2. Scanning electron micrograph of the OM-*M. hungatei* coculture on calcium laurate medium. Bar equals 1 μ m

Fig. 3. Electron micrograph of negatively stained cells of strain OM. Bar equals 1 μ m

Fig. 4. Electron micrograph of thin section of strain OM. Bar equals 0.2 μ m

carbon dioxide, VFA and butyl esters of LCFA were determined by gas chromatography as previously described (Roy et al. 1985). Dissolved CO_2 and bicarbonate were measured with an infrared analyser as previously described (Samain et al. 1982).

Electron microscopy

Negative staining was performed with phosphotungstic acid 1% v/v). Ultrathin section were stained with uranyl acetate

and lead citrate according to Reynolds (1963). Prior to scanning electron microscopy, samples were fixed using thiocarbonylhydrazide according to Costerton (1980).

Chemicals

All chemicals were reagent grade. Technical stearic acid (Ref. 800673) and pure stearic acid for biochemistry (Ref. 674) were obtained from Merck, Darmstadt, FRG.

Other LCFA were purchased from Merck, Janssen, Beerse, Belgium and Sigma, St. Louis, MO, USA.

Results

Isolation

Isolation of LCFA degrading anaerobes was attempted from the oleate degrading enrichment previously described (Roy et al. 1985). When using *Desulfovibrio vulgaris* as the hydrogen utilizing partner, clearing zones associated with black sulfide precipitate were observed up to the 10^{-7} dilution within 6 weeks. By repeating the dilution procedure using the center of a clearing zone as inoculum, a defined coculture of a LCFA degrader (strain OS) with *D. vulgaris* was obtained. The isolation was also performed using *Methanospirillum hungatei* as the hydrogen scavenger. In this case, the clearing zones were associated with development of gas split in the agar and were observed at the same level after 6 weeks of incubation. The isolation of a pure LCFA degrading strain (OM) in association with *M. hungatei* was achieved as above. The two defined cocultures used oleate and technical stearate without any lag and with similar growth rates (doubling time of 40–45 h). Addition of *D. vulgaris* to the OM-*M. hungatei* coculture on a sulfate medium resulted after two consecutive transfers in a complete disappearance of methane production associated with the development of *D. vulgaris* as the sole hydrogen utilizer. As both strains OM and OS appeared morphologically and physiologically identical, only the former was further characterized.

Up to now all attempts to purify the acetogen from the stearate degrading enrichment were unsuccessful. The cultures obtained after the purification procedure were always contaminated by an organism, probably *Pelobacter carbinolicus*, which was revealed during purity checking on acetoin.

Morphological and cellular characteristics

Cells of strain OM were short curved rods with slightly rounded tapered ends and had an average size of $0.5 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$ (Figs. 1 and 2). They were slightly motile and stained Gram-negative. Spores were never observed by microscopic examination and no growth occurred after a heat shock (10 min at 80°C) followed by a reinoculation of *M. hungatei*. Negative staining showed the presence of 2 to 4 flagella laterally inserted in the concave side of the cell (Fig. 3). Electron microscopy of ultrathin sections revealed a Gram-negative structure of the cell wall (Fig. 4).

Nutritional and growth properties

Optimal growth conditions were determined on butyrate medium. The maximum growth rate (0.025 h^{-1}) was at pH 7.3 at $35-37^\circ\text{C}$. The pH and temperature limits were 6.3–8.1 and $25-45^\circ\text{C}$, respectively. Amino acids and B vitamins were both required. In fact, a very weak growth was obtained on mineral medium only supplemented with B vitamins or with vitamin free casamino acids (DIFCO). In coculture with *M. hungatei* the doubling times of the strain OM were close to those previously reported for the oleate degrading enrichment (Roy et al. 1985). The strain OM was an obligate anaerobe although cultures could survive short exposure (30 min) to pure oxygen.

Table 1. Substrates used by the coculture OM-*Methanospirillum hungatei*

Substrate* (2 g/l)	No of C atom	Initial substrate concentration (mM)	Fermentation product (mM)		
			Acetate	Pro- pionate	CH ₄
Butyrate	4:0	22.7	39.7	0	10.7
Valerate	5:0	19.6	17.8	14.3	8.1
Caproate	6:0	17.2	46.7	0	18.9
Heptanoate	7:0	15.4	35.8	12.7	15.5
Caprylate	8:0	13.9	46.2	0	18.7
Caprate	10:0	11.6	62.2	0	25.6
Undecanoate	11:0	10.7	45.7	8.8	20.9
Laurate	12:0	10	62.5	0	25.0
Myristate	14:0	8.8	62.0	0	25.0
Pentadecanoate	15:0	8.2	31.2	3.9	9.1
Palmitate	16:0	7.8	54.2	0	22.0
Margarate	17:0	7.4	5.2	0	1.5
Stearate	18:0	7.0	6.8	0	1.3
Elaidate	18:1	7.1	55.2	0	21.9
Oleate	18:1	7.1	57.5	0	19.7
Linoleate	18:2	7.1	58.7	0	23.1

* Fatty acids longer than heptanoate were tested in presence of equimolar amount of CaCl_2 . Incubations were done at pH 7.2, 35°C for 1 month

Substrates not utilized: acetate, propionate, linolenate ($\text{C}_{18:3}$), nonadecanoate, arachidate ($\text{C}_{20:0}$), behenate ($\text{C}_{22:0}$), erucate ($\text{C}_{22:1}$), lignocerate ($\text{C}_{24:0}$) isobutyrate, β -hydroxybutyrate, crotonate, 2 methylbutyrate, isovalerate, isocaproate, isoheptanoate, isostearate, DL-12 hydroxystearate tributyrine, tripalmitine, glycerol, ethylene glycol, 2–3 butanediol, acetoin, lactate, pyruvate, fumarate, succinate, malate, glucose, fructose xylose, ethanol, propanol, butanol

Table 2. Influence of palmitate on stearate degradation by the coculture OM-*M. hungatei*

Substrate	Percentage of degradation	
	Palmitate	Stearate
Palmitate* (2 g/l)	86	—
Stearate* (2 g/l)	—	10
Stearate* (1 g/l) + palmitate* (1 g/l)	87	32
Technical stearate ^b (2 g/l)	86	76

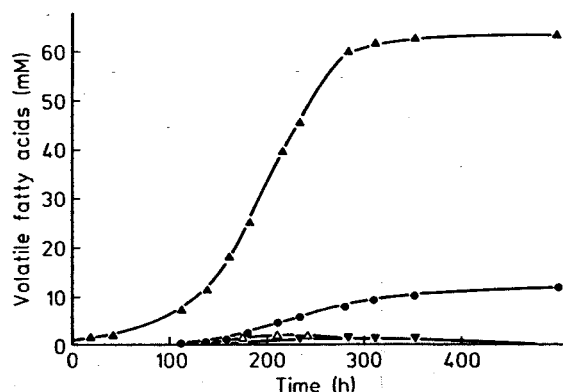
* 99% pure stearate and palmitate

^b Qualitative and quantitative analysis showed that technical stearate contained 50% of palmitate

The OM-*M. hungatei* coculture did not utilize any of the following electron acceptors: sulfate, sulfite, thiosulfate, nitrate, nitrite, fumarate and oxygen. The only substrates used were linear fatty acids longer than butyrate (Table 1). Long chain fatty acids with more than 18 carbon atoms were not used and even stearate (C_{18}) was only incompletely degraded within 4 weeks. However, cultivation of strain OM on a palmitate-stearate mixture resulted in a significant increase of the percentage of stearate degradation (Table 2). Among the unsaturated fatty acids tested, oleate (cis-9-octadecenoate), elaidate (trans-9-octadecenoate) and linoleate (cis-9-12-octadecadienoate) were fermented. On the contrary, linolenate (cis-9-12-15-octadecatrienoate) was not used.

Table 3. Stoichiometry of fermentation of oleate and undecanoate by the coculture OM-*M. hungatei*

Substrate	Substrate degraded μmol	CO_2 consumed μmol	Products μmol			Carbon recovery %	Hydrogen recovery %
			Acetate	Propionate	CH_4		
Oleate	100	323	859	0	328	96	87
Undecanoate	100	178	389	90.62	182	96	91

**Fig. 5.** Formation of volatile fatty acids during growth of the OM-*M. hungatei* coculture on undecanoate (16 mM): ▲ Acetate; ● Propionate; △ Butyrate; ▼ Valerate

Even numbered fatty acids were fermented to acetate and methane (Table 3) with a transient accumulation of butyrate and caproate. In addition, one mol of propionate was produced per mol of odd numbered fatty acids degraded (Tables 1 and 3). Batch cultures on undecanoate showed a transient formation of valerate, heptanoate and also of butyrate (Fig. 5).

Enumerations

A lab scale anaerobic contact digester treating wastewaters from a chitterling factory was operated for one year (Table 4). Assuming that hydrogenophilic methanogens were in sufficient numbers in the digester sludge, enumerations of obligate proton reducing acetogens were performed without any addition of a hydrogen scavenger. The prevalent hydrogenophilic methanogens (9×10^6 cells/ml) were fluorescent irregular cells similar to *Methanogenium*. Acetoclastic methanogens (2×10^5 cells/ml) were cells in packets releasing coccoid single cells like *Methanosarcina mazei* (Touzel et al. 1983; Mah 1980).

The number of fatty acid degrading organisms were similar on oleate (2×10^6) and butyrate (5×10^5 cells/ml). In the last positive dilution tubes, organisms were short curved rods similar to the strain OM and associated with the hydrogenophilic methanogen. No degradation of propionate nor significant growth with this substrate was observed in all the dilution tubes revealing less than 10^{-3} propionate users by ml of digester sludge.

Discussion

Ecology

The isolation and characterization of the strain OM extends the range of known syntrophic fermenting anaerobes to

Table 4. Treatment of wastewater from a chitterling factory by an anaerobic contact digester

Chemical composition of the wastewater	
Total organic matter	14 g/l
Chemical oxygen demand	31 g/l
Lipids	9.1 g/l
Calcium chloride (added)	10 mM
Operating conditions	
Volatile suspended solids	5.3 g/l
Temperature	35°C
Hydraulic retention time	9 days
Methane production	1.1 l/lxd
COD removal	95%

organisms oxidizing long chain fatty acids up to stearate. Furthermore, it is the first report on a syntrophic bacterium able to degrade unsaturated fatty acids. Results of enumeration evidenced that organisms similar to strain OM play a role in methanogenic digesters fed with significant amounts of lipids. However, as strain OM does not cleave the acylglycerol linkage, it depends on lipolytic bacteria such as *Anaerovibrio lipolytica* (Hobson and Mann 1961; Henderson 1971). The ability of our isolate to use either butyrate or oleate with similar growth rates suggests that the same organisms were enumerated with these two substrates. The wide range of fatty acids utilized by strain OM may also contribute to its maintenance in anaerobic ecosystems with low input of LCFA such as sewage sludge digesters or aquatic sediments.

In rumen, unsaturated fatty acids are partially or completely hydrogenated by several carbohydrate utilizing anaerobic species unable to catabolize the corresponding saturated acid (Harfoot 1978). In these species such as *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* or *Fusobacterium* sp., electrons involved in biohydrogenation have to be provided by carbohydrate catabolism. In anaerobic digesters, the significance of biohydrogenation prior to β -oxidation of LCFA remains an open question. Since the OM culture is able to use some mono- or di-unsaturated fatty acids, we can assume that the respective importance of biohydrogenation versus direct catabolism depends on the ratio of lipids to electron donors such as carbohydrates or proteins in the feed.

Metabolism

From the data presented here, it appears clearly that strain OM ferments fatty acids by a classical β oxidation mechanism as *Syntrophomonas wolfei* does (McInerney, personal communication). In the case of unsaturated fatty acids, two

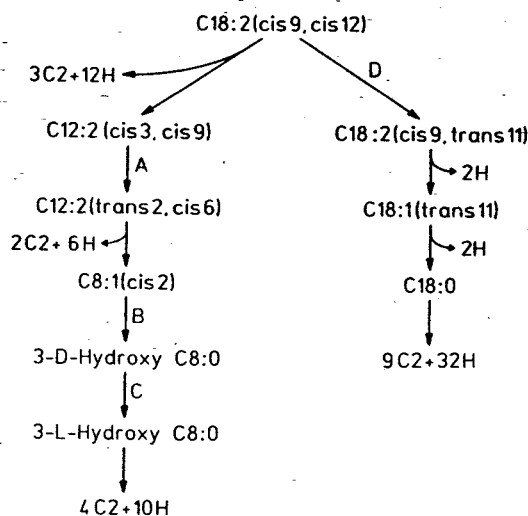


Fig. 6. The two possible pathways of linoleate β oxidation. Enzymes: A Δ^3 -cis- Δ^2 -trans enoyl CoA isomerase; B Δ^2 -cis enoyl CoA hydratase; C 3-hydroxyacyl CoA epimerase; D Δ^{12} -cis- Δ^{11} -trans isomerase

main hypothesis may be proposed (Fig. 6). First, a pathway involving a 3 -cis- 2 -trans enoyl CoA isomerase, a 2 -cis enoyl CoA hydratase and a 3 hydroxyacyl CoA epimerase is proposed as it was shown in mitochondria (White et al. 1968). In this hypothesis, the inability of our strain OM to catabolize linolenate may be explained only by its high toxicity for bacteria (Demeyer and Henderickx 1967). The second possibility involves a preliminary hydrogenation of the unsaturated fatty acids before degradation. In the case of linoleate, the only mechanism reported in anaerobes (Harfoot 1978) implies an isomerisation of this substrate to cis-9, trans-11-octadecadienoate. Kemp and Lander (1984) showed that the complete hydrogenation of linoleate to stearate by rumen organisms in vitro requires at least two bacteria with different enzymatic systems. Thus, in this second hypothesis, apart from the toxicity of triunsaturated fatty acid, the failure of strain OM to utilize this substrate may be explained by its inability to carry out a complete hydrogenation alone.

Lastly, the absence of degradation of arachidate (C 20), behenate (C 22) and lignocerate (C 24) and the low utilization of stearate may be related to the low solubility constant of their calcium salts (Irani and Callis 1960). The stimulation of stearate degradation by palmitate remains unclear. One can suggest a sequential utilization of these substrate, i.e. growth and cell production on palmitate and subsequent degradation of stearate by a "dense" population. However, other mechanisms such as inducibility of some enzymes can not be excluded.

Taxonomy

As Gram-negative non spore-forming rod, strain OM has to be affiliated with the family Bacteroidaceae (Holdeman et al. 1984). It is also very similar to *Syntrophomonas wolfei* in its morphology, in having laterally inserted flagella and in oxidizing short chain fatty acids from butyrate to caprylate with protons serving as sole electron acceptors. However it differs definitely from this species in utilizing a broader range of substrates, i.e. saturated and unsaturated

linear long chain fatty acids up to 18 carbon atoms. All attempts to cultivate *S. wolfei* on LCFA have been unsuccessful even in media supplemented with calcium (Roy et al. 1985). Moreover, in contrast to *S. wolfei* strain OM does not use isoheptanoate. Therefore, a new species *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov. is proposed. Consequently, the original description of the genus *Syntrophomonas* (McInerney et al. 1981) has to be emended to take into account the ability of this proposed new species to use fatty acids with a chain length longer than 8 carbon atoms.

Emended description of the genus *Syntrophomonas*

syn.tro.pho.mon'.as, Gr.adj.syn together with; Gr.n.trophos one who feeds; Gr.n.monas a unit, monad; M.L. fem.n. *Syntrophomonas*, monad which feeds together with (another species).

Non-sporing, Gram-negative, slightly helical or curved rods, 0.5 to 1.0 by 2.0 to 7.0 μ m with rounded ends. Most cells occur singly or in pairs. Multiplication by binary fission. Cells possess at least two flagella that are laterally inserted on the concave side of the cell. Under most conditions, cells exhibit only a sluggish twitching motility. Cells have a multilayered Gram-negative cell wall, are chemoorganotrophic and β -oxidize fatty acids anaerobically with protons serving as electron acceptors. Growth and degradation of fatty acids occur only in syntrophic association with H_2 -utilizing bacteria and are stimulated by B vitamins and amino-acids or rumen fluid. Carbohydrates, proteinaceous materials, alcohols or other organic compounds do not support growth. Common electron acceptors such as fumarate, malate, nitrate, oxygen, sulfate, sulfite, sulfur, thiosulfate are not utilized.

Isolated from anaerobic environments such as aquatic sediments, digester sludge and rumen digesta where organic matter is degraded with CO_2 and CH_4 as the major products.

The type strain of the genus is the Göttingen strain, *Syntrophomonas wolfei* DSM no 2245.

Description of *Syntrophomonas sapovorans*

sa.po'vo.rans.L.n.sapo soap; L.v.voro to devour; M.L.part.adj. sapovorans devouring soap (i.e. long chain fatty acids).

Cells possess two to four flagella. Linoleate, oleate, elaidate and saturated linear fatty acids up to 18 carbon atoms are β -oxidized. Even numbered fatty acids are degraded to propionate, acetate and H_2 . Linoleate, branched-chain and substituted fatty acids are not used. Both amino acids and B-vitamin mixture are required for growth. For degradation of fatty acids longer than 8 carbon atoms, calcium is required.

pH range: 6.3–8.1 with an optimum at 7.3.

Growth at 25–45°C with an optimum at 35°C.

The type strain is the INRA strain DSM 3441 in coculture with *M. hungatei* strain JF 1.

Acknowledgements. We thank Dr. Gérard Prensier for taking the electron micrographs (I.N.S.E.R.M. U 142 Villeneuve d'Ascq, France).

References

Costerton JW (1980) Some techniques involved in study of adsorption of microorganisms to surfaces. In: Bitton G, Marshall

- KC (eds) Adsorption of microorganisms to surfaces. Wiley-Interscience, New York Chichester Brisbane Toronto, pp 403–423
- Demeyer DI, Henderickx HK (1967) The effect of C:18 unsaturated fatty acids on methane production in vitro by mixed rumen bacteria. *Biochim Biophys Acta* 137:484–497
- Harfoot CG (1978) Lipid metabolism in the rumen. *Prog Lipid Res* 17:21–54
- Henderson C (1971) A study of the lipase produced by *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen bacterium. *J Gen Microbiol* 65:81–89
- Henson JM, Smith PH (1985) Isolation of a butyrate utilizing bacterium in coculture with *Methanobacterium thermoautotrophicum* from a thermophilic digester. *Appl Environ Microbiol* 49:1461–1466
- Heukelekian H, Mueller P (1958) Transformation of some lipids in anaerobic sludge digestion. *Sewage Wastes* 30:1108–1120
- Hobson PN, Mann SO (1961) The isolation of glycerol fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J Gen Microbiol* 25:227–240
- Holdeman LV, Kelley RW, Moore WEL (1984) *Bacteroidaceae*. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1. Williams and Wilkins, Baltimore London, pp 602
- Irani RR, Callis EF (1960) Metal complexing by phosphorus compound. II. Solubilities of calcium soap of linear carboxylic acid. *J Phys Chem* 64:1741–1743
- Jeris JS, McCarty PL (1965) The biochemistry of methane fermentation using C¹⁴ tracers. *J Water Poll Control Fed* 27:178–192
- Kemp P, Lander DJ (1984) Hydrogenation in vitro of linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J Gen Microbiol* 130:527–533
- Mah RA (1980) Isolation and characterization of *Methanococcus mazei*. *Curr Microbiol* 3:321–326
- McInerney MJ, Bryant MP, Hespell RB, Costerton JW (1981) *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 4:1029–1039
- Miller TL, Wolin MJ (1974) A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol* 27:985–987
- Pfennig N, Widdel F, Trüper HG (1981) The dissimilatory sulfate reducing bacteria. In Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) *The prokaryotes* vol 1, chapt 74. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 926–940
- Reynolds E (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208–212
- Roy F, Albagnac G, Samain E (1985) Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophic cultures degrading long-chain fatty acids. *Appl Environ Microbiol* 49:702–705
- Samain E, Albagnac G, Dubourguier HC, Touzel JP (1982) Characterization of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor dependent association with a gram-negative homoacetogen. *FEMS Microbiol Lett* 15:69–74
- Shelton DR, Tiedje JM (1984) Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3 chlorobenzoic acid. *Appl Environ Microbiol* 48:840–848
- Stieb M, Schink B (1985) Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. *Arch Microbiol* 140:387–390
- Touzel JP, Albagnac G (1984) Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiol Lett* 16:241–245
- Weng CN, Jeris JS (1976) Biochemical mechanisms in the fermentation of glutamic and oleic acids. *Water Res* 10:9–18
- White A, Handler P, Smith E (1968) *Principle of biochemistry*. McGraw Hill Book Company, New York St Louis San Francisco London Mexico Sydney Toronto, pp 495–496
- Widdel F (1980) Anaerobier Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfatreduzierender Bakterien. *Diss Univ Göttingen*

Received January 27, 1986/Accepted April 10, 1986

XII. CARACTERISATION MICROBIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DE DESULFOBULBUS ELONGATUS

Les numérations sur milieu sulfate ont montré que les bactéries sulfatoréductrices dégradant le propionate et le butyrate sont, dans les digesteurs, largement sous dominantes par rapport aux organismes syntrophes. Les faibles concentrations de sulfate détectées dans les effluents suffisent à expliquer leur présence dans les faibles dilutions et elles n'interviennent probablement pas en tant que bactéries O.H.P.A.. Ceci confirme les observations de Widdel (1980) qui a montré qu'aucune des souches sulfatoréductrices qu'il avait isolé sur différents acides gras ne pouvait être cultivée en absence de sulfate en association avec une méthanogène.

Les bactéries du genre *Desulfobulbus* dégradent le propionate en acétate et possèdent des activités hydrogénasiques puisqu'elles sont capables d'utiliser l'hydrogène comme seule source d'électrons. Afin de comprendre les raisons de l'absence de transfert d'hydrogène entre ce type de bactéries et les méthanogènes, nous avons étudié chez *Desulfobulbus elongatus* la régulation de l'activité hydrogénasique et les protéines de transfert d'électrons impliquées dans le métabolisme de l'hydrogène et du propionate.

D. elongatus a été purifié à partir d'un enrichissement méthanogène dégradant le propionate et nous présentons tout d'abord son isolement, sa caractérisation et sa description en tant que nouvelle espèce.

System. Appl. Microbiol. 5, 391-401 (1984)

Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Technologie Alimentaire
59650 Villeneuve d'Ascq, France

Isolation and Characterization of *Desulfobulbus elongatus* sp. nov. from a Mesophilic Industrial Digester

E. SAMAIN, H. C. DUBOURGUIER, and G. ALBAGNAC

Received April 24, 1984

Summary

From a methanogenic enrichment with propionate as sole carbon source, a new gram negative, propionate degrading sulfate reducer was isolated. The cells of this strain FP are motile rods sometimes slightly curved. The DNA base ratio is 59 mol% guanine plus cytosine. Like *Desulfobulbus propionicus* strain FP lacked desulfoviridin and its sulfite reductase was identified as desulforubidin. In the presence of sulfate, strain FP oxidises propionate, lactate, pyruvate, ethanol and propanol to acetate. Lactate and pyruvate are fermented to acetate and propionate in the absence of sulfate. Thus, strain FP is nutritionally related to the genus *Desulfobulbus*. According to its morphology and to whole cell protein patterns, a new species, *Desulfobulbus elongatus* is proposed.

Key words: *Desulfobulbus elongatus* – Propionate – Anaerobic degradation – Desulforubidin – Propionic fermentation – Sulfate reduction

Introduction

In the absence of light and inorganic electron acceptors such as nitrate or sulfate, propionate is degraded to acetate and methane by syntrophic association of obligate hydrogen producing bacteria like *Syntrophobacter wolinii* and hydrogenophilic methanogens (Boone and Bryant, 1980).

In the presence of sulfate, propionate supports the growth of various sulfate reducing bacteria which were classified in two groups by Pfennig et al. (1981). The first group includes genera able to oxidize completely propionate and other fatty acids to CO₂: *Desulfococcus* (*D. multivorans*), *Desulfonema* (*D. limicola* and *D. magnum*) and *Desulfosarcina* (*D. variabilis*). Bacteria belonging to the second group oxidize incompletely propionate to acetate and are included in a sole genus, namely *Desulfobulbus*, characterized by ellipsoidal cells and the lack of desulfoviridin.

We report in this paper the isolation and the characterization of a rod – shaped propionate degrading sulfate reducer, the strain FP belonging to the genus *Desulfobulbus*. According to its specific cellular characteristics, we propose a new species *Desulfobulbus elongatus*.

Material and Methods

Sources of microorganisms

Desulfobulbus propionicus Lindhorst (DSM 2032), *Desulfovibrio "baculatus"* Norway 4 (DSM 1741), *Methanospirillum hungatei* JF1 (DSM 864) and *Methanobrevibacter arboriphilicus* AZ (DSM 744) were purchased from the German collection. *Desulfovibrio* Madison strain was a gift of Professor J. G. Zeikus.

Media and culture conditions

The anaerobic technique of *Hungate* modified by *Miller* and *Wolin* (1974) was used throughout this study. Carbonate buffered basal medium (*Zeikus* and *Wolfe*, 1972) modified according to *Samain* et al. (1982) served for enrichments, enumeration and culture under low sulfate concentration. In the high sulfate basal medium, NH_4Cl was omitted and the final concentration of sulfate raised to 20 mM by adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.24 g/l) and Na_2SO_4 (1.5 g/l). Prior to autoclaving, cysteine-HCl (0.5 g/l) was added as the reducing agent. Substrates were aseptically added from sterile stock solutions and their final concentration was usually 20 mM. Routinely incubations were performed at 35 °C and pH 7.3. Isolation was achieved in anaerobic roll-tubes on the high sulfate medium solidified with 1.5% agar in the presence of 20 mM propionate. Individual colonies were purified and then transferred to the same liquid medium inside an anaerobic glove box (Forma Scientific model 1024).

Enumeration of methanogens and propionate oxidisers was carried out by the three tubes most probable number method with the following substrates: H_2/CO_2 , acetate, propionate, propionate plus sulfate.

Analytical methods

Growth was followed in anaerobic culture tubes (18 × 160 mm) by measuring the increase of turbidity at 550 nm. Volatile fatty acids were determined by gas chromatography. Sulfide concentration was monitored with a sulfide electrode (Orion model 9416).

DNA base content

The DNA was purified according to *Marmur* (1961). Thermal denaturation assays were performed in triplicate on a Uvikon 810 spectrophotometer. Melting points (T_m) were computed by the method of *Ferragut* and *Leclerc* (1976) and the mole % G + C was calculated according to the equation of *De Ley* (1970).

Characterisation of desulforubidin and cytochromes

Cells grown on lactate plus sulfate (13 g wet weight) were suspended in 13 ml Tris-HCl buffer 10 mM – pH 7.6. After disruption in a French pressure cell at 20000 psi, debris were removed by centrifugation (16000 g – 20 mn) and membrane fraction was recovered by further centrifugation at 140000 g for 1 hour. The clear supernatant (soluble fraction) was applied to a DEAE cellulose column (2 × 25 cm) equilibrated with the same buffer. Proteins were eluted with a linear concentration gradient up to 500 mM.

In the column eluate, desulforubidin was identified by its absorption spectrum and its sulfite reductase activity was checked manometrically (*Lee* et al., 1973a).

Cytochromes were characterised in the membrane fraction and in the DEAE-cellulose eluate by spectroscopy after reduction of the solution by a few crystals of sodium dithionite.

Enzyme assays

Hydrogenase activity was measured by the hydrogen evolution assay from reduced methyl viologen, as described by *Le Gall* et al. (1982) and modified as follows: temperature was 35 °C and 50 ml of cell suspension was added to a 5 ml mixture.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Wet cells (100 mg) were lysed (20 mn, 100 °C) in 1 ml of Tris buffer (3 M - pH 8.9) containing SDS (5% v/v), β mercaptoethanol (5% v/v) and glycerol (20% v/v). The separation gel was composed of a linear 7 to 15% polyacrylamide gradient, the slabs (15 $\times$ 15 cm) were electrophoresed at constant voltage at 200 V (12 V/cm) in Tris buffer (2 M, pH 8.9) containing glycine (0.25 M) and SDS (0.1% W/V). Gels were stained for 16 h with a 0.25% W/V solution of Coomassie brilliant Blue R in aqueous methanol (50/50).

Electron microscopy

Negative staining was performed with phosphotungstic acid (1% W/V). Prior to transmission electron microscopy ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963).

Results

Enrichment, isolation and enumeration

A methanogenic stable enrichment degrading propionate was established from a mesophilic contact anaerobic digester fed with vegetable canning waste waters. After seven transfers on propionate medium with low sulfate concentration (0.48 mM), bacterial clumps were fluffy and gave a clear supernatant. Phase contrast microscopy revealed a network of *Methanothrix*-like filamentous methanogens entrapping various rod-shaped bacteria. A strict anaerobe, strain FP, was isolated from the 10^{-5} dilution after 10 days of incubation. Attempts to isolate a propionate syntroph according to the lawn technique of Boone and Bryant (1980) were unsuccessful either in the presence of *Desulfovibrio* Madison strain, *Methanobrevibacter arboriphilicus* AZ or *Methanospirillum hungatei* JF1.

In the anaerobic sludge, 4×10^6 cells per ml degrading acetate into methane were counted after 12 weeks of incubation. The prevailing organisms in the last positive tubes were long filamentous non-fluorescent bacteria similar to *Methanothrix*. No clumps of *Methanosarcina*-like methanogens were observed. Enumeration of hydrogenophilic methanogens led to 4×10^7 cells per ml. The organisms were straight non - motile fluorescing rods similar to *Methanobacterium formicicum*. In low sulfate media, 2.3×10^6 cells performing acetogenesis with hydrogen production from propionate were counted. The fermentation products were only methane and carbon dioxide. *Methanothrix*-like filament, fluorescent straight rods and short non-motile rods were present. With sulfate, similar enumerations were obtained but 4×10^5 propionate utilizing sulfate reducers per ml were counted as evidenced by hydrogen sulfide production and the absence of methanogenesis. The sole fermentation product was acetate. In this sulfide positive tubes, prevailing organisms were motile rods similar to strain FP. No onion or lemon shaped bacteria were observed.

Morphology and cellular characteristics

On agar sulfate medium, colonies (1 to 2 mm) were black and lenticular. The isolated organism was a Gram-negative, motile straight or slightly curved rod with pointed ends. Cells (0.5–0.7 $\mu\text{m} \times$ 1.5–2.5 μm) appeared usually singly or in pairs (Fig. 1). Negatively stained samples showed a single polar flagellum and sometimes fimbriae. Transmission electron microscopy revealed an outer membrane (Fig. 2a).

Some cells showed polysaccharidic inclusions (Fig. 2b) that were confirmed by Thiery's staining (Thiery, 1967). Spores were never evidenced neither by phase contrast microscopy nor after heat shock (10 mn at 80 °C).



Fig. 1. Phase contrast photomicrograph of strain FP. Bar equals 5 μ m.



Thermal denaturation of DNA yielded a content of 59.0 ± 0.6 mol% G + C.

Desulfovibrin was never detected either by the *Postgate* test (Postgate, 1979) or by a characteristic absorption of crude extracts at 628 nm. Desulforubidin eluted from DEAE cellulose columns around a concentration of 250 mM and was further characterised by spectroscopy (absorption peaks at 392, 544 and 580 nm) (Fig. 3) and sulfite reductase assays. We also found this protein in extracts of *Desulfovibrio propionicus* Lindhorst. In addition, three fractions eluting respectively near 10, 110, 180 mM contained c-type cytochromes exhibiting characteristic absorption maxima at 418, 522 and 551 nm after dithionite reduction of the solution, whereas the membrane fraction contained mainly b-type cytochromes (absorption peaks at 420, 525, 557 nm).

Polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins

The patterns of the protein bands from lactate + sulfate grown cells clearly differentiated *Desulfovibrio* Norway 4 (Fig. 4, lane a) from the other species. Strain FP and *D. propionicus* Lindhorst gave similar overall protein patterns but the former lacked five protein bands at 20, 46, 100, 110 and 170 kilodaltons (Fig. 3, lane c). In addition, *D. propionicus* extracts contained four specific proteins with molecular weights ranging between 36,000 and 40,000 daltons (Fig. 4, lane d). Cultivation of strain FP on propionate plus sulfate resulted in the lack of three major protein bands with molecular weights of 48, 54 and 68 kilodaltons (Fig. 4, lane b).

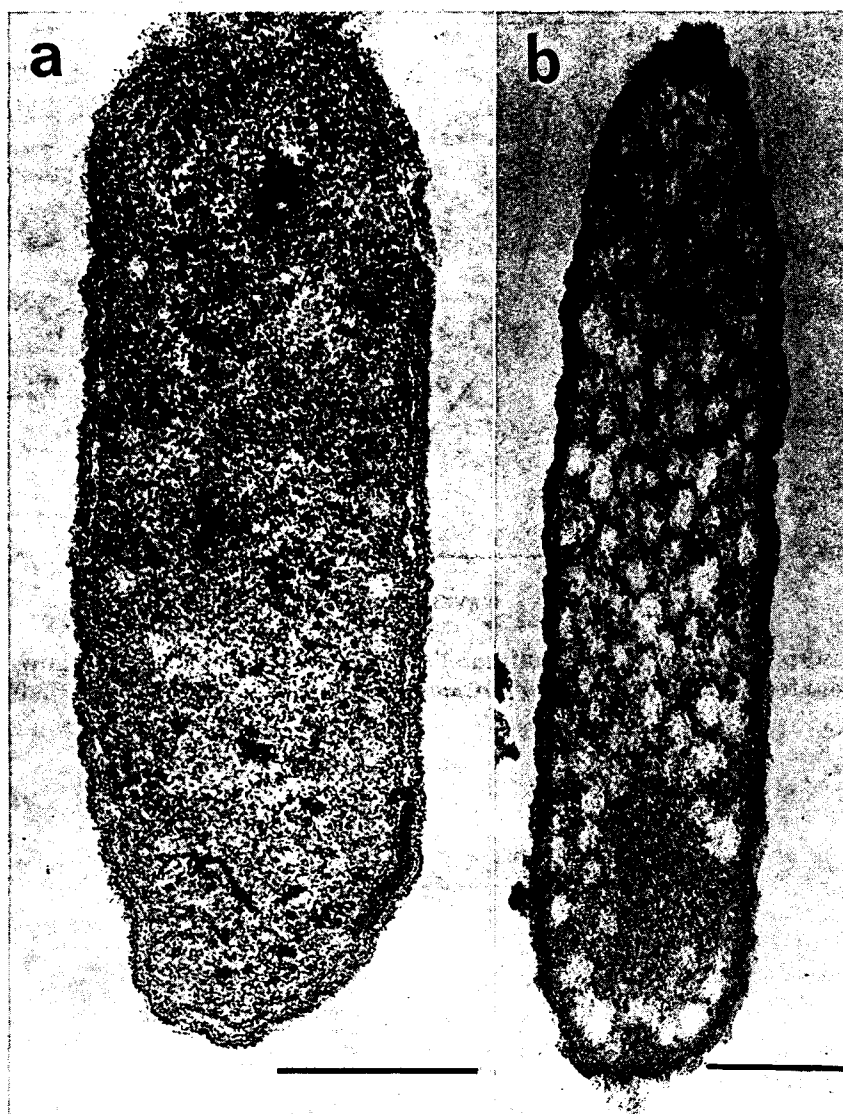


Fig. 2 a-b. Electron micrographs of thin sections of strain FP.

Bar equals 0.3 μm .

Note, a the multilayered cell wall, b the polysaccharidic inclusions.



Growth conditions

The pH range of growth of strain FP was 6.0 to 7.8 with an optimum at pH 7.0. Growth occurred between 20 °C and 40 °C but not at 45 °C. The optimum temperature was 35 °C. Ammonium salts were used as sole nitrogen source. Yeast extract, rumen fluid or casaminoacid did not improve the growth rate. Among the 10 vitamins present in the basal medium, only p-aminobenzoic acid was required.

Instead of sulfate, thiosulfate and sulfite were used as electron acceptors. Neither nitrate nor fumarate were utilised.

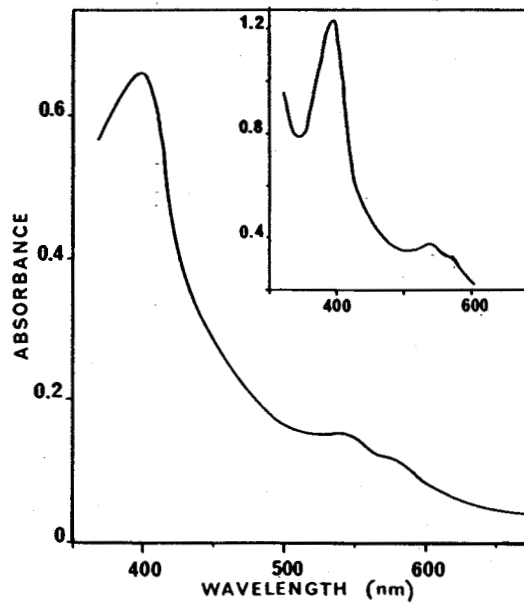
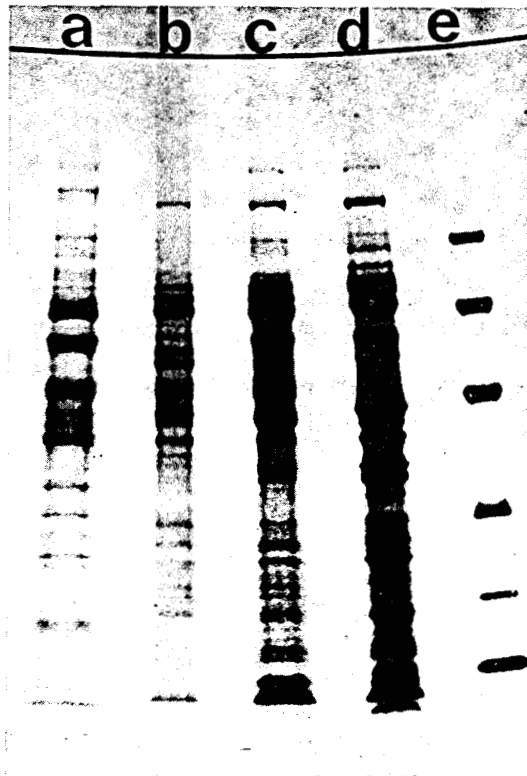


Fig. 3. Absorption spectrum of desulforubidin from strain FP. The insert shows the desulforubidin from *Desulfovibrio desulfuricans* strain Norway 4 (Lee et al., 1973 b).



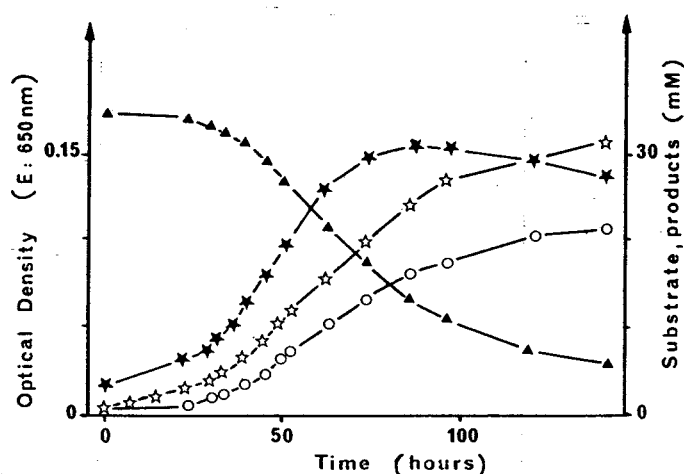


Fig. 5. Batch culture of strain FP on propionate sulfate media.

- (★) growth ($OD_{650\text{ nm}}$ - 1 cm length path)
 (☆) acetate
 (○) sulfide
 (▲) propionate

In batch culture on propionate sulfate medium, a minimum doubling time of 12 h was observed in the early stage of growth (Fig. 5). After 30 h, growth was linear. The experimental balance was in good agreement with the theoretical stoichiometry of propionate oxidation to acetate and CO_2 with sulfate as electron acceptor. The other substrates used by strain FP are indicated in Table 1. In the presence of sulfate,

Table 1. Substrate utilisation by strain FP

Substrates (a)	Low sulfate medium			Sulfate medium	
	Growth A 550 nm	Acetate	Product Propionate	Growth A 550 nm	Product (mM) Acetate
Lactate	0.31	8.5	14	0.66	24
Pyruvate	0.64	16	7	0.68	25.2
Ethanol	0	nd	nd	0.38	23
Propanol	0	nd	nd	0.35	14.6
Propionate	0	nd	nd	0.29	25.1
$H_2:CO_2$	0	nd	nd	0.27	nd

(a) 25 mM were added except for propanol (15 mM) and $H_2:CO_2$ (80:20 mixture under 2 atm.)

Fig. 4. Whole cell protein patterns.

- a) *Desulfovibrio desulfuricans*, strain Norway 4, grown on lactate + sulfate.
 b) Strain FP grown on propionate + sulfate.
 c) Strain FP grown on lactate + sulfate.
 d) *Desulfobulbus propionicus* strain Lindhorst grown on lactate + sulfate.
 e) Calibration kit; from the top the molecular weights are respectively 94000, 67000, 43000, 30000, 20100, 14400.

lactate, ethanol, pyruvate and propanol were incompletely oxidized to acetate. Hydrogen can be used as sole electron donor but in this case acetate and CO_2 were required as carbon sources. Other substrates including methanol, n-butanol, isopropanol, acetate, butyrate, malate, fumarate, succinate, formate, glucose, fructose and xylose were not used. In low sulfate media, growth occurred on lactate and pyruvate which were fermented to a mixture of acetate and propionate. Ethanol was not fermented.

Strain FP did not grow on propionate and ethanol in co-culture with *Methanospirillum hungatei* or *Methanobrevibacter arboriphilicus*.

Hydrogenase activities

When grown with H_2 as electron donor, significant hydrogenase activity was measured in cell suspensions of strain FP ($2 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mn}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ dry cells), whereas cells grown on lactate or propionate with sulfate as electron acceptor, hydrogenase activities were very low ($0.19 \mu\text{mol} \cdot \text{mn}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ dry cells).

Discussion

Ecological aspects

The results of enumeration presented here show that, in anaerobic digesters, propionate is mainly oxidized to acetate by syntrophic bacteria such as *Syntrophobacter wolinii* (Boone and Bryant, 1980). In our samples, the H_2 -scavenger is morphologically similar to *Methanobacterium formicicum* and the produced acetate is further metabolised by a filamentous acetophilic methanogen.

On the other hand, counts of propionate degrading sulfate reducers are at least 10 times lower than those of obligately hydrogen producing acetogenic organisms and, thus, suggest that propionate is not oxidised by sulfate reducers by interspecies H_2 -transfer. This is supported in this work by the inability to establish co-cultures of the strain FP with various hydrogenophilic methanogens. The late results are consistent with those obtained by Widdel (1980) and McInerney and Bryant (1980) with respectively *D. propionicus* and other propionate utilising sulfate reducers. These failures are probably due to the very low hydrogenase activity measured when cells are grown on lactate or propionate with sulfate. In contrast, *Desulfovibrio* species, which present high hydrogenase levels when grown on lactate plus sulfate, are able to catabolise lactate with interspecies hydrogen transfer (Bryant et al., 1977). Consequently, the presence of the propionate degrading strain FP in the anaerobic sludge is due to low but significant amounts of sulfate as demonstrated by similar counts obtained in the low sulfate methanogenic enrichments.

Taxonomy

Enrichment of *Desulfovibrio* degrading propionate have been previously described (Jankowski and Zobell, 1944). A short non-motile rod with pointed ends, *Desulfo-ristella hydrocarbonoblastica* was described as using formate, lactate, acetate and propionate (Hvid-Hansen, 1951). But the original culture has been lost and the Subcommittee on Sulfate-Reducing Bacteria (ICSB) has not accepted this species in the 9th Edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984).

At the present time, *Desulfobulbus* is the only recognized genus of bacteria able to oxidize incompletely propionate to acetate and is characterised by a peculiar morphology, i.e. "ellipsoidal cells, often lemon or onion shaped with pointed ends" (Widdel and Pfennig, 1982). In spite of its different shape, strain FP is closely related to *Desulfobulbus* by its metabolic properties and DNA base content. On the other hand, electrophoretic patterns of whole-cell proteins become an established method of classifying bacteria (Kerstens and De Ley, 1975; Feltham and Sneath, 1979). Similarity between patterns of *D. propionicus* Lindhorst and strain FP were observed in this work. But these patterns differ at least in five major protein bands.

In addition, this work shows that desulforubidin is not only found in our strain but also in *D. propionicus* strain Lindhorst. This result extends the range of the occurrence of sulfite reductase which was previously described in only one species, *Desulfovibrio desulfuricans* strain Norway 4 (Lee et al., 1973b). The latter organism was recently classified as *Desulfovibrio baculatus* by Widdel and Pfennig (1984) and is morphologically similar to strain FP. But it is unable to oxidise propionate. However, the presence of desulforubidin in other sulfate reducers performing a complete oxidation of propionate to CO₂ and lacking desulfovibridin, such as *Desulfovibrio barsii* and *Desulfosarcina variabilis*, remains to be investigated.

Considering the genera recognised in the 9th Edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology and the general properties of the strain FP, we propose a new species, *Desulfobulbus elongatus*.

Description of a novel species.

Desulfobulbus elongatus sp. nov.

e.lon.ga'tus L. adj. elongatus, elongated.

Straight to slightly curved rod with pointed ends, 0.6–0.7 µm × 1.5–2.5 µm, motile with a single polar flagellum. Fimbriae are present on some cells. Sulfate, sulfite, thiosulfate served as electron acceptor and are reduced to sulfide. Nitrate and fumarate are not reduced. Propionate, lactate, pyruvate, ethanol, propanol are used and incompletely oxidised to acetate in the presence of sulfate. Sugars, fumarate, succinate, formate, acetate and butyrate are never used. Hydrogen is used as electron donor in the presence of acetate and CO₂ as carbon sources. In the absence of sulfate, lactate and pyruvate are fermented to a mixture of acetate and propionate. Growth occurs in mineral medium with ammonium as sole nitrogen source. p-aminobenzoate is required.

pH range: 6.0–7.8, optimum at 7.0

Temperature range: 20 °C–40 °C, optimum 35 °C

Presence of b and c-type cytochromes

Absence of desulfovibridin but presence of desulforubidin

The mol% G + C of the DNA of the type strain is 59.0 (Tm)

Isolated from anaerobic digester

Type strain: DSM 2908 (strain FP of Samain)

Acknowledgements

Determination, of pigments, cytochromes and hydrogenase were started in the laboratory of Pr. Le Gall (Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens). We are grateful

400 E. Samain, H. C. Dubourguier, and G. Albagnac

to Dr. F. Widdel for helpful comments on taxonomy. Excellent technical assistance was provided by C. Albagnac, M. Loonis and I. Thomas. Electron microscopy was done by Dr. G. Prensier (I.N.S.E.R.M. U 142, Villeneuve d'Ascq).

References

- Boone, D.R., Bryant, M.P.: Propionate degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. 40, 626-632 (1980)
- Bryant, M.P., Campbell, L.L., Reddy, C.A., Crabill, M.R.: Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H_2 utilising methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1162-1169 (1977)
- De Ley, J.: Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. J. Bact. 101, 738-754 (1970)
- Feltham, R.K.A., Sheath, P.H.A.: Quantitative comparison of electrophoretic trace of bacterial proteins. Comp. Biomed. Res. 12, 247-263 (1979)
- Ferragut, C., Leclerc, H.: Etude comparative des méthodes de détermination du T_m de l'ADN bactérien. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 127, 223-235 (1976)
- Hvid-Hansen, N.: Sulfate-reducing and hydrocarbon-producing bacteria in ground-water. Acta. path. microbiol. scand. 29, 266-289 (1951)
- Jankowski, G.J., Zobell, C.E.: Hydrocarbon production by sulfate-reducing bacteria. J. Bact. 47, 447 (1944)
- Kerstens, K., De Ley, J.: Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. J. Gen. Microbiol. 87, 333-342 (1975)
- Lee, J., Le Gall, J., Peck, H.D.: Isolation of assimilatory- and dissimilatory-type sulfite reductases from *Desulfovibrio vulgaris*. J. Bact. 115, 529-542 (1973 a)
- Lee, J., Yi, C., Le Gall, J., Peck, H.D.: Isolation of a new pigment, desulforubidin, from *Desulfovibrio desulfuricans* (Norway strain) and its role in sulfite reduction. J. Bact. 115, 453-455 (1973 b)
- Le Gall, J., Ljungdahl, P.O., Moura, I., Peck, H.D., Xavier, A.V., Moura, J.J.G., Teixeira, M., Huynh, B.H., Der Vartanian, D.V.: The presence of redox-sensitive nickel in the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 610-616 (1982)
- Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. J. molec. Biol. 3, 208-218 (1961)
- McInerney, M.J., Bryant, M.P.: Syntrophic association of H_2 utilizing methanogenic bacteria and H_2 producing alcohol and fatty acid degrading bacteria in anaerobic degradation of organic matter. In: Anaerobes and anaerobic infections (Gottschalk et al., eds.). Stuttgart, Gustav Fischer Verlag 1980
- Miller, T.L., Wolin, M.J.: A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. Appl. Environ. Microbiol. 41, 346-354 (1974)
- Peck, H.D., Le Gall, J.: Biochemistry of dissimilatory sulphate reduction. Phil. Trans. Roy. Soc. (Lond.) B 298, 443-446 (1982)
- Pfennig, N., Widdel, F., Truper, H.G.: The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. In: The Prokaryotes, Vol. 1 (Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G., eds.). Berlin, Springer Verlag 1981
- Postgate, J.R.: The sulfate reducing bacteria. Cambridge University Press 1979
- Reynolds, E.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17, 208-212 (1963)
- Samain, E., Albagnac, G., Dubourguier, H.C., Touzel, J.P.: Characterization of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor-dependent association with a gram negative homoacetogen. FEMS Microbiol. Lett. 15, 69-74 (1982)

- Thiery, J.P.: Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.* 6, 987-1018 (1967)
- Widdel, F.: Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoessäure durch neu isolierte Arten sulfatreduzierender Bakterien. Diss., Univ. Göttingen 1980
- Widdel, F., Pfennig, N.: Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. II Incomplete oxydation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov. sp. nov. *Arch. Microbiol.* 131, 360-365 (1982)
- Widdel, F., Pfennig, N.: Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1 (Krieg N.R., ed.), 9th ed. Baltimore, Williams and Wilkins 1984
- Zeikus, J.G., Wolfe, R.S.: *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *J. Bact.* 109, 707-715 (1972)

Dr. E. Samain, Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Technologie Alimentaire, 369, Rue Jules Guesde, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

Redox studies of the tetraheme cytochrome c_3 isolated from the propionate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium *Desulfobulbus elongatus*

Eric Samain, Guy Albagnac and Jean Legall*

Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Technologie Alimentaire, BP 39, F59651 Villeneuve d'Ascq, France and *Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

Received 9 June 1986

A tetraheme cytochrome c_3 was purified from extracts of *Desulfobulbus elongatus*. Redox potentiometry studies indicated that one of the four hemes has a uniquely high E_m value (-30 mV), whereas the other three have a lower redox potential with E_m values of -165 mV. In the presence of a membrane preparation from *Db. elongatus* the cytochrome c_3 is partially reduced (23% at pH 7.6) by succinate. The physiological significance of the high redox potential of this cytochrome c_3 is discussed as a function of the propionate metabolism of *Desulfobulbus* which is known to proceed via the succinate pathway.

Cytochrome c_3 (Desulfobulbus) Redox potentiometry Succinate pathway

1. INTRODUCTION

Cytochromes c_3 constitute a class of multiple-heme cytochromes which are generally found in the sulfate-reducing bacteria belonging to the genus *Desulfovibrio*. They have low redox potentials and are considered as specific cofactors for the enzyme hydrogenase [1]. The two described species of *Desulfobulbus*, i.e. *Db. propionicus* and *Db. elongatus*, can be distinguished from the *Desulfovibrio* species by their ability to oxidize propionate into acetate and to ferment, in the absence of sulfate, lactate and pyruvate, into a mixture of acetate and propionate [2,3].

We found that lactate/sulfate-grown cells of *Db. elongatus* which contained extremely small amounts of hydrogenase activities [3] still contained high level of a multiple-heme cytochrome c apparently related to cytochrome c_3 . We report here the purification, properties and possible physiological significance of this hemoprotein.

2. MATERIALS AND METHODS

Db. elongatus was grown on lactate/sulfate as described [3]. Wet cells (450 g) were resuspended in 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) and broken by passing through a Manton-Gaulin homogenizer. Purification was performed from the soluble fraction obtained after high-speed centrifugation, by conventional chromatography on DEAE-Bio-Gel, CM-Bio-Gel and hydroxyapatite. Several cytochromes c were separated but only the major fraction was purified to homogeneity with a final yield of 9 mg of electrophoretically pure protein which presented a purity index ($A_{551\text{nm}}(\text{reduced})/A_{280\text{nm}}(\text{oxidized})$) of 3.7. The pellet from the high-speed centrifugation ($140000 \times g$ for 1 h) was utilized as a source of succinate dehydrogenase.

Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. [4] with horse heart cytochrome c as standard.

The number of c -type heme groups per cytochrome molecule was estimated by the

pyridine hemochromogen technique by using a millimolar extinction coefficient of 29.1 at 550 nm [5]. Hydrolysis of protein and analysis of amino acids were performed as in [6]. Cysteine was determined as cysteic acid by oxidation with performic acid prior to acid hydrolysis. Redox titration combined with spectrophotometry was carried out as in [7] in an anaerobic cuvette containing potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.6), purified cytochrome c_3 and 10 μ M of each of the following redox mediators: phenazine methosulfate, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, 2-hydroxy-1,4-anthraquinone, methyl viologen.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The amino acid composition of *Db. elongatus* cytochrome c_3 is shown in table 1 and compared with three other cytochromes c_3 from different *Desulfovibrio* species. The results clearly indicate a close relationship between the four hemoproteins, in particular the presence of eight cysteinyl

Table 1

Amino acid composition of *Db. elongatus* cytochrome c_3 and comparison with other cytochromes c_3 ^a

Amino acid	<i>Db. elongatus</i>	<i>D. vulgaris</i>	<i>D. desulfuricans</i> El Agheila
Lys	10	20	15
His	6	9	8
Arg	2	1	1
Trp	0	0	1
Asp + Asn	8	12	8
Thr	8	5	5
Ser	7	6	8
Glu + Gln	10	5	6
Pro	10	4	6
Gly	10	9	8
Ala	14	10	13
Cys	8	8	8
Val	5	8	5
Met	1	3	4
Ile	3	0	2
Leu	5	2	0
Tyr	1	3	1
Phe	2	2	3
Total	110	107	102

^a From [14]

residues which are indicative of the presence of four hemes per molecule. This was confirmed by the pyridine hemochromogen method that gave a value of 3.9 hemes c per molecule of 13.4 kDa as determined by sedimentation equilibrium. Assuming a composition of four hemes and a total of 110 residues, a molecular mass of 13727 Da was calculated. The optical spectrum of the fully reduced cytochrome shows that the four hemes are in a low-spin complex (table 2). Since histidyl residues are the only external heme iron ligands of all other cytochromes c_3 [8,9], the low value of the number of this residue (6 instead of 8) is unexplained and may be due to a low yield during protein hydrolysis. Methionine may be excluded as a possible ligand since the characteristic 690 nm band was absent as in all cytochromes c_3 [10].

The analogy with other cytochromes c_3 is further substantiated by the fact that, in contrast to mitochondrial cytochrome c , *Db. elongatus* cytochrome c_3 is fully reduced by molecular hydrogen in the presence of pure periplasmic hydrogenase from *D. vulgaris*. Redox potentiometry combined with optical spectroscopy (fig. 2) showed that *Db. elongatus* cytochrome c_3 had two completely distinct classes of hemes with E_m values of -30 mV ($\sim 25\%$ of reduction) and -165 mV ($\sim 75\%$ of reduction). It thus appears that one of the four hemes has a uniquely high redox potential for a cytochrome c_3 .

The presence of a high succinate dehydrogenase activity has been detected in *Db. propionicus* [11] and is compatible with the proposed succinate pathway for propionate oxidation. Since the redox potential of the couple succinate/fumarate is close to that of the high-potential heme of *Db. elongatus* cytochrome c_3 , the reduction of this protein by succinate in the presence of a particulate fraction was

Table 2

Absorption maxima and molar extinction coefficients of *Db. elongatus* cytochrome c_3

Oxidized		Dithionite-reduced	
$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon (\times 10^{-3})$	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon (\times 10^{-3})$
531	35.6	551	116.5
408	417.0	522	61.4
280	31.4	418	717.9

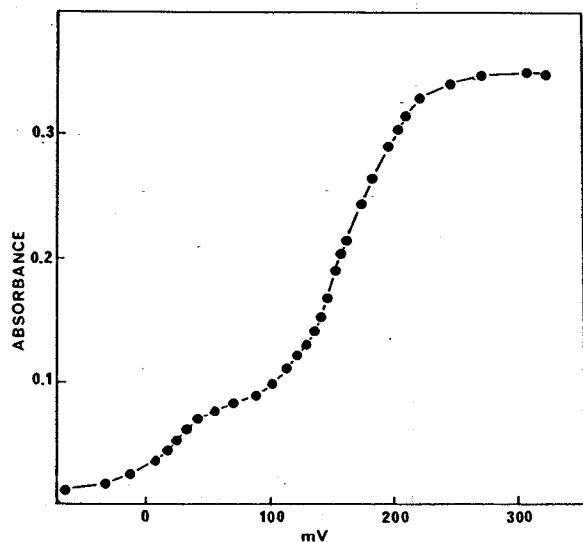


Fig. 1. Redox titration of *Db. elongatus* cytochrome c_3 . Absorbance was measured at 553 nm from 50 to -140 mV and at 551 nm from -140 to -350 mV.

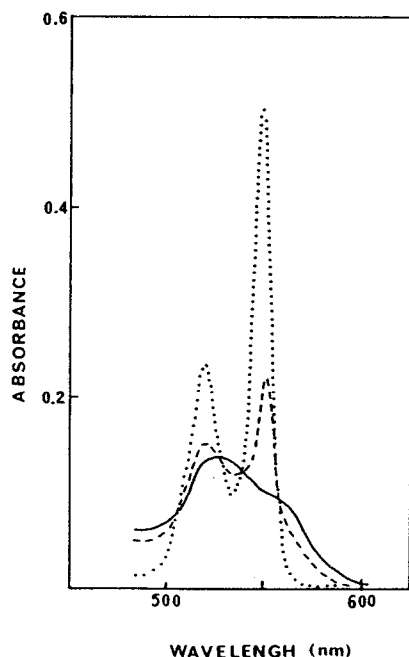


Fig. 2. Absorption spectra of *Db. elongatus* cytochrome c_3 : (—) oxidized; (---) reduced by succinate in the presence of a membrane preparation (protein concentration, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$); (...) reduced by sodium dithionite. To prevent reoxidation by oxygen these experiments were performed in an anaerobic cuvette.

assayed. The result, shown in fig. 1, indicates that only one heme is reduced (23% of the total α -band at pH 7.6).

It thus appears that, in *Db. elongatus*, the synthesis of tetraheme cytochrome c_3 is not necessarily linked to a high specific activity hydrogenase. Furthermore, this hemoprotein is adapted to the presence of a succinate dehydrogenase within the cell since one of its hemes has uniquely acquired a redox potential which is compatible with the succinate/fumarate redox couple. Some *Desulfovibrio* species can utilize fumarate as a terminal electron acceptor [12,13] and *D. multispirans* was shown to contain a unidirectional fumarate reductase [12]. However, the presence of a high-potential cytochrome c_3 in these organisms has not been reported. Further studies will involve the cellular localisation of both succinate dehydrogenase and cytochrome c_3 as well as the search for intermediary electron transfer proteins. Preliminary experiments have shown that solubilized preparations of succinate dehydrogenase are unable to reduce the cytochrome c_3 with succinate. This suggests that other redox components, possibly quinones, are necessary for electron transfer between succinate dehydrogenase and cytochrome c_3 .

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank B. Prickril for his help in the determination of the redox potentials, Mrs P. Kelly and the staff of the UGA fermentation plant for growing the cells which have been used in this study. This work was supported in part by a grant from the National Science Foundation to J.L.

REFERENCES

- [1] Yagi, T., Honya, M. and Tamiya, N. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 699-705.
- [2] Widdel, F. and Pfennig, N. (1982) *Arch. Microbiol.* 131, 360-365.
- [3] Samain, E., Dubourguier, H.C. and Albagnac, G. (1984) *System. Appl. Microbiol.* 5, 391-401.
- [4] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- [5] Fuhrhop, J.H. and Smith, K.M. (1975) in: *Laboratory Methods* (Smith, K.M. ed.) *Porphyrins and Metalloporphyrins*, pp.751-861, Elsevier, Amsterdam, New York.

- [6] Liu, M.C., Peck, H.D. jr, Payne, W.J., Anderson, J.L., Dervartanian, D.V. and LeGall, J. (1981) FEBS Lett. 129, 155-160.
- [7] Dutton, P.L. (1978) Methods Enzymol. 54, 411-435.
- [8] Haser, R., Pierrot, M., Frey, M., Payant, F., Astier, J.P., Brushi, M. and LeGall, J. (1979) Nature 282, 806-810.
- [9] Higushi, Y., Bando, S., Kusunoki, M., Matsuoka, Y., Yasuoka, N., Kadono, M., Yamanaka, A.T., Yagi, T. and Inokushi, M. (1981) J. Biochem. Tokyo 89, 1659-1662.
- [10] LeGall, J. and Fauque, G. (1986) in: Environmental Microbiology of Anaerobes (Zehnder, A.J.B. ed.), in press.
- [11] Stam, A.J.M., Kremer, D.R., Nicolay, K., Weenk, G.H. and Hansen, T.A. (1984) Arch. Microbiol. 139, 167-173.
- [12] He, S.H., Dervartanian, D.V. and LeGall, J. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun., in press.
- [13] Hatchikian, C.E. and LeGall, J. (1970) Ann. Inst. Pasteur 118, 288-301.
- [14] Bruschi, M., Hatchikian, C.E., Golovleva, L.A. and LeGall, J. (1977) J. Bacteriol. 129, 30-38.

Isolation of succinate dehydrogenase from *Desulfobulbus elongatus*, a propionate oxidizing, sulfate reducing bacterium

E. Samain, D.S. Patil*, D.V. DerVartanian*, G. Albagnac and J. LeGall*

*Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Technologie Alimentaire, BP 39, F59651 Villeneuve d'Ascq, France and *Department of Biochemistry, School of Chemical Sciences, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA*

Received 20 March 1987

Succinate dehydrogenase was purified from the particulate fraction of *Desulfobulbus*. The enzyme catalyzed both fumarate reduction and succinate oxidation but the rate of fumarate reduction was 8-times less than that of succinate oxidation. Quantitative analysis showed the presence of 1 mol of covalently bound flavin and 1 mol of cytochrome *b* per mol of succinate dehydrogenase. The enzyme contained three subunits with molecular mass 68.5, 27.5 and 22 kDa. EPR spectroscopy indicated the presence of at least two iron sulfur clusters. 2-Heptyl-4-hydroxy-quinoline-*N*-oxide inhibited the electron-transfer between succinate dehydrogenase and a high redox potential cytochrome *c*₃ from *Desulfobulbus elongatus*.

Succinate dehydrogenase; EPR; Succinate pathway; Iron-sulfur center; (*Desulfobulbus elongatus*)

1. INTRODUCTION

The interesting characteristic of the sulfate reducing bacteria belonging to the genus *Desulfobulbus* is their ability to oxidize propionate and to ferment, in the absence of sulfate, pyruvate and lactate into a mixture of acetate and propionate [1]. The two species which have been described so far namely *Db. propionicus* [1] and *Db. elongatus* [2] have been shown to possess the same metabolism although their morphology was significantly different [2]. It has been demonstrated that both the formation and the

degradation of propionate occur via the succinate pathway and high levels of fumarate reductase and succinate dehydrogenase activities have been found in extracts of *Db. propionicus* [3].

An unidirectional fumarate reductase has recently been isolated from another sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio multispirans* which can use fumarate as a respiratory substrate but is unable to oxidize propionate [4].

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Growth of the organism and preparation of the membrane fraction

Db. elongatus was grown on lactate medium as described [2]. Cells (450 g wet wt) were mixed with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) to give a 1:3 (w/v) suspension and were broken by passing through a Manton-Gaulin homogenizer two times at 9000 psi. A few milligrams of DNase were added to lessen the viscosity of the crude extract. The preparation was treated with neutralized streptomycin-sulfate (0.5 mg/mg protein) and cen-

Correspondence address: J. LeGall, Department of Biochemistry, School of Chemical Sciences, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

Abbreviations: FR, fumarate reductase; SDH, succinate dehydrogenase; DCPIP, 2,6-dichlorophenol-indophenol; PMS, phenazine methosulfate; HHOQnO, 2-heptyl-4-hydroxy-quinoline-*N*-oxide; MK-5(H₂), menaquinone-5- with saturated isoprenoid side chain; ClHgPhSO₃H, 4-chloromeriphenylsulfonate

trifuged at $13000 \times g$ for 30 min at 4°C . The supernatant was recentrifuged at $140000 \times g$ for 90 min at 4°C . The pellets from the two centrifugations were combined and suspended in a final volume of 560 ml of Tris-HCl buffer (pH 7.6). This preparation was considered as the membrane fraction.

2.2. Solubilization and isolation of succinate dehydrogenase

Unless indicated all buffers were adjusted to pH 7.6 and all procedures were carried out at 4°C . Sodium cholate was first added to the membrane fraction at a concentration of 2 g/l. After stirring for 4 h the preparation was centrifuged at $140000 \times g$ for 1 h. The pellet was suspended in 460 ml of 20 mM Tris-HCl buffer containing 1% Triton X-100. This preparation was stirred overnight and then centrifuged for 1 h at $140000 \times g$. The pellets were washed with 250 ml of the same extraction buffer and recentrifuged. The two last supernatants which contained most SDH activity (table 1) were combined and called Triton extract. SDH was separated from other components present in the Triton extract through successive DEAE and Ultrogel ACA 34 columns. The recovery of the initial activity present in the membrane fraction was 20% with a 14-fold increase in specific activity. The purified preparation was free of cytochrome *c* but all attempts to remove the cytochrome *b* were unsuccessful.

2.3. Assays and metal determination

SDH activity was determined spectrophotometrically by measuring the decrease in absorbance at 600 nm ($\epsilon = 18 \text{ mM}^{-1}$) caused by the reduction of DCPIP by succinate in the presence of PMS. The assay mixture contained 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6), 0.05 mM DCPIP, 0.05 mM PMS, 10 mM sodium succinate. The reaction was started by the addition of the enzyme. Fumarate reductase activity was determined spectrophotometrically by measuring in anaerobic cuvettes the decrease in absorbance at 436 nm ($\epsilon = 10.6 \text{ mM}^{-1}$) caused by the oxidation of reduced FMN by fumarate. The assay mixture contained 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6), 10 mM sodium fumarate, 0.2 mM FMN. The FMN was reduced by the addition of a few microlitres of 10 mM sodium dithionite solution. The reaction was started by the addition of

fumarate. No activity could be detected when methylviologen was used as an electron donor in the presence of hydrogen and hydrogenase as described in [4] for the determination of *D. multispirans* FR activity.

Protein concentrations were determined with the Lowry method [5] using bovine serum albumin as the standard. The carbonate solution was supplemented with 2% SDS to prevent precipitation due to the presence of Triton X-100.

Total iron was determined by plasma emission spectroscopy using a Jarrel-Ash model 750 atom-corp. Nonheme iron was measured colorimetrically with bathophenanthroline [6].

Total flavin and nonacid extractable flavin were determined by the method of Rao et al. [7].

2.4. Electrophoresis and molecular mass determination

Subunit composition was determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis [8] and molecular mass of the undissociated enzyme by sedimentation equilibrium technique.

2.5. Electron paramagnetic spectroscopy

EPR measurements were performed with a Varian E-109 spectrometer interfaced with a Hewlett Packard model 9816 microcomputer.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Localization and activities of SDH

Db. elongatus SDH was a tightly membrane-bound enzyme as shown by the fact that sodium cholate was not sufficient to extract it. In contrast, Triton X-100 readily solubilized the enzyme with a yield superior to 90%. The purified SDH catalyzed both fumarate reduction and succinate oxidation and, the rate of fumarate reduction was 8-times less than that of succinate oxidation. The same ratio was also observed in the crude extract and in the membrane fraction. The apparent K_m values for fumarate reduction and succinate oxidation were found to be equal to 14.9 and 23.8 μM , respectively. This and also the fact that resting cells of *Db. elongatus* grown on a lactate sulfate medium oxidize propionate and produce propionate from lactate without any lag [9], suggest that the same enzyme catalyzes in vivo both fumarate reduction and succinate oxidation

although it cannot be ruled out that another enzyme was present but undetected. These results also suggest that *Db. elongatus* is different from *Escherichia coli* which has two distinct enzymes, an SDH involved in aerobic respiration which is repressed during anaerobic growth and an FR which participates in the anaerobic respiration with fumarate as the electron acceptor and which is repressed during aerobic growth [10,11].

3.2. Molecular mass, subunits and stoichiometry

Sedimentation equilibrium studies indicated a molecular mass of 170 kDa. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis revealed three major bands with apparent molecular masses of 68.5, 27.5 and 22 kDa for a total of 118 kDa. The purity of the preparation was estimated to be 90%. The high value of the molecular mass calculated from the sedimentation equilibrium studies can be explained by the binding of Triton X-100 molecules to the enzyme as it was shown in the SDH of *Neurospora crassa* [12]. Assuming a molecular mass of

118 kDa, quantitative analysis showed the presence of 1 mol cytochrome *b*, 1 mol flavin and 8 mol nonheme iron per mol SDH (table 2). The protoheme of the cytochrome *b* was extractable by acetone-HCl and the flavin was not acid extractable and thus covalently bound to the protein. It is to be noted that both *E. coli* and *Vibrio succinogenes* SDH preparations also contain *b*-type hemes [13,14].

3.3. Light absorption

The light absorption of the purified SDH showed in its oxidized state peaks at 414 and 530 nm due to the cytochrome *b* and a shoulder at around 450 nm due to the flavin (fig.1). Addition of succinate resulted in partial reduction of both cytochrome *b* and flavin as indicated by the shift of the Soret peak to 429 nm, the appearance of the peak at 560 nm and the decrease of absorbance in the 450 nm region. Complete reduction of flavin

Table 1

Solubilization and purification of *Db. elongatus* SDH

Purification steps	Specific activity ^a	Total units
Membrane fraction	0.78	11800
Cholate pellet	0.75	9720
Triton extract	0.80	8860
DEAE Bio-Gel	8.16	3.212
ACA 34	11.12	2450

^a $\mu\text{mol DCPIP reduced/min} \times \text{mg protein}$

Table 2

Quantitative analysis of *Db. elongatus* succinate dehydrogenase

	Iron, heme and flavin content in atoms or mol per 170 kDa protein
Non acid extractable flavin	0.68
Total iron	9.70
Nonheme iron	7.50
Heme <i>b</i>	0.91

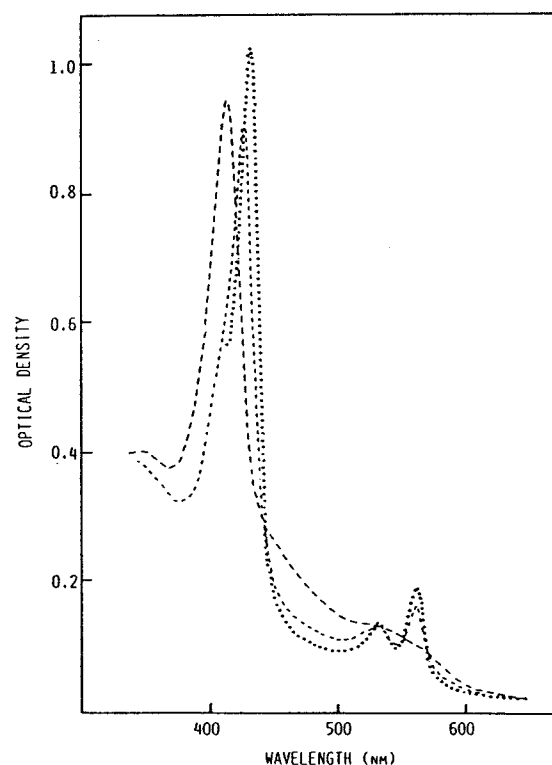


Fig.1. Absorption spectra of *Db. elongatus* succinate dehydrogenase: (---) oxidized; (---) reduced by 10 mM succinate; (-.-.-) reduced by dithionite. The protein concentration was 0.75 mg/ml.

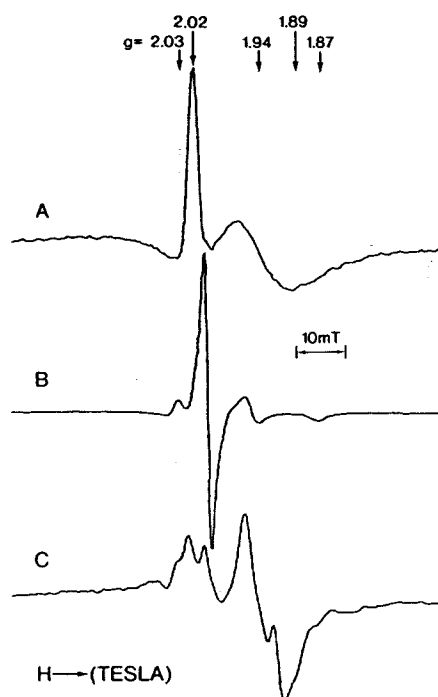


Fig.2. EPR spectra of *Db. elongatus* succinate dehydrogenase (10 mg/ml of protein in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.6): (A) as prepared, receiver gain 1.25×10^4 ; (B) as A, but reduced with 10 mM sodium succinate for 10 min, receiver gain 2.5×10^4 ; (C) as A, but reduced with slight excess of sodium dithionite for 3 min, receiver gain 1.25×10^4 . EPR conditions were: temperature, 6 K; microwave frequency, 9.244 GHz; scanning rate, 40 mT/min; time constant, 0.13 s; modulation amplitude, 1 mT; microwave power, 0.02 mW.

and cytochrome *b* was observed after addition of sodium dithionite. In the presence of air, reduced cytochrome *b* was not readily reoxidized.

3.4. Iron-sulfur clusters and EPR spectroscopy

SDH in the native state exhibited a complex axial EPR signal with *g* values at 2.02 and 1.93 when measured at 6 K (fig.2). This EPR signal very likely arises from either a [3Fe-XS] or a superoxidized [4Fe-4S] cluster. On reduction with succinate, the initial signal disappeared and was replaced by a weak rhombic EPR signal with *g* values at 2.03, 1.94 and 1.87. Also, a signal appeared at *g* = 2.00 which is attributable to a flavin semiquinone

radical species. The subsequent further addition of succinate had no effect on the latter signals. However, when sodium dithionite was added to SDH, the flavin half reduced species at *g* = 2.00 was not detected and a yet more complex rhombic EPR signal was observed with *g* values at 2.05, 2.03, 1.94, 1.93 and 1.87 indicating that a [4Fe-4S] species may have been reduced.

Morningstar et al. [15] observed in *E. coli* fumarate reductase an EPR signal with a sharp peak at *g* = 2.02, a broad trough at 1.97 with an extended tail toward high field and a distinct shoulder at *g* = 1.99 and assigned this signal to an oxidized 3Fe cluster. The spectrum noted in this study (fig.2A) for the native state of succinate dehydrogenase is strikingly similar (with yet a broad shoulder and tail) with the spectrum by Morningstar et al. [15]. They confirmed the nature of the 3Fe cluster by magnetic circular dichroism spectroscopy. By comparison, we tentatively assign the *g* = 2.02 signal in this study to a 3Fe cluster and will await confirmation of this assignment by magnetic circular dichroism and Mössbauer spectral studies in the near future.

3.5. Inhibition studies

A tetraheme cytochrome *c*₃ which has a uniquely high redox potential and which is specifically reduced by succinate in the presence of a membrane preparation, has recently been isolated from *Db. elongatus* [16]. We showed here that HHO-QnO inhibited the reduction of this cytochrome *c*₃ (fig.3) but had no effect on the reduction of ferricyanide. Since *Db. propionicus* was found to contain menaquinone MK-5[H₂] [17], one can assume that it might mediate the electron-transfer from SDH to cytochrome *c*₃. On the other hand, ClHgPhSO₃H inhibited the reduction of both cytochrome *c*₃ and ferricyanide, suggesting that it reacts directly on the sulfhydryl groups of the SDH.

3.6. Physiological significance

Although *Db. elongatus* SDH and *D. multispirans* are both sulfate reducing bacteria, the properties of their SDH and FR are different. These differences can be interpreted in terms of the physiological significance of the two enzymes. Although in *Db. elongatus* an FR is involved in the propionic fermentation of lactate and pyruvate,

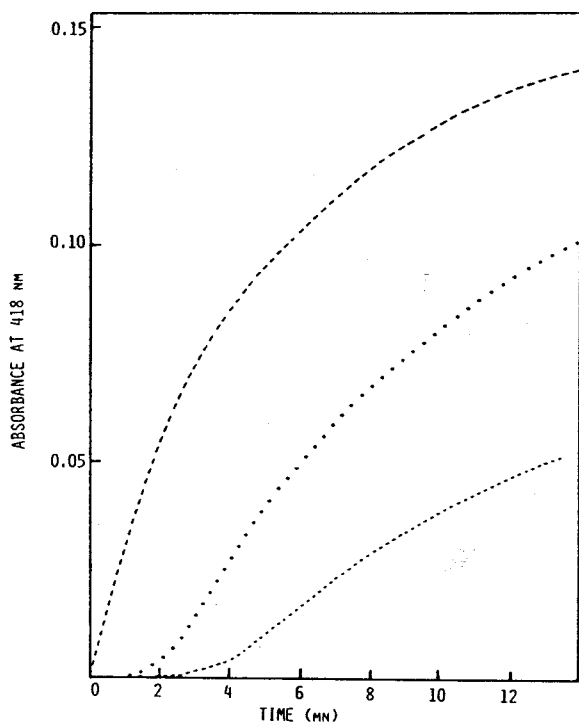


Fig.3. Effect of HHOQnO on the reduction of *Db. elongatus* cytochrome c_3 ($1.7 \mu\text{M}$) by succinate in presence of the membrane fraction (0.1 mg/ml): (---) control without HHOQnO; (***) $9 \mu\text{M}$ HHOQnO; (-.-) $36 \mu\text{M}$ HHOQnO. The experiments were performed in anaerobic cuvettes under an atmosphere of oxygen free nitrogen.

this organism does not grow by dismutation of fumarate as do *D. gigas* and *D. multispirans* [18,19]. This can be explained either by the low FR activity of *Db. elongatus* SDH or by the absence in this bacterium of a significant activity of the malic enzyme which catalyzes, in some *Desulfovibrio*, the direct conversion of malate to pyruvate [19] whereas, in *Desulfovibrio*, pyruvate formation from malate is obligatorily associated with the carboxylation of propionyl CoA to methylmalonyl CoA [3]. On the other hand, as *D. gigas* and *D. multispirans* do not grow on propionate or on succinate, the presence of an SDH activity in these organisms is physiologically unnecessary.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mrs L. DerVartanian for her excellent technical expertise with the EPR measurements

and Mrs P. Kelly and the staff of the fermentation plant of the University of Georgia for growing the cells. This study was supported in part by NSF grant PCM 8213874 to D.V.D., DMB 8602789 to J.L. and AM 01135 and GM 32187 to Dr B.H. Huynh, Department of Physics, Emory University, Atlanta.

REFERENCES

- [1] Widdel, F. and Pfennig, N. (1982) Arch. Microbiol. 131, 360-365.
- [2] Samain, E., Dubourguier, H.C. and Albagnac, G. (1984) System Appl. Microbiol. 5, 391-401.
- [3] Stam, A.J.M., Kremer, D.M., Nicolay, K., Weenk, G.H. and Hansen, T.A. (1984) Arch. Microbiol. 139, 167-173.
- [4] He, S.H., DerVartanian, D.V. and LeGall, J. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 135, 1000-1007.
- [5] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.G. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- [6] Brumby, P.E. and Massey, V. (1967) Methods Enzymol. 10, 469-470.
- [7] Rao, R.A., Felton, S.P. and Huennekens, F.M. (1967) Methods Enzymol. 10, 494-499.
- [8] Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
- [9] Samain, E., Dubourguier, H.C., LeGall, J. and Albagnac, G. (1986) Biology of Anaerobic Bacteria (Dubourguier, H.C. et al. eds) Elsevier, in press.
- [10] Hirsch, C.A., Raminsky, M., Davies, B.D. and Lin, E.C.C. (1963) J. Biol. Chem. 238, 3770-3774.
- [11] Spencer, M.E. and Guest, J.R. (1973) J. Bacteriol. 144, 563-570.
- [12] Weiss, H. and Kolb, H.J. (1979) J. Biochem. 99, 139-149.
- [13] Murakami, H., Kita, K., Oya, H. and Anraku, Y. (1985) FEMS Microbiol. Lett. 30, 307-311.
- [14] Unden, G. and Kroger, A. (1981) Eur. J. Biochem. 120, 577-584.
- [15] Morningstar, J.E., Johnson, M.K., Cecchini, G., Ackrell, B.A.C. and Kearney, E.B. (1985) J. Biol. Chem. 260, 13631-13638.
- [16] Samain, E., Albagnac, G. and LeGall, J. (1986) FEBS Lett. 204, 247-250.
- [17] Widdel, F. (1987) in: Environmental Microbiology of Microbes (Zehnder, A.J.B. ed.) in press.
- [18] Czechowski, M.H., He, S.H., Nacro, M., DerVartanian, D.V., Peck, H.D. and LeGall, J. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 1025-1032.
- [19] Hatchikian, E.C. and LeGall, J. (1970) Ann. Inst. Pasteur 118, 288-301.

REGULATION OF HYDROGENASE ACTIVITY IN THE PROPIONATE OXIDIZING SULFATE REDUCING BACTERIUM DESULFOBULBUS ELONGATUS

E. SAMAIN^{*}, H.C. DUBOURGUIER^{*}, J. LE GALL^{**} and G. ALBAGNAC^{*}

^{*} I.N.R.A., Station de Technologie Alimentaire, B.P. 39, 59651 VILLENEUVE

D'ASCQ Cedex (France)

^{**} Department of Biochemistry, University of Georgia, ATHENS GA 30602 (U.S.A.)

INTRODUCTION

Desulfohalobus is a recently described genus of sulfate reducing bacteria which differs from the genus Desulfovibrio by its ability to oxidize propionate into acetate and to ferment in absence of sulfate, pyruvate and lactate into a mixture of acetate and propionate (1). The two described species, i.e. D. propionicus (1) and D. elongatus (2), can use hydrogen as sole electron donor but are unable to degrade propionate in absence of sulfate by an interspecies hydrogen transfer. In D. elongatus, this failure could be related to the very low hydrogenase activities observed in propionate or lactate sulfate grown cells (2) compared to those detected in cells cultivated on hydrogen plus sulfate and in cells of any species of Desulfovibrio in which hydrogenases are constitutive.

In this paper we report on the regulation of the hydrogenase activity and on its possible physiological significance.

MATERIALS AND METHODS

Growth of the organism

Desulfohalobus elongatus (DSM N° 2908) was grown in a basal mineral carbonate buffered medium (2) either on propionate (30 mM) with sulfate (20 mM), or on lactate (50 mM) with or without sulfate (25 mM), or on acetate (5 mM) and sulfate (30 mM) under an H₂:CO₂ (80:20 v/v) atmosphere.

Experiments with resting cells

Cells were anaerobically harvested by centrifugation (7,000 x g for 20 mn) and resuspended in the anaerobic basal mineral medium. Cells suspensions (3 ml) were transferred in 23 ml anaerobic serum bottles. After equilibration at 35°C, the reactions were started by the addition of substrates.

Analytical techniques

Acetate and propionate were determined by gas chromatography. Hydrogenase activities were determined in whole cells either by measuring by gas chromatography the hydrogen evolution from dithionite reduced methylviologen (3) or spectrophotometrically in anaerobic cuvettes by following at 550 nm the reduction of benzylviologen (2 mM) in presence of hydrogen in a Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.8).

RESULTS AND DISCUSSION

Hydrogenase activities of cells of D. elongatus grown on lactate without sulfate or on hydrogen plus sulfate were ten times higher than these of cells grown on propionate or lactate with sulfate (Table 1), whatever the hydrogenase test used was.

Resting cells pregrown on lactate with or without sulfate converted without any lag phase lactate into acetate and propionate at about the same rate. This suggests that the high hydrogenase activity present in lactate alone grown cells is apparently not physiologically necessary for the propionic fermentation of lactate.

TABLE 1
Metabolic activities of resting cells of Desulfobulbus elongatus

Substrates used for the growth of the resting cells	Propionate degradation (1)	Lactate degradation (2)	Propionate formation from H_2+CO_2 +acetate (3)	Hydrogenase activity (4)
Lactate without sulfate	3.12	3.05	0.83	1.56
Lactate with sulfate	2.84	2.78	0.01	0.18
Propionate with sulfate	4.24	0	0	0.18
Hydrogen with sulfate	4.16	0	0.17	2.01

(1) μ mole of propionate degraded to acetate in presence of sulfate per mg of dry cell and per hour

(2) μ mole of lactate degraded to acetate and propionate in absence of sulfate per mg of dry cell and per hour

(3) μ mole of propionate produced from H_2 CO_2 and acetate (50 mM) per mg of dry cell and per hour

(4) μ mole of hydrogen produced from reduced methylviologen per mg of dry cell and per mn.

When "hydrogenase positive" cells were incubated in presence of propionate or lactate with sulfate, an immediate decrease of the hydrogenase activity was observed (Fig. 1). However, when the same experiment was performed under an atmosphere of hydrogen, the hydrogenase activity remained stable for several hours. Since the hydrogenase activity of cells incubated in a lactate sulfate free medium did not show any significant variation even in presence of chloramphenicol (result not shown), the loss of activity observed in the lactate or propionate sulfate medium cannot be only explained by a repression of the hydrogenase synthesis.

On the other hand, a net increase of hydrogenase activity was observed in "hydrogenase negative" cells when they were incubated in a lactate sulfate free medium. As it was inhibited by chloramphenicol, this net increase corresponds to a biosynthesis *de novo*. Since "hydrogenase negative" cells cannot metabolize efficiently hydrogen, their incubation under hydrogen with sulfate induced only a very weak increase of hydrogenase activity.

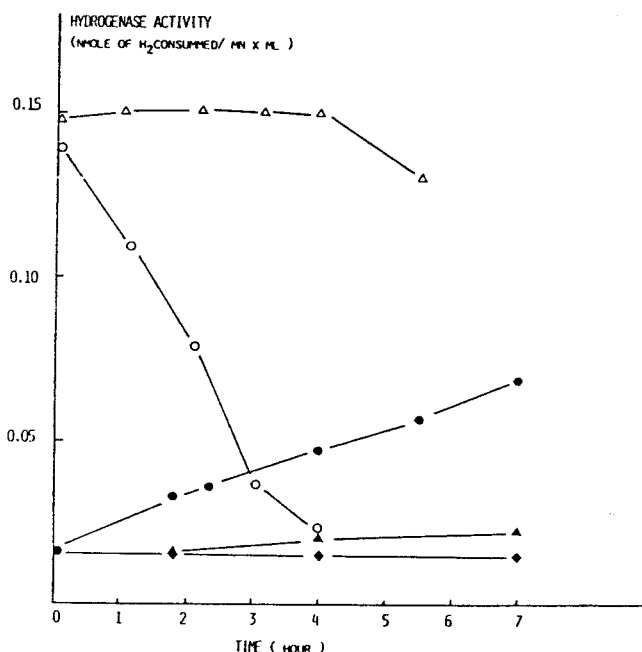


Fig. 1. Regulation of hydrogenase activity in resting cells of *Desulfobulbus elongatus*. Lactate without sulfate grown cells incubated in a lactate sulfate medium under nitrogen (O) and under hydrogen (Δ). Lactate sulfate grown cells incubated under hydrogen with sulfate (▲) and in a lactate sulfate free medium in presence (◆) and in absence (●) of chloramphenicol. Hydrogenase activities were determined spectrophotometrically.

In order to investigate the physiological significance of the regulation of the hydrogenase activity, we first examined the influence of hydrogen on the oxidation of propionate by growing cells of *D. elongatus*. Hydrogen (1 atm), added to a culture actively growing on propionate, neither was utilized, nor inhibited the growth and the propionate utilization rate.

As cells grown on lactate with or without sulfate degraded propionate at the same rate (Table 1), we used these cells to study the influence of the hydrogenase activity on the rate of propionate degradation in presence of hydrogen. The figure 2 shows that hydrogen inhibited significantly the utilization of propionate by "hydrogenase positive" cells but had no effect on "hydrogenase negative" cells.

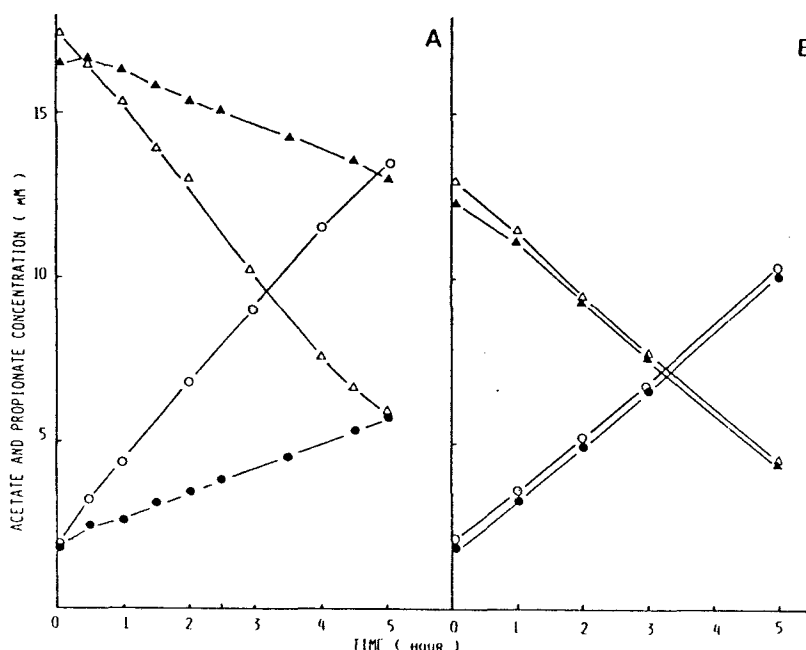


Fig. 2. Influence of hydrogen on the degradation of propionate by resting cells of *Desulfobulbus elongatus* grown on lactate alone (A) and on lactate sulfate (B). Propionate degraded under nitrogen (Δ) and under hydrogen ($\blacktriangle$). Acetate produced under nitrogen ($\circ$) and under hydrogen ($\bullet$). Cell concentrations (dry weight) were 0.73 mg/ml (A) and 0.59 mg/ml (B).

These results suggest that the repression of the hydrogenase is a mechanism which allows the bacteria of the genus *Desulfobulbus* to degrade propionate independently of the presence of hydrogen. In absence of this regulatory mechanism, it is likely that hydrogen which is a more energetic substrate than propionate, either would be used preferentially, or would inhibit propionate degradation as observed in our experiments.

Such an inhibition by hydrogen has been previously reported in other anaerobes : the growth on ethanol of the homoacetogen Acetobacterium carbinolicum is partially inhibited by hydrogen (4) and Methanosarcina TM 1 do not grow on acetate in presence of hydrogen (5).

Our results also indicate that propionate which is a major intermediate in the anaerobic mineralisation of organic matters can be degraded even under high partial pressure of hydrogen in sulfate containing environments.

REFERENCES

- (1) F. Widdel and N. Pfennig, 1982. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. II Incomplete oxidation of propionate by Desulfobulbus propionicum gen. nov. sp. nov., Arch. Microbiol., 131, 360-365.
- (2) E. Samain, H.C. Dubourguier and G. Albagnac, 1984. Isolation and characterization of Desulfobulbus elongatus sp. nov. from a mesophilic industrial digester, System. Appl. Microbiol., 5, 391-401.
- (3) J. Le Gall, P.O. Ljungdahl, I. Moura, H.D. Peck, A.V. Xavier, J.J.G. Moura, M. Teixeira, B.H. Huynh and D.V. Der Vartanian, 1982. The presence of redox-sensitive nickel in the periplasmic hydrogenase from Desulfovibrio gigas, Biochem. Biophys. Res. Commun, 106, 610-616.
- (4) B. Eichler and B. Schink, 1984. Oxidation of primary aliphatic alcohols by Acetobacterium carbinolicum sp. nov., a homoacetogenic anaerobe, Arch. Microbiol., 140, 147-152.
- (5) S.H. Zinder and R.A. Mah, 1979. Isolation and characterization of a thermophilic strain of Methanosarcina unable to use H_2 - CO_2 for methanogenesis, Appl. Environ. Microbiol., 38, 996-1008.

XIII. PREMIERES ETAPES DE LA DEGRADATION DES TRIHYROXYBENZENES CHEZ PELOBACTER ACIDIGALLICI

L'acide gallique est un composé aromatique qui est présent dans certaines eaux résiduaires (effluents d'usines de fabrication de panneaux de fibres de bois) et nous avons étudié sa dégradation en anaérobiose. A partir d'enrichissements méthanogènes, nous avons isolé une souche réalisant une fermentation homoacétique de l'acide gallique. Cette souche, qui utilise également tous les dérivés di- et trihydroxylés du benzène et du benzoate, a été identifiée de par sa morphologie et sa physiologie à *Pelobacter acidigallici*, espèce récemment décrite par Schink et Pfennig (1982).

En suivant la dégradation de l'acide gallique par cette bactérie nous avons pu mettre en évidence des accumulations transitoires de pyrogallol et de phloroglucinol, et nous proposons ici un schéma général rendant compte des premières étapes du catabolisme des composés aromatiques trihydroxylés.

Initial steps of catabolism of trihydroxybenzenes in *Pelobacter acidigallici*

Eric Samain, Guy Albagnac, and Henri-Charles Dubourguier

Institut National de la Recherche Agronomique, Station de technologie alimentaire, F-59651 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Abstract. The initial steps of the anaerobic degradation of trihydroxylated aromatic monomers were investigated in a strain (AG2) isolated on gallic acid and identified as *Pelobacter acidigallici*. Kinetic studies showed that strain AG2 fermented gallic acid into acetate with a transient accumulation of pyrogallol and phloroglucinol in the medium. In addition phloroglucinol was produced from all other trihydroxylated aromatic monomers and pyrogallol from 2,3,4-trihydroxybenzoate. Although protocatechuate did not support growth of the organism, it was partially decarboxylated by resting cells of strain AG2. Cell free extract of strain AG2 catalysed the oxidation of NADPH in presence of resorcinol, 2,4,6-trihydroxybenzoate and phloroglucinol. However, comparison of activities indicated that the latter was the true physiological electron acceptor. Phloroglucinol and its reduction product dihydrophloroglucinol appeared thus to play a key role in metabolism of trihydroxybenzenes and a unified pathway, involving a decarboxylation of trihydroxybenzoates, a para transhydroxylation of pyrogallol into phloroglucinol and the formation of dihydrophloroglucinol, was proposed.

Key words: *Pelobacter acidigallici* – Gallic acid – Pyrogallol – Phloroglucinol – Phloroglucinol reductase – Pyrogallol isomerase – Decarboxylation of trihydroxybenzoates – Anaerobic degradation

Recently, Schink and Pfennig (1982) described a new anaerobic species, *Pelobacter acidigallici*, able to perform a homoacetogenic fermentation of some trihydroxylated aromatic monomers, i.e. pyrogallol, phloroglucinol, gallate and 2,4,6-trihydroxybenzoate. This organism does not use any other compounds and is dependent of demethoxylating bacteria such as *Acetobacterium woodii* (Bache and Pfennig 1981) for the utilisation of syringic acid and other methoxylated aromatic monomers. Like two other phloroglucinol-utilizing organisms, *Rhodospseudomonas gelatinosa* (Whittle et al. 1976) and a strain of *Coprococcus* sp. (Tzai and Jones 1975), *P. acidigallici* contains a NADPH-dependent phloroglucinol reductase. This strongly suggest that phloroglucinol and dihydrophloroglucinol are common metabolic intermediates of the catabolism of trihydroxylated aromatic monomers.

In this paper, we confirmed this hypothesis by showing that a strain isolated on gallic acid and identified as *P.*

acidigallici, decarboxylates di- and tri-hydroxybenzoates and performs a para transhydroxylation of pyrogallol into phloroglucinol. In addition, we partially characterized the phloroglucinol reductase of this organism.

Materials and methods

Strain AG2 (DSM number 3663) was isolated from an anaerobic sewage digester after enrichment on gallic acid as described by Schink and Pfennig (1982).

The carbonate buffered basal medium BCYT (Touzel and Albagnac 1983) was used throughout this study. Substrates were added aseptically to BCYT medium from anaerobic stock sterile solutions. In all experiments, incubation temperature was 35°C. Fermentation balances were performed in 23 ml anaerobic culture tubes (18 × 160 mm) containing 10 ml of medium. For kinetic studies, the strain was grown in a 2 l fermenter. Collected samples (2 ml) were stored under anaerobic and acidic conditions at –20°C in order to avoid oxidation of trihydroxybenzenes. Volatile fatty acids were routinely determined by gas chromatography. Di- and trihydroxylated aromatic monomers were separated and determined by HPLC on a radial pack C18 column (Waters). The solvent was ammonium phosphate buffer (0.2 M, pH 2.5) containing 10% (v/v) methanol and its flow rate was 1.5 ml/min. Column effluent was monitored by its absorbance at 210 nm. Identification of pyrogallol and phloroglucinol were confirmed by gas chromatography – mass spectrometry of their trimethylsilyl derivatives after extraction with ethylacetate. The production of CO₂ was determined as previously described (Samain et al. 1982).

Resting cells used for decarboxylation experiments were prepared as follows: 100 ml of a culture of strain AG2 grown on gallic acid was anaerobically centrifuged after 24 h of incubation. The pellet was then suspended in basal medium and diluted in order to adjust the optical density of the suspension to about 1 at 660 nm. The reaction was started by the addition of substrates. For enzymatic studies, the strain was grown on gallic acid (10 nM) in a 10 l anaerobic flask. Cells were harvested by centrifugation after 24 h of incubation and disrupted in a French pressure cell at 130,000 kPa. The lysate was then centrifuged for 20 min at 20,000 × g and the supernatant was used for determination of enzymatic activities. NADPH dependent phloroglucinol reductase activity was determined spectrophotometrically by measuring the decrease of absorbance at 340 nm (Patel et al. 1981). The assay mixture contained: 50 mM TRIS-HCl buffer pH 7.2; 3 mM dithiothreitol; 0.2 mM NADPH; 2 mM phloroglucinol, resorcinol or 2,4,6-trihydroxy-

benzoates; extract in an appropriate concentration. The reaction was started by the addition of substrate.

Results

Strain AG2 was an anaerobic, Gram-negative, motile, non-sporulating, short, slightly curved rod ($0.5 \times 1-2 \mu\text{m}$) occurring singly or in pairs. Cells often appeared aggregated within a network of extracellular material (electron microscopy not shown). Trihydroxylated derivatives of benzene and of benzoate were the only substrates utilized and were fermented to 3 mol of acetate. Sulfate, sulfite, nitrate, protons and fumarate were not used as electron acceptor. By its morphological and physiological properties, the strain AG2 was assigned to the species *Pelobacter acidigallici*.

During batch fermentation of gallic acid (Fig. 1), strain AG2 displayed first a high exponential growth rate (doubling time of about 2 h) with acetate as the major end product. After 15 h of incubation, the growth rate decreased dramatically and a transient accumulation of pyrogallol and phloroglucinol in the medium was observed. These two phenolic compounds reached their maximal concentration after 30 and 80 h respectively. Decrease of phloroglucinol concentration occurred only after total disappearance of gallic acid and pyrogallol. After 120 h of fermentation, a final stoichiometry of 3 mol of acetate per mol of gallic acid degraded was obtained.

The fermentation balances of other trihydroxylated aromatic monomers (Table 1) were examined by using high

substrate concentrations (20 mM). Acetate was the only product of phloroglucinol degradation. On the contrary, phloroglucinol formation was observed during fermentation of all other substrates. In addition, pyrogallol was produced from gallate and 2,3,4-trihydroxybenzoate. Although protocatechuate did not support growth of the organism, it was partially decarboxylated by resting cells. Other carboxylated aromatic compounds such as 3,5-dihydroxybenzoate, 3,4-dihydroxyphenylpropionate, monohydroxybenzoate and benzoate were not attacked.

Cell free extract of strain AG2 catalyzed the oxidation of NADPH in presence of phloroglucinol, resorcinol and 2,4,6-trihydroxybenzoate. Pyrogallol and gallate were not reduced and NADH could not replace NADPH as electron donor. Resorcinol and 2,4,6-trihydroxybenzoate reductase activities were only 15 and 20% respectively of that obtained for phloroglucinol reductase ($0.85 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ of protein $^{-1}$). The enzyme had an optimum pH of 7.2 and its K_m for NADPH and phloroglucinol were $1.7 \cdot 10^{-5}$ and $7.6 \cdot 10^{-4}$ M respectively. The product of phloroglucinol reduction was identified to dihydrophloroglucinol by comparing its UV absorption spectrum to this of the chemically prepared dihydrophloroglucinol (Patel et al. 1981). When using a freshly prepared extract the kinetics of reduction of phloroglucinol was immediately linear. However, after 1 day at 4°C , the enzyme showed a lag phase of about 30 min with a final activity identical to this found in the fresh extract. Preincubation of the extract during 30 min at 35°C in presence of NADPH resulted in a complete disappearance of the lag phase. In these conditions, 90% of the initial activity was recovered even when the enzyme was stored for 4 days at 4°C .

Discussion

Our results show clearly that phloroglucinol and dihydrophloroglucinol are common and obligate intermediates in the conversion of trihydroxylated aromatic monomers into acetate by *Pelobacter acidigallici*. An unified pathway of homoacetic fermentation of these compounds is therefore proposed (Fig. 2). It involves: decarboxylation of trihydroxybenzoates, isomerisation of pyrogallol into phloroglucinol and reduction of this latter compound to dihydrophloroglucinol. Subsequent ring cleavage reactions may involve hydration and oxidation of dihydrophloroglucinol leading to 2-oxo, 4-hydroxyadipate as postulated in *R. gelatinosa* (Evans 1977). This proposed pathway differs significantly from that postulated by Kaiser and Hanselman which in-

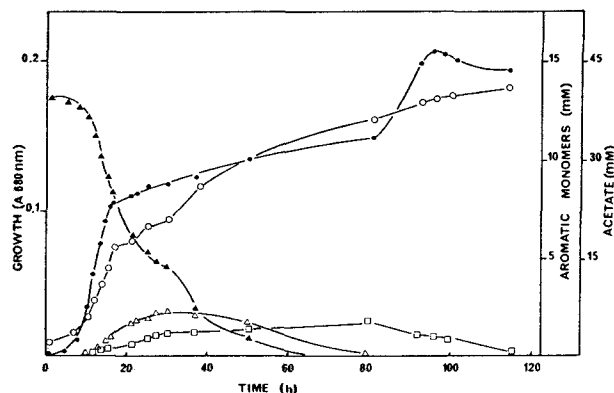


Fig. 1. Batch culture of strain AG2 on gallic acid. (●) Growth; (▲) gallic acid; (Δ) pyrogallol; (□) phloroglucinol; (○) acetate. Initial and final pH were respectively 7.4 and 6.5

Table 1. Stoichiometry of fermentation by strain AG2

Substrate (20 mM)	Substrate utilized (mM)	Growth O.D. 660 nm	Products (mM)			
			Pyrogallol	Phloroglucinol	Acetate	CO ₂
Gallic acid	15.9	0.285	4.3	3.6	23.2	14.9
2,3,4-tri OH benzoate	9.6	0.154	2.8	2.1	8.33	nd
2,4,6-tri OH benzoate	14.6	0.327	0	5.2	26.2	nd
Pyrogallol	17.9	0.142	0	4.7	40.7	0.4
Phloroglucinol	13.2	0.185	0	0	42.0	nd

Cultures were incubated for 1 week
nd: not determined

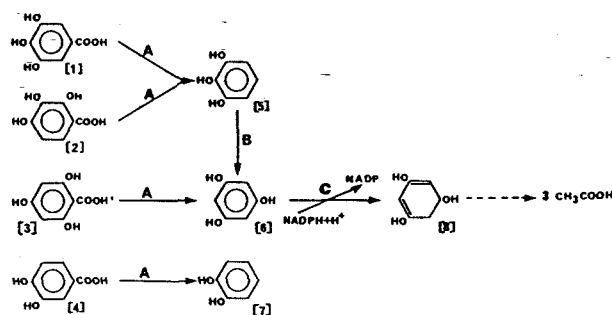


Fig. 2. Proposed pathway for the degradation of di- and trihydroxylated aromatic monomers by strain AG2. (1) Gallic acid; (2) 2,3,4-trihydroxybenzoate; (3) 2,4,6-trihydroxybenzoate; (4) protocatechuic acid; (5) pyrogallol; (6) phloroglucinol; (7) catechol; (8) dihydrophloroglucinol. Enzyme: (A) Decarboxylase; (B) isomerase; (C) NADPH dependent phloroglucinol reductase

volves a direct hydrogenation of pyrogallol (1982a) or gallic acid (1982b).

Experiments with resting cells show that the decarboxylase of strain AG2 is specific of di- and trihydroxybenzoates having one of the hydroxyl group located in the para position. This decarboxylase appears thus quite different of its counterpart in *Citrobacter* which requires one hydroxyl group in the meta position (Yoshida et al. 1982).

To our knowledge, the isomerisation of pyrogallol which involves a para transhydroxylation has never been observed in nature. In our assay conditions no isomerase activity was detected in the crude extract and the mechanisms and coenzymes involved in this reaction remain to be determined.

The oxidation of NADPH observed in presence of 2,4,6-trihydroxybenzoate can be explained either by a non-specificity of the phloroglucinol reductase or by the presence in the extract of decarboxylase activity. Since by measuring by HPLC the formation of pyrogallol or phloroglucinol from trihydroxybenzenes, we never detected in the crude extract any decarboxylase activity (results not shown), the first hypothesis is more likely. In addition, the reductase of a strain of *Penicillium* sp. was reported to attack a wide spectrum of hydroxylated aromatic compounds including resorcinol and 2,4,6-trihydroxybenzoate (Patel et al. 1981). Thus the reductase of *P. acidigallici* strain AG2 appears specific of di- and trihydroxylated aromatic monomers having two hydroxyl groups located in meta position without any substitution of the carbon in ortho. This property distinguishes this reductase from that of *Coprococcus* which can only reduce phloroglucinol and 2-methyl 1,4-naphthoquinone. The two enzymes differ also by their K_m for NADPH and phloroglucinol which are respectively $2.9 \cdot 10^{-4}$ and $3 \cdot 10^{-5}$ M in *Coprococcus* and $1.7 \cdot 10^{-5}$ and $7.6 \cdot 10^{-4}$ M in *P. acidigallici*.

The transient accumulation of pyrogallol and phloroglucinol during gallic acid degradation was not observed in previous studies on *P. acidigallici* probably in reason of the very low substrate concentration used by Schink and Pfennig (1982). The excretion of these two intermediates is concurrent with a net decrease of growth and acetate production. This suggests an inhibition of the metabolic pathway between phloroglucinol and acetate, the decarboxylase and isomerase activities remaining unchanged.

From the data presented here and in the literature, the phloroglucinol reductase appears to be a key enzyme in the anaerobic degradation of trihydroxybenzenes and thus a possible common metabolic pathway of dihydrophloroglucinol catabolism in different species of microorganisms.

References

- Bache R, Pfennig N (1981) Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch Microbiol* 130:255–261
- Evans WC (1977) Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature (Lond)* 270:17–22
- Kaiser JP, Hanselman KW (1982a) Aromatic chemicals through anaerobic conversion of lignin monomers. *Experientia* 38:167–175
- Kaiser JP, Hanselman KW (1982b) Fermentative metabolism of substituted monoaromatic compounds by a bacterial community from anaerobic sediments. *Arch Microbiol* 133:185–194
- Patel TR, Jure KG, Jones GA (1981) Catabolism of phloroglucinol by the rumen anaerobic *Coprococcus*. *Appl Environ Microbiol* 42:1010–1017
- Samain E, Albagnac G, Dubourguier HC, Touzel JP (1982) Characterisation of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor dependent association with a gram-negative homoacetogen. *FEMS Microbiol Lett* 15:69–74
- Schink B, Pfennig N (1982) Fermentation of trihydroxybenzenes by *Pelobacter acidigallici* gen. nov. sp. nov., a new strictly anaerobic, non-sporeforming bacterium. *Arch Microbiol* 133:195–201
- Touzel JP, Albagnac G (1983) Isolation and characterisation of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiol Lett* 16:241–245
- Tzai CG, Jones GA (1975) Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic phloroglucinol degradation. *Can J Microbiol* 21:794–801
- Whittle PJ, Lunt DO, Evans WC (1976) Anaerobic photometabolism of aromatic compounds by *Rhodospseudomonas* sp. *Biochem Soc Trans* 4:490–491
- Yoshida H, Tani Y, Yamada H (1982) Isolation and identification of a pyrogallol producing bacterium from soil. *Agric Biol Chem* 46:2539–2546

Received November 19, 1985/Accepted January 23, 1986

CONCLUSIONS GENERALES

L'étude des fermentations intermédiaires impliquées dans la méthanogénèse constitue un sujet très vaste et mon travail peut paraître un peu dispersé puisqu'il comprend aussi bien la numération et l'identification de bactéries que leur caractérisation physiologique et biochimique. En fait l'approche purement microbiologique que j'ai développée en abordant ce sujet était absolument nécessaire compte tenu du manque de renseignement sur ce type de bactérie et notre désir de travailler sur des souches représentatives des populations dominantes dans les digesteurs. Ce travail long et fastidieux en raison des difficultés techniques liées à la cultures de ces bactéries anaérobies strictes (faibles taux de croissance, association obligatoire avec des organismes utilisateurs d'hydrogène) a contribué à améliorer notre connaissance du schéma biologique de la fermentation méthanique grâce à l'identification et à la quantification des organismes et des types de fermentations impliqués dans l'étape d'acétogénèse.

Il apparaît ainsi que, dans les digesteurs anaérobies, les bactéries sulfatoréductrices ne jouent un rôle significatif que dans la fermentation du lactate. Elles interviennent alors probablement en tant que bactéries O.H.P.A et sont en compétition avec les bactéries propioniques dont les concentrations sont du même ordre. Par contre, sur éthanol, butyrate et propionate le niveau des bactéries sulfatoréductrices est très largement inférieur à celui des syntrophes. Les bactéries dominantes dégradant l'éthanol et le butyrate ont pu être identifiées respectivement à *Pelobacter carbinolicus* et à *Syntrophomonas wolfei*. Dans les plus fortes dilutions dégradant le propionate, on observe une formation significative de butyrate. Le microorganisme responsable de cette fermentation n'a pu être isolé et des études sur le mécanisme de la conversion du propionate en butyrate sont actuellement en cours dans le laboratoire.

Ce travail a également abouti à l'isolement de souches dont certaines présentaient, de par leur métabolisme, leur physiologie ou leur morphologie, une originalité suffisante pour justifier leur description en tant que nouvelle espèce.

La souche X₄ fut la première bactérie connue comme pouvant fermenter l'éthanol en acétate et propionate et nous avons montré par la suite que *Clostridium propionicum* réalisait également cette fermentation. Bien que morphologiquement et physiologiquement proche de cette dernière, la souche X₄ s'en différencie cependant par la teneur en G+C de son ADN et par l'utilisation de sucres. Ceci et le fait que le pourcentage d'homologie de l'hybridation ADN/ADN ne soit que de 18% indiquent qu'il s'agit de deux espèces différentes et nous avons proposé avec J.P. Touzel la création d'une nouvelle espèce: *Clostridium neopropionicum* (DSM n°3847).

La souche OM isolée à partir d'enrichissements sur oléate est morphologiquement semblable à *Syntrophomonas wolfei*. Elle utilise cependant contrairement à cette dernière des acides gras à plus de 10 carbones et fut décrite pour cette raison comme une nouvelle espèce de *Syntrophomonas*: *S. sapovorans* (DSM n°3441).

Isolée sur propionate à partir d'un digesteur anaérobie, la souche sulfatoréductrice FP est physiologiquement très proche de *Desulfobulbus propionicus*. La souche FP est cependant un bacille droit ou légèrement incurvé et est donc différente de *D. propionicus* qui possède une morphologie caractéristique en forme de citron ou d'oignon. Elle fut donc décrite en fonction de sa morphologie comme une nouvelle espèce de *Desulfobulbus*: *D. elongatus* (DSM n°2908).

Une partie importante de ce mémoire a été consacrée à l'étude du métabolisme et des systèmes de transferts d'électrons liés à la production d'hydrogène chez les bactéries acétogènes. En raison de contraintes techniques (impossibilité de réaliser des cultures de masse de cellules de bactéries acétogènes syntrophes en raison de leur faibles rendements de croissance et de la présence obligatoire de bactéries utilisatrices d'hydrogène), seule l'étude de *Pelobacter carbinolicus* et de souches sulfatoréductrices était pratiquement possible.

Chez *P. carbinolicus* la détermination des activités enzymatiques impliquées dans la dégradation de l'éthanol en acétate et hydrogène a permis de démontrer que l'ATP était produit par une phosphorylation au niveau du substrat grâce à la formation d'une liaison thio-ester riche en énergie (acétyl-CoA) durant l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate.

Desulfobulbus elongatus est une bactérie sulfatoréductrice capable d'oxyder le propionate en acétate et CO_2 . Cette souche synthétise une hydrogénase lorsqu'elle est cultivée sur hydrogène ou sur lactate en absence de sulfate et nous avons montré que l'activité hydrogénasique était réprimée quand les cellules étaient incubées sur lactate ou propionate en présence de sulfate. Ce phénomène est, à notre connaissance un cas unique chez les bactéries sulfatoréductrices et nous avons proposé l'interprétation écologique (peut être un peu finaliste) suivante : l'hydrogène est un substrat beaucoup plus énergétique que le propionate et ce mécanisme de répression de l'activité hydrogénasique permettrait, quelque soit la concentration en hydrogène dans le milieu, une utilisation préférentielle du propionate par des bactéries du genre *Desulfobulbus*. Cette régulation de l'activité hydrogénasique pourrait également expliquer en partie l'absence de transfert d'hydrogène entre les espèces du genre *Desulfobulbus* et des méthanogènes dans des milieux pauvres en sulfate.

Chez *Desulfobulbus*, le propionate est synthétisé et probablement dégradé par la voie du succinate. L'oxydation du propionate en acétate implique donc une déshydrogénation du succinate en fumarate et, chez *D. elongatus*, nous avons purifié et caractérisé un complexe enzymatique membranaire catalysant cette réaction. Ce complexe est constitué d'une flavoprotéine et d'un cytochrome b et catalyse également la réduction du fumarate. Le potentiel redox du couple fumarate/succinate ($E_o' = +33$ mV) est très élevé par rapport à celui des transporteurs d'électrons des bactéries sulfatoréductrices (cytochrome c_3 , ferrédoxine et flavodoxine). Ceci pourrait expliquer la présence, chez *D. elongatus*, d'un cytochrome c_3 tétrahémique dont l'un des hèmes possède un potentiel redox (-30 mV) suffisamment haut pour accepter des électrons provenant de l'oxydation du succinate. Ce cytochrome c_3 que nous avons purifié est en effet spécifiquement réduit par le succinate en présence d'une préparation membranaire de *D. elongatus*. Les cytochromes c_3 qui étaient considérés comme des cofacteurs spécifiques des hydrogénases, peuvent donc jouer un rôle dans d'autres réactions de déshydrogénation. Le cytochrome c_3 de *D. elongatus* est réduit par l'hydrogène en présence des hydrogénases de *Desulfovibrio vulgaris* et de *D. gigas* et il intervient donc probablement également dans le métabolisme de l'hydrogène. Cependant le potentiel redox des trois autres hèmes de ce cytochrome n'est que de -165 mV et est largement moins négatif que celui du couple H_2/H^+ qui est de -420 mV. L'hydrogénase ne pourrait donc pour des raisons thermodynamiques fonctionner que dans le seul sens de la consommation d'hydrogène et ceci peut être une seconde explication au fait qu'il soit impossible de cultiver cette bactérie en absence de sulfate en association syntrophique avec une méthanogène.

APPENDICE TECHNIQUE

-solution de vitamines

biotine	2 mg
acide folique	2 mg
pyridoxine-HCl	10 mg
thiamine-HCl	5 mg
riboflavine	5 mg
acide nicotinique	5 mg
pantothénate de calcium	5 mg
vitamine B ₁₂	0,1 mg
acide p-aminobenzoïque	5 mg
acide lipoïque	5 mg
eau distillée	1 l

-solution réductrice

cystéine-HCl	12,5 g
Na ₂ S, 9 H ₂ O	12,5 g
eau distillée	1 l

L'eau est portée à ébullition puis refroidie sous azote jusqu'à 50°C. La cystéine est alors ajoutée et le pH est ajusté à 7,0 par addition de soude 10 N. Après addition du sulfure de sodium, la solution est répartie par 10 ml sous azote dans des flacons pénicilline de 25 ml.

La composition finale du milieu est la suivante :

- solution macrominérale	50 ml
- solution d'oligoéléments	10 ml
- solution de vitamines	10 ml
- NH ₄ Cl	1 g
- résazurine (0,1%)	1 ml
- eau distillée	1 l

I. TECHNIQUES ET MILIEUX DE CULTURE

La technique de Hungate modifiée par Miller et Wolin (1973) a été utilisée pour la préparation des milieux et la culture et l'isolement des microorganismes. Le même milieu de base minéral a été employé dans toute cette étude. Il est dérivé du CBBM de Zeikus et Wolfe (1973) et est préparé à partir des solutions concentrées suivantes :

- solution macro-minérale

KH_2PO_4	6 g
NaCl	12 g
MgSO_4	2,4 g
CaCl_2	1,6 g
eau distillée	1 l

-solution d'oligo-éléments

$\text{FeSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,3 g
$\text{MnCl}_2, 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CoCl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,1 g
ZnCl_2	0,1 g
CuCl_2	0,02 g
H_3BO_3	0,01 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,01 g
Na_2SeO_3	0,017 g
$\text{NiSO}_4, 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,026 g
acide nitrilotriacétique	12,8 g
eau distillée	1 l

L'acide nitrilotriacétique est dissout dans 500 ml d'eau distillée et le pH est amené à 6,5 par addition de soude 10 N. Les minéraux sont ajoutés dans l'ordre et le volume est ajusté à 1 l avec de l'eau distillée.

Le milieu est porté à ébullition puis refroidi sous un courant d'un mélange de $N_2:CO_2$ (85:15) jusqu'à 50°C. On ajoute alors 4,5 g/l de $KHCO_3$ de manière à tamponner le milieu à pH 7,2-7,4. Ce dernier est ensuite réparti sous $N_2:CO_2$ dans des tubes de culture anaérobie ou des flacons pénicillines. La solution réductrice et les substrats carbonés sont rajoutés stérilement après autoclavage.

Les éventuelles modifications apportées à la composition de ce milieu (pH, composition de la phase gazeuse, addition de sulfate, de trypticase, d'extrait de levure) sont indiquées dans les résultats. Les isollements sont réalisés en milieu gélosé soit en "roll tubes" soit en gélose profonde dans des tubes de verre (9 x 160 mm). Les dilutions et le repiquage des colonies sont effectués dans la chambre anaérobie (Forma scientific).

II. TECHNIQUES ANALYTIQUES

Les acides gras volatils et les alcools sont séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse (chromatographe Varian équipé d'un détecteur à ionisation de flamme).

- colonne en acier inoxydable (2,5 m x 1/8") remplie de chromosorb W.A.W. 100-120 mesh imprégné de 25 % de néopentyl glycol adipate et de 2 % d'acide phosphorique;
- gaz vecteur N₂, saturé en acide formique (débit 30 ml/mn);
- température de l'injecteur et du détecteur: 230°C;
- température de la colonne: 160°C pour la séparation des acides gras volatils et 80°C pour la séparation des alcools.

Les gaz sont séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse (chromatographe Pye Unicam équipé d'un détecteur à conductivité thermique).

- colonne en acier inoxydable (2 m x 1/4") remplie de Porapak S;
- les températures de la colonne, de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 50, 60 et 100°C;
- le gaz vecteur (50 ml/mn) est de l'azote pour le dosage de l'hydrogène et de l'hélium pour le dosage du méthane et du CO₂.

Les acides organiques (lactate, succinate) et les composés aromatiques sont séparés et dosés par chromatographie liquide haute pression.

- colonne à compression radiale C₁₈ Waters (10 x 0,8 cm);
- éluant: tampon phosphate (0,2 M, pH 3);
- détection par spectrophotométrie à 210 nm.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les références citées dans les articles reproduits dans la thèse ne sont pas classées ci-dessous

ABRAM J.W., NEDWELL D.B. (1978)

Inhibition of methanogenesis by sulfate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. Arch. Microbiol., 117, 89-92

ADAMSE A.D. (1980)

New isolation of *Clostridium aceticum*. Antonie Leeuwenhoek, J. Microbiol., 46, 523-531

AKAGI J.M. (1981)

Dissimilatory sulfate reduction, mechanistic aspects. Dans: Biology of inorganic nitrogen and sulfur (Bothe H., Trebst A. eds), Springer Verlag, pp 178-187

ANDRESEN J.R., GOTTSCHALK G., SCHLEGEL H.G. (1970)

Clostridium formicoaceticum nov. spec. Isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*. Arch. Microbiol., 72, 154-174

ARCHER D.B., POWELL G.E. (1985)

Dependence of the specific growth rate of methanogenic mutualistic coculture. Arch. Microbiol., 141, 133-137

BACHE R., PFENNIG N. (1981)

Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. Arch. Microbiol., 130, 255-261

BADZIONG W., THAUER R.K., ZEIKUS J.G. (1978)

Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source. Arch. Microbiol., 116, 41-49

BADZIONG W., THAUER R.K. (1980)

Vectorial electron transport in *Desulfovibrio vulgaris* growing on hydrogen plus sulfate as sole energy source. Arch. Microbiol., 125, 167-174

BALCH W.E., SCHOBERTH S., TANNER R.S., WOLFE R.S. (1977)

Acetobacterium, a new genus of hydrogen- oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., 27, 355-361

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

BARKER H.A. (1936a)

On the biochemistry of the methane fermentation. Arch. Mikrobiol., 7, 404-419

BARKER H.A. (1936b)

Studies upon the methane producing bacteria. Arch. Mikrobiol., 7, 420-438

BARKER H.A. (1937)

Arch. Mikrobiol., 8, 415

BARKER H.A. (1940)

Studies upon the methane fermentation. IV. The isolation and culture of *Methanobacillus omelianskii*. Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol., 6, 201-220

- BARKER H.A. (1941)
Studies on the methane fermentation. V. Biochemical activities of *Methanobacillus omelianskii*. J. Biol. Chem., 137, 153-167
- BARKER H.A. (1943)
Studies on the methane fermentation. VI. The influence of carbon dioxide concentration on the rate of carbon dioxide reduction by molecular hydrogen. Proc. Nat. Acad. Sci. 29, 184-190
- BARKER H.A., KAMEN M.D., HAAS V. (1945)
Carbon dioxide utilization in the synthesis of acetic and butyric acids by *Butyribacterium rettgeri*. Proc. Nat. Acad. Sci., 31, 355-360
- BARKER H.A. (1956)
Biological formation of methane. Dans: Bacterial Fermentation, John Wiley et sons, New York, pp 1-27
- BECHAMP A. (1868)
Ann. Chim. Phys., 13, 103
- BHAT J.V., BARKER H.A. (1947)
Clostridium lacto-acetophilum nov. sp. 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* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. Appl. Environ. Microbiol., 40, 626-632
- BORNSTEIN B.T., BARKER H.A. (1948)
The energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. J. Biol. Chem., 172, 659-669
- BRANDIS A., THAUER R.K. (1981)
Growth of *Desulfovibrio* species on hydrogen and sulfate as a sole energy source. J. Gen. Microbiol., 126, 249-252
- BRANDIS-HEEP A., GEBHARDT N.A., THAUER R.K., WIDDEL F., PFENNIG N. (1984)
Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfobacter postgatei*. 1. Demonstration of all enzymes required for the operation of the citric acid cycle. Arch. Microbiol., 136, 222-229
- BRAUN M., SCHOBERTH S., GOTTSCHALK G. (1979)
Enumeration of bacteria forming acetate from H₂ and CO₂ in anaerobic habitats. Arch. Microbiol., 120, 201-204
- BRAUN M., MAYER F., GOTTSCHALK G. (1981)
Clostridium aceticum (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. Arch. Microbiol., 128, 288-293
- BRAUN M., GOTTSCHALK G. (1982)
Acetobacterium wieringae sp. nov., a new species producing actetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., 3, 368-376
- BRAUN M., STOLP H. (1985)
Degradation of methanol by a sulfate reducing bacterium. Arch. Microbiol., 142, 77-80

- BRUSCHI M., LEGALL J., HATCHIKIAN C.E., DUBOURDIEU M. (1969)
Cristallisation et propriétés d'un cytochrome intervenant dans la réduction du thiosulfate. *Bul. Soc. Franc. Physiol. Veg.*, 15, 381
- BRUSCHI M., HATCHIKIAN C.E., LEGALL J., MOURA J.J.D., XAVIER A.V. (1976)
Purification, characterization and biological activity of three forms of ferredoxin from the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *Biochim. Biophys. Acta*, 449, 275-284
- BRYANT M.P., WOLIN E.A., WOLIN M.J., WOLFE R.S. (1967)
Methanobacillus omelianskii, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. 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 hydrogen utilizing methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 1162-1169
- BRYANT M.P. (1976)
The microbiology of anaerobic degradation and methanogenesis with special reference to sewage. Dans: *Microbiol Energy Conservation* (H.G. Schlegel et J. Barnea eds), Göttingen, pp 107-118
- BRYANT M.P. (1979)
Microbial methane production. Theoretical aspects. *J. Anim. Sci.*, 48, 193-201
- BUCHANAN R.E., GIBBONS M.E. (1974)
Bergey's manual of determinative bacteriology, 8^{me} édition, William et Wilkins.
- BURTON R.M., STADMAN E.R. (1953)
The oxidation of acetaldehyde to acetyl-CoA. *J. Biol. Chem.*, 202, 873-890
- BUSWELL A.M., NEAVE S.L. (1930)
Illinois state water survey, Bull. n° 30
- BUSWELL A.M., SOLLO F.W. (1948)
The mechanism of methane fermentation. *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 1778-1780
- CAMMACK R., RAO K.K., HALL D.O., MOURA J.J.D., XAVIER A.V., BRUSCHI M., LEGALL 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
- CAPPENBERG T.E. (1975)
Relationships between sulfate-reducing and methane producing bacteria. *Plant Soil*, 43, 125-139
- CARDON B.P., BARKER H.A. (1946)
Two amino-acids fermenting bacteria, *Clostridium propionicum* and *Diplococcus glycinophilus*. *J. Bacteriol.*, 52, 629-634

CORD-RUWISCH R., OLIVIER B. (1986)

Interspecific hydrogen transfer during methanol degradation by *Sporomusa acidovorans* and hydrogenophilic anaerobes. Arch. Microbiol., 144, 163-165

DOELLE H.W. (1975)

Bacterial metabolisme, 2^{ème} édition, Academic Press

DRAKE H.L., AKAGI J.M. (1977)

Bisulfite reductase of *Desulfovibrio vulgaris* : explanation for product formation. J. Bacteriol., 132, 139-143

DRAKE H.L., AKAGI J.M. (1978)

The dissimilatory reduction of bisulfite by *Desulfovibrio vulgaris*. J. Bacteriol., 136, 916-923

EHHALT D.H. (1976)

The atmospheric cycle of methane. Dans: Microbiol production of gases (Schlegel H.G., Gootschalk G., Pfennig N. eds), Göttingen, pp 13, 22

EICHLER B., SCHINK B. (1984)

Oxidation of primary 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., 30, 1-7

FAUQUE G. (1985)

Relation structure-fonction de différentes protéines d'oxydoréduction isolées de bactéries sulfatoréductrices et méthanigènes, Thèse, Univ. de tech. de Compiègne.

FERRY J.G., WOLFE R.S. (1977)

Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbiol consortium. Arch. Microbiol., 107, 33-40

FISCHER F., LIESKE R., WINZER K. (1932)

Biologische gasreaktion. II. Mitteilung: Über die bildung von essigsäure bei der biologischen umsetzung von Kohlenoxyd und kohlenensäure mit wasserstoff zu methan. Biochem. Zeishr., 245, 2-12

FONTAINE F.E., PETERSON W.J., Mc COY E., JOHNSON M.J., RITTER G.J. (1942)

A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n. sp.. J. Bacteriol., 43, 701-715

FOX G.E., MAGRUM C.J., BALCH W.E., WOLFE R.S., WOESE C.R. (1977)

Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterisation. Proc. Nat.Acad. Sci. 74, 4537-4541

GEBHARDT N.A., LINDER D., THAUER R.K. (1984)

Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfobacter postgatei*. 2. Evidence from ¹⁴C-labelling studies for the operation of the citric acid cycle. Arch. Microbiol., 136, 230-233

HASCHKE R.H., CAMPBELL L.L. (1971)

Thiosulfate reductase from *Desulfovibrio vulgaris*. J. Bacteriol., 106, 603-607

- HATCHIKIAN E.C., LEGALL 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. *Biochim. 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., ZEIKUS J.G. (1983)
Characterization of a new type of dissimilatory sulfite reductase present in *Thermodesulfobacterium commune*. *J. Bacteriol.*, 153, 1211-1220
- HEALY J.B., YOUNG L.Y., REINHARD M. (1980)
Methanogenic decomposition of ferulic acid, a model lignin derivative. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 436-444
- HEALY J.B., YOUNG L.Y. (1979)
Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 84-89
- HENKELEKIAN H., MUELLER P. (1958)
Transformation of some lipids in anaerobic sludge digestion. *Sewage Ind. Wastes*, 30, 1108-1120
- HENSON J.M., SMITH P.H. (1985)
Isolation of a butyrate-utilizing bacterium in coculture with *Methanobacterium thermoautotrophicum* from a thermophilic digester. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1461-1466
- HILLMER P., GOTTSCHALK G. (1974)
Solubilization and partial characterization of particulate dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Biochim. Biophys. Acta*, 334, 12-23
- HILPERT W., SCHINK B., DIMROTH P. (1984)
Life by a new decarboxylation-dependent energy conservation mechanism with Na⁺ as coupling ion. *The EMBO J.*, 3, 1670-1676
- HOPPESEYLER F. (1876)
Über die processe der garungen und ihre beziehung zum leben der organismen. *Pflüger's Arch. f. Ges. Physiol.*, 12, 1-17
- HOPPESEYLER F. (1887)
Die methangährung der essigsäure. *Z. Physiol. Chem.*, 11, 561-568
- HUNGATE R.E. (1950)
The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 14, 1-49
- HUNGATE R.E. (1966)
The rumen and its microbes, Academic press, New York
- HUNGATE R.E. (1967)
Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentations. *Arch. Microbiol.*, 59, 158-164
- HUSER B.A., WUHRMANN K., ZEHNDER A.J.B. (1982)
Methanothrix soehgenii gen. nov., sp. nov., a new acetotrophic non hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, 132, 1-9

IANNOTI E.L., KAFKEWITZ P., WOLIN M.J., BRYANT M.P. (1973)

Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio succinogenes*. Changes caused by interspecies transfer of hydrogen. J. Bacteriol., 114, 1235-1240

INGVORSEN K., ZEHNDER A.J.B., JORGENSEN B.B. (1984)

Kinetics of sulfate and acetate uptake by *Desulfobacter postgatei*. Appl. Environ. Microbiol., 47, 403-408

ISA Z., GRUSENMEYER S., VERSTRAETE W. (1986a)

Sulfate reduction relative to methane production in high rate anaerobic digestion: technical aspects. Appl. Environ. Microbiol., 51, 572-579

ISA Z., GRUSENMEYER S., VERSTRAETE W. (1986b)

Sulfate reduction relative to methane production in high rate anaerobic digestion: microbiological aspects. Appl. Environ. Microbiol., 51, 580-587

JERIS J.S., MC CARTY P.L. (1965)

The biochemistry of methane fermentation using C¹⁴ tracers. J. Wat. Poll. Contr. Fed., 37, 178-192

JOHNS A.T., BARKER H.A. (1960)

Methane formation; fermentation of ethanol in the absence of carbon dioxide by *Methanobacillus omelianskii*. J. Bacteriol., 80, 837-841

JONES W.J., DONNELLY M.T., WOLFE R.S. (1985)

Evidence of a common pathway of carbon dioxide reduction to methane in methanogens. J. Bacteriol., 163, 126-131

JONES W.J., NAGLE D.P., WHITMANS W.B. (1987)

Methanogens and the diversity of archaeobacteria. Microbial. Rev., 51, 135-177

JUNGERMANN K., THAUER R.K., RUPPRECHT E., OHRLOFF C., DECKER K. (1969)

Ferredoxin mediated hydrogen formation from NADPH in a cell-free system of *Clostridium kluyveri*. FEBS Lett., 3, 144-146

JUNGERMANN K., THAUER R.K., LEIMENSTOLL G., DECKER K. (1973)

Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxine oxidoreductases in saccharolytic *Clostridia*. Biochim. Biophys. Acta, 305, 268-280

KAISER J.P., HANSELMANN K.W. (1982)

Fermentative metabolism of substituted monoaromatic compounds by a bacterial community from anaerobic sediments. Arch. Microbiol., 133, 185-194

KIM J.O., AKAGI J.M. (1985)

Characterization of a trithionate reductase system from *Desulfovibrio vulgaris*. J. Bacteriol., 163, 472-475

KING G.M. (1984)

Metabolism of trimethylamine, choline and glycine betaine by sulfate reducing and methanogenic bacteria in marine sediments. Appl. Environ. Microbiol., 48, 719-725

KLEMPES R., CYPIONKA H., WIDDEL F., PFENNIG N. (1985)

Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. Arch. Microbiol., 143, 203-208

KOCH M., DOLFING J., WUHRMANN K., ZEHNDER A.J.B. (1983)

Pathways of propionate degradation by enriched methanogenic cultures. Appl. Environ. Microbiol., 45, 1411-1414

KRISTJANSSON J.K., SCHONHEIT P., THAUER R.K. (1982)

Different K_s value for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. Arch. Microbiol., 131, 278-282

KRUMHOLZ L.R., BRYANT M.P. (1985)

Clostridium pfenigii sp. nov. uses methoxyl group of monobenzoids and produces butyrate. Int. J. Syst. Bacteriol., 35, 454-456

KRUMHOLZ L.R., BRYANT M.P. (1986)

Eubacterium oxidoreductans sp. nov. requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. Arch. Microbiol., 144, 8-14

LAANBROEK H.J., ABEE T., VOOGD I.L. (1982)

Alcohol conversion by *Desulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. Arch. Microbiol., 133, 178-184

LAANBROEK H.J., GEERLIGS H.J., SIJTSMA L., VELDKAMP H. (1984)

Competition for sulfate and ethanol among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* species isolated from intertidal sediments. Appl. Environ. Microbiol., 47, 329-334

LEE J.P., PECK H.D. jr (1971)

Purification of the enzyme reducing bisulfite to trithionate from *Desulfovibrio gigas* and its identification as desulfovibrin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 583-589

LEE J.P., YI C.S., LEGALL J., PECK H.D. jr (1973)

Isolation of a new pigment, desulforubidine, from *Desulfovibrio desulfuricans* (Norway strain) and its role in sulfite reduction. J. Bacteriol., 115, 453-455

LEE S.Y., MABEE M.S., JANGAARD M.O. (1978)

Pectinatus, a new genus of the family Bacteroidaceae. Inter. J. Syst. Bacteriol., 28, 582-594

LEGALL J., MAZZA G., DRAGONI N. (1965)

Le cytochrome c₃ de *Desulfovibrio gigas*. Biochim. Biophys. Acta, 56, 385-387

LEGALL J., BRUSHI-HERIAUD M. (1968)

Purification and some properties of a new cytochrome from *Desulfovibrio desulfuricans*. Dans: Structure and fonction of cytochromes (Okuniki K., Kamen M.D., Siekusu I. eds), Univ. Tokio, Press and University Park, p 467

LEGALL 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

LEIGH J.A., MAYER F., WOLFE R.S. (1981)

Acetogenium kivui, a new thermophilic hydrogen-oxidizing, acetogenic bacterium. Arch. Microbiol., 129, 275-280

LOROWITZ W.H., BRYANT M.P. (1984)

A *Peptosterptococcus productus* strain grows rapidly with CO as energy source. Appl. Environ. Microbiol., 47, 961-964

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. (1983)

Methanogenesis from methanol and methylamines and acetogenesis from hydrogen and carbon dioxide in the sediments of an eutrophic lake. Appl. Environ. Microbiol., 45, 1310-1315

LOVELEY D.R. (1985)

Minimum threshold for hydrogen metabolism in methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 49, 1530-1531

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 degrees. Appl. Environ. Microbiol., 41, 1363-1373

MAZE P. (1903)

Sur la fermentation forménique et le ferment qui la produit. C. R. Acad. Sci., 137, 887-889

MAZE P. (1915)

Ferment forménique, fermentation forménique de l'acetone, procédé de culture simple du ferment forménique. C. R. Soc. Biol., 78, 398-405

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

MC INERNEY M.J., BRYANT M.P. (1980)

Syntrophic associations of H₂-utilizing methanogenic bacteria and H₂-producing alcohol and fatty acid-degrading bacteria in anaerobic degradation of organic matter. Dans: Anaerobes and anerobic infections (Gottschalk et al. eds), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp 117-126

MC INERNEY M.J., BRYANT M.P. (1981)

Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of H₂ on acetate degradation. Appl. Environ. Microbiol., 41, 346-354

MC INERNEY M.J., BRYANT M.P., HESPELL R.B., COSTERTON J.W. (1981)

Syntrophomonas wolfei gen. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol., 41, 1029-1039

MILLER T.L., WOLIN M. (1974)

A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. Appl. Microbiol., 27, 985-987

- MOLLER B., OSSMER R., HOWARD B.H., GOTTSCHALK G., HIPPE H. (1984)
Sporomusa, a new genus of gram negative anaerobic bacteria including
Sporomusa phenoides sp. nov., and *Sporomusa ovata* sp. nov. Arch. Microbiol.,
139, 388-396
- MOLLETA R., DUBOURGUIER H.C., ALBAGNAC G. (1985)
dans: Energy from biomass (Palz W. and Coombs J. eds), Elsevier, pp 516-521
- MOUNTFORT D.O., ASCHER R.A., MAYS E.L., TIEDJE J.M. (1980)
Carbon and electron flow in mud and sandflat intertidal sediments at
Delaware Inlet, Nelson, New Zealand. Appl. Environ. Microbiol., 39, 686-694
- MOUNTFORT D.O., ASHER R.A. (1981)
Role of sulfate reduction versus methanogenesis in terminal carbon flow in
polluted intertidal sediment. Appl. Environ. Microbiol., 42, 252-258
- MOUNTFORT D.O., BRYANT M.P. (1982)
Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate-
degrading bacterium from sewage sludge. Arch. Microbiol., 133, 249-256
- MOUNTFORT D.O., BRULLA W.J., KRUMHOLZ L.R., BRYANT M.P. (1984)
Syntrophus buswelli gen. nov. sp. nov. : a benzoate catabolizer from
methanogenic ecosystems. Inter. J. Syst. Bacteriol., 34, 216-217
- NAKAJIMA K., SUZUKI N., IMAHORI S. (1978)
J. Biochem., 84, 193-201
- NOTTINGHAM P.M., HUNGATE R.E. (1969)
Methanogenic fermentation of benzoate. J. Bacteriol., 98, 1170-1172
- O'BRIEN W.E., LJUNGDAHL L.G. (1972)
Fermentation of fructose and synthesis of acetate from carbon dioxide by
Clostridium formicoaceticum. J. Bacteriol., 109, 626-632
- ODOM J.M., PECK H.D.jr (1981)
Localization of dehydrogenases, reductase and electron transfer components
in the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. J. Bacteriol., 147,
161-169
- ODOM J.M., PECK H.D.jr (1981)
Hydrogen cyclic as a general mechanism for energy coupling in the sulfate
reducing bacteria, *Desulfovibrio* sp.. FEMS Microbiol. Lett., 12, 47-50
- OLIVIER B., CORD-RUVISCH R., LOMBARDO A., GARCIA J.L. (1985)
Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a
methylotrophic homoacetogenic bacterium. Arch. Microbiol., 142, 307-310
- OMELIANSKI V.L. (1897)
Sur la fermentation cellulosique. C. R. Acad. Sci., 125, 1131-1133
- OMELIANSKI V.L. (1898)
Sur la fermentation de la cellulose. Arch. Sci. Biol., 7, 411-435
- OMELIANSKI V.L. (1904)
Über die trennung der wasserstoff und methangarung der cellulose. Centralb.
Bakt., 2, 369-377

OMELIANSKI V.L. (1906)

De la mise en liberté de methane au cours de processus biologiques naturels. Arch. Sci. Biol., 12, 113-131

OMELIANSKI V.L. (1916)

Fermentation methanique de l'alcool éthylique. Ann. Inst. Pasteur, 30, 56-60

OREMLAND R.S., MARSH L.M., POLCIN S. (1982)

Methane production and simultaneous sulfate reduction on anoxic, salt marsh sediments. Nature, 296, 143-145

OREMLAND R.S., POLCIN S. (1982)

Methanogenesis and sulfate reduction : competitive and non competitive substrates in estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol., 44, 1270-1276

PINE L., BARKER H.A. (1954)

Tracer experiments on the mechanism of acetate formation from carbon dioxide by *Butyribacterium rettgeri*. J. Bacteriol., 68, 216-226

PIPYN P. VERSTRAETE W. (1981)

Lactate and ethanol as intermediates in two-phase anaerobic digestion. Biotechnol. Bioeng., 23, 1145-1154

PFENNIG N., WIDDEL F., TRUPER H.G. (1981)

The dissimilatory sulfate reducing bacteria. Dans: The procaryotes (Starr M. P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G eds), Springer, pp 926-940

POPOFF L. (1875)

Pfuger's Arch. f. Ges. Physiol., 10, 113

POSTGATE J.R. (1956)

Cytochrome c_3 and Desulfoviridin : pigments of the anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans*. J. Gen. Microbiol., 14, 545-572

POSTGATE J.R. (1979)

The sulfate reducing bacteria, Cambridge University Press

REDDY C.A., BRYANT M.P., WOLIN M.J. (1972a)

Characteristic of S organism isolated from *Methanobacillus omelianskii*. J. Bacteriol., 109, 539-545

REDDY C.A., BRYANT M.P., WOLIN M.J. (1972b)

Ferredoxin and NAD-dependent H_2 production from ethanol and formate in extracts of S organism isolated from *Methanobacillus omelianskii*. J. Bacteriol., 110, 126-132

REDDY C.A., BRYANT M.P., WOLIN M.J. (1972c)

Ferredoxin dependent conversion of acetaldehyde to acetate and H_2 in extracts of S organism. J. Bacteriol., 110, 133-138

ROBINSON J.A., TIEDJE J.M. (1984)

Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H_2 under resting and growing conditions. Arch. Microbiol., 137, 26-32

ROY F. (1985)

Fermentation méthanique des déchets glucidiques et des lipides. Expérimentation en fermenteurs pilote, Thèse Univ. Sci. Tech. de Lille I

SAMAIN E. (1980)

Etude de la phase acidifiante de la fermentation méthanique des glucides,
D.E.A., Univ. Sci. Tech. de Lille I.

SAMAIN E. (1983)

Métabolisme des composés intermédiaires de la fermentation méthanique.
Thèse Univ. Sci. Tech. de Lille I.

SCHULTON D.R., TIEDJE J.M. (1984)

Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. Appl. Environ. Microbiol., 48, 840-848

SCHINK B., PFENNIG N. (1982a)

Fermentation of trihydroxybenzenes by *Pelobacter acidigallici* gen. nov. sp. nov., a new strictly anaerobic non sporeforming bacterium. Arch. Microbiol., 133, 195-201

SCHINK B., PFENNIG N. (1982b)

Propionigenium modestum gen. nov. sp. nov. a new strict anaerobic, non sporing bacterium growing on succinate. Arch. Microbiol., 133, 209-216

SCHINK B., THOMPSON T.E., ZEIKUS J.G. (1982)

Characterization of *Propionispira arboris* gen. nov. sp. nov., a nitrogen fixing anaerobe common to wetwoods of living trees. J. Gen. Microbiol., 128, 2771-2779

SCHINK B., STIEB M. (1983)

Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, non sporeforming bacterium. Appl. Environ. Microbiol., 45, 1905-1913

SCHINK B. (1984)

Fermentation of 2,3-butanediol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov. and *Pelobacter propionicus* sp. nov.. Arch. Microbiol., 137, 33-41

SCHNELLEN (1947)

Onderzoekingen over de methaangisting, Dissertation, Tech. Univ. Delft., De Maasstadt, Rotterdam

SCHONHEIT P., FRISTJANSSON J.K., THAUER R.K. (1982)

Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate. Arch. Microbiol., 132, 285-288

SHARAK GENTHNER B.R., DAVIS C.L., BRYANT M.P. (1981)

Feature of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol and H₂ CO₂ utilizing species. Appl. Environ. Microbiol., 42, 12-19

SMITH L.P., MAH R.A. (1966)

Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. Appl. Environ. Microbiol., 14, 368-371

SOEHNGEN N.L. (1910)

Sur le rôle du méthane dans la vie organique. Rec. Trav. Chim. des Pays-Bas et de la Belgique, 29, 238-274

STADTMAN T.C., BARKER H.A. (1949)

Study on the methane fermentation. VII. Tracer experiments on the mechanism of methane formation. Arch. Biochem., 21, 256-264

STADTMAN T.C., BARKER H.A. (1951a)

Study on the methane fermentation. VIII. Tracer experiments on fatty acid oxidation by methane bacteria. J. Bacteriol., 61, 67-80

STADTMAN T.C., BARKER H.A. (1951b)

Study on the methane fermentation. IX. The origin of methane in the acetate and methanol fermentations by *Methanosarcina*. J. Bacteriol., 61, 81-86

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 aspect of the electron donor metabolism of sulfate reducing bacteria, Thesis, Univ. Groningen

STIEB M., SCHINK B. (1985)

Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. Arch. Microbiol., 140, 387-390

STIEB M., SCHINK B. (1986)

Anaerobic degradation of isovalerate by a defined methanogenic coculture. Arch. Microbiol., 144, 291-295

SZEWZYK U., SZEWZYK R., SCHINK B. (1985)

Methanogenic degradation of hydroquinone and catechol via reductive dehydroxylation to phenol. FEMS Microbiol. Ecol., 31, 79-87

TARVIN D., BUSWELL A.J. (1934)

The methane fermentation of organic acids and carbohydrate. J. Amer. Chem. Soc., 56, 1751-1755

TANNER R.S., STACKEBRANDT E., FOX G.E., WOESE C.R. (1981)

A phylogenetic analysis of *Acetobacterium woodii*, *Clostridium barkeri*, *Clostridium lituseburens*, *Eubacterium limosum* and *Eubacterium tenue*. Curr. Microbiol., 5, 35-38

TANNER R.S., STACKEBRANDT E., FOX G.E., GUPTA R., MAGRUM L.J. (1982)

A phylogenetic analysis of anaerobic eubacteria capable of synthesizing acetate from carbon dioxide. Curr. Microbiol., 7, 127-132

THAUER R.K., JUNGERMAN K., DECKER K. (1977)

Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacterial Rev., 41, 100-157

THAUER R.K., MORRIS J.G. (1984)

Metabolism of chemotrophic anaerobes : old views and new aspects. Dans: The microbes, part 2, Prokaryotes and Eukaryotes (Kelly D.P., Carr N.G. eds), Cambridge University Press, pp 123-168

THOMAS I. (1986)

Profils protéiques et immunochimiques des méthanogènes. Thèse Univ. Sci. Tech. de Lille I.

TRAORE A. (1981)

Energétique de la croissance des bactéries sulfatoréductrices lorsque l'accepteur final d'électrons est le sulfate ou une bactérie méthanigène, Thèse, Univ. d'Aix-Marseille.

TRUDINGER P.A. (1970)

Carbon monooxide-reacting pigment from *Desulfotomaculum nigrificans* and its possible relevance to sulfite reduction. J. Bacteriol., 104, 158-170

TSCHECH A., SCHINK B. (1985)

Fermentative degradation of resorcinol and resorcylic acids. Arch. Microbiol., 143, 52-59

TSCHECH A., SCHINK B. (1986)

Fermentative degradation of monohydroxybenzoates by defined syntrophic cocultures. Arch. Microbiol., 145, 396-402

TWAROG R., WOLFE R.S. (1962)

Enzymatic phosphorylation of butyrate. J. Biol. Chem., 237, 2474-2477

UEKI A., MATSUDA K., OHTSUKI C. (1986)

Sulfate-reduction in the anaerobic digestion of animal waste. J. Gen. Appl. Microbiol., 32, 111-123

VALENTINE R.C., WOLFE R.S. (1960)

Purification and role of phosphotransbutyrylase. J. Biol. Chem., 235, 1948-1952

WENG C.N., JERRIS J.S. (1976)

Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. Water Res., 10, 9-18

WIDDEL F. (1980)

Anaerober abbau von fettsäuren und benzoessäure durch neu isoliertearten von sulfat-erdurzirenderbakterien, Doktorat Thesis, Göttingen

WIDDEL F., PFENNIG N. (1984)

dans: Bergey's manual of systematic bacteriology (Krieg N.R., Holt J.G. eds), Williams end Wilkins, Vol 1, pp 663-679

WIDDEL F. (1986)

Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. Appl. Environ. Microbiol., 51, 1056-1062

WIDDEL F. (1986)

Microbiology and ecology of sulfate and sulfur reducing bacteria. Dans: Environmental microbiology of microbes (ZHENDER A.J.B. eds), in press.

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

WIEGEL J., BRAUN M., GOTTSCHALK G. (1981)

Clostridium thermoautotrophicum species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. Curr. Microbiol., 5, 255-260

WIERINGA K.T. (1936)

Over het verdwynen van waterstof enkoolsmir onder anaerobe voorwaarden. Antonie Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol., 3, 263-273

WIERINGA K.T. (1940)

The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic sporeforming bacteria. *Antonie Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, 6, 251-262

WINFREY M.R., WARD D.M. (1983)

Substrates for sulfate reduction and methane production in intertidal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 193-199

WINTER J.U., WOLFE R.S. (1980)

Methane formation from fructose by syntrophic associations of *Acetobacterium woodii* and different strains of methanogens. *Arch. Microbiol.*, 124, 73-79

WOLFE R.S. (1979)

Biochemical pathways and control. 1^o Symposium on anaerobic digestion, Cardiff

WOLFE R.S. (1985)

Unusual coenzymes of methanogenesis. *Trends in Biochem. Sci.*, 10, 396-399

WOLIN E.A., WOLIN M.J., WOLFE R.S. (1963)

Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.*, 238, 2882-2886

WOLIN M.J. (1974)

Metabolic interactions among intestinal microorganisms. *Arch. Microbiol.*, J.Clin. Nutr., 27, 1320-1328

WOLIN M.J. (1976)

Interactions between hydrogen-producing and methane-producing species. Dans: *Microbiol production and utilisation of gases* (Schlegel H.G., Gottschalk G., Pfennig N. eds), Göttingen, pp 141-150

WOOD W.A. (1961)

Fermentation of carbohydrate and related compounds. Dans: *The bacteria* (Gunsalus I.C., Stanier R.Y. eds), vol. II, Academic Press, pp 76-78

YOUSTEN A.A., DELWICHE E.A. (1961)

Biotin and vitamin B₁₂ coenzymes in succinate decarboxylation by *Propionibacterium pentosaceum* and *Veillonella alcalescens*. *Bacteriol. Proc.*, 61, 175

ZEHNDER A.J.B., HUSER B.A., BROCK T.D., WUHRMANN K. (1980)

Characterization of an acetate-decarboxylating, non hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, 124, 1-11

ZEHNDER A.J.B. (1981)

Microbiology of methane bacteria. Dans: *Anaerobic Digestion* (Hughes et al. eds), Elsevier Biomedical Press, pp 45-68

ZEIKUS J.G., WOLFE R.S. (1972)

Methanobacterium thermoautotrophicum sp. nov., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, 109, 707-713

ZEIKUS J.G. (1979)

Microbiol populations in anaerobic digesters. 1st International Symposium on Anaerobic Digestion, Cardiff

ZEIKUS J.G., LYND L.H., TOMPSON T.E., KRZYCKI J.A., WEIMER P.J., HEGGE P.W. (1980)

Isolation and characterization of a new methylotrophic, acidogenic anaerobe, the marburg strain. *Curr. Microbiol.*, 3, 423-456

RESUME

Dans les écosystèmes méthanogènes, les métabolites intermédiaires (alcools, acides organiques et acides gras volatils) produits lors de la première étape de la fermentation des matières organiques sont dégradés en acétate et H_2 , seuls substrats assimilables par les bactéries méthanogènes. Ces réactions sont réalisées par des bactéries dites acétogènes productrices obligées d'hydrogène (O.H.P.A.) qui peuvent être soit des sulfatoréducteurs, soit des organismes mal définis taxonomiquement et appelés bactéries "syntrophes".

Dans ce mémoire, nous avons énuméré et identifié les bactéries responsables de la dégradation, dans des digesteurs anaérobies industriels, de l'éthanol, du lactate et des acides gras à plus de 3 carbones, et avons précisé les rôles respectifs des sulfatoréducteurs et des bactéries syntrophes.

Ce travail nous a permis d'isoler des souches originales de par leur morphologie, leur physiologie ou leur métabolisme et nous a conduit à décrire 3 nouvelles espèces bactériennes: *Desulfobulbus elongatus*, *Syntrophomonas sapovorans* et *Clostridium neopropionicum*.

Contrairement aux *Desulfovibrio*, les bactéries sulfatoréductrices utilisatrices de propionate du genre *Desulfobulbus* ne peuvent être cultivées en absence de sulfate en association syntrophique avec des méthanogènes. Afin de comprendre les raisons de cette importante différence physiologique, nous avons déterminé les activités hydrogénasiques de *Desulfobulbus elongatus* et étudié les protéines d'oxydo-réduction impliquées dans le métabolisme du propionate et de l'hydrogène. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un mécanisme de régulation de l'activité hydrogénasique et purifier un cytochrome c_3 à haut potentiel, dont la présence pourrait être liée au métabolisme du propionate qui implique une déshydrogénation du succinate en fumarate.

