

GERBAM — Deuxième Colloque International de Bactériologie marine — CNRS, Brest, 1-5 octobre 1984
IFREMER, Actes de Colloques, 3, 1986, pp. 89-95

9

INTERRELATIONS ENTRE DES COMMUNAUTÉS MIXTES DE BACTÉRIES ANAÉROBIES ISOLÉES DE SÉDIMENTS MARINS

D.G. MARTY

Microbiologie Marine CNRS - ER 223

Université de Provence 3, place Victor-Hugo - 13331 MARSEILLE (FRANCE)

RÉSUMÉ - Des expériences de cultures mixtes simplifiées associant différents types de bactéries anaérobies d'origine marine, susceptibles d'intervenir dans la minéralisation de la cellulose (bactéries cellulolytiques, bactéries fermentatives non-cellulolytiques et bactéries méthanogènes), ont été effectuées. Ces études ont permis de mettre en évidence à la fois des phénomènes d'inhibition (inhibition de la souche méthanogène en présence d'un développement important des souches fermentatives) et des phénomènes de synergie (utilisation par la souche fermentative non-cellulolytique de métabolites produits par la souche cellulolytique ; accélération de l'hydrolyse de la cellulose en présence de la souche fermentative non-cellulolytique ; transfert d'hydrogène interspécifique entre les souches fermentatives et la souche méthanogène).

Mots clés : bactérie anaérobie, sédiment marin, méthanogenèse, cellulolyse, fermentation.

ABSTRACT - The mineralization of cellulose was examined in mono and cocultures of marine anaerobic bacteria (cellulolytic bacteria, fermentative non-cellulolytic bacteria and methane-producing bacteria). These studies displayed interactions between these groups of microorganisms : inhibition relationships (inhibition of methanogens during active growth of fermentative bacteria) and syntrophic relationships (growth of fermentative non-cellulolytic bacteria depended on metabolites produced by cellulolytic bacteria ; increase in rate of cellulose hydrolysis in presence of fermentative non-cellulolytic bacteria ; interspecies H₂ transfer reaction between fermentative bacteria and methane-producing bacteria).

Key words : anaerobic bacteria, methanogenesis, cellulolysis, fermentation, marine sediment.

INTRODUCTION

Si de nombreux sédiments marins renferment des bactéries méthanogènes, il est difficile de quantifier le rôle de ces dernières dans la minéralisation de la matière organique. En effet, la présence de sulfate dans le milieu océanique permet le développement de populations sulfato-réductrices. Les bactéries sulfato-réductrices pouvant utiliser les mêmes substrats que les bactéries méthanogènes et présentant des constantes d'affinité plus faibles pour ces substrats, dans la plupart des sédiments marins, le processus de sulfato-réduction devient prédominant au détriment de la méthanogenèse (Abram et Nedwell, 1978 ; Winfrey et Zeikus, 1979 ; Nedwell et Banat, 1981 ; Marty, 1981 ; Winfrey *et al.*, 1981 ; Kristjansson *et al.*, 1982 ; Lovley *et al.*, 1982 ; Winfrey et Ward, 1983). Toutefois, pour des raisons encore mal connues (microzonation dans le sédiment, présence de substrats spécifiques aux bactéries méthanogènes ...), dans les sédiments dominés par la sulfato-réduction, on peut observer une faible production de méthane (Atkinson et Richards, 1967 ; King et Wiebe, 1980 ; Senior *et al.*, 1982 ; King, 1984). Bien que la production de méthane ne soit pas le processus dominant dans les sédiments marins

anoxiques, les bactéries méthanogènes étant présentes et fonctionnelles, elles peuvent donc intervenir dans la minéralisation de la matière organique. Cette minéralisation est le résultat de l'activité métabolique combinée et coordonnée de différentes populations bactériennes présentant chacune des fonctions cataboliques distinctes vis-à-vis du carbone (Bryant, 1976, 1979 ; Zehnder, 1978 ; Wolfe et Higgins, 1979) :

- les bactéries hydrolytiques qui excrètent des enzymes extracellulaires hydrolysant les polymères et qui catabolisent les produits de cette hydrolyse en acides gras, alcools, hydrogène et gaz carbonique ;
- les bactéries acétogènes productrices d'hydrogène, qui convertissent les acides gras et les alcools en acétate et hydrogène (oxydation couplée à la réduction des protons en hydrogène moléculaire) ;
- les bactéries méthanogènes qui catabolisent l'acétate et les composés mono-carbonés en méthane.

La stabilité de ces processus de minéralisation est le reflet d'interactions qui aboutissent à l'établissement de conditions optimales pour le métabolisme anaérobie, comprenant l'approvisionnement en éléments nutritifs, la suppression de métabolites inhibant ces processus et l'accroissement des vitesses cataboliques spécifiques. Les bactéries méthanogènes exerceraient trois sortes de fonctions régulatrices : régulation des protons, régulation des électrons et régulation des éléments nutritifs. La régulation des électrons *via* le catabolisme de l'hydrogène, qui a été étudiée ici, semble importante au niveau de la création de conditions thermodynamiquement favorables au catabolisme des composés multi-carbonés (Zeikus, 1980).

Afin d'étudier les phénomènes de synergie ou d'inhibition pouvant exister au sein de communautés bactériennes marines, des expériences de cultures mixtes associant différents types de bactéries susceptibles d'intervenir dans la minéralisation de la matière organique, ont été effectuées. Les études ont porté sur la dégradation de la cellulose par des monocultures, des dicultures et des tricultures.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Les bactéries utilisées lors de ces expériences de recombinaisons *in vitro* ont été isolées de sédiments marins lagunaires ou littoraux (Marty, 1983) :

. Souche C : bâtonnet sporulé, anaérobie strict, isolé de sédiments de la lagune du Brus, dégradant la cellulose.

. Souche F : bâtonnet asporulé Gram négatif, anaérobie facultatif, isolé de sédiments de la lagune du Brus, dégradant le cellobiose mais pas la cellulose.

. Souche M : bâtonnet asporulé, anaérobie strict, isolé de sédiments de la baie de Concarneau, produisant du méthane à partir de H_2-CO_2 et / ou du formate.

- Les expériences de recombinaison ont été effectuées en fioles de 600 ml contenant 400 ml de milieu de culture dont la composition est la suivante (en g/l) :

. Milieu minéral dérivant de celui de Zehnder et Wuhrmann (1977) : KH_2PO_4 0,41 ; $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 0,53 ; NH_4Cl 0,3 ; $NaCl$ 10 ; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,11 ;

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,11 ; $NaHCO_3$ 4 ;

. Réducteurs : Cystéine 0,3 ; Na_2S 0,3 ;

. Indicateur d'anaérobiose : résazurine 0,001 ;

. Solution d'oligo-éléments dérivant de celle de Ben-Bassat *et al.* (1981) (10 ml de solution par litre de milieu de culture) : Acide nitrilotriacétique neutralisé à pH 6,5 avec KOH 12,8 ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,1 ; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,17 ; $ZnCl_2$ 0,1 ; $NiSO_4$ 0,026 ; $CuCl_2$ 0,02 ; H_3BO_3 0,01 ; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,01 ; $NaCl$ 1 ; Na_2SeO_3 0,02 ;

- . Facteurs de croissance : extraits de levure 1 ; biotrypcase 1 ;
 - . Substrats : cellobiose ou CMC (carboxyméthylcellulose de sodium) 6-10 g/l.
- Après autoclavage en aérobiose, les fioles sont placées sous atmosphère dépourvue d'oxygène ($N_2 = 100 \%$). Le bicarbonate est autoclavé séparément dans des tubes hermétiquement clos et ajouté avant le dégazage des fioles, en même temps que les composés non-autoclavables stérilisés par filtration.
- Après ensemencement des fioles, des aliquotes de l'atmosphère des fioles et du milieu de culture sont prélevées toutes les heures et permettent de suivre :
- la disparition du substrat : le cellobiose et la CMC sont respectivement coupés en molécules de glucose sous l'action d'une β -glucosidase et d'une cellulase, puis le glucose est dosé par colorimétrie à 610 nm, après action de la glucose-oxydase, en présence de peroxydase et d'ABTS (Marty, 1983).
 - l'apparition et/ou la consommation des métabolites gazeux. . Détermination de H_2 , CO_2 et CH_4 par chromatographie en phase gazeuse à catharomètre (3 colonnes montées en série : une colonne silicagel, une colonne vide et une colonne tamis moléculaire ; température du four : $80^\circ C$, de l'injecteur : $100^\circ C$ et du détecteur : $110^\circ C$; filament : 120 mA ; gaz vecteur : Argon).
 - l'apparition des alcools. Détermination du méthanol, éthanol, isopropanol, propanol, isobutanol et butanol par chromatographie en phase gazeuse à ionisation de flamme (colonne Chromosorb 101 ; température du four : $165^\circ C$, de l'injecteur : $190^\circ C$ et du détecteur : $175^\circ C$; gaz vecteur : Argon).
 - l'apparition et/ou la consommation des acides gras volatils :
 - . Détermination du formate par dosage colorimétrique à 515 nm, après action chimique (Lang et Lang, 1972) ;
 - . Détermination du L et D-lactate par dosage colorimétrique à 340 nm, après action enzymatique (Tests combinaison Boehringer-Mannheim).
 - . Détermination de l'acétate, propionate, isobutyrate, butyrate, isovalérate et valérate par chromatographie en phase gazeuse à ionisation de flamme après acidification par H_3PO_4 (colonne Chromosorb WAW, SP 1220 15 % + H_3PO_4 1 % ; température du four : $120^\circ C$, de l'injecteur : $180^\circ C$ et du détecteur : $160^\circ C$; gaz vecteur : Hélium).
 - l'évolution des diverses populations bactériennes impliquées :
 - . Dénombrement des bactéries méthanogènes par MPN sur milieu H_2-CO_2 /formate préparé selon la technique de Hungate (1969) ;
 - . Dénombrement des bactéries cellulolytiques par MPN sur milieu CMC (Marty, 1983) ;
 - . Dénombrement des bactéries fermentatives non-cellulolytiques sur boîtes de Petri, milieu gélosé-cellobiose-glucose (Marty, 1983).
 - Les cultures réalisées sont :
 - . monocultures : souche C sur CMC
souche F sur cellobiose
 - . dicultures : souche C + souche F sur CMC
 - . tricultures : souche C + souche F + souche M sur CMC

RÉSULTATS ET DISCUSSION

- Les monocultures :

La souche F dégrade le cellobiose en gaz carbonique, acétate, éthanol, lactate, formate et un peu de butanol et d'hydrogène.

La souche C dégrade la CMC ou le cellobiose en hydrogène, gaz carbonique, acétate, éthanol, et un peu de propionate, formate et lactate (fig. 1).

- Les dicultures (souche C + souche F sur CMC)

Les dicultures dégradent la CMC en hydrogène, gaz carbonique, acétate, éthanol, un peu

Figure 1 : Monoculture
(Souche C sur CMC)

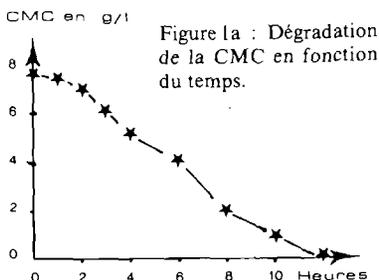
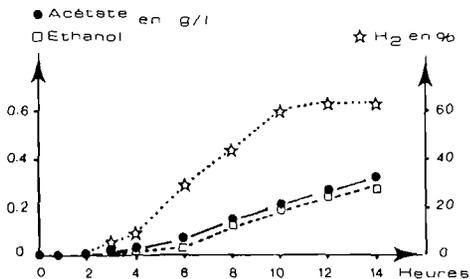


Figure 1b : Production d'Acétate Ethanol et H₂ en fonction du temps.



de propionate, et une production plus ou moins importante de formate et lactate (fig. 2). On observe le développement concomitant des deux populations fermentatives, la CMC étant dégradée par la souche C, le lactate et le formate étant produits par la souche F. Il y a donc association syntrophique entre la souche C et la souche F, cette dernière, incapable de s'attaquer à la CMC, seul substrat disponible, dépend de la souche C pour son approvisionnement en carbone utilisable (sans doute le cellobiose libéré dans le milieu de culture après action des CMCases extracellulaires de la souche C).

Figure 2 : Diculture

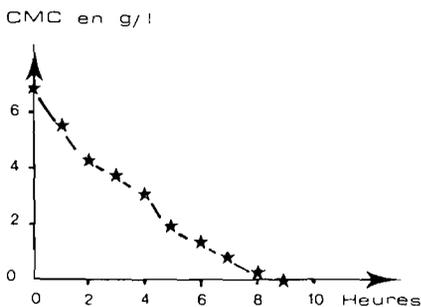


Figure 2a : Dégradation de la CMC en fonction du temps

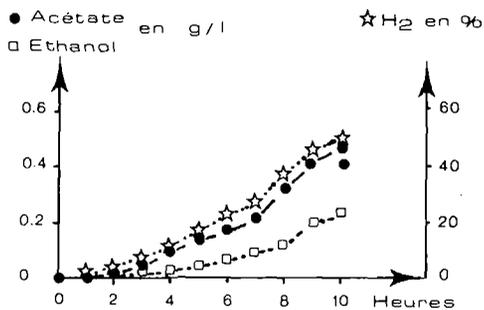


Figure 2b : Production d'Acétate, Ethanol et H₂ en fonction du temps.

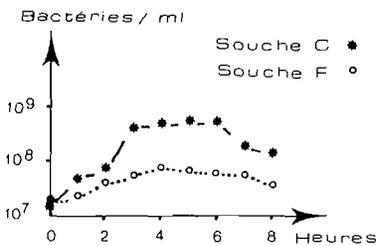


Figure 2c : Evolution des populations bactériennes en fonction du temps.

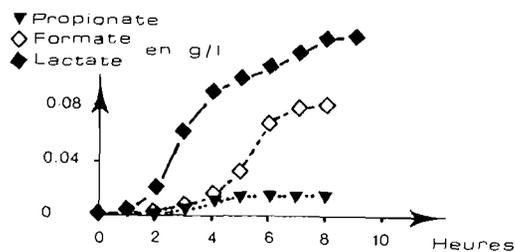


Figure 2d : Production de Propionate, Formate et Lactate en fonction du temps.

Dans un certain nombre d'expériences (Marty, 1983), les études de dénombrements bactériens ont montré la suprématie de la population cellulolytique par rapport à la population non-cellulolytique. Dans ce cas, les métabolites produits par la souche F sont en quantité moindre que dans les cultures où les deux populations bactériennes présentent des effectifs similaires.

Lorsque les développements des deux souches sont analogues, on observe un accroissement de la vitesse de la cellulolyse par rapport à celle enregistrée dans les monocultures de la souche C ou dans les dicultures où la souche C prédomine. Cette accélération de l'hydrolyse de la cellulose avait déjà été observée par Ng *et al.* (1981) sur des cocultures associant *Clostridium thermocellum* (souche thermophile cellulolytique) et *Clostridium thermohydrosulfuricum* (souche thermophile, non-cellulolytique, capable de dégrader de nombreux sucres dont le cellobiose). Les auteurs en avaient conclu que dans la diculture, la consommation rapide par la souche non-cellulolytique, de produits hydrolytiques tels que des sucres réduits pouvait faciliter la dégradation de la cellulose. Ces produits hydrolytiques réduits ne seraient ni le glucose, ni le cellobiose qui, ne s'accumulant jamais dans le milieu de culture, n'apparaissent pas comme des facteurs limitant la cellulolyse.

- Les tricultures (souche C + souche F + souche M)

Les tricultures dégradent la CMC en acétate, gaz carbonique, et méthane, avec production variable d'hydrogène, formate, lactate, propionate et éthanol (fig. 3).

Figure 3 : Triculture
(Souche C + Souche F + Souche M sur CMC)

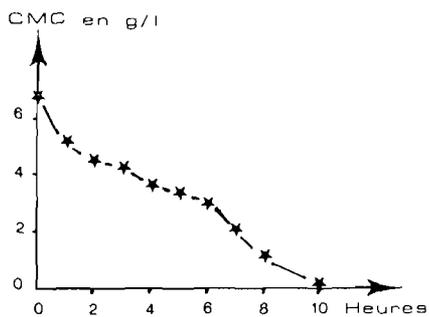


Figure 3a : Dégradation de la CMC en fonction du temps.

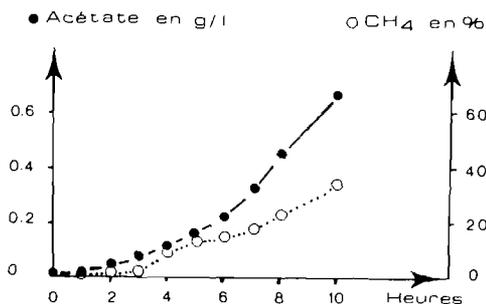


Figure 3b : Production d'Acétate et CH₄ en fonction du temps.

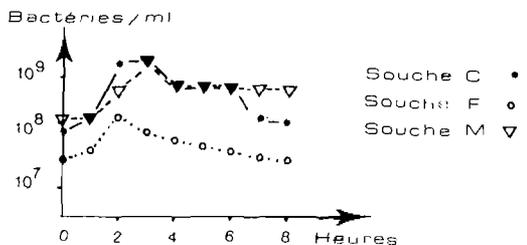


Figure 3c : Evolution des populations bactériennes en fonction du temps.

Certaines expériences ont mis en évidence des phénomènes d'inhibition : lorsque le développement des deux souches fermentatives est particulièrement important, on observe une inhibition temporaire ou définitive du développement de la souche méthanogène. Une telle inhibition dont le mécanisme n'a pas encore été éclairci avait déjà été observée par Weimer et Zeikus (1977) dans des dicultures associant *Clostridium thermocellum* (souche cellulolytique thermophile) et *Methanobacterium thermoautotrophicum* (souche méthanogène thermophile).

Outre ces phénomènes d'inhibition, des phénomènes de synergie, plus ou moins importants ont été mis en évidence :

- Dans certaines expériences, les souches fermentatives ont pratiquement atteint la phase stationnaire de leur développement quand la souche méthanogène commence la phase exponentielle de sa croissance. Dans un premier temps, il y a donc production de métabolites identiques à ceux obtenus en dicultures : hydrogène, gaz carbonique, acétate, éthanol, formate, lactate et propionate. Lorsque la souche méthanogène se développe, elle consomme l'hydrogène, le gaz carbonique et le formate, et produit du méthane. Le formate et l'hydrogène sont entièrement consommés, montrant qu'ils sont les facteurs limitant la quantité de méthane formé.

- Lorsque la souche méthanogène commence à se développer au cours de la phase exponentielle des souches fermentatives, il y a des interactions suffisantes entre les souches fermentatives et la souche méthanogène pour que cette dernière puisse altérer le métabolisme des premières. Plus la quantité d'hydrogène produit par les souches fermentatives est consommée rapidement par la souche méthanogène, plus l'influence de celle-ci sur le métabolisme fermentatif est important. On observe alors une production de gaz carbonique, méthane et acétate, une faible production d'éthanol, les autres acides gras volatils n'étant pas produits.

Afin d'obtenir un développement simultané des trois populations bactériennes, nous avons suivi la technique préconisée par Chen et Wolin (1977) : préculture de la souche méthanogène en fiole sous H_2-CO_2 , cette fiole étant par la suite utilisée pour la triculture après ajout de CMC et déplacement de l'atmosphère $H_2-CO_2-CH_4$ par $N_2 = 100\%$. On observe alors une production d'acétate, gaz carbonique et méthane, l'hydrogène étant utilisé au fur et à mesure de sa production par la souche méthanogène, l'éthanol, formate, lactate, propionate et butanol n'étant pas produits. Il y a donc transfert d'hydrogène interspécifique avec déviation du flux d'électrons produits au cours de la fermentation. Les électrons sont détournés de la production de produits organiques réduits (éthanol, formate, lactate, propionate) vers la réduction de protons, la formation d'hydrogène moléculaire devenant alors le principal "puits à électrons". Etant donné les propriétés thermodynamiques de ce processus qui est endergonique, un tel détournement de flux des électrons nécessite une élimination constante de l'hydrogène moléculaire formé, et le système méthanogène est le mécanisme le plus efficace pour maintenir une pression partielle en hydrogène extrêmement faible.

Ces expériences de recombinaison *in vitro* ont permis de mettre en évidence la capacité des communautés bactériennes marines à dégrader la cellulose jusqu'au stade méthane. A l'intérieur de ces communautés microbiennes existent des phénomènes de synergie (transfert d'hydrogène interspécifique entre les souches fermentatives et la souche méthanogène ; utilisation par les souches fermentatives non-cellulolytiques de métabolites produits par les souches cellulolytiques ; accélération de l'hydrolyse de la cellulose en présence des souches fermentatives non-cellulolytiques) et des phénomènes d'inhibition (inhibition de la croissance de la souche méthanogène lors d'un développement trop important des souches fermentatives). Le développement des souches méthanogènes correspond à l'étape limitant la vitesse de minéralisation de la cellulose, et la quantité d'hydrogène moléculaire produit par les souches fermentatives détermine la quantité de méthane formé.

La présence de bactéries méthanogènes dans les sédiments marins peut donc influencer le cycle de minéralisation de la matière organique en détournant le métabolisme des bactéries non-méthanogènes de la production d'acides gras volatils et alcools vers la production de composés mono ou di-carbonés (gaz carbonique, méthane, acétate) ; la présence de bactéries méthanogènes peut donc conduire à une minéralisation plus complète de la matière organique présente.

- ABRAM J.W., NEDWELL D.B., 1978. Inhibition of methanogenesis by sulphate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. *Arch. Microbiol.* 117 : 89-92.
- ATKINSON L.P., RICHARDS F.A., 1967. The occurrence and distribution of methane in the marine environment. *Deep Sea Res.* 14: 673-684.
- BRYANT M.P., 1976. The microbiology of anaerobic degradation and methanogenesis with special reference to sewage. *Microbial Energy conversion* , Seminar UNITAR Gottingen 4-8 oct. 1976, pp. 107-117.
- BRYANT M.P., 1979. Microbial methane production : theoretical aspects. *J. anim. Sci.* 48 : 193-201.
- CHEN M., WOLIN M.J., 1977. Influence of CH₄ production by *Methanobacterium ruminantium* on the fermentation of glucose and lactate by *Selenomonas ruminantium*. *Appl. environ. Microbiol.* 34 : 756-759.
- HUNGATE R.E., 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in Microbiology* Eds Norris and Ribbon, Academic Press Inc. , London, 3B : 117-132.
- KING G.M., WIEBE W.J., 1980. Regulation of sulfate concentrations and methanogenesis in salt marsh soils. *Estuarine Coast. Mar. Sci.* 10 : 215-223.
- KING G.M., 1984. Utilization of hydrogen, acetate, and "noncompetitive" substrates by methanogenic bacteria in marine sediments. *Geomicrobiol. J.* 3 : 275-306.
- KRISTJANSSON J.K., SCHONHEIT P., THAUER R.K., 1982. Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria : an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch. Microbiol.* 131 : 278-282.
- LANG E., LANG H., 1972. Spezifische Farbreaktion zum direkten Nachweis der Ameisensäure. *J. Anal. Chem.* 260 : 8-10.
- 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.
- MARTY D., 1981. Distribution of different anaerobic bacteria in Arabian Sea sediments. *Mar. Biol.* 63 : 277-281.
- MARTY D., 1983. Cellulolyse et méthanogénèse dans les sédiments marins. *Thèse d'Etat*, Université de Provence, Marseille.
- NEDWELL D.B., BANAT I.M., 1981. Hydrogen as an electron donor for sulfate reducing bacteria in slurries of salt marsh sediment. *Microbiol. Ecol.* 7 : 305-313.
- Ng T.K. BEN-BASSAT A., ZEIKUS J.G., 1981. Ethanol production by thermophilic bacteria : fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium Thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. environ. Microbiol.* 41 : 1337-1343.
- SENIOR E., LINDSTROM E.B., BANAT I.M., NEDWELL D.B., 1982. Sulfate reduction and methanogenesis in the sediment of a saltmarsh on the East Coast of the United Kingdom. *Appl. environ. Microbiol.* 43 : 987-996.
- WEIMER P.J., ZEIKUS J.G., 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. environ. Microbiol.* 33 : 289-297.
- WINFREY M.R., Zeikus J.G., 1979. Anaerobic metabolism of immediate methane precursors in Lake Mendota. *Appl. environ. Microbiol.* 37 : 244-253.
- WINFREY M.R., MARTY D., BIANCHI A., WARD D.M., 1981. Vertical distribution of sulfate reduction, methane production, and bacteria in marine sediments. *Geomicrobiol. J.* 2 : 341-362.
- WINFREY M.R., WARD D.M., 1983. Substrates for sulfate reduction and methane production in intertidal sediments. *Appl. environ. Microbiol.* 45 : 193-199.
- WOLFE R.S. HIGGINS I.J., 1979. Microbial biochemistry of methane. A study in contrasts. *Microbial Biochem* 21 : 267-300.
- ZEHNDER A.J.B., 1978. Ecology of methane formation. In Mitchell Ed., *Water pollution Microbiology*, Wiley and Sons, New York, 2 : 349-376.
- ZEIKUS J.G., 1980. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34 : 423-464.