

SYLVIE DUFRESNE

**Étude phylogénétique et physiologique
d'*Acidobacter disulfidooxidans* gen. nov. comb. nov.,
Methylobacterium lavalensis sp. nov. et *Thiobacillus thiooxidans*
formant un consortium bactérien**

**Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)**

**Microbiologie-Immunologie
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC**

AOÛT 1998



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-36263-9

Canada

Ce 11e jour du mois de juin 1998, les personnes soussignées, en leur qualité de membres du jury de la thèse de Mme Sylvie Dufresne, ont assisté à la soutenance de cette thèse.

<u>NOMS</u>	<u>UNIVERSITÉ</u>	<u>SIGNATURE</u>
<u>M. Jean-Guy Bisailon</u>	<u>Institut Armand Frappier</u>	
<u>M. Jean Bousquet</u>	<u>Université Laval</u>	
<u>M. Christian Vadeboncoeur</u>	<u>Université Laval</u>	
<u>M. Roger Guay</u>	<u>Université Laval</u>	

RÉSUMÉ

Acidobacter disulfidooxidans gen. nov. comb. nov., *Methylobacterium lavalensis* sp. nov. et *Thiobacillus thiooxidans* ont été identifiées parmi les espèces bactériennes d'un consortium isolé à partir de boues d'usine d'épuration des eaux usées et oxydant certains composés soufrés organiques. Les espèces bactériennes ont été identifiées sur la base de leurs phénotypes et sur la foi de résultats obtenus d'une étude phylogénétique. Elles sont toutes acidophiles et/ou acidotolérantes, et mésophiles en ce qui a trait à leur température optimale de croissance; de plus, elles sont autosuffisantes lorsqu'elles utilisent le soufre élémentaire comme source d'énergie. Par ailleurs, leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques diffèrent: *A. disulfidooxidans* est un bâtonnet gram-positif, formant des spores et mixotrophe; *T. thiooxidans* est un bâtonnet gram-négatif et autotrophe; et *M. lavalensis* est un bâtonnet gram-négatif, polymorphe et hétérotrophe. Des interactions mutualistes, commensales, antagonistes et compétitives ont été observées entre ces espèces.

RÉSUMÉ

L'oxydation des composés organiques soufrés par les microorganismes est complexe, ils sont souvent cométabolisés par plus d'une espèce bactérienne à la fois. Ce projet de recherche porte sur l'isolement et la caractérisation morphologique, phylogénétique et physiologique des différentes espèces bactériennes formant un consortium qui oxyde certains composés soufrés organiques et qui a été isolé à partir de boues d'usine d'épuration des eaux usées.

Acidobacter disulfidooxidans gen. nov. comb. nov., *Methylobacterium lavalensis* sp. nov. et *Thiobacillus thiooxidans* ont été isolés de ce consortium et caractérisés. Ces espèces bactériennes sont toutes acidophiles et/ou acidotolérantes, et mésophiles en ce qui a trait à leur température optimale de croissance; de plus, elles sont autosuffisantes en croissance dans le consortium lorsqu'elles utilisent le soufre élémentaire comme source d'énergie. *A. disulfidooxidans* est un bâtonnet gram-positif, formant des spores et des chaînes; il est chimiolithohétérotrophe, car il utilise des composés organiques comme source de carbone tout en ayant la capacité de tirer son énergie de l'oxydation de composés inorganiques. *T. thiooxidans* est un bâtonnet gram-négatif, mobile, thio-oxydant, acidifiant et chimiolithoautotrophe; alors que *M. lavalensis* est un bâtonnet gram-négatif, polymorphe, méthylotrophe et chimioorganohétérotrophe.

Plusieurs types d'interactions ont été observés. En premier lieu, *T. thiooxidans* a une relation d'antagonisme envers les autres espèces du consortium en raison de sa production d'acide sulfurique. Il manifeste aussi une relation mutualiste avec les *Acidobacter* sp. qui est probablement basée sur l'échange d'un facteur de croissance. Par ailleurs, *M. lavalensis* et les *Acidobacter* sp. ont probablement établi une relation commensale avec le *T. thiooxidans* en utilisant les métabolites organiques excrétés par ce dernier qui lui sont toxiques. Cependant, l'utilisation de ces métabolites par *M. lavalensis* et les *Acidobacter* sp. les fait vraisemblablement entrer eux-mêmes en compétition.

L'oxydation du soufre organique par le consortium n'a pas été résolue. Cependant, la composition du consortium ainsi que les rôles de chacun des partenaires ont été élucidés en grande partie. L'étude des consortia en est à ses débuts et progresse très lentement, car les technologies qui peuvent servir à suivre des populations microbiennes vivant dans un même environnement sont peu nombreuses

“ Sylvie Dufresne ”

Dr Roger Guay

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout spécialement le Dr Roger Guay mon directeur de thèse. J'ai apprécié sa disponibilité à tous moments, les encouragements et les conseils judicieux qu'il m'a apportés tout au long de mon doctorat. Je remercie Monsieur Aristide Pusterla pour son aide et ses précieux conseils lors de la préparation des échantillons et des séances de microscopie électronique; ainsi que le Dr. Karl Poralla pour l'analyse des lipides de l'*Acidobacter disulfidooxidans*. Je tiens aussi à remercier le Dr. Maurice Boissinot et son équipe pour leurs conseils et participation lors du séquençage de l'ADNr 16S de l'*A. disulfidooxidans*, ainsi que le Dr Brett Goebel pour les séquences des ADNr 16S et l'identification des autres partenaires du consortium. Je veux également remercier le Dr. Jean Bousquet ainsi que les membres de son laboratoire pour leur aide lors des analyses phylogénétiques de deux nouvelles bactéries isolées du consortium.

Je tiens à remercier tout spécialement le Dr. Philip Fedorak et sa famille pour leur soutien et leur accueil chaleureux à Edmonton, ainsi que Debbie, Ann, Kevin et Dave pour leur patience et pour m'avoir aidé lors de mon passage dans leur laboratoire. Je veux exprimer une grande reconnaissance au personnel du Département de Microbiologie de la Faculté de Médecine. Et finalement, j'aimerais remercier chaleureusement mes parents et mon frère qui m'ont soutenue tout au long de mes études.

AVANT-PROPOS

Ce projet d'étude est la suite d'un travail de recherche portant sur la désulfuration du noir de carbone pyrolytique qui a mené à l'isolement d'un consortium bactérien. Le présent ouvrage est consacré à l'étude des partenaires bactériens de ce consortium et à la caractérisation des interactions associatives entre ceux-ci. Dans cette étude, le terme consortium a été utilisé pour décrire l'association entre trois espèces bactériennes, dont deux ont été obtenues en culture pure. Même s'il est formé d'une culture mixte dont l'une des espèces n'a pu être isolée en culture pure, le terme consortium a surtout été utilisé pour décrire des bactéries possédant des relations fonctionnelles.

Cette thèse n'a pas été rédigée sous une forme classique basée sur les résultats finaux. Chacun des chapitres de résultats contient sa section discussion ou l'équivalent. La présentation des résultats décrit en premier lieu l'isolement et la culture des différentes espèces bactériennes formant le consortium. Par la suite, chacune des espèces bactériennes du consortium est caractérisée à l'intérieur d'un chapitre. Les espèces appartenant au genre *Sulfobacillus* (*Acidobacter*) ont été étudiées en premier, suivi des *Methylobacterium* sp. et du *T. thiooxidans*, dont la plupart des caractéristiques ont été déduites des résultats obtenus pour les autres isolats et le consortium SD-2. De plus, une discussion générale a été ajoutée après ces chapitres de résultats et discussion pour décrire les interactions qui existent entre les différentes espèces bactériennes formant le consortium SD-2.

L'analyse de ce travail a soulevé beaucoup d'hypothèses sans nécessairement amener les réponses, la durée de ce doctorat ne permettant pas de trouver les réponses à toutes les questions soulevées. Cependant, ce travail a permis de jeter les bases du développement de projets impliquant le consortium.

La présente étude a aussi contribué à la découverte de nouvelles espèces bactériennes dont l'une a été publiée dans une revue internationale :

Dufresne, S., J. Bousquet, M. Boissinot et R. Guay. 1996. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:1056-1064.

Dufresne, S. 1993. Biotransformation de composés soufrés par *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov. M.Sc. Université Laval, Ste-Foy. 109 pages.

Les travaux effectués au cours de ce projet de recherche ont également été présentés lors de diverses réunions scientifiques (conférence, congrès, symposium) au Québec et à l'étranger :

Dufresne, S., J.F. Blais et R. Guay. 1993. Municipal waste water treatment plant sludges: a source of organic carbon-tolerant, sulfur-oxidizing *Thiobacillus* and *Sulfobacillus* strains dans: *Biohydrometallurgical Technologies Vol.II: Fossils Energy Materials, Bioremediation, Microbial Physiology*, A.E. Torma, M.L. Apel, et C.L. Brierley (éditeurs). *International Biohydrometallurgy Symposium*, Jackson Hole, Wyoming, USA. pp. 267-276

Dufresne, S., C. Roy et R. Guay. 1992. Rôle des microorganismes dans la bonification du noir de carbone pyrolytique. ACFAS, Montréal, Québec, Canada.

Dufresne, S, L. Rodrigue et R. Guay. 1996. Biotransformation of organic compounds of sulfur by a microbial consortium of *Sulfobacillus disulfidooxidans*, an acidophilic *Thiobacillus* sp. and a *Beijerinckia* sp. ISMOM 96, Nancy, France.

Dufresne, S., C. Roy, M. Boissinot et R. Guay. 1995. Isolation and physiological characterization of a new gram-positive acidophilic strain from wastewater treatment sludges: *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov. American Society for Microbiology, 95 th General Meeting, Washington, DC.

TABLE DES MATIÈRES

	page
RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	V
AVANT-PROPOS	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES TABLEAUX	XVII
INTRODUCTION	1
Mise en situation	3
Hypothèse	4
Objectif	5
CHAPITRE 1. MICROBIOLOGIE DU SOUFRE ET DE L'AZOTE	6
1.1 Biooxydation des composés soufrés	7
1.1.1 Composés soufrés inorganiques	8
1.1.1.1 Bio-oxydation du soufre élémentaire.....	9
1.1.1.2 Oxydation du thiosulfate et du tétrathionate.....	10
1.1.1.3 Oxydation du sulfite.....	10
1.1.1.4 Oxydation des sulfures métalliques.....	11
1.1.1.5 Microorganismes impliqués dans l'oxydation des composés soufrés inorganiques.....	11
1.1.2 Composés soufrés organiques	14
1.1.2.1 Dibenzothiophène.....	14
1.1.2.2 Autres composés organiques soufrés.....	15

	page
1.2 Oxydation et réduction des composés azotés (N_2, NO_3^-, NO_2^-, NH_3)	17
1.2.1 Assimilation.....	17
1.2.2 Ammonification.....	18
1.2.3 Nitrification.....	18
1.2.4 Dénitrification.....	18
1.2.5 Fixation de l'azote.....	18
1.2.6 Bactéries fixatrices d'azote (diazotrophes) non photosynthétiques	19
 CHAPITRE 2. MÉTABOLISME DES BACTÉRIES CHIMIOTROPHES AÉROBIES	 22
2.1 Vue d'ensemble du métabolisme	23
2.2 Métabolisme des hétérotrophes	25
2.2.1 Le sentier Embden-Meyerof-Parnas (EMP).....	25
2.2.2 Le sentier des Hexoses Monophosphate (HMP)	26
2.2.3 Le sentier Entner-Doudoroff (ED).....	27
2.2.4 Le cycle du citrate (TCA)	27
2.3 Métabolisme des bactéries chimioautotrophes	28
2.3.1 Cycle de Calvin ou cycle de la ribulose bisphosphate (RuBP).....	28
2.3.2 Cycle de réduction du citrate.....	29
2.4 Métabolisme des bactéries thio-oxydantes	30
2.4.1 Physiologie des bactéries chimiolithoautotrophes obligatoires.....	30
2.4.2 Physiologie des bactéries chimiolithoautotrophes facultatives.....	32
2.4.3 Physiologie des bactéries chimiolithohétérotrophes et chimioorgano-hétérotrophes	34
2.5 Métabolisme des bactéries diazotrophes	34
2.5.1 Nitrogénase	35
2.5.2 Nitrogénase vs oxygène	35
2.5.2.1 Bactéries diazotrophes anaérobies facultatives.....	35
2.5.2.2 Microaérophilie	36
2.5.2.3 Polysaccharides.....	36
2.6 Métabolisme du phosphore	37
2.7 Production d'énergie	37
 CHAPITRE 3. COMMUNAUTÉS MICROBIENNES	 38
3.1 Techniques de culture employées pour caractériser les communautés	41
3.1.1 La culture pure.....	41
3.1.2 L'enrichissement.....	41
3.1.3 La culture mixte.....	41
3.1.4 La culture des communautés	41

	page
3.2 Techniques existantes pour analyser les communautés bactériennes.....	42
3.2.1 Techniques d'identification des isolats.....	42
3.2.1.1 Caractérisation basée sur les substrats de croissance.....	42
3.2.1.2 Analyse des lipides.....	43
3.2.1.3 Hybridation de colonies.....	44
3.2.1.4 Caractérisation de l'ARNr.....	44
3.2.1.5 Empreinte génétique de l'ADN ("ADN fingerprinting").....	45
3.2.2 Analyses basées sur l'extraction directe de molécules indicatrices.....	45
3.2.2.1 Analyse des lipides.....	45
3.2.2.2 Sondes génétiques.....	46
3.2.2.3 Analyse des ARNr et ADNr.....	46
3.3 Classification des interactions entre les espèces.....	46
3.3.1 Classification basée sur les effets sur la croissance.....	47
3.3.1.1 Compétition.....	47
3.3.1.2 Antagonisme (amensalisme).....	48
3.3.1.3 Commensalisme, synergisme et mutualisme.....	48
3.3.1.4 Analyse de la classification basée sur les effets sur la croissance.....	49
3.3.2 Classification des interactions basées sur les mécanismes biologiques.....	50
3.3.2.1 Échange d'un facteur de croissance (classe 1).....	50
3.3.2.2 Diminution de l'inhibition de croissance (classe 2).....	52
3.3.2.3 Altération des constantes de croissance (classe 3).....	53
CHAPITRE 4. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	54
4.1 Isolement et culture du consortium bactérien.....	55
4.2 Isolement et culture des isolats formant le consortium SD-2.....	55
4.2.1 <i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i> SD-11.....	55
4.2.2 Isolats SD-7 et SD-8.....	56
4.2.3 Isolats SD-6 et SD-9.....	57
4.3 Caractérisation des isolats du consortium SD-2.....	57
4.3.1 Caractérisation morphologique.....	57
4.3.1.1 Microscopie photonique.....	57
4.3.1.2 Microscopie électronique à transmission et à balayage.....	58
4.3.2 Caractérisation physiologique.....	59
4.3.3 Grille API 50 CH.....	59
4.3.4 Caractérisation biochimique.....	60
4.3.5 Analyse des acides gras.....	61
4.3.6 Étude phylogénétique.....	61
4.3.6.1 Croissance et conditions de culture des isolats.....	61
4.3.6.2 Récolte des cellules.....	61
4.3.6.3 Lyse des cellules et extraction de l'ADN du <i>S. disulfidooxidans</i> SD-11.....	62
4.3.6.4 PCR.....	62
4.3.6.5 Analyse des séquences.....	63
4.3.6.6 Études phylogénétiques des isolats SD-6, SD-7, SD-8, de la culture mixte contenant les isolats SD-6 et SD-9, et du consortium SD-20.....	64
4.3.6.7 Numéro d'accès des séquences nucléotidiques.....	65
4.4 Évaluation de la mixotrophie chez les <i>Sulfobacillus</i> sp.....	66

	page
4.5 Fixation du ¹⁴CO₂ par la culture mixte des <i>Sulfobacillus</i> sp. (SD-6 + SD-9)	66
4.6 Oxydation des composés soufrés	68
4.6.1 Détermination de la production de polythionates et du sulfate lors de la croissance de <i>S. disulfidooxidans</i> SD-11 sur des composés soufrés.....	68
4.6.2 Détermination des métabolites produits lors de l'oxydation de composés organiques soufrés par les <i>Sulfobacillus</i> sp.....	69
4.7 Analyses enzymatiques	70
4.7.1 Préparation des extraits enzymatiques.....	70
4.7.2 Électrophorèse sur gel amidon).....	71
4.7.3 Détection des enzymes.....	73
4.7.4 Dosage de la RuBisPCase : Ribulose bispohosphate carboxylase.....	75
4.7.5 Dosage de la citrate lyase.....	75
 CHAPITRE 5. RÉSULTATS ET DISCUSSION: ISOLEMENT ET CULTURE DES ESPÈCES BACTÉRIENNES FORMANT LE CONSORTIUM SD-2	 76
5.1 <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11	78
5.2 Isolement de l'isolat SD-6 et de la culture mixte contenant l'isolat SD-9	79
5.3 Isolats SD-7 et SD-8	82
5.4 Espèce thio-oxydante acidophile acidifiante	83
5.5 Composition du consortium SD-2	83
 CHAPITRE 6. RÉSULTATS ET DISCUSSION: LES ACIDOBACTER	 86
6.1 Caractérisation morphologique	87
6.2 Caractérisation phylogénétique	88
6.2.1 <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11.....	88
6.2.2 <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-6 et SD-9.....	91
6.3 Caractérisation des acides gras membranaires du <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11	94
6.4 Propriétés biochimiques	98
6.5 Caractérisation physiologique	98
6.5.1 Caractéristiques physiologiques sommaires.....	99
6.5.2 Grille API 50CH.....	100
6.5.3 Sentiers métaboliques.....	101
6.5.4 Influence de l'extrait de levure.....	102
6.5.4.1 Sur la croissance du <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-6.....	102
6.5.4.2 Sur le métabolisme de la culture mixte des <i>Sulfobacillus</i> sp. (SD-6 + SD-9).....	104

	page
6.5.5 Utilisation des composés carbonés organiques	106
6.5.5.1 Par le <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-6.....	106
6.5.5.2 Par la culture mixte des <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-6 et SD-9.....	110
6.5.6 Utilisation du CO ₂ atmosphérique.....	113
6.5.6.1 Dosage de la RuBisPCase et de l'ATP:citrate lyase	113
6.5.6.2 Fixation du ¹⁴ CO ₂ par la culture mixte (SD-9 + SD-6)	114
6.5.7 Oxydation des composés soufrés par le <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11	118
6.6 Discussion	120
6.6.1 Analyse des caractéristiques morphologiques	120
6.6.2 Analyse phylogénétique	121
6.6.3 Analyse des acides gras chez le <i>S. disulfidooxidans</i> SD-11	122
6.6.4 Analyse des propriétés biochimiques des <i>Sulfobacillus</i> sp.....	124
6.6.5 Analyse des caractéristiques physiologiques et des sentiers métaboliques des <i>Sulfobacillus</i> sp.	124
6.6.6 Analyse du métabolisme des <i>Sulfobacillus</i> sp.....	126
6.6.6.1 Influence de l'extrait de levure.....	126
6.6.6.2 Métabolisme des composés carbonés organiques.....	128
6.6.6.3 Métabolisme du CO ₂	133
6.6.6.4 Métabolisme des composés soufrés.....	136
6.6.6.5 Métabolisme mixotrophe des <i>Sulfobacillus</i> sp.....	137
6.6.7 Analyse taxinomique.....	139
6.6.8 Controverse à propos du genre <i>Sulfobacillus</i>	142
6.6.9 Description d' <i>Acidobacter disulfidooxidans</i> gen. nov. comb. nov.....	145
CHAPITRE 7. RÉSULTATS: LES METHYLOBACTERIUM.....	147
7.1 Caractérisation morphologique.....	148
7.2 Séquence de l'ADNr 16S et topologie de l'arbre phylogénétique.....	149
7.3 Propriétés biochimiques, demande en oxygène et source d'azote.....	155
7.4 Caractéristiques physiologiques.....	157
7.5 Discussion	159
7.5.1 Analyse des caractéristiques morphologiques	159
7.5.2 Analyse phylogénétique	160
7.5.3 Analyse des propriétés biochimiques.....	161
7.5.4 Analyse physiologique.....	162
7.5.5 Analyse taxinomique.....	163
7.5.6 Description du <i>Methylobacterium lavalensis</i> sp. nov.	168
CHAPITRE 8. RÉSULTATS ET DISCUSSION : THIOBACILLUS THIOOXIDANS ET LE CONSORTIUM SD-2.....	169
8.1 Caractéristiques morphologiques.....	170
8.2 Caractéristiques phylogénétiques.....	173
8.3 Demande en oxygène et source d'azote du consortium SD-20.....	174

	page
8.4 Caractéristiques physiologiques	175
8.5 Discussion	178
8.5.1 Analyses des caractéristiques morphologiques.....	178
8.5.2 Analyse phylogénétique.....	179
8.5.3 Analyses des propriétés biochimiques.....	179
8.5.4 Analyse physiologique.....	180
8.5.5 Analyse taxinomique.....	181
 CHAPITRE 9. DISCUSSION GÉNÉRALE: INTERACTIONS ENTRE LES ESPÈCES BACTÉRIENNES DU CONSORTIUM SD-2	182
9.1 Classification basée sur les mécanismes biologiques	183
9.1.1 Échange de facteurs de croissance.....	184
9.1.2 Approvisionnement d'un élément nutritif.....	184
9.1.3 Diminution de l'inhibition de croissance.....	185
9.1.4 Cométabolisme des composés soufrés organiques.....	186
9.2 Distinction des espèces bactériennes du consortium SD-2 basée sur leurs fonctions	187
 CONCLUSIONS	188
 BIBLIOGRAPHIE	193
 ANNEXE	209
 Annexe A . Schémas récapitulatifs des principaux sentiers métaboliques de dégradation des hydrates de carbone	210
 Annexe B . Milieux de culture	213
9K sans sulfate ferreux (Silverman et Lungren, 1959).....	213
9K-EL (Dufresne, 1993).....	213
9K-m.....	213
9K 1/10.....	213
Acidiphilium (Harrison, 1981).....	214
B, B-EL, B-NH ₄ (milieu Beijerinckia d'Atlas (1993) modifié).....	214
BAM-SM (milieu ATCC 1656) (Gherna <i>et al.</i> , 1992).....	215
BS (Barton et Shively, 1968).....	215
FT(G) (sulfate ferreux, tétrathionate, glucose) basé sur le milieu WAYE de Johnson (1995).....	216
Indicateur universel No.1 (Sober, 1970).....	216
LSMM (low sulfate mineral medium, basé sur le milieu 9K).....	217
MMM (methanol mineral salt medium) modifié (Green, 1992).....	217
NF (nitrogen free medium) (Pedrosa <i>et al.</i> , 1980).....	218
Peptone Medium (Atlas, 1993).....	218
PGA (peptone-glycérol-agar) (Green, 1992).....	218
SFMM (Omori <i>et al.</i> , 1992).....	219
Solution de métaux en trace.....	219
Solution de vitamines.....	220

	page
Annexe C . Composition de l'extrait de levure Difco	221
Annexe D . Essais d'isolement infructueux des partenaires formant le consortium	222
Essai 1 : Tampons.....	222
Essai 2 : Agents inhibiteurs.....	222
Essai 3 : Gradients pH.....	223
Essai 4 : Gradients d'agents inhibiteurs et de substrats	224
Essai 6 : Utilisations d'ions et de sulfures métalliques comme agents sélectifs.....	225
Essai 7 : Variation de la concentration en azote du milieu et utilisation de l'acétate comme agent inhibiteur.....	225
Essai 8 : Dilution en couche mince.....	225
Annexe E . Coloration de Gram	230
Préparation des solutions.....	230
Methodologie.....	230
Observation.....	230
Annexe F . Dosage des protéines, du glucose et du sulfate	231
Annexe G . Radioactivité ¹⁴C	234
Essai 1	234
Essai 2	234
Quantité de CO ₂ fixée par les <i>Sulfobacillus</i> sp.....	235
Annexe H . Essais enzymatiques sur gel	236
Annexe I . Dosage de la RuBisPCase	240
Annexe J . Dosage de l'ATP citrate lyase (EC 4.1.3.8)	241
Annexe K . Séquence de l'ADNr 16S des isolats SD-6 et SD-9	242
Isolat SD-6.....	242
Séquence partielle de la culture mixte contenant l'isolat SD-9.....	242
Identification de l'isolat SD-9.....	242
Annexe L . Courbes de Fixation du ¹⁴CO₂ en fonction du temps	244
Annexe M . Séquence de l'ADNr 16S de l'isolat SD-8	245
Séquence complète de l'ADNr 16S de l'isolat SD-8.....	Error! Bookmark not defined.
Alignement.....	245
Annexe N . Séquence de l'ADNr 16S de l'espèce thio-oxydante du consortium SD-20	247
Séquence de l'ADNr 16S d'un clone de type 1 provenant du consortium SD-20	247
Recherche BLAST de la NCBI.....	247
Annexe O . International Journal of Systematic Bacteriology, Oct. 1996, 46:1056-1064	249

LISTE DES FIGURES

	page
Figure 1.1 Cycle du soufre	8
Figure 1.2 Résumé des réactions d'oxydation des composés réduits du soufre par les thiobacilles acidophiles.....	9
Figure 1.3 Cycle biologique de l'azote	17
Figure 2.1 Vue simplifiée du métabolisme cellulaire	23
Figure 2.2 Représentation des différents stades du catabolisme	24
Figure 3.1 Communauté microbienne mettant en cause <i>B. polymyxa</i> et <i>P. vulgaris</i>	51
Figure 3.2 Métabolisme du cyclohexane par une culture mixte	52
Figure 3.3 Biooxydation du méthane par un consortium bactérien	52
Figure 3.4 Métabolisme du thiosulfate par une culture mixte formée de <i>T. neapolitanus</i> et <i>P. versutus</i>	53
Figure 4.1 Représentation d'une fiole utilisée pour la fixation du $^{14}\text{CO}_2$ par la culture mixte des <i>Sulfobacillus</i> sp.....	67
Figure 4.2 Détection de l'activité enzymatique après électrophorèse sur gel d'amidon.....	74
Figure 5.1 Photomicrographies photoniques en contraste de phase des <i>Sulfobacillus</i> sp.....	80
Figure 5.2 Résumé des manipulations menant à l'isolement des isolats SD-6 et SD-9.....	81
Figure 6.1 Photomicrographies électroniques du <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11.....	89
Figure 6.2 Position phylogénétique de l'isolat SD-11 parmi les bactéries gram-positives basée sur l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S.....	93
Figure 6.3 Chromatographie en phase gazeuse d'un extrait lipidique du <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11	94
Figure 6.4 Chromatographie en phase gazeuse d'un extrait lipidique du <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11	95
Figure 6.5 Spectres de masse des acides gras membranaires ω -cycliques retrouvés chez <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11.....	96
Figure 6.6 Spectre de masse de l'acide gras membranaire ω -cyclohexane- α -OH- C_{15} , retrouvé chez <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11	97
Figure 6.7 Influence de l'extrait de levure sur le rendement cellulaire lors de la croissance de <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-6 dans le milieu 9K 1/10-EL pH 2,5	103
Figure 6.8 Production des sulfates et des protéines lors de la croissance <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-6 dans le milieu 9K 1/10-EL (0,01 %) pH 2,5 sans substrat ajouté.....	104
Figure 6.9 Production des sulfates et des protéines lors de la croissance de la culture mixte des <i>Sulfobacillus</i> sp. dans le milieu 9K 1/10-EL (0,01 %) pH 2,5 sans substrat ajouté.....	104
Figure 6.10 Croissance du <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-6 dans le milieu 9K 1/10-EL 0,001 % pH 2,5.....	107
Figure 6.11 Croissance du <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-6 dans le milieu 9K 1/10-EL 0,01 % pH 2,5.....	109

Figure 6.12 Rendement cellulaires lors de la croissance des <i>Sulfobacillus</i> sp. dans le milieu 9K 1/10-EL (0,001 %) pH 2,5.....	111
Figure 6.13 Croissance de la culture mixte des <i>Sulfobacillus</i> sp. dans le milieu 9K 1/10-EL 0,01 % pH 2,5.....	112
Figure 6.14 Suivi de la croissance de la culture utilisée pour la fixation du CO ₂ dans le milieu 9K-EL pH 2,25 en présence de soufre et de glucose, ou de glucose.....	115
Figure 6.15 Fixation du CO ₂ par les <i>Sulfobacillus</i> sp. (SD-6 + SD-9) dans le milieu 9K-EL 0,01 % à pH 2,25 en présence de soufre et/ou de glutamate.....	116
Figure 6.16 Taux de fixation du CO ₂ par les <i>Sulfobacillus</i> sp. (SD-6 + SD-9) pour différentes concentrations d'extrait de levure dans le milieu 9K pH 2,25 contenant du soufre (0,1 %).....	117
Figure 6.17 Moyenne des taux de fixation du CO ₂ par les <i>Sulfobacillus</i> sp. (SD-6 + SD-9) en présence de soufre et/ou de glutamate.....	117
Figure 6.18 Production des oxyanions du soufre par le <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11 en présence de 0,02 % EL. ...	119
Figure 7.1 Photomicrographies électroniques à transmission sur des sections de l'isolat SD-8.....	150
Figure 7.2 Position phylogénétique de l'isolat SD-8 parmi les bactéries du genre <i>Methylobacterium</i> obtenue par l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S.....	154
Figure 8.1 Photomicrographies électroniques du consortium SD-20.....	171
Figure 8.2 Position phylogénétique du clone de type 1 du consortium SD-20 parmi les bactéries du genre <i>Thiobacillus</i> basée sur l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S par la méthode du "maximum likelihood".....	174
Figure 8.3 Activités enzymatiques d'extraits bactériens après électrophorèse sur gel d'amidon.....	178
Figure 9.1 Échange de facteurs de croissance entre les deux <i>Acidobacter</i> sp.....	184
Figure 9.2 Métabolisme de l'azote par le consortium SD-2.....	185
Figure 9.3 Production de métabolites par <i>T. thiooxidans</i>	185
Figure 9.4 Métabolisme du glucose par les <i>Acidobacter</i> sp.....	186
Figure 9.5 Métabolisme des composés soufrés organiques par le consortium.....	186
Figure A.1. Sentier métabolique Entner-Doudoroff (ED).....	209
Figure A.2. Sentier métabolique Embden-Meyerof-Parnas (EMP).....	210
Figure A.3. Sentier métabolique des Hexoses Monophosphate (HMP).....	211
Figure D.1 Résumé des manipulations des essais d'isolement 2 à 4.....	225
Figure D.2 Résumé de l'essai d'isolement 5 et purification des isolats SD-7 et SD-8.....	227
Figure D.3 Essai d'isolement du ou des partenaire(s) acidifiant(s).....	228
Figure F.1 Courbe standard du dosage des protéine avec et sans soufre.....	230
Figure F.2 Courbe standard du dosage du glucose.....	231
Figure F.3 Courbe standard du dosage des sulfates.....	232
Figure L.1 Taux de fixation du CO ₂ par les <i>Acidobacter</i> sp. (SD-6 + SD-9) dans le milieu 9K-EL (0,01%) pH 2,25 contenant du soufre et/ou du glutamate.....	243

LISTE DES TABLEAUX

	page
Tableau 1.1 Espèces de <i>Thiobacillus</i> en regard de leurs substrats énergétiques	12
Tableau 1.2 Reclassification de certaines espèces du genre <i>Thiobacillus</i> à partir d'études taxonomiques	13
Tableau 1.3 Microorganismes impliqués dans la biodégradation du DBT.....	15
Tableau 1.4 Microorganismes impliqués dans la biodégradation des composés organiques soufrés autres que le DBT.....	16
Tableau 1.5 Bactéries diazotrophes aérobies non symbiotiques.....	20
Tableau 2.1 Type physiologique parmi les bactéries non photosynthétiques thio-oxydantes.....	30
Tableau 3.1 Exemples de coopérations mutuelles ou commensales chez les bactéries	49
Tableau 3.2 Classification des communautés microbiennes basée sur les mécanismes biologiques impliqués ...	50
Tableau 4.1 Amorces utilisés pour l'amplification PCR de l'ADNr du 16S	63
Tableau 4.2 Conditions de croissance utilisées pour les différents isolats et les cultures témoins	71
Tableau 4.3 Systèmes Tampons utilisés pour les différents enzymes à l'étude.....	72
Tableau 4.4 Tampons utilisés lors de la préparation des gels en fonction des enzymes et lysats.....	73
Tableau 6.1 Identité des séquences de l'ADNr 16S entre l'isolat SD-11, plusieurs bactéries gram-positives et quelques protéobactéries ¹	92
Tableau 6.2 Caractéristiques physiologiques des isolats SD-6, SD-9 et SD-11.....	99
Tableau 6.3 Utilisation des hydrates de carbone par le <i>Sulfobacillus</i> SD-11 d'après les résultats obtenus en utilisant la grille de culture API 50CH (BioMérieux)	100
Tableau 6.4 Enzymes clés de différents sentiers métaboliques retrouvées dans les extraits cellulaires du <i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11 et d' <i>Alb. cycloheptanicus</i>	101
Tableau 6.5 Croissance de la culture mixte des <i>Sulfobacillus</i> sp. (SD-6 + SD-9) dans le milieu 9K pH 2,2 contenant différents facteurs de croissance.....	105
Tableau 6.6 Activité de la RuBisPCase dans les extraits cellulaires de bactéries appartenant à différent genre..	113
Tableau 6.7 Liste des acides gras membranaires identifiés chez <i>S. disulfidooxidans</i> SD-11.....	123
Tableau 6.8 Cinétique de la production des sulfates et de l'oxydation du glucose par le <i>S. disulfidooxidans</i> SD-6 et la culture mixte des <i>Sulfobacillus</i> sp. (SD-6 + SD-9).	133
Tableau 6.9 Liste révisée des types physiologiques des bactéries non photosynthétiques thio-oxydantes.....	138
Tableau 6.10 Caractéristiques morphologiques du <i>S. disulfidooxidans</i> SD-11 et des espèces du genre <i>Alicyclobacillus</i>	139
Tableau 6.11 Caractéristiques physiologiques du <i>S. disulfidooxidans</i> et des espèces du genre <i>Alicyclobacillus</i>	140

Tableau 7.1 Identité des séquences de l'ADNr 16S entre l'isolat SD-8 et les espèces du genre <i>Methylobacterium</i> ainsi que quelques protéobactéries.....	153
Tableau 7.2 Besoin en oxygène et en azote des isolats SD-7 et SD-8	156
Tableau 7.3 Utilisation des hydrates de carbone par les isolats SD-7 et SD-d'après les résultats obtenus en utilisant la grille de culture API 50CH (BioMérieux)	158
Tableau 7.4 Enzymes clés de différents sentiers métaboliques retrouvées dans les extraits cellulaires de <i>M. lavalensis</i> SD-7 et SD-8.....	159
Tableau 7.5 Caractéristiques permettant de différencier les espèces du genre <i>Methylobacterium</i>	165
Tableau 7.6 Regroupement des différentes espèces du genre <i>Methylobacterium</i> par différentes méthodes d'analyses	166
Tableau 8.1 Besoin en oxygène et en azote du consortium SD-20.....	175
Tableau 8.2 Caractéristiques physiologiques du <i>T. thiooxidans</i> et du consortium.....	176
Tableau 8.3 Enzymes clés de différents sentiers métaboliques retrouvées dans les extraits cellulaires des partenaires du consortium	177
Tableau B.1. Quantité de sels phosphatés retrouvés dans le milieu 9K-m en fonction du pH désiré.....	213
Tableau D.1 Concentrations des agents inhibiteurs utilisés.....	221
Tableau D.2 Description des milieux utilisés pour la culture des consortiums SD-101 à SD-110.....	222
Tableau H.1 Solutions révélatrices pour les différents enzymes recherchés.....	235
Tableau M.1 Classification des espèces les plus ressemblantes à l'isolat SD-8 selon le program BLAST de la NCBI	244

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Aux cours des siècles, nous avons appris à utiliser les substances produites par les microorganismes (antibiotiques, biogaz, etc.); et plus récemment, nous avons commencé à comprendre et à manipuler les activités de biosynthèse et de dégradation des microorganismes, ce qui a mené au développement de procédés biotechnologiques. Les communautés microbiennes sont utilisées dans le traitement des eaux usées, des sols contaminés aux hydrocarbures, et dans les systèmes de biofiltration et de compostage.

Les communautés microbiennes peuvent être décrites par plusieurs expressions, dont le terme consortium. C'est un terme utile lorsqu'il réfère à des populations de microorganismes qui manifestent des interrelations fonctionnelles les unes avec les autres. Jusqu'à un certain point, un consortium peut décrire une association commensale ou proto-coopérative de bactéries. Malheureusement, il est aussi employé pour décrire un mélange de bactéries qui n'ont pu être séparées en culture pure. Dans ce dernier cas, le terme consortium ne décrit pas une association fonctionnelle, mais il est plutôt le reflet de l'isolation partielle des composantes individuelles d'une culture mixte.

L'abondante littérature sur la biochimie, la physiologie, et la morphologie des microorganismes est dérivée de l'étude d'organismes sous des conditions de croissance artificielles dans un milieu de culture en l'absence d'autres espèces. Les cultures pures fournissent une quantité importante d'information, mais il est loin d'être certain que les propriétés observées aient une signification écologique. Elles peuvent cependant donner des informations utiles sur les besoins des différentes espèces, et aider à la compréhension des liens qui les unissent dans une communauté. Même si les microbiologistes sont enclins à travailler avec des cultures pures, une communauté formée d'une seule espèce bactérienne est très rare dans la nature puisque, par définition, une communauté est composée de plusieurs populations bactériennes.

Une meilleure compréhension des relations entre les populations microbiennes permettra de mieux contrôler le développement et le fonctionnement des procédés biotechnologiques. L'utilisation d'une communauté microbienne dans une application biotechnologique requiert donc une bonne connaissance des microorganismes qui la composent ainsi que des interactions qui les caractérisent pour optimiser le procédé.

Mise en situation

L'isolement et la caractérisation sommaire de *Sulfobacillus disulfidooxidans* ont fait l'objet d'un travail de recherche au niveau du deuxième cycle universitaire et ont donné lieu à la production d'un mémoire de maîtrise (Dufresne, 1993). Initialement, le projet de recherche portait sur la désulfuration du soufre "contaminant" le noir de carbone pyrolytique (Roy *et al.*, 1990) par des thiobacilles et la lixiviation simultanée des métaux lourds (zinc et fer) par l'acide sulfurique produit par les bactéries. Cependant, la plupart des thiobacilles isolés d'environnements miniers sont sensibles à la matière organique. Les boues d'usine d'épuration des eaux usées ont donc été utilisées comme source de bactéries thio-oxydantes potentiellement résistantes à la présence de matière organique. Les enrichissements de boues par du soufre élémentaire ont mené à l'isolement de microorganismes thio-oxydants. L'ajout du noir de carbone pyrolytique à ces enrichissements a ensuite permis d'isoler un consortium bactérien qui contenait entre autres une nouvelle espèce bactérienne, *Sulfobacillus disulfidooxidans*.

L'utilisation uniquement de thiobacilles n'a pas pu permettre la désulfuration, mais seulement la solubilisation des métaux par l'ajout de soufre élémentaire. Cependant, ce consortium semblait être capable d'oxyder une partie du soufre contenu dans le noir de carbone pyrolytique même si celui-ci était retrouvé majoritairement sous forme organique.

Plusieurs problèmes restaient cependant à élucider, principalement le comportement de *S. disulfidooxidans* en présence du ou des partenaire(s) du consortium de départ. En culture mixte, il y a augmentation de la proportion cellulaire de *S. disulfidooxidans* par rapport au partenaire bactérien acidophile lorsque placé en présence du noir de carbone et du soufre élémentaire. De plus *S. disulfidooxidans* nécessite l'apport de facteurs de croissance en culture pure, mais cette exigence semble être levée dans les co-cultures. *S. disulfidooxidans* semble accélérer la vitesse d'oxydation du soufre du partenaire acidifiant. Il y a donc lieu d'étudier le type de relation mutualiste qui semble lier ces deux bactéries. Est-ce que le soufre organique est disponible et métabolisé par *S. disulfidooxidans*? Est-ce que la matrice carbonée des composés soufrés organiques est modifiée par *S. disulfidooxidans*? La croissance sur le glutathion oxydé et sur les autres composés soufrés laisse à penser que ces substrats sont utilisés, mais son

métabolisme n'a pas été élucidé. Certains métabolites intermédiaires ont été identifiés, mais leur présence ne permet pas d'établir complètement la séquence des réactions. D'autres études sont donc nécessaires pour déterminer les types et niveaux enzymatiques exprimés selon les substrats utilisés et les autres métabolites intermédiaires inconnus.

De plus en plus, les chercheurs portent leur attention sur l'utilisation de cultures mixtes ou séquentielles lorsque la dégradation de composés xénobiotiques est envisagée, une souche bactérienne ne possédant pas toutes les enzymes nécessaires à la biodégradation de composés aux caractéristiques chimiques différentes. Le premier but en biodégradation, selon Howard Slater et Lovatt (1984), est d'obtenir des microorganismes en quantité suffisante pour élucider les mécanismes de biodégradation en déterminant les sentiers cataboliques probables et en identifiant les métabolites intermédiaires potentiellement impliqués. Cependant, tel qu'il sera expliqué au chapitre 3, il est important de connaître la composition de ces communautés pour les utiliser dans des procédés biotechnologiques.

Hypothèse

L'oxydation sélective du soufre organique par les bactéries semble particulièrement complexe. La plupart d'entre elles l'utilisent comme source de soufre assimilable au matériel cellulaire, et non comme source d'énergie. Conséquemment, le taux d'oxydation du soufre est beaucoup plus faible que celui des bactéries qui l'utilisent comme source d'énergie et il est rarement retrouvé dans le milieu après la croissance bactérienne.

Nous savons qu'en présence d'un consortium bactérien incluant *S. disulfidooxidans*, le soufre organique semble être transformé en acide sulfurique. Cependant, cette bactérie une fois isolée ne peut que produire certains oxyanions du soufre en croissance sur le glutathion.

Nous posons donc l'hypothèse que l'oxydation ou le métabolisme des composés organiques soufrés procède avec la participation essentielle de deux bactéries présentes dans un consortium. L'une d'entre elles transformerait les disulfures organiques en oxyanions du soufre que le deuxième partenaire oxyderait finalement en acide sulfurique. Ce consortium pourrait être de plus complété par la présence d'une autre espèce qui assurerait la détoxification du milieu ou qui contribuerait à fournir des éléments nutritifs essentiels aux deux autres partenaires (peut-être au moyen de la fixation de l'azote atmosphérique).

Objectif

L'objectif global du présent projet est donc de caractériser l'oxydation du soufre organique en acide sulfurique lors de la croissance simultanée de *S. disulfidooxidans* et des bactéries associées.

Pour répondre à cet objectif, nous devons commencer par isoler en culture pure le ou les bactéries associée(s) à *S. disulfidooxidans* et les caractériser sommairement (conditions de croissance optimale). Nous effectuerons également une étude phylogénétique de *S. disulfidooxidans* pour confirmer son identification. De plus, à mesure que les bactéries associées seront isolées, nous procéderons à une analyse phylogénétique pour confirmer leur identification. Les bactéries associées que nous n'aurons pas réussi à isoler en culture pure seront identifiées directement à partir d'une analyse phylogénétique du consortium.

De plus, la physiologie de *S. disulfidooxidans* et des bactéries associées sera étudiée lors de l'oxydation de composés soufrés organiques ou inorganiques par la recherche de certains enzymes clés de leur métabolisme. La compréhension du métabolisme des différentes espèces du consortium nous permettra alors d'identifier les interactions bactériennes qui les associent. Enfin, la probabilité de l'oxydation sélective de l'atome de soufre contenu dans les composés soufrés organiques et le pouvoir détoxifiant vis-à-vis de ceux-ci seront abordés.

CHAPITRE 1

MICROBIOLOGIE DU SOUFRE ET DE L'AZOTE

CHAPITRE 1

1. MICROBIOLOGIE DU SOUFRE ET DE L'AZOTE

Tous les composés chimiques d'un écosystème font partie d'un cycle ou d'un sentier biochimique qui en relie les portions abiotiques et biotiques. Le carbone, l'hydrogène et, sauf pour quelques exceptions, l'oxygène sont des constituants de toutes les molécules organiques. En opposition, le soufre, l'azote et le phosphore font seulement partie de certaines classes de composés organiques comme les acides aminés. Tous les organismes vivants participent aux cycles biogéochimiques des éléments, mais les microorganismes jouent un rôle majeur en raison de leur ubiquité, leur capacité métabolique variée et leurs activités enzymatiques élevées.

1.1 Biooxydation des composés soufrés

Les mécanismes généraux d'oxydation et de réduction biologique du soufre sont relativement bien connus et les microorganismes y jouent un rôle très important (Norris, 1990; Atlas et Bartha, 1987; Wainwright, 1978; Suzuki, 1974; Parker et Prisk, 1953). Le cycle du soufre (Figure 1.1) comporte deux parties principales : la portion aérobie qui inclut les microorganismes capables d'oxyder les composés soufrés et la section anaérobie, ceux qui les réduisent. Les points communs des deux parties se retrouvent au niveau du sulfate, le stade le plus oxydé du soufre, et du sulfure d'hydrogène, le plus réduit. L'assimilation du soufre dans le matériel cellulaire des microorganismes se fait à partir du sulfate et peut se faire aussi bien dans la portion aérobie que lors de l'anaérobiose.

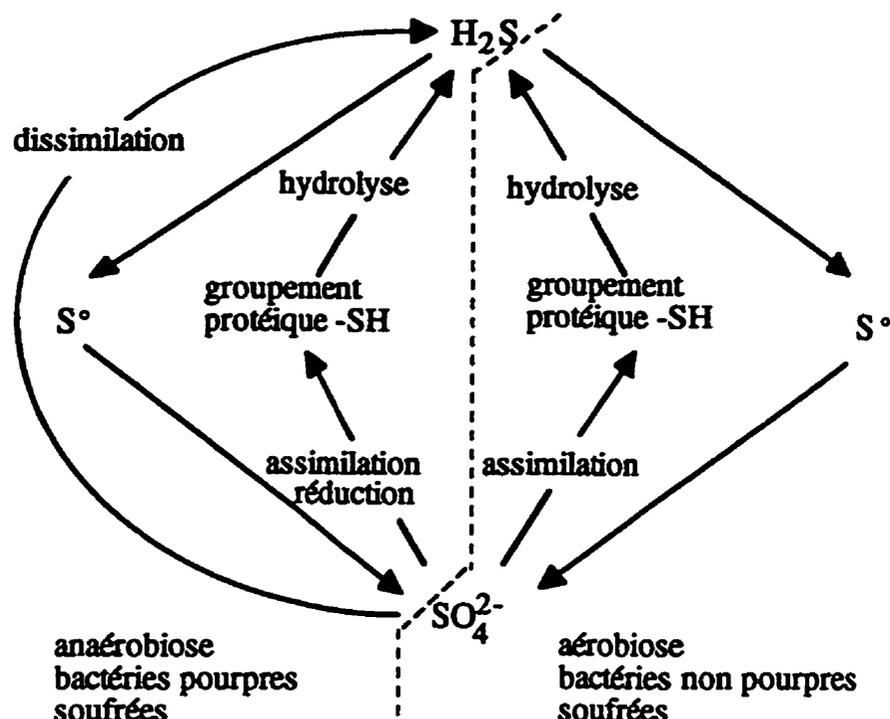


Figure 1.1 Cycle du soufre (adapté de Wainwright, 1984). Représentation de la transformation microbiologique des composés oxydés et réduits du soufre. S° , soufre élémentaire; SO_4^{2-} , sulfate; H_2S , sulfure d'hydrogène.

1.1.1 Composés soufrés inorganiques

L'intérêt porté à l'oxydation des composés soufrés inorganiques s'est manifesté au début du siècle. Selon les propos rapportés par Mc Lean (1917), Chisholm mélangeait du soufre à du phosphate insoluble (apatite) pour que l'acide, produit par l'oxydation microbiologique du soufre, libère le phosphate sous forme soluble. En 1911, Brioux et Guerbet concluaient que l'oxydation du soufre dans les sols était un procédé complexe faisant intervenir l'activité d'un nombre élevé d'espèces bactériennes. C'est en 1922 que Waksman *et al.* ont décrit pour la première fois l'oxydation bactérienne du soufre en proposant l'équation suivante :



Par la suite, d'autres découvertes ont permis de démystifier l'oxydation des composés soufrés inorganiques par divers microorganismes. Un modèle proposé par Pronk *et al.* (1990a) et représenté à la Figure 1.2 résume bien l'oxydation microbiologique des composés soufrés inorganiques.

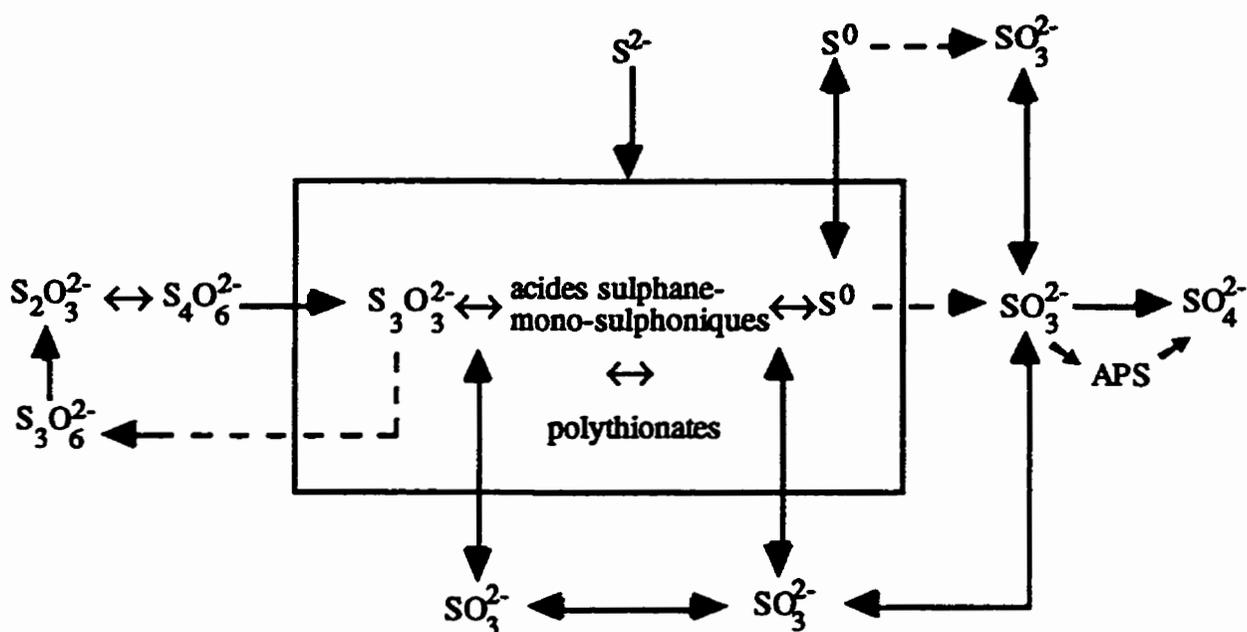
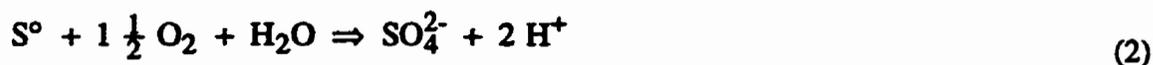


Figure 1.2 Résumé des réactions d'oxydation des composés réduits du soufre par les thiobacilles acidophiles (adapté de Pronk *et al.*, 1990a). La boîte entourant une partie des réactions et des composés représente un groupe de composés sulfurés intermédiaires. La nature des intermédiaires formés à partir du soufre et du sulfure d'hydrogène est inconnue, de même que la formation biologique du sulfure d'hydrogène à partir du soufre élémentaire. S⁰, soufre élémentaire; SO₄²⁻, sulfate; S²⁻, sulfure; S₂O₃²⁻, thiosulfate; S₃O₆²⁻, trithionate; S₄O₆²⁻, tétrathionate.

1.1.1.1 Bio-oxydation du soufre élémentaire

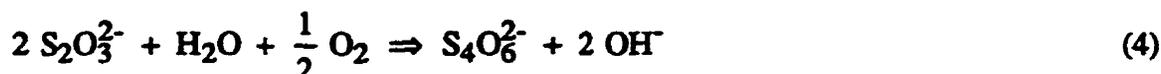
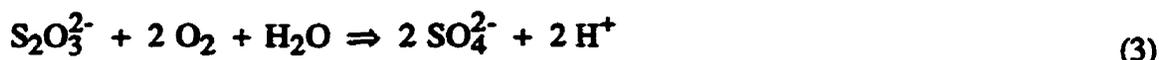
Le soufre élémentaire est oxydé directement en sulfate (réaction 2) et il n'y a aucun intermédiaire libéré dans le milieu (Parker et Prisk, 1953; Roy et Trudinger, 1970; Shivers et Brock., 1973; Suzuki, 1974), à l'exception du sulfite aussitôt transformé en sulfate.



Pour être oxydé, le soufre doit d'abord être transformé en intermédiaire soluble. Il est oxydé par l'intermédiaire du glutathion réduit (GSH) dans des vésicules retrouvées entre la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique des bactéries (Karavaiko et Pivovarova, 1977; Roy et Trudinger, 1970). Cependant, Bacon et Ingledew (1989) ont démontré qu'il y avait libération d'une faible quantité de H₂S durant la croissance de *Thiobacillus ferrooxidans*.

1.1.1.2 Oxydation du thiosulfate et du tétrathionate

Le thiosulfate est instable en milieu acide. À un pH inférieur à 4,0, il se décompose en sulfite et en soufre (Johnston et McAmish, 1973). L'oxydation complète du thiosulfate mène aussi à la production de sulfate (réaction 3). La première étape du métabolisme du thiosulfate est l'oxydation en tétrathionate selon la réaction 4 (Pronk *et al.*, 1990; Sinha et Walden, 1966).



Le tétrathionate peut réagir avec d'autres composés soufrés réduits pour donner des pentathionates (réaction 5) (Sinha et Walden, 1966). La formation de trithionate a aussi été rapportée par réaction chimique du tétrathionate avec le sulfite (réaction 6) (Roy et Trudinger, 1970), et biologiquement par oxydation de l'acide S_3 -sulphane monosulphonique. Le tétrathionate peut être hydrolysé (réaction 7) ou participer à l'élongation de l'acide sulphane monosulphonique (réaction 8a et 8b) menant à la formation de soufre élémentaire (réaction 9) (Steudel *et al.*, 1987).



1.1.1.3 Oxydation du sulfite

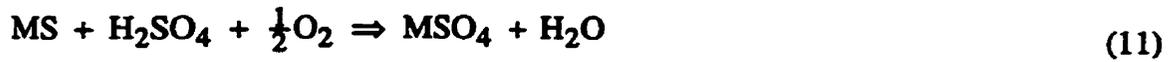
Les solutions de sulfite sont rapidement oxydées en sulfate en présence d'oxygène, et cette réaction chimique est catalysée par plusieurs ions métalliques (Roy et Trudinger, 1970). Par ailleurs, l'oxydation du sulfite par les bactéries peut aussi être couplée à la phosphorylation de l'ADP (Kelly, 1968; Parker et Prisk, 1953; Suzuki, 1974).

1.1.1.4 Oxydation des sulfures métalliques

Les métaux peuvent être solubilisés directement à partir de leurs sulfures respectifs par des microorganismes ou indirectement par les produits de leur métabolisme (Lundgren et Silver, 1980). Le mécanisme direct implique la transformation des sulfures métalliques insolubles en sulfates solubles tel que décrit à la réaction 10 (Hutchins *et al.*, 1986) :



Le mécanisme indirect implique l'action de l'acide sulfurique sur les sulfures (réaction 11) et les oxydes métalliques (réaction 12) (Habashi, 1980), et l'oxydation des sulfures par les ions ferriques produits par l'oxydation microbiologique de la pyrite (Guay *et al.*, 1989).



1.1.1.5 Microorganismes impliqués dans l'oxydation des composés soufrés inorganiques

La participation biologique dans la transformation des composés soufrés inorganiques a été démontrée par Winogradsky il y a environ 100 ans. Par la suite, en 1902, Nathanson isola la première culture pure de *Thiobacillus* et Beijerinck décrivit, en 1904, le genre et deux des espèces les plus communes encore reconnues aujourd'hui : *T. thioparus* et *T. denitrificans* (Smith et Strohl, 1991).

Les thiobacilles sont des bactéries à gram-négatif, en forme de petits bâtonnets aérobies et capables d'oxyder les composés de valence réduite du soufre en acide sulfurique (Harrison, 1984). Pendant plusieurs années, la capacité d'oxyder le thiosulfate était essentielle pour qu'une bactérie puisse être classée parmi les thiobacilles. Cependant, comme le thiosulfate se décompose en soufre élémentaire et en sulfite à pH acide, l'application de ce critère n'est plus obligatoire. Le genre *Thiobacillus* est divisé en deux groupes : les espèces acidophiles et les espèces neutrophiles (Kelly et Harrison, 1988; Kuenen *et al.*, 1992). Le Tableau 1.1 présente une liste complète des espèces de thiobacilles ainsi que les substrats qu'ils utilisent habituellement.

Tableau 1.1 Espèces de *Thiobacillus* en regard de leurs substrats énergétiques

Groupes	Espèces	Substrats	Références
Acidophiles	<i>T. acidophilus</i>	S, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₃ O ₆ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻ , glucose	(Guay et Silver, 1975)
	<i>T. albertis</i>	S, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	(Bryant <i>et al.</i> , 1983)
	<i>T. caldus</i>	S, S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S _n O ₆ ²⁻ , H ₂ , extrait levure, glucose	(Hallberg et Lindström, 1994)
	<i>T. ferrooxidans</i>	S, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻ , Fe ²⁺ , MS	(Temple et Colmer, 1951)
	<i>T. prosperus</i>	MS, S ²⁻ , Fe ²⁺	(Huber et Stetter, 1989)
	<i>T. thiooxidans</i>	S, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	(Waksman et Joffe, 1922)
Neutrophiles	<i>T. capsulatus</i>	S, S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S _n O ₆ ²⁻	(Lashley <i>et al.</i> , 1988)
	<i>T. halophilus</i>	S, S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S _n O ₆ ²⁻	(Wood et Kelly, 1991)
	<i>T. denitrificans</i>	S, S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S _n O ₆ ²⁻	(Beijerinck, 1904)
	<i>T. hydrothermalis</i>	S, S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S _n O ₆ ²⁻	(Durand <i>et al.</i> , 1993)
	<i>T. neapolitanus</i>	S, S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S _n O ₆ ²⁻	(Parker et Prisk, 1953)
	<i>T. tepidarius</i>	S, S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S _n O ₆ ²⁻	(Wood et Kelly, 1985)
	<i>T. thioparus</i>	S, S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , SCN ⁻ , S _n O ₆ ²⁻ , CS ₂ , (CH ₃) ₂ S	(Beijerinck, 1904)
	<i>T. aquaesulis</i>	S, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₃ O ₆ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻ , extrait de levure	(Wood et Kelly, 1988)
	<i>T. delicatus</i>	S, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻ , pyruvate, aspartate	(Mizoguchi <i>et al.</i> , 1976)
	<i>T. novellus</i>	S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻ , glucose, extrait de levure	(Starkey, 1934)
	<i>T. thermophilica</i>	S, S ₂ O ₃ ²⁻ , extrait de levure	(Williams et Hoare, 1972)

L'arrivée des techniques de biologie moléculaire a permis une percée dans le domaine de la taxonomie bactérienne dont celle des thiobacilles. Certaines espèces qui possédaient les caractéristiques physiologiques propres au genre *Thiobacillus* ont été reclassées sur la base de critères phylogénétiques, à l'intérieur d'autres genres ou dans des genres nouveaux, créés pour tenir compte de leur singularité (Tableau 1.2). Il y aura probablement d'autres changements puisque que le genre *Thiobacillus* est encore hétérogène du point de vue phylogénétique (Moreira et Amils, 1997).

Tableau 1.2 Reclassement de certaines espèces du genre *Thiobacillus* à partir d'études taxinomiques

Espèces	Référence	Reclassé	Référence
" <i>T. cuprinus</i> "	(Huber et Steier, 1990)	<i>Thiomonas cuprina</i>	(Moreira et Amils, 1997)
" <i>T. intermedius</i> "	(London, 1963)	<i>Thiomonas intermedia</i>	(Moreira et Amils, 1997)
" <i>T. perometabolis</i> "	(London et Rittenberg, 1967)	<i>Thiomonas perometabolis</i>	(Moreira et Amils, 1997)
" <i>T. thermosulfatus</i> "	(Shoener et al., 1996)	<i>Thiomonas thermosulfata</i>	(Moreira et Amils, 1997)
" <i>T. versus</i> "	(Harrison Jr, 1983)	<i>Paracoccus versus</i>	(Katayama et al., 1995)
" <i>T. thysiaris</i> "	(Wood et Kelly, 1989)	<i>Thiomicrospira thysirae</i>	(Wood et Kelly, 1993)

Les genres *Thiomicrospira* et *Thiosphaera* ont des caractéristiques physiologiques similaires aux *Thiobacillus*, mais leur morphologie sphérique permet de les différencier. Le genre *Sulfobacillus* peut oxyder le soufre, le thiosulfate, les sulfures métalliques et le sulfate ferreux; il est un des seuls genres oxydant le soufre à produire des spores, puisque ce sont des bactéries à gram-positif (Karavaiko et al., 1987). D'autres organismes comme *Sulfobus*, *Thermoplasma* et *Thermus* oxydent le soufre élémentaire en condition thermophile (Brannan et Caldwell, 1980). Les genres *Beggiatoa*, *Achromatum*, *Macromonas*, *Thiobacterium*, *Thioplaca*, *Thiovulum*, et *Thiothrix* ont la capacité d'oxyder le soufre et le sulfure d'hydrogène, ils produisent des globules de soufre internes dans certaines conditions (LaRivière et Schmidt, 1992). De même, les familles de bactéries photosynthétiques *Chlorobiaceae*, *Chromatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, et *Rhodospirillaceae* oxydent le H₂S (Brune, 1989).

Certains microorganismes n'appartenant pas aux ordres des bactéries sulfureuses vertes, pourpres ou incolores tels *Aquaspirillum autotrophicum*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas* sp., *Xanthobacter autotrophicus* peuvent oxyder lentement le thiosulfate, mais ils ne possèdent pas le système enzymatique pour oxyder le soufre (Friedrich et Mitrenga, 1981; Tuttle et al., 1974). Quelques bactéries isolées du sol (*Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp.) de même que certaines moisissures (*Penicillium* sp., *Sordaria* sp., *Cladosporium herbarium*, *Streptomyces* sp.) oxydent le soufre en thiosulfate et en sulfate, mais l'activité oxydante est beaucoup plus faible que chez les thiobacilles (Wainwright, 1978; Wainwright, 1984; Yagi et al., 1971); de plus, l'ajout d'un substrat carboné est nécessaire, ces organismes étant incapables de fixer le CO₂ atmosphérique.

1.1.2 Composés soufrés organiques

Des composés organiques contenant un ou plusieurs atomes de soufre comme les sulfures thio-cycliques, les benzothiophènes, les thia-indanes et les disulfures de diphényles ont été identifiés et retrouvés dans les huiles, le noir de carbone et l'air des villes (Dooley *et al.*, 1974; Lee et Hites, 1976; Lee *et al.*, 1976). À l'inverse du métabolisme du soufre inorganique, le métabolisme du soufre organique n'est pas reconnu pour servir de source d'énergie aux bactéries. Le mécanisme d'oxydation de l'atome de soufre est souvent dû à l'activité d'enzymes non spécifiques telles les oxygénases. L'atome de soufre est donc rarement transformé jusqu'à son état le plus oxydé ($S^{+6} = SO_4^{2-}$). Cependant, comme l'enlèvement des composés soufrés présents dans les combustibles dépend des formes sous lesquelles ils sont retrouvés, il existe plusieurs rapports concernant la dégradation microbienne du dibenzothiophène (DBT), puisque celui-ci est souvent utilisé comme un modèle de composé soufré organique retrouvé dans le charbon et dans les huiles (Krawiec, 1990).

1.1.2.1 Dibenzothiophène

L'utilisation du DBT par les microorganismes comme seule source de carbone, d'énergie et de soufre a été rapportée par deux groupes. En 1961, Knecht a mentionné avoir isolé une culture mixte qui métabolisait le DBT en sulfate et en métabolites cellulaires sans retrouver d'autres produits ou métabolites dans le milieu. En 1976, Malik et Claus ont rapporté avoir isolé 20 souches bactériennes différentes utilisant le DBT comme seule source de carbone, d'énergie et de soufre; cependant, ces isolats n'oxydaient pas l'atome de soufre du DBT. La décomposition du DBT se fait habituellement par l'attaque et le bris d'un des cycles pour rendre la molécule soluble (Hou et Larkin., 1976; Laborde et Gibson, 1977; Thurnheer *et al.*, 1986); à ce stade, elle contient toujours l'atome de soufre. Beaucoup plus tard, Kilbane (1990a) a proposé un sentier métabolique de dégradation du DBT qui se traduisait par la libération de l'atome de soufre et son oxydation sous forme de sulfate; c'est le seul sentier métabolique existant présentement qui permettrait la formation d'acide sulfurique à partir de soufre organique. Cependant, très peu de microorganismes possèdent les enzymes nécessaires à l'utilisation de ce sentier, et présentement, seules deux bactéries sont reconnues pour leur utilisation de ce procédé: *Sulfolobus acidocaldarius* (température de croissance 80°C) et *Rhodococcus erythropolis* (Gray *et al.*, 1996; Izumi *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996; Wang et Krawiec, 1996). Le Tableau 1.3 énumère les microorganismes ayant la capacité de dégrader le DBT ainsi que le type de métabolites produits lors de cette biodégradation.

Tableau 1.3 Microorganismes impliqués dans la biodégradation du DBT

Microorganismes	Métabolites	Références
<i>Achrobacter + Pseudomonas</i>	sulfate	(Knecht Jr., 1961)
<i>Acinetobacter</i> ou <i>Rhizobium</i>	organiques soufrés	(Malik et Claus, 1976)
<i>Beijerinckia</i> sp.	organiques soufrés	(Laborde et Gibson, 1977)
<i>Brevibacterium</i> sp.	organiques soufrés	(Van Afferden <i>et al.</i> , 1990)
<i>Corynebacterium</i> sp.	sulfate (17 %)	(Omori <i>et al.</i> , 1992)
<i>Pseudomonas janii</i>	organiques soufrés	(Kodama <i>et al.</i> , 1970)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	organiques soufrés	(Hou et Larkin, 1976)
<i>Pseudomonas</i> sp.	organiques soufrés	(Monticello et Finnerty, 1985)
<i>Pseudomonas</i> CB1	sulfate	(Isbister et Kobylinski, 1985)
<i>Pseudomonas</i> IGTS7	sulfate	(Kilbane, 1990b)
<i>Pseudomonas</i> TG232 si une source de carbone est ajoutée	sulfate (12 %) sulfate (68 %)	(Kilbane, 1990b)
<i>Rhodococcus erythopolis</i>	sulfate	(Izumi <i>et al.</i> , 1994)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	sulfate (100 %) sulfate (15 %)	(Kargi et Robinson, 1983) (Miller et Risatti, 1986)

1.1.2.2 Autres composés organiques soufrés

Plusieurs groupes de chercheurs se sont attardés à étudier la biodégradation de composés soufrés organiques autres que le DBT. Les acides naphthalène-sulfoniques sont des produits importants de l'industrie de procédés chimiques, leurs sels étant utilisés comme agents de solubilisation et les alkyles comme agents émulsifiants. Ils sont dégradés en métabolites non identifiés qui peuvent être repris par d'autres bactéries avec libération du sulfate (Hou et Larkin, 1976). L'amétryne et la prométryne ont été étudiées. Ces molécules sont retrouvées sous une forme presque pure et utilisées fréquemment comme herbicides. Elles sont utilisées comme seule source de soufre par certaines bactéries (Cook et Hütter, 1982). Le benzothiophène, retrouvé dans les huiles et disponible commercialement, est transformé en 3-méthylbenzothiophène-sulfone (Fedorak et Grbic-Galic, 1991). Schreiner *et al.* (1988) ont étudié la possibilité d'oxyder les composés soufrés hétérocycliques du charbon à l'aide d'une enzyme : la lignase. Le thianthrène a servi de modèle lors des essais et il a été transformé en monosulfoxyde

de thianthrène qui est plus soluble. Plusieurs autres composés ont été étudiés, mais il reste beaucoup de recherche à faire avant que le métabolisme de ces composés soit bien compris. Le Tableau 1.4 résume les essais microbiologiques de biodégradation de ces composés.

Tableau 1.4 Microorganismes impliqués dans la biodégradation des composés organiques soufrés autres que le DBT

Produits	Microorganismes	Métabolites	Références
Acide naphthalène sulfonique	<i>Pseudomonas</i> C22	sulfate	(Brilon <i>et al.</i> , 1981)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	matériels cellulaires	(Zürrer <i>et al.</i> , 1987)
	<i>Moraxella</i>	sulfate	(Wittich <i>et al.</i> , 1988)
Ametryne et Prometryne	<i>Pseudomonas</i> sp.	matériels cellulaires	(Cook et Hütter, 1982)
Thianthrène	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	organiques soufrés	(Schreiner <i>et al.</i> , 1988)
Benzothiophène	<i>Pascilomyces</i>	organiques soufrés	(Faison <i>et al.</i> , 1991)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	organiques soufrés	(Fedorak et Grbic-Galic, 1991)
Dibenzyldisulfure	méthanogène mixte	sulfate (déduction)	(Miller, 1992)

1.2 Oxydation et réduction des composés azotés (N_2 , NO_3^- , NO_2^- , NH_3)

Comme pour le soufre et les autres éléments chimiques de la planète, l'azote est lui aussi continuellement recyclé. Il est essentiellement transformé par l'intermédiaire d'organismes vivants (Figure 1.3).

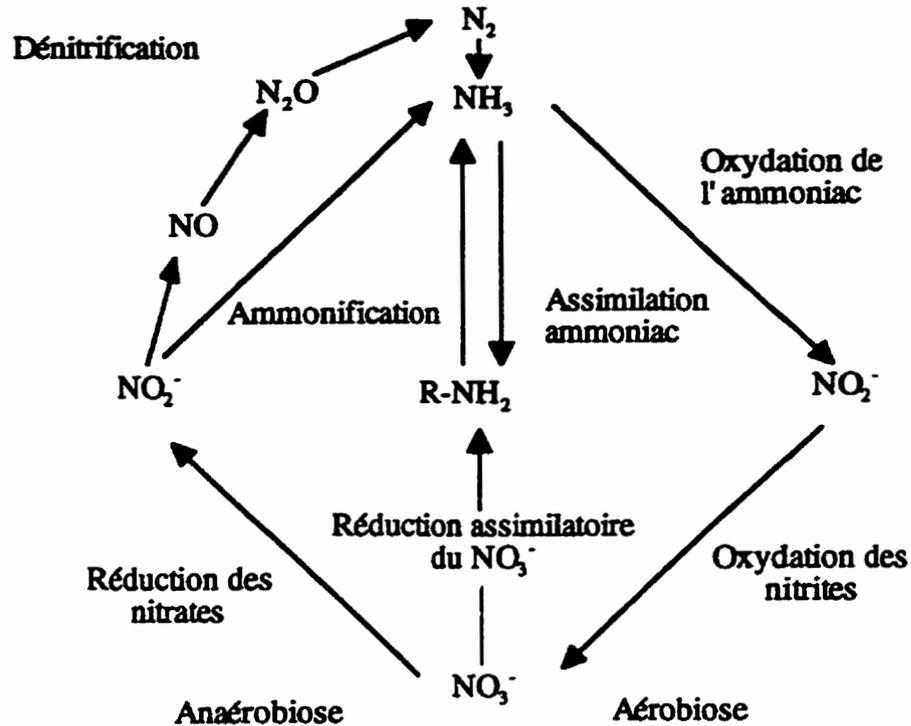
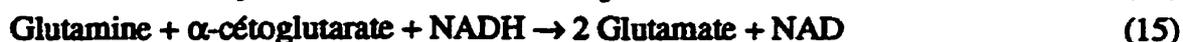


Figure 1.3 Cycle biologique de l'azote (adapté d'Atlas et Bartha, 1987). La portion de gauche représente les procédés anaérobies alors que la portion de droite décrit ceux aérobies. $R-NH_2$ représente les groupements aminés des protéines cellulaires.

1.2.1 Assimilation

L'assimilation biologique des composés azotés réfère à leur conversion en composés azotés organiques. Les plantes et les microorganismes du sol peuvent assimiler les nitrates (NO_3^-) et les incorporer aux acides aminés ou à d'autres composés azotés organiques de la cellule ($R-NH_2$). Ils peuvent aussi réduire les nitrates en ammoniac (NH_3) en passant par les nitrites (NO_2^-). L'ammoniac est alors incorporé aux polymères azotés. Ce procédé est appelé réduction assimilatoire des nitrates, car l'atome d'azote est incorporé à une molécule organique. L'ammoniac est surtout assimilé lors de la formation du glutamate à partir de l' α -cétoglutarate, un intermédiaire du métabolisme du carbone, à l'aide de la glutamate déshydrogénase (réaction 13). Cependant, l'enzyme possède une faible affinité pour le NH_3 et catalyse une réaction

réversible. Les bactéries ont alors recours à une deuxième enzyme, la glutamine synthase qui nécessite de l'énergie (réaction 14). Mais comme le glutamate est la molécule clé lors de la formation des autres acides aminés, le glutamate sera régénéré grâce à la glutamate synthase (réaction 15).



1.2.2 Ammonification

L'ammonification est le procédé par lequel les composés azotés organiques sont transformés en ammoniac. L'autolyse, la décomposition et la putréfaction de la matière biologique sont responsables de cette transformation principalement grâce à la glutamate déshydrogénase (réaction 13) (Postgate, 1987).

1.2.3 Nitrification

L'ammoniac peut être réoxydé en nitrate par deux groupes de bactéries nitrifiantes : *Nitrosomonas* sp. qui oxyde l'ammoniac en nitrite et *Nitrobacter* sp. qui oxyde les nitrites en nitrate. Ces deux classes de bactéries sont très répandues mais difficiles à isoler et à cultiver en laboratoire. Ces microorganismes exigent, en effet, des conditions de croissance particulières, puisqu'elles utilisent l'énergie libérée par l'oxydation de l'ammoniac pour fixer le CO₂ (Postgate, 1987).

1.2.4 Dénitrification

La dénitrification sera surtout effectuée en anaérobiose par des microorganismes qui peuvent utiliser les nitrates comme accepteurs finals d'électron au lieu de l'oxygène. Les nitrates peuvent être convertis en nitrites qui entreront ensuite dans la section assimilatoire du cycle. Il existe cependant plusieurs groupes de bactéries qui réduisent les nitrates en azote. Des exemples sont retrouvés dans les genres *Pseudomonas*, *Micrococcus* et *Thiobacillus* (Postgate, 1987).

1.2.5 Fixation de l'azote

La perte d'azote combiné sous forme d'azote gazeux est compensée par un procédé appelé fixation de l'azote. L'habileté à fixer l'azote (diazotrophie) est limitée aux formes vivantes primitives. Elle est retrouvée parmi les procaryotes (eubactéries et métabactéries), mais elle est absente chez les eucaryotes. Même parmi les bactéries, cette capacité n'est pas universelle. Il y a deux groupes de microorganismes fixateurs d'azote : les symbiotiques et les non symbiotiques. Les microorganismes symbiotiques sont associés aux plantes et ce sont de

loin les plus importants agents biologiques de fixation de l'azote. Malgré cela, les microorganismes non symbiotiques contribuent de manière importante à la fixation de l'azote dans les sols pauvres ou non fertilisés. Le premier produit de la fixation est l'ammoniac, mais il est assimilé presque aussi rapidement qu'il est produit. Il pourra cependant être relâché dans le milieu sous forme d'acides aminés (Pati *et al.*, 1994).

1.2.6 Bactéries fixatrices d'azote (diazotrophes) non photosynthétiques

Durant les vingt dernières années, il y a eu une augmentation du nombre de microorganismes non-symbiotiques confirmés comme étant fixateur d'azote. Ceci est indubitablement relié à l'utilisation de nouvelles méthodes de détection des capacités fixatrices d'azote des microorganismes, dont la réduction de l'acétylène. Cette méthode a permis de vérifier la fixation d'azote chez certaines espèces bactériennes comme les *Pseudomonas* qui ont ensuite été appelées des "fantômes"; puisqu'elles pouvaient croître sur des milieux sans azote combiné, mais qu'elles ne fixaient pas réellement le N₂. Les "fantômes" sont des bactéries qui ont été prises pour des fixatrices d'azotes pour deux raisons. Premièrement, l'azote combiné retrouvé dans les impuretés des produits employés lors de la préparation des milieux de culture est suffisant pour permettre leur croissance, puisque la teneur en azote de leur colonie varie de 1 à 6 % au lieu des 10 à 15 % retrouvés normalement chez les bactéries. Deuxièmement, une bactérie diazotrophe peut se développer à l'intérieur de la colonie d'une autre espèce bactérienne et ainsi fournir les composés azotés nécessaire à la croissance de cette dernière.

À l'exception des bactéries photosynthétiques fixatrices d'azote, la plupart des bactéries diazotrophes sont hétérotrophes. Elles nécessitent un habitat qui leur fournit une source de carbone utilisable pour répondre à la demande énergétique nécessaire à la fixation de l'azote. La diazotrophie a été étendue à quelques bactéries chimiolithotrophes incluant les bactéries oxydant le méthane et le soufre, et à celles capable d'utiliser le H₂ comme source d'énergie en croissance autotrophe. De plus, certaines bactéries anaérobies facultatives des genres *Klebsiella* et *Enterobacter* qui nécessitent une source d'azote combiné pour croître en aérobiose sont capables de fixer l'azote en anaérobiose (Evans et Burris, 1992).

Les bactéries diazotrophes les plus connues font partie du genre *Azotobacter* (Tableau 1.5). En effet, *Azt. chroococcum* a été la deuxième bactérie fixatrice d'azote non symbiotique découverte. Aujourd'hui, le groupe des *Azotobacter* contient plusieurs genres : *Azotobacter*, *Azomonas*, *Azotococcus*, *Beijerinckia* et *Dexia*. Ils sont semblables en apparence; les cellules sont grosses, ovales ou en bâtonnets, parfois mobiles, contenant des granules et formant des colonies gluantes lorsque cultivées sur un milieu sans azote. De plus, leurs caractéristiques physiologiques sont similaires. En général, les *Azotobacter* tolèrent la présence d'oxygène alors

que l'initiation de la croissance de *Derxia* est ralentie en présence d'oxygène. Si les bactéries du genre *Derxia* sont les plus sensibles à l'oxygène, celles du genre *Beijerinckia* ont une tolérance moyenne, alors que les *Azotobacter* sont les moins sensibles.

Tableau 1.5 Bactéries diazotrophes aérobies non symbiotiques (Evans et Burris, 1992)

Bactéries diazotrophes	Genre	Espèces (exemple seulement)
Aérobies	<i>Azotobacter</i>	<i>A. chroococcum</i> , <i>A. vineletii</i>
	<i>Azotococcus</i>	<i>A. agilis</i>
	<i>Azomonas</i>	<i>A. macrocytogenes</i> , <i>A. agilis</i>
	<i>Beijerinckia</i>	<i>B. indica</i> , <i>B. fluminis</i> , <i>B. mobilis</i>
	<i>Derxia</i>	<i>D. gummosa</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. diazotrophicus</i>
Microaérophiles (normalement aérobies lorsqu'elles ne fixent pas l'azote)	<i>Azospirillum</i>	<i>A. lipoferum</i> , <i>A. braziliensis</i>
	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>
	<i>Methylosinus</i>	<i>M. trichosporum</i> , <i>M. sporium</i>
	<i>Thiobacillus</i>	<i>T. ferrooxidans</i>
Anaérobies facultatifs (aérobies lorsqu'elles ne fixent pas l'azote)	<i>Xanthobacter</i>	<i>X. flavus</i> , <i>X. autotrophicus</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>B. polymyxa</i> , <i>B. azotofixans</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>E. agglomerans</i>
	<i>Echerichia</i>	<i>E. intermedia</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. shermanii</i> , <i>P. petersonii</i>

Les bactéries aérobies ou microaérophiles hétérotrophes, dont font partie les *Azotobacter* et *Azospirillum*, sont retrouvées dans la plupart des sols. Les *Azotobacter* sont, cependant, rarement retrouvés dans les milieux salins (Jensen, 1981). Par ailleurs, les *Beijerinckia* sont reconnus pour être localisés dans les sols acides tropicaux de l'hémisphère sud (Döbereiner et Pedrosa, 1987). Cependant, Jordan et McNicol (1978) ont identifiés des bactéries appartenant à ce genre à partir d'échantillons de sols provenant des Territoires du Nord-Ouest canadien. De plus, ils sont aussi retrouvés dans les sols humides comme les *Derxia*. Les *Beijerinckia* préfèrent les températures comprises entre 10 et 60°C et un sol légèrement acide (pH 5,5-6,5) même s'ils peuvent croître à des pH variant de 3,5 à 9,0. Ils tolèrent aussi des concentrations de fer, d'aluminium et de manganèse caractéristiques des sols latériques (sols concentrés en métaux souvent argileux et acides, sols rouges). *B. indica* (colonie "Gummy white") et *B. fluminensis* (colonie blanc neige) sont les deux espèces les plus faciles à identifier; alors que les autres,

n'ayant pas de caractéristiques aussi marquées, sont plus difficiles à reconnaître, donc peu recherchées (Jones, 1976).

La présence des bactéries diazotrophes est donc influencée par la température, l'humidité, le pH des sols, la disponibilité d'une source de carbone, la concentration d'azote combiné, la disponibilité de certains éléments minéraux et les interactions entre les microorganismes.

Concentration en ions H^+ : le pH du sol interagit avec plusieurs facteurs dont la disponibilité des nutriments. La fixation de l'azote est plus efficace à un pH voisin de la neutralité (pH 6,8).

Source de carbone et d'énergie : la plupart des composés carbonés à faible poids moléculaire peuvent être utilisés de même que quelques composés aromatiques (benzoate). Les polysaccharides et autres composés de haut poids moléculaire ne sont généralement pas utilisés à l'exception de l'amidon par *Azt. chroococcum*. Il a été démontré que l'addition de substances carbonées décomposables augmente l'activité de la nitrogénase sauf pour quelques exceptions.

Azote combiné : il interfère avec le système de régulation de la fixation de l'azote en permettant aux bactéries de croître dans des conditions où elles sont incapables de fixer l'azote. Un ratio carbone/azote combiné (C/Ac) < 70 fait diminuer le taux de fixation de l'azote, un ratio C/Ac < 26 arrête la fixation et un ratio C/Ac = 100 donne le meilleur rendement. Cependant, une faible quantité d'azote combiné peut avoir un effet stimulant sur la fixation de l'azote. L'initiation de la croissance en présence d'azote combiné permet de consommer l'oxygène et d'en diminuer la tension. Les bactéries diazotrophes peuvent ainsi croître à des pH plus bas et à des températures plus élevées en présence d'azote combiné.

Nutriments minéraux : le molybdate est nécessaire à l'induction de la fixation d'azote et sa concentration doit être plus élevée lorsque le pH est bas, ce qui est le cas pour les *Beijerinckia*. De plus, ces derniers n'ont pas besoin de calcium et tolèrent une plus grande variation dans la concentration en phosphate (jusqu'à un minimum de 2 % dans le milieu).

Interactions avec les autres microorganismes : l'association des diazotrophes avec d'autres microorganismes a un effet stimulant dans la plupart des cas. Elle peut être reliée à la modification d'un substrat qui n'est pas assimilable (ex. : cellulose), à la production de substances qui augmente la croissance (production de facteur de croissance) ou encore à l'enlèvement de substances inhibitrices.

CHAPITRE 2

MÉTABOLISME DES BACTÉRIES CHIMIOTROPHES AÉROBIES

CHAPITRE 2

2. MÉTABOLISME DES BACTÉRIES CHIMIOTROPHES AÉROBIES

2.1 Vue d'ensemble du métabolisme

Le métabolisme, qui comprend toutes les réactions chimiques qui permettent à la cellule de se développer, est composé de deux grandes branches que sont l'anabolisme (la plupart des voies biosynthétiques) et le catabolisme (transformation et oxydation de composés complexes) (Figure 2.1).

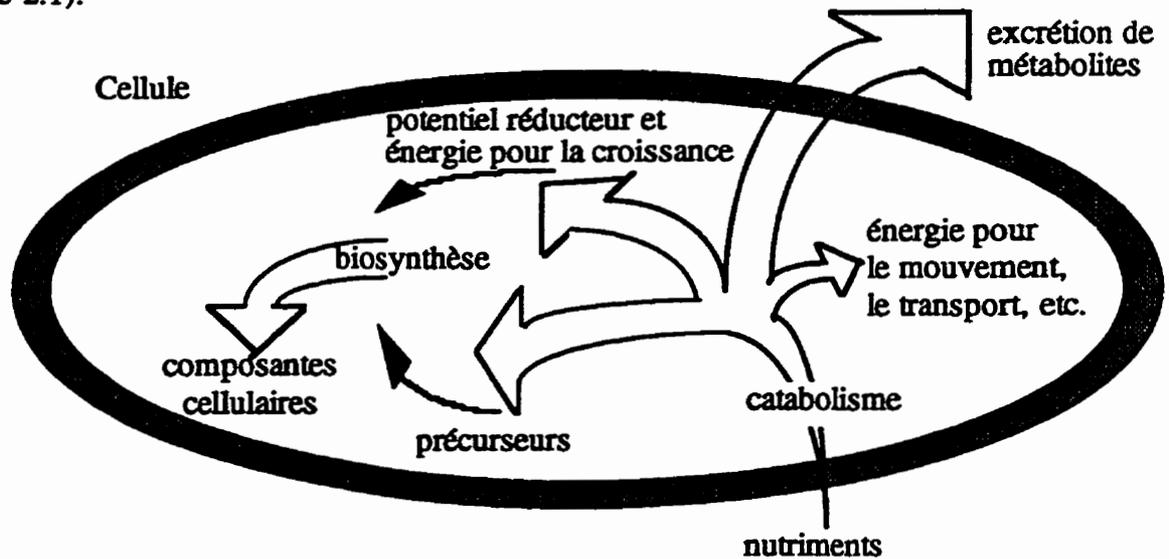


Figure 2.1 Vue simplifiée du métabolisme cellulaire

Le métabolisme implique une transformation des nutriments, matières chimiques de l'environnement, en constituants cellulaires. Il implique des réactions de biosynthèse, puisque le résultat du métabolisme est obtenu par la synthèse biochimique de nouveaux matériaux. La biosynthèse est un procédé qui requiert de l'énergie et des molécules carbonées de base. Il existe deux sources d'énergie pour les microorganismes dans l'environnement : la lumière et les composés chimiques. La plupart des microorganismes tirent leur énergie de la transformation de composés chimiques (chimiotrophes) qu'ils soient organiques (chimioorganotrophes) ou inorganiques (chimiolithotrophes). En outre, les microorganismes peuvent utiliser deux sources de carbone : le CO_2 (autotrophes) ou les composés chimiques organiques (hétérotrophes). La plupart des microorganismes chimiolithotrophes sont autotrophes alors que les bactéries chimioorganotrophes sont hétérotrophes. Cependant, certains microorganismes ont la capacité d'utiliser les composés inorganiques comme source d'énergie et les composés organiques comme source de carbone, ils sont appelés mixotrophes. Cette appellation s'applique également aux bactéries qui sont capables de fixer le CO_2 en même temps qu'elles assimilent le carbone organique.

Le catabolisme, par ailleurs, est le procédé par lequel les composés organiques sont scindés en plus petits constituants qui seront ensuite utilisés dans les voies biosynthétiques (Figure 2.2). Cette série de réactions a pour effet de libérer de l'énergie.

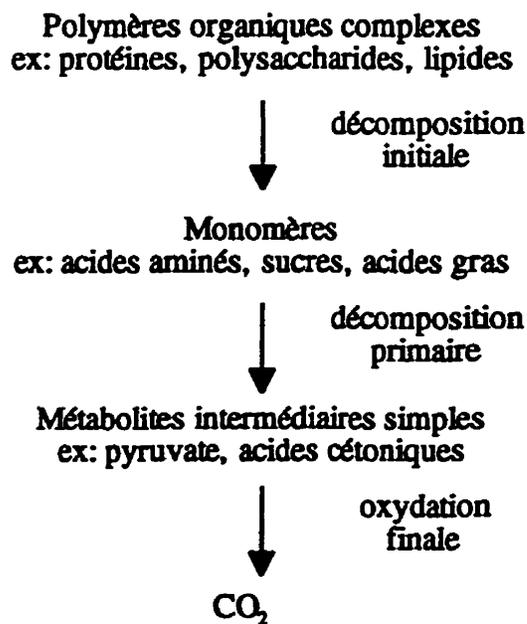


Figure 2.2 Représentation des différents stades du catabolisme (adapté de Dawes et Sutherland, 1992)

2.2 Métabolisme des hétérotrophes

Deux termes décrivent les différents systèmes permettant de produire de l'énergie et d'assimiler le carbone nécessaire à la croissance des bactéries hétérotrophes.

La fermentation où le composé organique sert à la fois de donneur et d'accepteur final des électrons.

La respiration où l'oxygène ou d'autres composés inorganiques ou organiques sont utilisés comme accepteurs finals des électrons dans les chaînes respiratoires. Ces chaînes acceptent les électrons d'un donneur et les transfèrent à un accepteur tout en permettant de conserver l'énergie relâchée pour la synthèse d'ATP (transporteur d'énergie).

Les séries de réactions impliquées dans l'oxydation des composés organiques sont appelées des sentiers métaboliques. Trois sentiers principaux (Embden-Meyerof-Parnas, Pentose phosphate et Entner-Doudoroff) sont utilisés, autant lors de la fermentation que lors de la respiration, pour la dégradation primaire des composés organiques. Ils permettent la transformation des sucres en pyruvate. La décomposition primaire des monomères relâche une faible quantité d'énergie et quelques métabolites intermédiaires simples. Le destin de ces molécules va dépendre de la présence ou de l'absence de l'oxygène ainsi que de son utilisation par la cellule. Chez les bactéries aérobies, les produits de la décomposition primaire vont entrer dans le cycle du citrate (TCA) (aussi connu sous le nom du cycle de Krebs ou des acides tricarboxyliques) où ils seront complètement oxydés en CO₂ et en eau.

2.2.1 Le sentier Embden-Meyerof-Parnas (EMP)

Le sentier Embden-Meyerof-Parnas ou glycolyse est retrouvé surtout chez les bactéries anaérobies strictes ou facultatives. La première étape de l'utilisation des glucides implique le transport transmembranaire et la phosphorylation. Un grand nombre de bactéries transportent et phosphorylent simultanément les hexoses et hexitols en une seule étape catalysée par un système de transport multienzymatique dépendant du phosphoénolpyruvate (PEP) appelé PTS. Le sentier ou cycle EMP permet la transformation du glucose en pyruvate selon la réaction globale 16. Dans ce sentier, une mole de glucose est phosphorylée deux fois pour donner une mole de fructose-1,6-bisphosphate (FDP). Le FDP sera ensuite divisé pour former deux moles de triose-P qui seront finalement oxydées en PEP et en pyruvate.



Il y a trois raisons pour considérer la glycolyse comme un cycle plutôt qu'un sentier lors de l'assimilation de plusieurs sucres (Matin, 1978).

- Premièrement, l'une des deux molécules de PEP formées à partir du catabolisme du glucose est utilisée lors de l'étape du transport du glucose dans la cellule.
- Deuxièmement, l'ATP synthétisé est utilisé pour la phosphorylation du fructose-6-P.
- Et troisièmement, le Pi et l'ADP utilisés pour la synthèse de l'ATP doivent être régénérés pour que le cycle continue.

Deux enzymes de ce sentier catalysent des réactions métaboliques irréversibles, l'hexokinase et la phosphofruktokinase (PFK). L'enzyme clé de ce sentier est la PFK. Elle catalyse la conversion du fructose-6-P en fructose-1,6-*bis*P (Doelle, 1975). Les bactéries qui utilisent seulement ce sentier catabolique lors de leur croissance demandent un milieu de culture complexe, puisqu'il n'y a pas de biosynthèse des précurseurs pentacarbonés.

2.2.2 Le sentier des Hexoses Monophosphate (HMP)

Le sentier complet porte aussi le nom du cycle des Pentoses phosphates (réaction 17). Pour que le cycle soit complet, les bactéries doivent posséder la fructose-1,6-*bis*phosphatase et la glucose-6-phosphatase qui permettront au glycéraldéhyde-3-P de remonter le sentier EMP jusqu'au glucose-6-P. Lorsque le sentier partiel (réaction 18) est utilisé, le glycéraldéhyde-3-P va emprunter le sentier EMP vers le pyruvate au lieu de le remonter.



Les bactéries aérobies vont utiliser de préférence le sentier partiel au cycle pour obtenir leur énergie au moyen du pyruvate et du cycle du citrate. De plus, ce sentier est souvent utilisé par les bactéries qui ne possèdent pas l'enzyme aldolase du sentier EMP, mais il peut aussi être utilisé en combinaison avec les sentiers EMP ou ED.

Le sentier HMP complet fournit une alternative à la glycolyse et au cycle du citrate. Le fonctionnement de ce sentier nécessite de l'oxygène ou un autre accepteur final d'électrons et il peut mener à l'oxydation complète en CO₂. La quantité d'énergie libérée à partir de l'oxydation complète du glucose par ce sentier est comparable à celle obtenue par la glycolyse. De plus, il y a cinq avantages à utiliser ce sentier chez les bactéries qui en sont capables (Saier Jr., 1987).

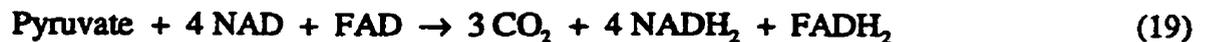
- Premièrement, les réactions se passent dans le cytoplasme et génèrent du NADPH (cofacteur principal de la biosynthèse) au lieu du NADH.
- Deuxièmement, le ribose-5-P, qui est nécessaire à la synthèse des purines et pyrimidines ainsi qu'à celle des acides aminés aromatiques, est synthétisé par ce sentier.
- Troisièmement, ce sentier permet le catabolisme des trioses, tétroses, pentoses, hexoses et heptoses.
- Quatrièmement, il permet leur inter-conversion.
- Et finalement, la fixation du CO₂ utilise certaines des enzymes de ce sentier.

2.2.3 Le sentier Entner-Doudoroff (ED)

Les bactéries aérobies obligatoires qui sont déficientes en PFK et qui ne peuvent par conséquent synthétiser le fructose-1,6-*bis*P utilisent majoritairement ce sentier pour dégrader le glucose. Ce sentier diverge du sentier HMP à partir du 6-P-gluconate qui perd une molécule d'eau et qui est divisé en deux pour donner une molécule de glycéraldéhyde-3-P et une molécule de pyruvate. Ce sentier est surtout retrouvé chez les *Pseudomonas* et chez les espèces bactériennes à gram-négatif.

2.2.4 Le cycle du citrate (TCA)

Plusieurs bactéries aérobies obtiennent leur énergie à partir de l'oxydation complète du pyruvate au moyen du cycle du citrate (réaction 19).



Ce cycle alimente la cellule non seulement en énergie mais aussi en précurseurs pour la synthèse du matériel cellulaire (Brock *et al.*, 1994). Cependant, l'utilisation des molécules du cycle au profit de la biosynthèse pourrait interrompre le cycle; pour le regarnir, il existe des réactions dites anaplérotiques. La plus importante de ces réactions est la transformation du pyruvate en oxaloacétate catalysée par la pyruvate carboxylase qui contient de la biotine (réaction 20). Deux autres réactions permettent aussi de regarnir le cycle du citrate, elles impliquent la PEP carboxylase (réaction 21) et l'enzyme malique (réaction 22) (Saier, 1987). Toutes ces réactions impliquent la fixation du CO₂. En général, les bactéries hétérotrophes ont un bilan net de production de CO₂. Cependant, certaines bactéries hétérotrophes (propionéobactéries) qui utilisent le glycérol comme source de carbone font exception à cette règle, ils fixent plus de CO₂ qu'ils n'en relâchent (Wood, 1989).





Lorsque les bactéries utilisent des acides gras ou de l'acétate comme source de carbone, l'acétyl-CoA est formé directement sans passer par le pyruvate. Dans ces conditions, il n'y a aucun moyen de générer de l'oxaloacétate à partir du pyruvate par la réaction de la pyruvate carboxylase. Cependant, la croissance aux dépens de l'acétate induit la synthèse de deux enzymes : l'isocitrate lyase et la malate synthase. Ces deux enzymes qui permettent de court-circuiter l'étape de décarboxylation du cycle du citrate forment le cycle du glyoxylate. Ce cycle fonctionne donc sans qu'aucun atome de carbone ne soit perdu sous forme de CO_2 , et les molécules à 4 carbones formées à partir de l'acétyl-CoA fourniront les précurseurs nécessaires à la biosynthèse.

2.3 Métabolisme des bactéries chimioautotrophes

Contrairement aux bactéries hétérotrophes, les bactéries chimioautotrophes ne peuvent assimiler le carbone organique et en tirer leur énergie. Elles devront donc utiliser le CO_2 atmosphérique comme source de carbone et différents composés inorganiques qu'elles pourront oxyder tels le S^0 , Fe^{2+} , NH_3 , etc. comme source d'énergie.

Trois sentiers sont utilisés chez les organismes autotrophes pour la fixation du CO_2 . Les bactéries aérobies fixent habituellement le CO_2 par le cycle de Calvin, tandis que les bactéries anaérobies fixent le CO_2 par le sentier de l'acétyl-CoA ou par le cycle de réduction du citrate (Fuchs, 1989). De plus, certaines réactions anaplérotiques permettent aussi la fixation du CO_2 autant chez les bactéries autotrophes qu'hétérotrophes (voir 2.2.4).

2.3.1 Cycle de Calvin ou cycle de la ribulose bisphosphate (RuBP)

Le mécanisme de la fixation du CO_2 est divisé en trois phases : la fixation du CO_2 , la réduction du CO_2 fixé et la régénération de l'accepteur primaire. Lors de la fixation, le CO_2 est incorporé à une molécule de ribulose-1,5-bisphosphate grâce à la ribulose bisphosphate carboxylase (RuBisPCase). Cette molécule est ensuite réduite et mène à la formation de deux molécules d'acide 3-phosphoglycérique (PGA). Après un réarrangement nécessitant de l'énergie, une nouvelle molécule de ribulose-1,5-bisphosphate est produite et une partie du carbone fixé sert à la synthèse du matériel cellulaire. Dans ce cycle, seuls deux enzymes, la phosphoribulokinase et la RuBisPCase, sont spécifiques aux organismes chimioautotrophes, puisque les autres enzymes appartiennent au cycle des pentoses phosphates. Ces enzymes sont inductibles et leur synthèse sera réprimée par la présence de matières organiques dans le milieu

de culture ce qui aura pour effet d'inhiber la croissance des bactéries autotrophes obligatoires, puisqu'elles ne pourront fixer le CO₂.

La RuBisPCase forme des inclusions polyhédriques appelées carboxysomes. En plus de la RuBisPCase, une caractérisation plus approfondie des carboxysomes de *T. neapolitanus* a démontré la présence de tous les enzymes du cycle de Calvin (Beudeker et Kuenen, 1981). Presque toutes les espèces de bactéries chimiolithotrophes obligatoires et les cyanobactéries (Kuenen et Beudeker, 1982) possèdent des carboxysomes. Leur présence est rare cependant parmi les bactéries chimiolithotrophes facultatives, les deux seuls à posséder des carboxysomes étant *Thiomonas intermedia* ("T. intermedius") et *T. acidophilus*. La présence des carboxysomes est induite seulement en condition d'autotrophie chez *Thm. intermedia*; alors que chez *T. acidophilus*, la présence de carboxysomes, en quantité moindre cependant, est observée même sous des conditions de croissance hétérotrophe (Pronk *et al.*, 1990b).

2.3.2 Cycle de réduction du citrate

Même si le cycle de Calvin est presque ubiquitaire chez les bactéries chimiolithotrophes aérobies fixant le CO₂, le cycle est absent chez *Hydrogenobacter thermophilus* (Shiba *et al.*, 1985). Dans ce cas, il a été démontré que la fixation du CO₂ était assumée par le cycle de réduction du citrate (cycle du citrate inversé), et que la RuBisPCase et la phosphoribulokinase étaient absentes.

Le cycle de réduction du citrate est utilisé pour former du citrate à partir de l'oxaloacétate (réaction 23). L'oxaloacétate est réduit au succinate par la malate déshydrogénase, la fumarase et la fumarate réductase. Ensuite, le succinate est activé en succinyl-CoA par l'action de la succinyl-CoA synthase. Puis, deux réactions impliquant la fixation de CO₂, catalysées par l' α -cétoglutarate synthase et l'isocitrate déshydrogénase, mènent à la formation d'isocitrate qui sera ensuite transformé en citrate par l'aconitase. Enfin, le citrate est transformé en acétate, puis en acétyl-CoA et en oxaloacétate par l'ATP:citrate lyase.



La seule réaction irréversible de ce sentier serait celle impliquant la fumarate réductase. Cependant, cette réaction est réversible chez *Desulfobacter hydrogenophilus*. Cette bactérie peut fixer le CO₂ sous des conditions de croissance autotrophe et oxyder l'acétate en hétérotrophie (Fuchs, 1989). Certains enzymes du cycle de réduction du citrate sont différents de ceux du cycle oxydatif du citrate; la fumarate réductase, l' α -cétoglutarate synthase et l'ATP:citrate lyase remplacent respectivement la succinate déshydrogénase, l' α -cétoglutarate déshydrogénase et la citrate synthase.

2.4 Métabolisme des bactéries thio-oxydantes

Même si les bactéries thio-oxydantes se distinguent principalement par leur habilité à générer de l'énergie à partir de composés soufrés inorganiques, certaines de ces bactéries possèdent aussi plusieurs caractéristiques du métabolisme énergétique des hétérotrophes. En réalité, il existe tout un spectre de métabolisme différent (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Type physiologique parmi les bactéries non photosynthétiques thio-oxydantes (adapté de Kuenen, 1989)

Type physiologique	Source d'énergie		Source de carbone	
	Composé soufré inorganique	composé organique	CO ₂	composé organique
Chimiolithoautotrophe obligatoire	+	-	+	-
Chimiolithoautotrophe facultatif	+	+	+	+
Chimiolithohétérotrophe	+	+	-	+
Chimioorganohétérotrophe	-	+	-	+

2.4.1 Physiologie des bactéries chimiolithoautotrophes obligatoires

Les bactéries thio-oxydantes chimiolithoautotrophes obligatoires appartiennent aux genres *Thiobacillus* et *Thiomicrospira*. Ce sont des organismes très spécialisés possédant un métabolisme relié à leur mode de vie. Ces bactéries sont incapables de tirer leur énergie de l'oxydation de composés organiques en raison de leur capacité très limitée à utiliser ces composés exogènes. Le sulfure de diméthyle est l'exception, puisqu'il peut servir de source d'énergie en étant oxydé en CO₂ et en sulfate (Kuenen et Bos, 1989).

Contrairement aux *Thiobacillus* qui fixent le CO₂ au moyen du cycle de Calvin, les espèces du genre *Thiomicrospira* fixent vraisemblablement le CO₂ en utilisant le cycle de réduction du citrate, mais aucune analyse détaillée n'a été publiée jusqu'à maintenant (Kelly, 1989).

Comme la fixation du CO₂ demande de l'énergie, les bactéries autotrophes obligatoires n'ont pas intérêt à perdre le carbone fixé en produisant de l'énergie par le cycle du citrate. Elles ne possèdent pas le complexe de l' α -cétoglutarate déshydrogénase ce qui signifie que le cycle du citrate est incomplet. La présence des enzymes du cycle du glyoxylate pourrait permettre à ces bactéries d'utiliser certains substrats carbonés en court-circuitant l'étape de l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Cependant, en plus de posséder un cycle du citrate incomplet, le cycle du glyoxylate est absent chez ces bactéries. Ceci explique l'incapacité de ces organismes à utiliser

les intermédiaires du cycle du citrate comme substrats pour la respiration et ainsi en tirer de l'énergie. Ces métabolites seront plutôt transformées en précurseurs nécessaires à la biosynthèse et incorporées aux constituants cellulaires (Matin, 1978). Le cycle du citrate est donc divisé en deux parties, une partie réductrice et une oxydatrice. Pour se rendre au succinate, l'organisme doit utiliser la voie anaplérotique de la pyruvate carboxylase pour d'abord transformer le pyruvate en oxaloacétate. Dans l'autre moitié du cycle, l'acétyl-CoA va réagir avec l'oxaloacétate et se rendre jusqu'à l' α -cétoglutarate. Le cycle joue donc un rôle purement biosynthétique comme pour les bactéries hétérotrophes anaérobies.

Même si les bactéries chimiolithotrophes obligatoires tels *T. neapolitanus*, *T. thioparus*, *T. denitrificans* synthétisent leur carbone organique à partir du CO₂, elles peuvent aussi assimiler entre 20 et 30 % de leur carbone à partir de composés organiques exogènes. L'assimilation de ces composés organiques pour la biosynthèse du matériel cellulaire permet d'épargner de l'énergie, mais tout comme la fixation du CO₂, elle est dépendante de l'oxydation de composés soufrés inorganiques. Lorsque la croissance de ces organismes est effectuée dans des conditions limitantes en énergie et en présence de composés carbonés organiques simples tel l'acétate, le rendement cellulaire est plus élevé qu'en son absence. L'utilisation du métabolisme hétérotrophe énergétique de ces bactéries se produit surtout sous des conditions de privation aux dépens de matériels de réserves internes comme le glycogène. Ces réserves peuvent être oxydées en présence d'oxygène ou fermentées en anaérobiose (Kuenen et Bos, 1989).

La plupart des bactéries chimiolithotrophes obligatoires ne possèdent pas les enzymes clés des sentiers EMP et ED. Aucune activité de la phosphofructokinase n'a été trouvée dans les extraits cellulaires de *T. neapolitanus* et de *T. thiooxidans*. Cependant, la présence des enzymes du sentier HMP a été démontrée (Matin, 1978). La régulation de ces sentiers métaboliques chez les bactéries chimiolithotrophes obligatoires est différente de celle des hétérotrophes, puisqu'ils ont seulement une fonction de biosynthèse. En général, la présence de composés organiques dans le milieu aura seulement un effet minime sur l'activité des enzymes autres que la RuBisPCase.

La capacité limitée des chimiolithotrophes obligatoires à assimiler les composés organiques exogènes a souvent été reliée à l'absence de mécanisme de transport membranaire. Néanmoins, l'acétate est absorbé par diffusion, même par les hétérotrophes, ce qui explique son assimilation par les bactéries chimiolithoautotrophes obligatoires. De plus, *T. neapolitanus* utilise un gradient électrochimique comme source d'énergie pour le transport actif d'acides aminés comme le font les hétérotrophes. Nous ne savons pas si ces bactéries possèdent des mécanismes de transport actif pour les sucres et les acides organiques (Matin, 1978).

2.4.2 Physiologie des bactéries chimiolithoautotrophes facultatives

Contrairement aux chimiolithoautotrophes obligatoires, les organismes facultatifs, en plus de croître en autotrophie en utilisant les composés soufrés inorganiques comme source d'énergie, peuvent aussi croître en hétérotrophie. Ces bactéries appartiennent aux genres *Thiobacillus*, *Thiomonas*, *Sulfolobus*, *Thermotrix*, *Paracoccus*, *Ralstonia* ("Hydrogenomonas") et *Sulfobacillus*. De plus, comparé au métabolisme relativement réduit des bactéries thiooxydantes obligatoires, les organismes facultatifs ont un métabolisme qui a la capacité de s'ajuster aux changements de disponibilité des substrats (Kuenen et Bos, 1989).

Whittenbury et Kelly ont postulé en 1977 que les bactéries chimiolithotrophes facultatives devaient être soit de très bons chimiolithoautotrophes, soit de très bons chimiolithohétérotrophes pour compétitionner avec les autres bactéries. Cependant, leur taux de croissance en autotrophie ou en hétérotrophie est inférieur à celui des organismes spécialistes. Lorsqu'un mélange de composés organiques et inorganiques est fourni, les organismes facultatifs vont souvent démontrer une croissance biphasique (diauxique). Cependant, lorsque la concentration des composés énergétiques et/ou carbonés est limitée, plusieurs substrats peuvent être utilisés simultanément (Kuenen et Bos, 1989).

Comme pour les *Thiobacillus* chimiolithoautotrophes obligatoires, les thiobacilles facultatifs fixent le CO₂ par le cycle de Calvin. Cependant, la RubisPCase est réprimée durant la croissance en hétérotrophie (Kelly, 1989). En condition de croissance mixotrophe, les bactéries démontrent une activité moyenne de la RuBisPCase. De plus, une utilisation efficace des ressources disponibles est démontrée. La fixation du CO₂ sera induite lorsque le ratio des composés soufrés par rapport aux composés organiques devient si élevé que les composés organiques ne rencontrent plus la demande en carbone organique. Au contraire, si le ratio est bas, le substrat organique peut servir de source de carbone et d'énergie. Dans ces conditions, le composé soufré inorganique sert de source d'énergie supplémentaire (Kuenen et Bos, 1989). Contrairement aux thiobacilles, les bactéries chimiolithoautotrophes facultatives qui oxydent l'hydrogène ("knallgas bacteria") peuvent aussi croître en chimiolithoautotrophie sur le soufre en fixant le CO₂ au moyen du cycle de réduction du citrate. De même, *Sulfolobus* et *Acidianus* n'utilisent probablement pas le cycle de Calvin, car ils semblent fixer le CO₂ par un sentier non établi qui pourrait être un cycle de réduction des acides carboxyliques similaire à celui des bactéries vertes soufrées photosynthétiques ou à celui des bactéries sulfato-réductrices (Kelly, 1989).

Les enzymes clés des sentiers EMP, ED et HMP ont été trouvés dans presque tous les extraits enzymatiques des chimiolithoautotrophes facultatifs en croissance sur les hexoses, exception faite de *T. novellus* qui ne possède pas la phosphogluconate déshydratase (ED). Chez *R. eutropha* ("Alcaligenes"-"Hydrogenomonas eutrophus") et *Thm. intermedia*, les enzymes du sentier ED sont activées par la présence des sucres. Cependant, la concentration des enzymes du sentier HMP reste faible et inchangée, et la concentration de la fructose-1,6-bisP aldolase diminue. Au contraire, la concentration des enzymes des trois sentiers augmente chez *P. versutus* et *T. acidophilus* (Matin, 1978). De plus, les bactéries chimiolithoautotrophes facultatives possèdent un cycle du citrate complet et, en général, la concentration des enzymes augmente lors de la croissance en hétérotrophie ce qui est en accord avec leur rôle de génération d'énergie (Matin, 1978). La présence des enzymes du cycle du glyoxylate a été démontrée chez *Pseudomonas facilis* ("Hydrogenomonas facilis"), *T. novellus*, *P. versutus* ("Thiobacillus A₂" - "T. versutus") et certains thiobacilles thermophiles.

Des études physiologiques sur des cultures en cuvée ("batch") de bactéries chimiolithoautotrophes facultatives comme *P. versutus* ont démontré la répression de la fixation du CO₂ et de la génération d'énergie à partir de l'oxydation des composés soufrés inorganiques par l'addition de substrats organiques dans le milieu (Gottschal et Kuenen, 1980). Le mode de culture peut aussi influencer l'utilisation des sentiers métaboliques. *P. versutus* utilise les trois sentiers lorsque cultivé en cuvée ("batch"), et seulement les sentiers ED et pentoses phosphate au cours de croissance en culture continue (Wood et Kelly, 1981).

Les bactéries chimiolithoautotrophes facultatives ont un métabolisme intéressant du point de vue de la régulation entre le métabolisme autotrophe, mixotrophe et hétérotrophe. Les études tendent à démontrer que :

- le taux de la RuBisPCase durant la phase stationnaire de la production de la biomasse d'une culture mixotrophe est déterminé par la concentration relative des substrats inorganiques et organiques lorsque les deux sont limitants;
- la proportion du carbone assimilé à partir du CO₂ et du carbone organique est aussi dépendante de la concentration du substrat, et suggère un mécanisme de régulation qui permet à la cellule d'utiliser le plus efficacement possible l'énergie métabolique disponible pour maximiser la production de la biomasse;
- un milieu permettant une croissance mixotrophe tend à sélectionner et à donner un avantage potentiel aux bactéries mixotrophes lorsqu'elles sont en compétition, dans une culture mixte (et possiblement aussi dans l'environnement), avec des bactéries chimiolithohétérotrophes ou chimiolithoautotrophes obligatoires.

2.4.3 Physiologie des bactéries chimiolithohétérotrophes et chimioorgano-hétérotrophes

Les bactéries hétérotrophes qui sont capables d'oxyder les composés soufrés inorganiques peuvent être divisées en deux sous-groupes : ceux qui tirent de l'énergie du procédé (chimiolithohétérotrophes) et ceux qui, à première vue, n'en tirent aucun bénéfice (chimioorgano-hétérotrophes).

Le premier groupe inclut des membres des genres *Thiobacillus* et *Pseudomonas*, mais peu d'études ont porté sur le métabolisme de ces bactéries thio-oxydantes hétérotrophes. L'une d'elles portait sur le *Thiobacillus* Q qui peut croître de manière hétérotrophe ou mixotrophe sur un mélange d'acétate et de thiosulfate. Cet organisme ne peut cependant croître en autotrophie complète. Un autre exemple de croissance chimiolithohétérotrophe est celui d'*Hyphomicrobium* EG en croissance sur le sulfure de diméthyle. Il a été démontré que ce composé est initialement métabolisé en formaldéhyde et en sulfure d'hydrogène. Par la suite, le formaldéhyde est utilisé comme source de carbone et d'énergie, et le H₂S est utilisé comme source d'énergie supplémentaire. Il n'y a aucune évidence de fixation autotrophe du CO₂ sous aucune condition de croissance (Kuenen et Bos, 1989).

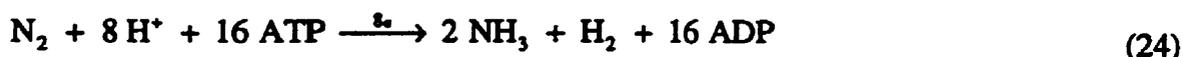
Le deuxième groupe comprend les genres *Thiospira* et *Macromonas* ainsi que certaines espèces du genre *Beggiatoa*. Ces bactéries ne semblent pas produire de l'énergie utile pour leur métabolisme, mais elles bénéficient de l'oxydation du H₂S en détruisant le peroxyde d'hydrogène formé lors du métabolisme hétérotrophe. En même temps, l'oxydation du H₂S produit des granules de soufre internes qui pourront servir d'accepteur d'électron lors de l'oxydation des composés organiques en anaérobiose.

2.5 Métabolisme des bactéries diazotrophes

Les bactéries diazotrophes utilisent les trois sentiers métaboliques principaux retrouvés chez les microorganismes, puisqu'elles sont, pour la plupart, hétérotrophes. Le métabolisme de ce groupe bactérien est surtout caractérisé par leur capacité à utiliser l'azote gazeux (N₂) comme source d'azote (N). Pour ce faire, elles possèdent une enzyme appelée nitrogénase. Cependant, cette enzyme est sensible à l'oxygène et, avec le temps, les microorganismes aérobies se sont adaptés de manière à être capables de fixer l'azote tout en utilisant l'oxygène pour la respiration. De plus, plusieurs facteurs environnementaux peuvent influencer la croissance et la fixation de l'azote chez les diazotrophes.

2.5.1 Nitrogénase

Les bactéries diazotrophes catalysent une réaction qu'un chimiste considérerait difficile. L'azote gazeux est une molécule très peu réactive. Ce composé chimique est très stable en raison du lien triple qui relie les deux atomes d'azote ($N\equiv N$). Le catalyseur biologique qui permet de rendre cette molécule réactive doit donc posséder des caractéristiques exceptionnelles. La nitrogénase est constituée de deux protéines : l'une, plus grosse, contient un atome de molybdène et un atome de fer, l'autre, plus petite, ne contient qu'un atome de fer. La conversion d'une molécule de N_2 en deux molécules de NH_3 implique une réduction de l'azote où l'agent réducteur est l'hydrogène. Cette réaction demande de l'énergie (ATP) et peut demander jusqu'à 16 molécules d'ATP pour transformer une molécule de N_2 en NH_3 (réaction 24)



Ce procédé est donc très énergivore. L'organisme doit utiliser des éléments nutritifs en grande quantité pour lui fournir l'énergie nécessaire à la formation de l'ATP (par exemple le glucose). De plus, cette enzyme a besoin d'un ion magnésium (Mg^{2+}) pour bien fonctionner. En plus de sa capacité à transformer l'azote, cette enzyme peut aussi former de l'hydrogène gazeux à partir des ions H^+ de l'eau en absence d'azote (en tube), elle est donc assez puissante pour décomposer l'eau. En réalité, cette réaction est présente dans la cellule lors de la fixation de l'azote, mais la cellule est capable de recycler l'hydrogène gazeux formé.

D'autres molécules possédant un lien triple (l'acétylène, le cyanure d'hydrogène, l'acide hydrazoïque et l'oxyde nitreux) peuvent aussi être transformées par la nitrogénase. Le monoxyde de carbone n'est pas transformé, mais il peut cependant inhiber la nitrogénase.

2.5.2 Nitrogénase vs oxygène

La nitrogénase est sensible à l'oxygène ce qui force les bactéries anaérobies facultatives, microaérophiles et aérobies à la protéger (Postgate, 1987). Elles ont développé différents mécanismes pour protéger la nitrogénase de l'oxygène.

2.5.2.1 Bactéries diazotrophes anaérobies facultatives

La plupart des bactéries diazotrophes anaérobies facultatives fixent l'azote en anaérobiose. Elles pourront toutefois fixer l'azote en présence d'oxygène à condition que celui-ci soit consommé par les cellules au fur et à mesure qu'il diffuse dans le milieu. Dans de telles conditions, les bactéries croissent en aérobiose tout en étant dans des conditions limitantes en oxygène.

2.5.2.2 Microaérophilie

Il existe des bactéries qui sont sensibles à l'oxygène mais qui en ont quand même besoin pour croître : ce sont les microaérophiles. Plusieurs bactéries diazotrophes aérobies se comportent comme des microaérophiles lorsqu'elles fixent l'azote. *Derxia gummosa* en est un bon exemple. Lorsqu'une population de cette bactérie est étalée sur un milieu gélosé contenant peu d'azote combiné, quelques organismes vont former de grosses colonies jaunes gluantes qui fixent vigoureusement l'azote, alors que les autres colonies resteront petites et incolores. Ce dimorphisme colonial peut être altéré si les vases de pétri sont incubés en microaérophilie (tension en oxygène de 0,05 atmosphère) ou si des traces d'un sel d'ammonium sont ajoutées à l'agar (5 µg NH₄Cl / ml milieu, n'influenceront pas l'activité de la nitrogénase). D'autres espèces de bactéries diazotrophes aérobies tels *Xanthobacter flavus*, *Azospirillum lipoferum*, *Xanthobacter autotrophicus* et les bactéries qui oxydent le méthane démontrent une sensibilité à l'oxygène similaire à *D. gummosa*. Chez les *Beijerinckia*, le taux de fixation de l'azote augmente lorsque la teneur en azote est supérieure à 0,8 atmosphère. De même, la fixation de l'azote augmente chez les bactéries aérobies lorsque la teneur en oxygène est faible (inférieure à 0,2 atmosphère) (Paerl *et al.*, 1981).

Respiration Les bactéries diazotrophes anaérobies facultatives ou microaérophiles vont fixer l'azote en présence d'oxygène seulement si la respiration leur permet de diminuer le taux d'oxygène à un niveau infime. La respiration permet de générer de l'ATP pour tous les organismes vivants non fermentants. Cependant, chez les diazotrophes, tout en générant de l'ATP, la respiration sert de mécanisme de protection de la nitrogénase contre l'oxygène.

2.5.2.3 Polysaccharides

Les bactéries diazotrophes forment souvent de grosses quantités de polysaccharides extracellulaires : les colonies mucoïdes des *Beijerinckia* peuvent être très spectaculaires. Il a été suggéré que cette couche de polysaccharide diminue la diffusion de l'oxygène jusqu'à la bactérie et forme ainsi une barrière contre l'oxygénation excessive. Mais certaines espèces de *Klebsiella* et de *Rhizobium* productrices de polysaccharides semblent aussi sensibles à l'oxygène que d'autres qui n'en produisent pas.

2.6 Métabolisme du phosphore

Tous les organismes vivants requièrent du phosphore pour leur croissance et leur métabolisme. C'est un facteur essentiel à la formation de l'énergie cellulaire (ATP) et de certaines structures cellulaires (ADN, ARN, phospholipides). Le cycle de phosphore implique essentiellement la conversion du phosphore organique à son état inorganique et celle de l'état inorganique à organique. Cependant, contrairement aux cycles microbiens du soufre et de l'azote, le phosphore, en général, ne subit pas de réactions d'oxydation ni de réduction. De plus, il est surtout retrouvé sous forme d'ion phosphate (PO_4^{3-}) (Jones, 1997). Par ailleurs, les ions phosphates ont tendance à se combiner avec plusieurs cations et à former des sels insolubles. Cependant, plusieurs microorganismes hétérotrophes produisent des acides organiques qui solubilisent ces sels (Atlas et Bartha, 1987). Quelques microorganismes chimiotrophes comme les *Nitrosomonas* et les *Thiobacillus* peuvent aussi solubiliser les sels phosphatés en produisant de l'acide nitrique ou sulfurique (Cantin, 1995; Tiessen et Stewart, 1985).

Même si la concentration en phosphore est souvent limitante au développement des microorganismes dans l'environnement, la concentration en phosphore disponible dans les milieux utilisés en laboratoire peut être contrôlée de manière à éviter qu'elle ne le devienne.

2.7 Production d'énergie

Lors de l'oxydation des composés organiques, l'énergie est générée sous forme d'ATP. Dans le sentier EMP, l'oxydation du glycéraldéhyde-3-P et l'ajout d'une molécule de phosphate inorganique mènent à la formation du 1,3-bisP-glycérate. Le lien phosphate possède un état d'énergie élevée qui peut être transféré à l'ATP lorsque ce dernier est formé à partir de l'ADP. De même, la conversion du PEP en pyruvate permet la formation d'ATP à partir de l'ADP. Dans ce système, l'énergie est transférée au moyen d'un groupement chimique (un groupe phosphorylé).

Chez les organismes aérobies, l'oxydation des composés organiques génère aussi une puissance réductrice sous forme de coenzymes réduits (NAD(P)H et FADH_2). Ces coenzymes réduits pourront être convertis en ATP par deux procédés : le transport des électrons et la phosphorylation oxydative. Lors du passage des électrons à travers la chaîne de transport d'électrons, les réactions d'oxydoréduction libèrent des protons qui seront entreposés sous forme d'un gradient transmembranaire. Ce gradient de protons sera utilisé par l'ATPase pour synthétiser de l'ATP (Saier, 1987).

CHAPITRE 3

COMMUNAUTÉS MICROBIENNES

CHAPITRE 3

3. COMMUNAUTÉS MICROBIENNES

Au cours du siècle dernier, la microbiologie a surtout été caractérisée par l'isolement et l'identification de microorganismes en culture pure à partir de leur environnement naturel. Beaucoup d'études ont porté sur la croissance et la physiologie de ces isolats en laboratoire. Cependant, l'étude des interactions entre les différentes espèces de microorganismes est devenue un sujet de recherche de pointe seulement depuis les années 1970 (Kelly, 1977). Depuis, les progrès ont surtout été réalisés sur le plan théorique. Les études sur la prédation et la compétition microbienne en sont deux exemples (Smith, 1993; Van Es *et al.*, 1984). Plusieurs limitations méthodologiques expliquent la faible progression au plan expérimental. Les technologies courantes ne permettent pas la culture de la majorité des microorganismes présents dans l'environnement. Et malgré le développement de techniques basées sur l'extraction directe de molécules indicatrices comme les acides nucléiques et les acides gras qui permettent l'étude des microorganismes sans en nécessiter leurs cultures, il est impossible d'identifier et d'énumérer toutes les espèces bactériennes présentes dans les communautés microbiennes. En 1971, Alexander disait que seules quelques espèces des communautés microbiennes étaient connues et que peu d'entre elles avaient été étudiées en profondeur. Ceci est encore vrai pour plusieurs des membres des communautés microbiennes marines, aquatiques et terrestres.

Une communauté microbienne est habituellement constituée de plusieurs populations d'organismes qui vivent ensemble dans un environnement particulier (Slater, 1977). D'autres auteurs ont utilisé les termes "consortium" et "association" pour décrire ces regroupements de microorganismes surtout lorsqu'ils ont été étudiés en laboratoire. Plusieurs termes ont été

définis par Brock (1966) pour distinguer les membres des communautés microbiennes et ce, sur la base de leur fonction à l'intérieur de la communauté :

- (a) espèces dominantes : celles qui ont une influence dominante sur la communauté;
- (b) espèces associées : dépendantes de la ou des espèce(s) dominante(s) pour leur survie;
- (c) espèces incidentes : qui sont plus ou moins influencées par l'action des espèces dominantes et associées.

De plus, Bull et Slater (1982) ont défini deux autres termes pour classer les communautés microbiennes qui sont impliquées dans la biodégradation des composés xénobiotiques. Ils les définissent comme suit :

- (i) utilisateurs primaires : espèces bactériennes capables d'assimiler ou de métaboliser le composé initial en l'utilisant comme source majeure de carbone et d'énergie;
- (ii) utilisateurs secondaires : espèces bactériennes incapables d'assimiler ou de métaboliser le substrat initial, mais qui ont la capacité d'utiliser les métabolites exogènes produits par les utilisateurs primaires ou les produits de la lyse cellulaire et qui sont des membres stables de la communauté.

La coexistence continue de plusieurs organismes à l'intérieur d'un habitat peut être expliquée, en partie, par des caractéristiques spatiales et temporelles qui délimitent différents micro-environnements, et par la nature des ressources disponibles pour la croissance des diverses espèces. La plupart des environnements sont hétérogènes, fournissant ainsi des niches physiques différentes, dont chacune supporte la croissance d'espèces microbiennes les plus adaptées à ces conditions particulières. De plus, au fur et à mesure que les conditions physico-chimiques changent, les espèces se succèdent en dominant chacune à leur tour la communauté selon les conditions qui prévalent. La diversité des ressources nutritives, particulièrement des sources de carbone, fournit des variations supplémentaires qui permettent à différentes espèces d'occuper le même habitat. Cependant, en plus des facteurs environnementaux, il est reconnu que la coexistence de différentes espèces dans la nature est le résultat de l'évolution de différents types d'interactions. En effet, la compétition, une interaction parmi d'autres, est probablement le mécanisme de base du procédé d'évolution qui a produit la diversité des microorganismes qui existent présentement (Slater, 1977).

3.1 Techniques de culture employées pour caractériser les communautés

Plusieurs techniques déjà existantes tels la culture pure, l'enrichissement, la culture mixte et les méthodes de culture combinée de plusieurs espèces ont été utilisées pour caractériser les communautés microbiennes (Caldwell *et al.*, 1997).

3.1.1 La culture pure

Les cultures pures sont utilisées pour identifier et caractériser les différents membres d'une communauté. Cependant, il arrive que l'association entre deux espèces soit si importante qu'il soit impossible d'en obtenir des cultures pures. Les techniques de la biologie moléculaire, développées au cours des vingt dernières années, permettent maintenant d'identifier ces espèces. Elles aident également à les caractériser par l'utilisation de sondes fluorescentes très spécifiques (ex : sonde de l'ADNr du 16S, voir section 3.2.2.2) qui permettent de suivre l'évolution d'une espèce soumise à des conditions particulières (Caldwell *et al.*, 1997).

3.1.2 L'enrichissement

Les cultures d'enrichissement ont surtout été employées pour isoler les espèces d'une communauté qui possèdent certaines caractéristiques spécifiques. De plus, elles ont aussi été utilisées pour obtenir des consortiums qui ont des capacités particulières de biodégradation (Caldwell *et al.*, 1997).

3.1.3 La culture mixte

Les cultures mixtes sont produites en combinant, sous des conditions stériles, deux ou plusieurs espèces qui ne sont cependant pas nécessairement des communautés (Caldwell *et al.*, 1997). L'utilité première d'une culture mixte est de démontrer et d'établir les mécanismes synergiques existant entre les espèces isolées d'une communauté. Ces expériences sont nécessaires pour établir les paramètres d'utilisation des communautés dans des procédés biotechnologiques des domaines agricoles, industriels ou environnementaux.

3.1.4 La culture des communautés

La culture des communautés fait allusion aux méthodes utilisées pour isoler et cultiver les consortiums, les communautés des biofilms, les micro-écosystèmes et autres réseaux de microorganismes interactifs. La culture des communautés est définie par la précision de l'environnement de la communauté plutôt que par l'isolement des espèces à l'aide de techniques

aseptiques. La composition de la culture résultante sera alors définie à travers la formation d'associations microbiennes.

Même s'il y a quelques exceptions, les procédures d'enrichissement conventionnelles et la culture en cuvée ("batch") permettent rarement d'isoler des communautés microbiennes. En général, elles sont isolées à l'aide de techniques de culture en mode continu comme la culture en chémostat. De plus, ce type d'enrichissement permet de faire varier certaines conditions de sélection comme la nature de l'élément nutritif limitant, ce qui augmente le potentiel d'isolement de plus d'une communauté (Slater, 1977).

3.2 Techniques existantes pour analyser les communautés bactériennes

Plusieurs des techniques d'analyse des communautés utilisées couramment sont basées sur l'isolement de chacune des espèces de la communauté sur des milieux solides, étape suivie de la caractérisation des colonies par différentes techniques. Cette approche générale est appropriée aux études nécessitant l'identification, la caractérisation ou l'étude génétique d'une espèce en particulier. De plus, elle est la plus sensible pour l'énumération et la caractérisation d'espèces possédant des paramètres de croissance particuliers (dégradation d'un composé xénobiotique, résistance aux métaux lourds ou aux antibiotiques), s'il existe un milieu de culture sélectif approprié. La plus grande limitation de cette approche générale se situe au niveau du peu d'espèces bactériennes qui sont cultivables. Plusieurs espèces bactériennes d'intérêt ne pourront ainsi être étudiées. Il existe plusieurs techniques plus directes, mais plus complexes et fastidieuses comme la caractérisation des acides nucléiques qui permettront alors d'étudier ces espèces bactériennes.

3.2.1 Techniques d'identification des isolats

Il existe plusieurs techniques pour identifier les espèces bactériennes isolées des communautés. La liste des substrats de croissance, l'analyse des lipides cellulaires, l'hybridation à l'aide de sonde spécifique, de même que la caractérisation de l'ARN ribosomique et l'empreinte génétique sont retrouvés parmi celles-ci.

3.2.1.1 Caractérisation basée sur les substrats de croissance

Les espèces bactériennes provenant de l'environnement sont souvent identifiées grâce à leur croissance en présence de substrats spécifiques (Kennedy, 1994). Ce type d'analyse est précédé d'une caractérisation des isolats sur la base de leur réaction de Gram, de la forme et la grosseur des cellules, et des réactions d'oxydase et de catalase. Il existe présentement plusieurs

systèmes commercialisés, dont Biolog (Hayward, Californie) et API (Plainview, New York), qui permettent de caractériser et d'identifier des espèces bactériennes sur la base de ces propriétés physiologiques. Cependant, seule une minorité des espèces bactériennes de l'environnement peuvent être identifiées par ces systèmes, puisqu'ils utilisent des conditions de culture très spécifiques qui ne sont pas toujours appropriées à ces dernières.

3.2.1.2 Analyse des lipides

Les espèces bactériennes peuvent aussi être identifiées grâce à la présence de lipides cellulaires spécifiques. Il existe plusieurs classes majeures et sous-classes de lipides bactériens (Kennedy, 1994). Les acides gras sont des lipides constitués de longues chaînes carbonées aliphatiques terminées par un acide carboxylique. Chez les bactéries, la longueur de la chaîne aliphatique peut varier de 2 à 90 atomes de carbone. Cependant, d'un point de vue taxinomique, les acides gras en C_{10} jusqu'à C_{24} fournissent le plus grand nombre d'information, et sont présents chez tous les microorganismes. La plupart des acides gras sont retrouvés dans la membrane cytoplasmique où ils forment la partie interne de la double membrane lipidique. Chez les bactéries gram-négatives, les acides gras sont également retrouvés dans la membrane externe, soit associés aux phospholipides, soit aux LPS.

Les acides gras sont classés selon la structure de base de leur squelette carboné, i.e. le nombre d'atomes de carbone, le nombre et la position des doubles liaisons dans la chaîne carbonée, et la présence de groupements fonctionnels. Les acides gras sont divisés en deux groupes, les chaînes linéaires (n-alcane) et les chaînes ramifiées. Parmi les acides gras ramifiés, sont inclus les embranchements *iso-*, *antéiso-* et 10-méthyl. Les acides gras *iso* et *antéiso* portent un groupement méthyle sur leur deuxième et troisième atomes de carbone de la chaîne à partir de l'extrémité ω (l'extrémité non carboxylique), respectivement, et ils sont uniques aux bactéries. Les bactéries possèdent différentes combinaisons de ces acides gras, formant ainsi des patrons distincts en fonction des groupes taxinomiques. De plus, les patrons d'acides gras peuvent être analysés quantitativement et fournir des informations taxinomiques au niveau de l'espèce (Suzuki *et al.*, 1993).

Cependant, plusieurs facteurs sont importants dans l'identification d'une espèce bactérienne à l'aide de son patron d'acides gras. Premièrement, la pureté de cette dernière est très importante. Deuxièmement, il est nécessaire d'avoir les bonnes souches de référence. Troisièmement, des conditions de croissance standard doivent être définies pour les souches de référence, car la composition en acides gras peut être influencée par plusieurs facteurs comme le milieu de culture et la température d'incubation (Suzuki *et al.*, 1993). Finalement, le nombre de

patrons de souches environnementales disponibles est limité dans les banques de données, ils contiennent surtout des espèces d'intérêt médical.

3.2.1.3 Hybridation de colonies

La présence ou l'absence de séquences génétiques particulières chez une espèce bactérienne isolée d'une communauté peut être déterminée par hybridation des colonies isolées à l'aide d'une sonde génétique (Sayler et *al.*, 1985). Les sondes peuvent être dirigées vers des fonctions spécifiques telles que les gènes codant pour des enzymes de dégradation de contaminants organiques ou de fixation de l'azote, ou encore des groupes phylogénétiques particuliers. Sayler et Layton (1990) ont décrit une liste exhaustive de sondes génétiques qui ont déjà été utilisées. S'il est possible de cultiver et de sélectionner l'espèce bactérienne d'intérêt, l'hybridation de colonies peut être quantitative et plus sensible que l'hybridation de l'ADN "in situ".

Le plus grand avantage de la technologie des sondes génétiques est sa spécificité à détecter et à énumérer des génotypes particuliers. Sa plus grande limitation se situe au niveau du manque de connaissance des souches environnementales. Pour appliquer cette technologie, le gène d'intérêt doit avoir été cloné et la séquence nucléotidique du gène cible doit partager une homologie de séquence élevée avec la sonde pour qu'il y ait hybridation. De plus, s'il existe plus d'un gène responsable de la fonction recherchée, l'hybridation de colonies va sous-estimer le nombre de colonies possédant la fonction d'intérêt. Au contraire, si des gènes sans intérêt partagent une homologie de séquence assez élevée avec le gène cible, le nombre va être surestimé.

3.2.1.4 Caractérisation de l'ARNr

La caractérisation de l'ARNr est la technique la plus précise pour déterminer le placement phylogénétique d'une espèce bactérienne formant des colonies isolées. Elle est devenue très puissante et elle est maintenant utilisée couramment pour caractériser les espèces bactériennes environnementales. La technique repose sur le concept de base que les molécules de l'ARNr, particulièrement le 16S et le 23S des prokaryotes, sont universelles et qu'elles possèdent une structure et une fonction conservées à travers l'évolution. Par conséquent, elles sont utiles comme indicateur spécifique de l'affiliation phylogénétique des espèces environnementales (Stackebrandt et Liesak, 1993).

Deux stratégies générales sont souvent employées pour l'identification de colonies à l'aide de l'ARNr. La première approche consiste à utiliser l'hybridation de colonies à l'aide de sondes synthétiques d'oligonucléotides dirigées contre un groupe phylogénétique spécifique. Le

peu de séquences des ARNr des espèces environnementales connues est la plus grande limitation de cette approche. La deuxième approche implique l'analyse des séquences des ARNr 16S. Cette approche fournit plus d'information que la première; cependant, elle est plus longue et fastidieuse, et elle demande un appareillage plus coûteux.

3.2.1.5 Empreinte génétique de l'ADN ("ADN fingerprinting")

La digestion de l'ADN par des enzymes de restriction (RFLP, restriction fragment length polymorphism) est l'une des techniques qui permet de différencier rapidement des espèces bactériennes environnementales reliées grâce à leur empreinte génétique. Les fragments d'ADN obtenus par cette méthode sont par la suite séparés sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide donnant un patron de bandes spécifiques pour le génome à l'étude. Cependant, cette technique ne permet pas d'identifier des bactéries de l'environnement jusqu'à l'espèce. Elle est plutôt utilisée pour démontrer des différences génétiques mineures ou des similitudes génétiques entre deux espèces bactériennes, ou encore pour étudier la diversité entre des espèces bactériennes apparentées (Palleroni, 1993).

La pureté de l'ADN est très importante dans une analyse de RFLP, puisque la présence de contaminant pourrait inhiber partiellement la digestion de l'ADN par les enzymes de restriction et ainsi donner un produit partiellement digéré impossible à analyser. L'amplification d'un gène spécifique par PCR est l'approche la plus simple pour obtenir de l'ADN convenable pour une analyse de RFLP.

3.2.2 Analyses basées sur l'extraction directe de molécules indicatrices

Pour contourner les limitations des techniques nécessitant la croissance en culture pure des espèces bactériennes environnementales, il existe une approche alternative qui est basée sur l'analyse de molécules indicatrices extraites directement du consortium. Les indicateurs les plus utilisés sont l'ADN, l'ARN et les phospholipides. Ces molécules fournissent des informations sur la structure et l'activité des communautés bactériennes.

3.2.2.1 Analyse des lipides

Les extraits d'acides gras totaux à partir d'un consortium ont été utilisés pour étudier la structure et l'état métabolique du consortium. Certaines populations des consortiums sont enrichies en acides gras particuliers. Par exemple, les bactéries gram-positives contiennent surtout des acides gras ramifiés, contrairement aux bactéries gram-négatives qui contiennent plutôt des acides gras linéaires (Kenada, 1991). De plus, les acides gras portant un groupement

cyclohexyl ou cycloheptyl à l'extrémité ω sont caractéristiques des bacilles acido-thermophiles (Deinhard *et al.*, 1987; DeRosa *et al.*, 1972).

Cependant, les mêmes restrictions s'appliquent à l'interprétation de l'analyse des extraits lipidiques des consortiums qu'à celle des cultures pures (3.2.1.2). Par contre, des changements dans les profils des acides gras, spécialement la présence de certains phospholipides utilisés comme biomarqueurs pour certaines espèces bactériennes, sont des indications de l'activité microbienne de la communauté (Kieft *et al.*, 1994).

3.2.2.2 Sondes génétiques

Les informations obtenues par l'hybridation quantitative de sondes génétiques aux acides nucléiques extraits directement du consortium sont dépendantes du gène cible. L'hybridation des ADN est utile pour la détection rapide de la présence et de la concentration relative de gènes codant pour une fonction spécifique. Alors que l'hybridation des ARN est un indicateur de l'activité spécifique du gène cible (Schleifer *et al.*, 1993).

La plupart des avantages et désavantages de cette approche expérimentale sont similaires à ceux de l'hybridation de colonies à partir de sondes génétiques (3.2.1.3). Cependant, l'aspect quantitatif des deux méthodes ne se compare pas. L'hybridation des colonies donne une évaluation similaire à celle obtenue par la méthode des unités formant des colonies (UFC). Pour l'hybridation directe des extraits d'acides nucléiques, la détermination de la concentration d'une séquence est très difficile à préciser, puisque les connaissances de la génétique des espèces bactériennes environnementales sont très limitées. La longueur et la spécificité de la sonde deviennent alors très importantes.

3.2.2.3 Analyse des ARNr et ADNr

L'analyse de la diversité des ARNr ou de leur gène dans un échantillon provenant d'une communauté bactérienne peut donner beaucoup d'indications sur la composition et l'activité des groupes phylogénétiques d'intérêt de la communauté. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées comme le séquençage et l'analyse phylogénétiques (Turner *et al.*, 1989), l'hybridation à l'aide de sondes spécifiques à des groupes de populations bactériennes (Amann *et al.*, 1995), et la classification par les patrons de RFLP dans des groupes taxinomiques (Moyer *et al.*, 1994). L'analyse de la structure des communautés est effectuée avec l'ADNr au lieu de l'ARNr, car l'ADN inclut tous les membres de la communauté sans tenir compte de leur activité.

3.3 Classification des interactions entre les espèces

En dépit des techniques développées pour étudier les communautés, peu d'entre elles ont été isolées et caractérisées jusqu'à maintenant. Cependant, quelques types ont été décrits en se basant sur les interdépendances entre les espèces. Elles sont classées selon les effets sur la croissance ou selon les mécanismes biologiques des interactions qui lient les différentes espèces bactériennes d'une communauté.

3.3.1 Classification basée sur les effets sur la croissance

Les interactions les plus importantes dans les communautés microbiennes sont la compétition, l'antagonisme, le commensalisme et le mutualisme.

3.3.1.1 Compétition

La compétition pour les éléments nutritifs se produit indubitablement lors de la croissance de plusieurs microorganismes et le résultat se reflète sur l'espèce dominante de l'écosystème. Le mécanisme de compétition directe pour un substrat limitant pour la croissance a été élucidé sur des cultures en laboratoire. Il dépend du taux de croissance spécifique (μ), de la concentration du substrat, elle-même déterminée par la constante de saturation (K_s), et du taux maximal de croissance (μ_{max}) des espèces compétitives.

Dans le cas de deux bactéries possédant des propriétés physiologiques similaires, et ne croissant que sur un seul substrat, l'une des deux bactéries peut démontrer un taux de croissance plus rapide indépendamment de la concentration du substrat. La croissance rapide de cette bactérie va lui permettre logiquement de dépasser en nombre l'autre bactérie. Dans un système de croissance continue, la culture mixte deviendrait rapidement une culture pure de la bactérie ayant la croissance la plus rapide (Veldkamp, 1976). Dans ces conditions, l'affinité de chacune des bactéries pour le substrat (K_s) n'a pas d'importance. Cependant, si le taux maximal de croissance (μ_{max}) dépend de la concentration du substrat, une des bactéries peut être avantagée lorsque la concentration du substrat est faible et l'autre lorsqu'elle est élevée. Ceci a été démontré expérimentalement pour une culture mixte contenant des souches de *Thiomicrospira pelophila* et de *Thiobacillus thioparus* en compétition pour le fer (Kuenen *et al.*, 1977). Lorsque la concentration en fer est faible, *Tms. pelophila* est dominant; et inversement, lorsque la concentration en fer est élevée, c'est *T. thioparus* qui est majoritaire. Si d'autres facteurs environnementaux pouvant influencer le taux de croissance comme la température, le pH et la salinité sont modifiés, la relation entre les bactéries peut changer. Dans l'environnement naturel où la présence d'un seul substrat est peu probable, la présence d'autres éléments nutritifs peut aussi influencer le taux de croissance. Par exemple, *Paracoccus versutus* A₂ croît lentement sur

le glucose seul, mais plus rapidement sur le glucose en présence d'une faible quantité de disaccharide (Wood et Kelly, 1977).

3.3.1.2 Antagonisme (amensalisme)

La définition originale de l'amensalisme implique que l'espèce antagoniste n'en retire aucun bénéfice. Cependant, un avantage indirect peut en découler. Par exemple, l'abaissement du pH du milieu lors de la production d'acide inorganique ou organique (ex. : les thiobacilles), ou la production d'oxygène ou de peroxyde d'hydrogène peuvent aider à contrôler l'invasion par d'autres espèces. D'autres composés comme le sulfure d'hydrogène (H_2S) et les antibiotiques peuvent aussi influencer la croissance des autres espèces (Bull et Slater, 1982). Même l'antagonisme le plus subtil causé par la production de substances toxiques par une bactérie contre les autres bactéries modifie le taux de croissance et l'habileté à compétitionner pour les éléments nutritifs. La production de ces métabolites peut jouer un rôle important dans la stabilité et la composition des communautés microbiennes et des écosystèmes (Kelly, 1977).

3.3.1.3 Commensalisme, synergisme et mutualisme

Dans le passé, l'emphase a surtout été placée sur le rôle et l'importance des interactions négatives, comme la compétition et l'amensalisme. Plus récemment, l'intérêt s'est porté sur les interactions qui aboutissent à la formation d'associations mutuellement bénéfiques entre différents microorganismes. Les unités formées de ses associations sont quelquefois plus aptes à exploiter les conditions environnementales qui prévalent que chacune des espèces de l'unité prises individuellement (Kelly, 1977).

Dans un système commensal, un organisme profite de son association avec un autre sans lui nuire. Une bactérie qui ne peut dégrader un composé dans l'environnement et qui s'associe à une autre qui produit des métabolites utilisables est un exemple de commensalisme. De même, des espèces qui utilisent des micronutriments (ex : facteurs de croissance) excrétés dans le milieu ou qui détruisent des composés inhibiteurs pour d'autres espèces exercent des actions favorisant le commensalisme (Kelly, 1977).

Par ailleurs, une relation de synergisme entre deux espèces bactériennes implique un avantage pour les deux. Mais contrairement au mutualisme, l'association n'est pas obligatoire; les deux espèces sont capables de survivre séparément dans leur environnement naturel. La relation est souvent basée sur l'habileté des espèces à synthétiser des facteurs de croissance mutuellement bénéfiques (Atlas et Bartha, 1987).

Le mutualisme est souvent appelé symbiose; puisque c'est une relation obligatoire et bénéfique entre deux espèces, tout en n'excluant pas la possibilité que ceux-ci puissent croître séparément dans un autre environnement. Ce type de relation est très spécifique : un des membres de l'association ne peut être remplacé par une autre espèce, et elle demande une proximité physique entre les deux espèces.

La coopération entre deux ou plusieurs organismes pour utiliser un substrat ou pour augmenter le métabolisme d'un composé est probablement très répandue, même si elle a été peu étudiée jusqu'à maintenant (Kelly, 1977). Certaines de ses relations sont décrites au Tableau 3.1. Un exemple particulièrement remarquable de coopération est retrouvé entre une souche de *Leptospirillum ferrooxidans*, et une souche de *T. thiooxidans* ou de *T. acidophilus*. La bactérie ferro-oxydante acidophile est incapable d'attaquer la pyrite selon Norris et Kelly (1978), alors que les deux autres thiobacilles peuvent oxyder le soufre mais pas la pyrite. Une fois jumelées, elles pouvaient oxyder la pyrite à un taux aussi élevé sinon plus rapide que *T. ferrooxidans* seul. Cependant, en 1982, Norris et Kelly ont tout de même isolé des souches de *L. ferrooxidans* qui pouvaient croître sur la pyrite en culture pure.

Tableau 3.1 Exemples de coopérations mutuelles ou commensales chez les bactéries

-
1. Lixiviation du cuivre et du nickel par *T. ferrooxidans* stimulée par *Beijerinckia lactinogenes* (Tsuchiya, 1978).
 2. Lixiviation de la pyrite par une culture mixte de *T. ferrooxidans* avec *T. acidophilus*, où *T. acidophilus* utilise la matière organique excrétée dans le milieu par *T. ferrooxidans* qui, lorsqu'elle s'accumule, l'inhibe (Norris et Kelly, 1982).
 3. Co-oxydation des cycloalcanes par des cultures mixtes (Dean, 1985).
 4. L'ammoniac libéré lors de l'utilisation des acides aminés par les hétérotrophes est utilisé par les bactéries nitrifiantes (Yanigita, 1990).
 5. *Bacillus cereus* hydrolyse la caséine et les acides aminés ainsi libérés sont utilisés par les *Pseudomonas* sp. (Yanigita, 1990).
 6. Des consortiums stables peuvent être isolés pour dégrader les herbicides (Lappin-Scott *et al.*, 1986).
 7. *Methanobacterium* sp. utilise l'acétate produit par *Desulfovibrio desulfuricans* (Veldkamp, 1977).
-

3.3.1.4 Analyse de la classification basée sur les effets sur la croissance

Il peut être tentant de voir l'interaction entre deux espèces comme étant la même peu importe les conditions. Cependant, la relation entre deux espèces n'est pas permanente, et elle doit être considérée comme étant dynamique et sujette à être modifiée par l'environnement (Brock, 1966). De plus, il est difficile de décrire une seule interaction par système, même entre deux espèces cultivées en laboratoire. Plusieurs interactions multiples ont été décrites (Bull et Slater, 1982). Le système impliquant *Bacillus polymyxa* et *Proteus vulgaris*, décrit plus loin (voir 3.3.2.1), a été l'un des premiers à être reconnu (Yeoh *et al.*, 1968). Le mutualisme est la réaction dominante, mais la production de protéine extracellulaire par *P. vulgaris* a un effet inhibiteur sur *B. polymyxa* et l'interaction a été décrite comme une relation de mutualisme antagoniste.

3.3.2 Classification des interactions basées sur les mécanismes biologiques

En 1978, Slater et Bull ont suggéré un système de classification basé sur les mécanismes biologiques impliqués. Même si l'analyse des communautés microbiennes isolées à ce jour est souvent incomplète, l'accumulation des données leur a permis d'avancer une classification (Tableau 3.2). Cependant, comme pour la classification basée sur les effets sur la croissance, une communauté peut démontrer les caractéristiques de plus d'une classe.

Tableau 3.2 Classification des communautés microbiennes basée sur les mécanismes biologiques impliqués

-
- Classe 1 : Basée sur l'approvisionnement d'un élément nutritif (facteur de croissance) par les espèces de la communauté
 - Classe 2 : Basée sur la diminution de l'inhibition de croissance, incluant l'enlèvement des métabolites qui inhibent l'espèce productrice
 - Classe 3 : Basée sur une interaction qui change les paramètres de croissance d'une espèce en produisant des performances communautaires plus compétitives ou efficaces
 - Classe 4 : Basée sur une combinaison des activités métaboliques qui ne sont pas exprimées par les espèces prises séparément
 - Classe 5 : Basée sur le cométabolisme
 - Classe 6 : Basée sur les réactions de transfert d'hydrogène
 - Classe 7 : Basée sur les interactions entre plusieurs espèces primaires
-

3.3.2.1 Échange d'un facteur de croissance (classe 1)

Plusieurs communautés microbiennes vivent dans des micro-environnements isolés. Elles dépendent alors des échanges nutritionnels entre les diverses espèces. Ces communautés sont basées sur le principe que l'une des espèces qui est incapable de produire un composé essentiel à sa croissance va croître en association avec une autre espèce qui le synthétise et l'excrète dans le milieu. Yeoh *et al.* (1968) ont décrit une communauté microbienne contenant deux membres d'une association dans laquelle *B. polymyxa* excrète la biotine nécessaire à la croissance de *P. vulgaris*, tandis que ce dernier excrète l'acide nicotinique nécessaire au premier (Figure 3.1).

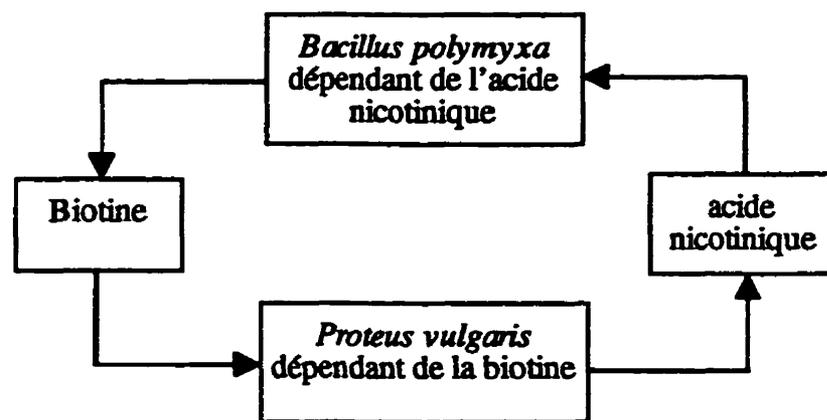


Figure 3.1 Communauté microbienne mettant en cause *B. polymyxa* et *P. vulgaris*

Plus récemment, Stirling et Watkinson (1977) ont isolé une culture mixte qui utilise le cyclohexane comme seule source de carbone et d'énergie. Une espèce de *Nocardia* a été identifiée sommairement comme l'utilisatrice primaire du cyclohexane, mais elle ne croît qu'en présence d'un *Pseudomonas* sp. ou lorsque le surnageant autoclavé du milieu de culture du *Pseudomonas* sp. en culture pure est ajouté à la culture du *Nocardia* sp. Les exigences en facteurs de croissance de *Nocardia* sp. étaient en partie remplies par la biotine, mais il semble probable que d'autres interactions interviennent entre les deux espèces pour assurer une croissance optimale. Le *Pseudomonas* sp. semble être retenu dans la communauté par son habileté à croître à partir des produits découlant du métabolisme du cyclohexane ou encore sur les produits de la lyse cellulaire (Figure 3.2).

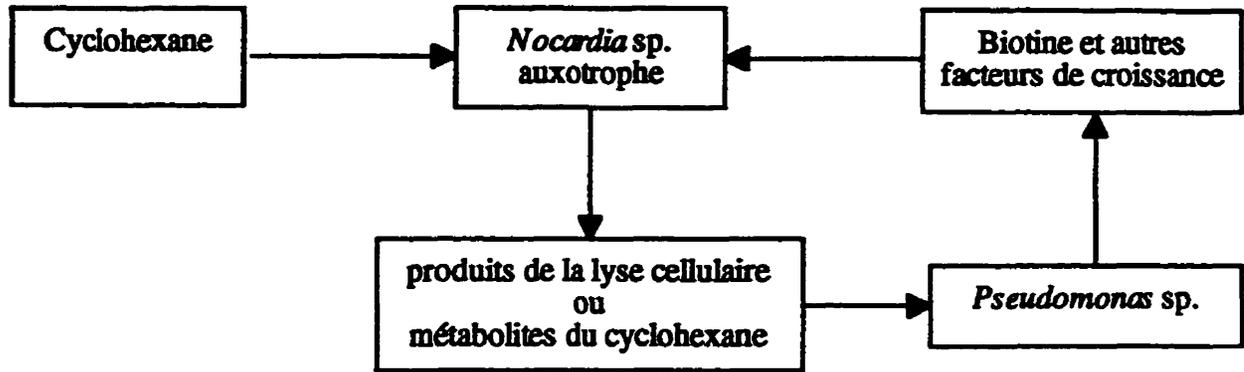


Figure 3.2 Métabolisme du cyclohexane par une culture mixte

3.3.2.2 Diminution de l'inhibition de croissance (classe 2)

Une culture mixte stable contenant quatre bactéries a été cultivée en mode continu avec le méthane comme seule source de carbone par Wilkinson *et al.* (1974). La communauté comprenait des espèces des genres *Pseudomonas*, *Hyphomicrobium*, *Flavobacterium* et *Acinetobacter*. Le *Pseudomonas* sp. était l'espèce dominante, puisqu'il était le seul à pouvoir utiliser le méthane comme source de carbone et d'énergie. Cependant, dans ces conditions de culture limitées en oxygène, la présence d'*Hyphomicrobium* sp. était requise pour enlever le méthanol libéré en concentration inhibitrice dans le milieu par et pour le *Pseudomonas* sp. L'*Acinetobacter* sp. et le *Flavobacterium* sp. étaient deux espèces incidentes du procédé. Ils ne jouaient aucun rôle dans l'oxydation du méthane ou du méthanol, mais ils utilisaient probablement des métabolites libérés par l'une ou l'autre des deux autres espèces (Figure 3.3).

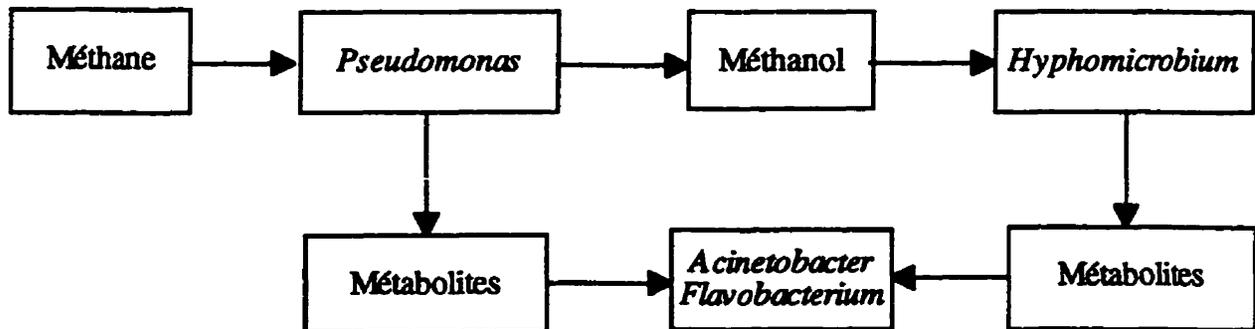


Figure 3.3 Biooxydation du méthane par un consortium bactérien

Un autre exemple intéressant est retrouvé parmi les bactéries fixatrices d'azotes. Il arrive parfois que *Clostridium pasteurianum*, qui ne peut se développer en présence d'oxygène, se multiplie à l'intérieur des colonies de bactéries comme les *Pseudomonas*. Sur un milieu dépourvu d'azote, la colonie du *Pseudomonas* sp. fournit un micro-environnement anaérobie pour le développement de *C. pasteurianum* qui peut fixer l'azote et fournir des composés azotés assimilables par le *Pseudomonas* sp. (Postgate, 1987).

3.3.2.3 Altération des constantes de croissance (classe 3)

Les communautés microbiennes peuvent aussi être sélectionnées préférentiellement à une culture pure lorsque les paramètres de croissance de la communauté, particulièrement le rendement de croissance maximum et la constante de saturation, leur sont plus favorables. Kuenen et Gottschal (1982) ont démontré ce principe au cours d'une expérience dans laquelle deux thiobacilles coexistaient de façon stable tout en étant en compétition pour le thiosulfate. Dans ce cas particulier, ils ont démontré que *T. neapolitanus* excréta beaucoup de composés organiques dans le milieu (jusqu'à 15 % du CO₂ fixé) surtout sous forme de glycolate (Figure 3.4). Ce composé pouvait ensuite être utilisé comme source de carbone et d'énergie par *P. versutus*, une espèce bactérienne chimiolithoautotrophe facultative. De plus, une analyse plus détaillée a démontré que la quantité de biomasse de la culture mixte formée par mole de thiosulfate était plus élevée que lors de l'addition des biomasses des deux cultures séparées.

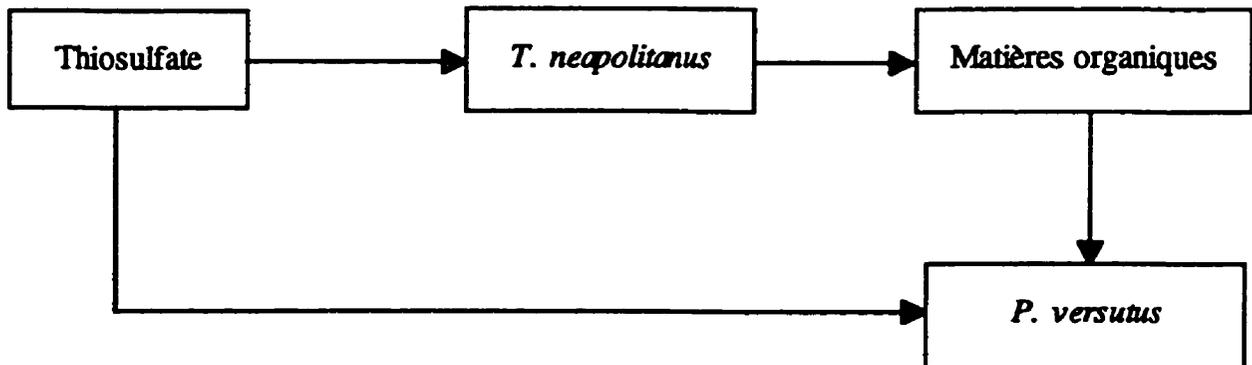


Figure 3.4 Métabolisme du thiosulfate par une culture mixte formée de *T. neapolitanus* et *P. versutus*

CHAPITRE 4

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE 4

4. MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1 Isolement et culture du consortium bactérien

Le consortium bactérien SD-2 a été isolé à partir de boues d'usine d'épuration des eaux usées (Dufresne, 1993). Le consortium a été maintenu actif, à tous les mois, par des sous-cultures effectuées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu 9K à pH 4,0 sans sulfate ferreux et inoculées avec 1,0 ml d'une culture en phase stationnaire. Comme source d'énergie, du soufre élémentaire (Fleur de soufre, Fisher), préalablement stérilisé par tyndallisation, a été ajouté à raison de 0,5 % (P/V) au contenu des flacons. Les Erlenmeyers ont été incubés à 30°C sous une agitation de 200 rpm dans un incubateur à agitation giratoire modèle G-26 (New Brunswick Scientific). Afin d'alléger le texte de ce chapitre, le lecteur trouvera la composition chimique des divers milieux de culture utilisés à l'Annexe B.

4.2 Isolement et culture des isolats formant le consortium SD-2

4.2.1 *Sulfobacillus disulfidooxidans* SD-11

L'isolement de la souche bactérienne *S. disulfidooxidans* SD-11 a été décrit précédemment (Dufresne, 1993; Dufresne *et al.*, 1993). *S. disulfidooxidans* SD-11 a été purifié par la préparation d'une suspension de spore à partir d'une sous-culture du consortium dans le milieu 9K-EL à pH 2,5 contenant du glutathion oxydé (Aldrich) à une concentration de 0,05 % (P/V) comme substrat. Après 14 jours de croissance à 30°C, la culture a été centrifugée à 40 000 x g durant 20 min à 4°C dans une centrifugeuse Beckman J2-21. Le culot a été resuspendu

dans du tampon phosphate (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) 0,2 M (pH 7,2) et lavé à deux reprises dans le même tampon. La suspension cellulaire a été placée dans un bain-marie à 100°C durant 30 min. La suspension de spores ainsi obtenue a été utilisée comme source de *S. disulfidooxidans* SD-11 après en avoir vérifié la viabilité. La germination des spores a été activée par un traitement au froid (à 4°C) pendant une période de 24 heures.

S. disulfidooxidans SD-11 a été maintenu par des sous-cultures (inoculum 2% V/V) aux 14 jours dans le milieu 9K-EL sur chacun des substrats suivants à une concentration finale de 0,05 % (P/V) : glucose, glutamate de sodium (Sigma), glutathion réduit ou oxydé (Aldrich), soufre élémentaire, thianthrène (Aldrich), dibenzothiophène (DBT) (Aldrich), dithio (bis)benzothiazole (DTBT) (Aldrich). Les substrats solubles ont été stérilisés par filtration et ceux insolubles par tyndallisation. Les cultures ont été incubées à 30°C sous une agitation de 200 rpm. Le milieu gélosé FTG basé sur le milieu WAYE décrit par Johnson (1995) a été utilisé pour vérifier la pureté de l'isolat.

4.2.2 Isolats SD-7 et SD-8

Deux autres isolats ont été identifiés et purifiés en variant le pH de départ du milieu de culture du consortium. Pour ce faire, des tubes contenant 2 ml du milieu 9K-m stérile (pH 4,0 à 7,0 par intervalle de 0,5 (sauf 6,5)) (Annexe B) ont été inoculés à partir des consortiums (SD-101 à SD-110) obtenus des essais d'isolement précédent (Annexe D : essai 2). Quelques grains de soufre ont été ajoutés comme substrat. Ces tubes ont par la suite été incubés à 30°C pendant 5 jours dans un incubateur à agitation giratoire. La croissance des cultures a été évaluée en microscopie photonique. L'acidification du milieu a été évaluée grâce à l'indicateur pH présent dans le milieu.

Pour s'assurer de la croissance réelle à un pH supérieur à 5 de certains des partenaires du consortium, un volume de 50 µl du tube, dont le pH de départ était le plus élevé et pour lequel une croissance positive avait été notée pour chacun des consortiums, a été étalé sur les milieux gélosés 9K-m pH 5,5 et 6,25. Après 7 jours d'incubation, 12 colonies ont été prélevées et resuspendues dans 100 µl du milieu liquide de départ. Par la suite, des dilutions ont été effectuées (10^0 à 10^{-3}) et un volume de 40 µl de chacune des dilutions a été étalé sur des géloses des milieux 9K-m pH 5,5 et 6,25, et elles ont été incubées à 30°C durant 10 jours. Pour chacun des milieux où une croissance positive a été observée, deux colonies ont été prélevées et utilisées pour inoculer deux tubes contenant 2 ml du milieu correspondant. Après 7 jours d'incubation à 30°C, le pH a été noté et les cultures ont été observées en microscopie photonique. Les bouillons démontrant une croissance positive ont été ensemencés sur les milieux gélosés BS4, 9K-m pH 5,5, 9K-m pH 6,25, *Beijerinckia* pH 6,25 et *Acidiphilium* pH 5,0. La croissance a

été notée après 7 jours et de nouveau des colonies (30) ont été resuspendues dans le milieu liquide correspondant. Après croissance positive, des géloses Beijerinckia + 0,01 % extrait de levure pH 4,0 (B-EL pH 4,0) contenant du glucose 1% (P/V) ou du thiosulfate 1% (P/V) ont été inoculées à partir des bouillons B-EL. Un nouvel étalement sur milieux gélosés B-EL pH 4,5 a permis d'isoler deux colonies non acidifiantes différentes : les isolats SD-7 et SD-8 (voir Annexe D, Figure D.2 pour le résumé de la procédure complète de l'isolement).

4.2.3 Isolats SD-6 et SD-9

Après plusieurs essais d'isolement infructueux (voir Annexe D), le consortium SD-20, ne contenant pas les souches SD-7 et SD-8, a été utilisé pour la suite des essais. Ce consortium provenait d'une colonie obtenue après un essai de dilution en couche mince de gélose décrit à l'Annexe D. Le milieu gélosé FTG a été inoculé à partir du surnageant de culture du consortium SD-20 adapté sur le DBT. Deux types de colonies différentes ont été observés à partir de cette étape de purification. La première possédait toutes les caractéristiques du *S. disulfidooxidans* SD-11 et a été numéroté SD-6. Elle a, par la suite, été utilisée pour plusieurs essais. La deuxième colonie était mixte : en plus de contenir l'isolat SD-6, elle comprenait une deuxième espèce (isolat SD-9). Plusieurs passages du milieu liquide 9K-EL pH 2,25 contenant quelques grains de sulfate ferreux au milieu FTG ont été effectués pour essayer de purifier cet isolat.

4.3 Caractérisation des isolats du consortium SD-2.

4.3.1 Caractérisation morphologique

4.3.1.1 Microscopie photonique

Les observations microscopiques de la morphologie cellulaire des isolats ont été effectuées à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase Nikon. Les colorations spéciales suivantes (Doetsh, 1981) ont été appliquées sur les frottis bactériens :

- Gram modifié (Annexe E) (la paroi)
- Shaeffer-Fulton (les endospores)
- Vela (les kystes)
- Sudan Black B (les granules de poly- β -hydroxybutyrate)
- bleu de méthylène de Loeffler (les inclusions de polyphosphates)
- bleu d'Alcian (les granules de polysaccharides)
- Anthony (la capsule)

4.3.1.2 Microscopie électronique à transmission et à balayage

Pour la microscopie électronique à transmission en coloration négative, une goutte d'un échantillon d'une culture active du *S. disulfidooxidans* SD-11 sur le glutathion oxydé a été déposée sur une grille de cuivre (grandeur 200 HH). Nous avons ensuite déposé sur la grille une goutte de phosphotungstate de sodium 2 % (pH 7,2) et le tout a été séché à l'aide d'un papier buvard. Les grilles ont été observées à l'aide d'un microscope électronique Philips EM 300 à 60 kV.

L'ultrastructure cellulaire interne a été révélée à partir de l'observation de coupes minces des isolats en microscopie électronique obtenue après croissance des cellules sur leur milieu respectif. Les cellules récoltées par centrifugation pendant 3 minutes dans une microcentrifugeuse ont été lavées 3 fois dans un tampon phosphate (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) 0,2 M (pH 7,2) et fixées à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde 4 % (V/V) préparée dans le même tampon. Après un séjour de 48 heures dans le fixateur, l'excès de glutaraldéhyde a été éliminé par deux lavages avec le tampon phosphate. Les culots obtenus ont été enrobés dans une matrice d'agarose 2 %. La postfixation des échantillons a été effectuée dans 3 % (V/V) de tétroxyde d'osmium pendant 2 heures à 4 °C. Après rinçage, les cellules ont été colorées à l'acétate d'uranyle (5 %) pendant 2 heures, puis rincées à nouveau. La déshydratation des échantillons a été réalisée dans un gradient d'éthanol (30 à 100 %) suivie de trois rinçages à l'oxyde de propylène. Les culots ont été placés une nuit dans une solution 50:50 d'oxyde de propylène et d'Epon. Une section des culots a été placée dans une résine d'épon pendant 36 heures. Des coupes minces ont été préparées à l'aide d'un microtome muni d'un couteau de diamant (Reichert OM V2). Les sections ont alors été récupérées et montées sur des grilles de cuivre (200 HH). Les coupes ont été colorées pendant 10 minutes avec une solution de 5 % d'acétate d'uranyle et d'hydroxyde de plomb, et examinées sur un microscope électronique Philips EM 300 à 80 kV.

Des observations ont aussi été effectuées en microscopie électronique à balayage sur un dépôt obtenu par la filtration de 100 µl de culture à travers un filtre Nucleopore 13 mm en polycarbonate (dimension des pores 0,1 µm) (Hobbie *et al.*, 1977). L'aspect structural tridimensionnel du consortium a été déterminé après la colonisation de pastilles de soufre. Des pastilles cylindriques de soufre (0,35 cm de hauteur x 1,0 cm de diamètre) ont été préparées dans des moules d'aluminium selon la technique de Bryant *et al.* (1984). L'incubation a été effectuée de façon stationnaire dans des flacons Erlenmeyers contenant 100 ml de milieu 9K-EL pH 2,5 et 5% (P/V) de pyrite ou de soufre. Après 21 jours, les échantillons ont été retirés avec soin des Erlenmeyers et lavés à l'eau distillée. Les filtres et les pastilles de soufre ont été placés

pendant 18 heures dans une solution de glutaraldéhyde à 2 % préparée dans un tampon PBS 0,01 M (pH 7,0). L'excès de glutaraldéhyde a été éliminé par trois lavages avec le tampon PBS. Les échantillons ont ensuite été traités selon la procédure décrite par Blais *et al.* (1992) et examinés avec un microscope électronique à balayage JEOL JMS-T330A.

4.3.2 Caractérisation physiologique

Les conditions utilisées pour déterminer les intervalles de température et de pH de croissance du *S. disulfidooxidans* SD-11 de même que les différents substrats utilisés ont déjà été décrites (Dufresne, 1993).

Pour les isolats SD-7 et SD-8, l'intervalle de pH de croissance a été déterminé par inoculation de milieux gélosés MMM au méthanol dont le pH variait de 3,0 à 10,0 par intervalles de 0,5. Les géloses ont été incubées à 30°C durant 7 jours. Le même milieu, à pH 7,0, a été utilisé pour déterminer l'intervalle de température permettant la croissance. Des géloses ont été incubées à 4°C durant 3 semaines, et à 25, 30, et 37°C durant 7 jours. La présence ou l'absence de croissance ainsi que la grosseur des colonies ont été notées après le temps d'incubation spécifié. La capacité de ces isolats à utiliser les différents substrats a été déterminée dans des Erlenmeyers de 25 ml contenant 10 ml du milieu MMM pH 7,1 stériles auxquels ont été ajoutés les substrats suivants : à une concentration finale de 0,5 % (P/V ou V/V) le soufre élémentaire, le tétrathionate de sodium (Sigma), le glycérol, et le thianthrène, le DBT, le DTBT, le disulfure de dibenzyl (Sigma), l'acétate de sodium, l'acide tartrique, le triéthanolamine; à une concentration finale de 0,15 % (P/V) la bêtaïne (Sigma), l'acide sébacique (Sigma), le méthylamine et le triméthylamine (Sigma); à une concentration finale de 0,02 % (V/V) le méthanol, l'éthanol, le diméthylsulfoxyde (DMSO), et le diméthylformamide (DFM). Une fiole contenant le milieu MMM pH 7,1 sans substrat ajouté a servi de témoin négatif, alors que la culture contenant du méthanol a été utilisée comme témoin positif. Les Erlenmeyers ont été incubés à la température de la pièce durant 7 jours. Des sous-cultures (environ 3) ont été effectuées jusqu'à ce qu'aucune croissance ne soit observée dans la culture témoin négative. Seuls les substrats permettant une croissance jusqu'à ce moment ont été notés comme positifs.

4.3.3 Grille API 50 CH

Pour permettre une comparaison des isolats SD-7, SD-8 et SD-11 avec certaines bactéries possédant des caractéristiques similaires, il a été nécessaire de caractériser leur utilisation de différents composés carbonés. L'emploi de la grille de caractérisation API 50CH (BioMérieux) décrite par Deinhard *et al.* (1987a) pour la caractérisation de *Alb. cycloheptanicus* a été utilisée.

Après une croissance de 5 jours de l'isolat SD-11 sur le glutamate (250 mg/ 100 ml) dans le milieu 9K-EL pH 2,25 à 30°C, les cellules ont été récoltées par filtration (0,22 µm) et resuspendues dans du milieu frais à une concentration équivalente à un 0,5 MacFarland tel que spécifié dans la procédure décrite par Deinhard *et al.* (1987a). De plus, 500 µl d'une solution de bleu de thymol (1g / 250 ml) ont été ajoutés à la suspension. Elle a ensuite été distribuée dans les microtubes en suivant les instructions du fabricant, puis la grille a été incubée à 30°C. La croissance a été évaluée aux jours 1, 2, 3, 6, 9 et 15 par la présence ou l'absence de turbidité et d'acidification. Au 15^e jour, une observation en microscopie photonique à contraste de phase a été effectuée pour vérifier le degré de croissance sur chacun des substrats.

Pour les isolats SD-7 et SD-8, le milieu 9K a été remplacé par le milieu B-EL pH 6,8 et le bromocrésol pourpre a été utilisé comme indicateur. Un deuxième essai sans extrait de levure a été effectué dans le milieu B-NH₄CL pH 4,5 avec le vert de bromocrésol comme indicateur, puis un troisième dans le milieu MMM pH 7,1 contenant le bromocrésol pourpre comme indicateur. La croissance a été évaluée par la turbidité et/ou la présence d'acidification après 3, 6, 9 et 12 jours d'incubation à 30°C.

4.3.4 Caractérisation biochimique

Les caractéristiques biochimiques des différents isolats ont été déterminées en utilisant leur milieu de culture respectif et selon les méthodes décrites par Smibert et Krieg (1994). La présence de la catalase (méthode 2) et de l'oxydase a été vérifiée pour les isolats SD-6, SD-7 et SD-8. La capacité d'hydrolyser la tributyrine, la caséine (méthode 1), la gélatine (méthode 1) et l'amidon, la capacité d'utiliser le citrate (méthode 1), de réduire des nitrates, de produire du H₂S et de l'indole (méthode 2) (milieu SIM), le test du rouge de méthyle et la réaction de Voges-Proskauer ont été vérifiés pour les isolats SD-7 et SD-8. La production de H₂S par l'isolat SD-6 a été vérifiée par inoculation d'un tube de gélose molle du milieu FTG (0,35 % P/V agarose).

Les besoins en oxygène et en azote combiné des isolats SD-7 et SD-8 ainsi que du consortium SD-20 ont été évalués dans des tubes de 20 mm de diamètre par 180 mm de haut contenant 20 ml du milieu NF, pH 4,0 à 9,0 par intervalle de 1,0, auxquels 0,05 % (P/V) d'agar a été ajouté ainsi que des concentrations variables d'azote combiné (0, 5, 50, 500 µg de N/ml milieu) sous forme d'extrait de levure, de NH₄Cl ((NH₄)₂SO₄ pour le consortium SD-20) ou de KNO₃ avant d'être stérilisé à l'autoclave. Par la suite, 0,5 % (P/V) de L-arabinose ou de soufre élémentaire a été ajouté comme substrat et les tubes ont été inoculés à partir des sous-cultures de chacun des isolats. Une série de tubes du milieu NF pH 7,0 pour les isolats SD-7 et SD-8 ont aussi été incubés en jarre anaérobie avec un GazPak (BBL #71045) pour microaérophile.

4.3.5 Analyse des acides gras

L'analyse des acides gras du *S. disulfidooxidans* SD-11 a été effectuée par l'équipe du Dr Karl Poralla (Mikrobiologie/Biotechnologie im Botanischen Institut (Hörsaalauflaufstockung), Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Germany) à partir de cellules lyophilisées après croissance dans le milieu 9K-EL pH 2,25 en présence de glutamate de sodium ou de soufre élémentaire. Les méthodes utilisées ont été décrites précédemment par Poralla et König (1983). Les esters méthylés des acides gras ont été identifiés en comparant les temps de rétention et les spectres de masse à ceux d'acides gras connus (Allgaier *et al.*, 1985; Hippchen *et al.*, 1981; Poralla et König, 1983).

4.3.6 Étude phylogénétique

4.3.6.1 Croissance et conditions de culture des isolats

La croissance de *S. disulfidooxidans* SD-11 a été effectuée en flacons Erlenmeyer de 125 ml stériles contenant 50 ml du milieu 9K-EL pH 2,25 et un des substrats suivants : glutathion oxydé, glutathion réduit, glutamate de sodium, ou soufre élémentaire à une concentration de 0,25 % (P/V). Le milieu 9K-EL a aussi été utilisé pour les isolats SD-6 et SD-9 mixte, mais du soufre (0,05 % P/V) et du glucose (0,05 % P/V) ont été ajoutés comme substrats. Les isolats SD-7 et SD-8 ont été cultivés dans des flacons Erlenmeyers de 500 ml contenant 200 ml du milieu B-EL pH 6,8 auxquels 0,5 % (P/V) de L-arabinose a été ajouté comme source de carbone tandis que le milieu BS4 contenant 0,5 % (P/V) de soufre élémentaire a été utilisé pour le consortium. La souche *Escherichia coli* K-12 ATCC 10798 a été utilisée comme référence lors des procédures d'amplification de l'ADN. La croissance a été effectuée dans un tube contenant 2 ml de bouillon d'infusion de coeur et cerveaux (BHI). Les cultures ont été incubées à 30°C, 200 rpm, durant 7 jours pour le consortium et les isolats, et 24 heures pour *E. coli*.

4.3.6.2 Récolte des cellules

Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 20 000 $\times g$ à 4°C. Pour les milieux contenant un substrat insoluble, le culot a été resuspendu dans 4 ml du milieu de culture de départ et centrifugé à base vitesse (800 rpm) 5 min pour séparer le substrat des cellules. Le surnageant a ensuite été recentrifugé à 20 000 $\times g$ à 4°C. Pour *S. disulfidooxidans* SD-11 et *E. coli*, les culots ont été lavés une fois dans 100 μ l d'eau bidistillée préalablement autoclavée et filtrée sur un filtre Gelman (0,22 μ m), puis resuspendus dans 100 μ l de la même eau dans un tube Ependorff de 0,5 ml. Pour les autres isolats et le consortium, les culots ont été lavés deux fois dans du PBS (tampon phosphate-NaCl) 0,2 M (pH 7,2) et resuspendus dans le même tampon à une concentration cellulaire finale de 20 % (P/V). Par la suite, des aliquotes de 200 μ l de la suspension ont été lyophilisées.

4.3.6.3 Lyse des cellules et extraction de l'ADN du *S. disulfidooxidans* SD-11

La méthode décrite dans "Short protocol in molecular biology : A compendium of methods from current protocols in molecular biology" (Ausubel *et al.*, 1992) a été utilisée. La suspension cellulaire obtenue à l'étape précédente a de nouveau été centrifugée dans une microcentrifugeuse. Le culot a été resuspendu dans 567 µl du tampon Tris-EDTA 0,1 M (pH 8,0) et 4 µl d'une solution de lysozyme 50 mg/ml ont été ajoutés, puis la solution a été incubée à 37°C durant 20 min. Par la suite, 30 µl de SDS 10 % et 3 µl de protéinase K (20 mg/ml) ont été ajoutés et l'incubation a été poursuivie. Après 1 heure, 100 µl de NaCl 5M ont été ajoutés et le tout a été agité, ensuite 80 µl de CTAB/NaCl ont été ajoutés et l'incubation s'est poursuivie pendant 10 min à 65°C. Une fois la solution refroidie à la température de la pièce, un volume égal d'une solution de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) a été ajouté, puis le mélange obtenu a été agité et centrifugé 5 min à 13 200 rpm dans une microcentrifugeuse (9000 x g). La phase supérieure a été récupérée et cette étape a été répétée avec la solution chloroforme-alcool isoamylique, puis avec du chloroforme seul. Après la dernière centrifugation, le surnageant a été récupéré et 0,6 volume d'isopropanol y a été ajouté. L'ADN a été récupéré en mélangeant les deux phases lentement à l'aide d'une pipette pasteur dont le bout avait préalablement été scellé à la flamme. L'ADN a été transféré dans 1 ml d'éthanol 70 % et le tout a été centrifugé 5 min dans une microcentrifugeuse; le culot a ensuite été séché, puis resuspendu dans 40 µl d'eau bisdistillée stérile et filtrée.

4.3.6.4 PCR

La séquence correspondant aux positions 8 à 1510 de l'ADNr 16S de *E. coli* a été amplifiée par la technique du PCR (Brosius *et al.*, 1978). Elle a été amplifiée en trois fragments qui se chevauchaient à partir des trois jeux d'amorces décrits au Tableau 4.1. L'amplification a été effectuée à l'aide d'un appareil Perkin Elmer Cetus GeneAmp PCR System 9600 à couvercle chauffant selon les conditions suivantes : l'échantillon a d'abord été chauffé à 98°C durant 1 min, puis soumis à 30 cycles d'amplification ayant un profil de température et de temps pour la dénaturation de l'ADN, l'attachement des amorces et l'élongation des amorces de 98-62-72°C pour une durée de 10-5-15 s pour la paire d'amorce SSU 27-SSU 785', et de 98-55-72°C pour une durée de 10-5-15 s pour les deux autres paires. Les amorces de référence p11p et p13p ont été utilisées pour vérifier le bon fonctionnement de l'amplification de l'ADN (Chen *et al.*, 1989). Après les 30 cycles, la réaction a été arrêtée et les produits de l'amplification PCR ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. La présence des fragments voulus a été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,3 % (P/V). La présence des bandes d'ADN dans le gel a été

révélée par une coloration au bromure d'éthidium (50 µl / L d'une solution de 10 mg / ml) pendant 5 min, suivi d'un lavage de 5 min à l'eau distillée.

Tableau 4.1 Amorces utilisés pour l'amplification PCR de l'ADNr du 16S

Amorces	Position ¹	Séquence	Référence
SSU 27	8-27	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 3'	(Dorch et Stackebrandt, 1992)
SSU 785'	785-805	5'- GGACTACCAGGGTATCTAATC- 3'	Cette étude
SSU 536	515-536	5'- GTGCCAGCMGCCGCGGTAATAC- 3'	Cette étude
SSU 1175'	1175-1195	5'- GACGTCATCCCCTCCTTCCTC- 3'	Cette étude
SSU 926	908-926	5'- AAACYAAAKGAATTGACGG- 3'	Cette étude
SSU 1492'	1492-1508	5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT- 3'	(Dorch et Stackebrandt, 1992)

¹ Relativement à la séquence de l'ADNr 16S de *E. coli*.

Pour le séquençage, les produits PCR obtenus ont été lavés à l'aide d'une trousse de chromatographie en colonne QIA quick-spin PCR Purification (no 28104) de QIAGEN (Chartworth, Californie) selon les instructions du manufacturier. Les deux brins d'ADN ont été séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique ABI 372 (PE-ABI, Foster city, Californie) par la méthode des *Taq* dyedeoxy.

4.3.6.5 Analyse des séquences (réalisée au centre de recherche en biologie forestière en collaboration avec l'équipe du D^r Jean Bousquet)

Les fragments des séquences de l'ADNr du 16S provenant de quatre extractions d'ADN différentes ont été analysés à l'aide du logiciel Sequence Navigator et alignés pour trouver la séquence consensus à l'aide du système GCG sur Eukaryota (Genetics Computer Group, Madison, Wisc). Ensuite, la séquence consensus de l'ADNr du 16S de l'isolat SD-11 a été alignée en premier lieu avec la séquence la plus ressemblante, celle de l'ADNr du 16S de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, en utilisant la commande ALIGNMENT du Ribosomal Database Project (RDP) (Maidak *et al.*, 1994); et deuxièmement, sur l'alignement déjà existant de 15 espèces différentes, incluant *S. thermosulfidooxidans*, obtenu de la banque du RDP (commande SUBALIGN). Les régions ambiguës correspondantes aux positions 1 à 225, 452 à 481, 998 à 1044 et 1510 à 1546 ont été enlevées et l'alignement restant de 1 208 nucléotides a été soumis aux analyses phylogénétiques.

Une analyse de parcimonie standard a été effectuée avec l'algorithme de recherche heuristique du logiciel PAUP v.3.1.1 (Swofford, 1993) dans laquelle les indels (insertions et délétions) de petite taille ont été considérés comme des données manquantes. Les séquences ont été soumises dans un ordre aléatoire à 100 reprises. L'homologie des séquences paires a aussi été évaluée et le taux de substitution par transformation a été soumis à la méthode à deux-paramètres de Kimura (Kimura, 1980) qui tient compte des transitions et des transversions. La matrice des taux de substitution résultante a été analysée par la méthode de neighbor-joining (Saitou et Nei, 1987) du logiciel MEGA v 1.0 (Kumar *et al.*, 1993). Les niveaux de confiance de la topologie des arbres obtenus pour les deux méthodes d'analyses utilisées, parcimonie (PAUP) et neighbor-joining (MEGA), ont été estimés par la méthode des analyses de rééchantillonnage des données avec 100 répliques (Felsenstein, 1981).

4.3.6.6 Études phylogénétiques des isolats SD-6, SD-7, SD-8, de la culture mixte contenant les isolats SD-6 et SD-9, et du consortium SD-20

Les séquences des ADNr 16S des isolats SD-6, SD-7, SD-8, de la culture mixte (SD-6 + SD-9) ainsi que celles du consortium SD-20 ont été séquencées par l'équipe du Dr Brett Goebel (Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, USA) à partir des cultures lyophilisées (voir sections 4.3.6.1 et 4.3.6.2). Les cultures lyophilisées des isolats SD-6, SD-7, SD-8 et de la culture mixte (SD-6 + SD-9) ont été resuspendues dans 550 µl du tampon de lyse (100 mM Tris (pH 8,0), 50 mM NaCl, 1 mM Na-citrate, 5 mM CaCl₂ et 10 mM EDTA) auxquels 28 µl de lysozyme (50 mg/ml) ont été ajoutés avant d'incuber à 37°C durant 15 min. Après l'ajout de 50 µl de protéinase K (20 mg/ml) et 25 µl de SDS (10%), l'incubation a été poursuivie à 50°C durant 1 heure. Après la lyse, les tubes ont été centrifugés à 10 x g 5 min pour enlever les débris cellulaires. Le surnageant a ensuite été transféré dans une autre tube où l'ADN a été purifié par la méthode d'extraction au phénol:chloroforme:alcool isoamylique (voir 4.3.6.3). L'ADN chromosomique a été récupéré par précipitation dans un volume égal d'acétate d'ammonium (4 M) et deux volumes d'isopropanol à la température de la pièce durant 30 min, suivi d'une centrifugation à 10 x g durant 15 min. Le culot d'ADN a été lavé avec de l'éthanol 70%, séché et finalement resuspendu dans 75 µl de tampon Tris 10 mM (pH 8,2).

L'ADNr du 16S a été amplifié par la technique du PCR en utilisant les amorces 8f et 1492r équivalentes aux amorces SSU 27 et SSU 1492'. Pour l'amplification, le mélange réactionnel a d'abord été chauffé durant 4 min à 94°C, puis soumis à 30 cycles d'amplification dont le profil de température et de temps pour la dénaturation de l'ADN, l'attachement des amorces et l'élongation des amorces était de 94-50-72°C pour une durée de 60-45-90 s. Par la suite, la purification et le séquençage des produits d'amplification ont été effectués selon la méthodologie décrite aux points 4.3.6.4 et 4.3.6.5.

Les séquences des isolats SD-6 et de la culture mixte (SD-6 + SD-9) ont été comparées à celle du *S. disulfidooxidans* SD-11. Par ailleurs, les séquences consensus des isolats SD-7 et SD-8 ont été soumises à une recherche d'homologie de séquence en utilisant le programme BLAST sur le site de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) pour rechercher la séquence la plus proche. La topologie de l'arbre a été évaluée à l'aide de la commande Suggest Tree du programme fastDNAm1 de Gary Olsen (RDP) (Maidak *et al.*, 1994) qui est basé sur la méthode du "maximum likelihood" (Felsenstein, 1981). Par la suite, les analyses phylogénétiques ont été confirmées selon les méthodes employées pour *S. disulfidooxidans* SD-11. Pour cette analyse, les régions ambiguës (positions 1 à 42, 71 à 80, 91 à 97 et 1383 à 1546) ont été enlevées et l'alignement restant de 1 383 nucléotides a été soumis aux analyses phylogénétiques. Le produit PCR obtenu à partir du consortium SD-20 a été cloné pour permettre l'identification des autres partenaires du consortium.

4.3.6.7 Numéro d'accès des séquences nucléotidiques

La séquence de l'ADNr de 16S du *S. disulfidooxidans* SD-11 obtenue lors de ces travaux a été déposée dans la banque des séquences nucléotidiques du GenBank sous le numéro d'accès U34974. Les numéros d'accès des séquences utilisées comme références sont les suivants : *Alicyclobacillus acidocaldarius*, X60742; *Alicyclobacillus acidoterrestris*, X60743; *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, X51928; *Bacillus subtilis*, K00637, M10606, X00007; *Beijerinckia indica*, M59060; *Clostridium innocuum*, M23732; *Escherichia coli*, J01695; *Methylobacterium* sp. F05, D32231; *Methylobacterium* sp. F15, D32232; *Methylobacterium* sp. F73, D32237; *Methylobacterium* sp. BF15, Z23160; *Methylobacterium* sp. PC30.39, Z23158; *Methylobacterium mesophilicum*, D32225; *Methylobacterium* sp. F42, D32235; *Methylobacterium* sp. F18, D32233; *Methylobacterium organophilum*, D32226; *Methylobacterium* sp. PC30.44, Z23159; *Methylobacterium* sp. BF10, Z23156; *Methylobacterium rhodinum*, D32229; *Methylobacterium* sp. F48, D32236; *Methylobacterium extorquens*, D32224; *Methylobacterium* sp. GK101, D25305; *Methylobacterium* sp. GK118, D25306; *Methylobacterium rhodesianum*, D32228; *Methylobacterium zatmanii*, D32230; *Methylobacterium radiotolerans*, D32227; *Methylobacterium* sp. F37, D32234; *Mycobacterium bovis*, M20940; *Streptomyces lividans*, Y00484; *Sporolactobacillus inulinis*, M58838; *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, Z21979; *Thiobacillus acidophilus*, M79399, M79400; *Thiobacillus thiooxidans*, M79396, M79397, M79398; l'isolat ALV (*Sulfobacillus acidophilus* (Norris *et al.*, 1996)), M79375, M79376, M80290; l'isolat BC1 (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Norris *et al.*, 1996)), M79380, M79381, M79382; et l'isolat TH3 (*Acidimicrobium ferrooxydans* (Clark et Norris, 1996)), M79434, M79433.

4.4 Évaluation de la mixotrophie chez les *Sulfobacillus* sp.

La croissance de l'isolat SD-6 ainsi que celle de la culture mixte contenant les isolats SD-6 et SD-9 ont été évaluées en conditions de croissance autotrophe, mixotrophe et hétérotrophe. Pour ce faire, des Erlenmeyers de 250 ml, contenant 100 ml du milieu 9K1/10-EL (0,001 ou 0,01 %) stériles et soit : 100 mg de soufre élémentaire, 100 mg du soufre élémentaire + 100 mg de glucose, 100 mg de glucose, ou aucun substrat (témoin négatif) ont été inoculés avec 1 ml de suspensions cellulaires. Pour préparer les suspensions cellulaires, des volumes de 50 ml de pré-cultures obtenues dans les mêmes conditions de croissance ont été centrifugés, puis les cellules ont été lavées et resuspendues dans un volume final de 5 ml du milieu 9K 1/10. Un fois inoculés, les Erlenmeyers ont été incubés à 30°C durant 10 jours. À tous les jours, un volume de culture de 1,5 ml a été prélevé et centrifugé pendant 3 min dans une microcentrifugeuse à 22°C, le culot bactérien a été resuspendu dans 0,75 ml d'eau physiologique et la suspension a été conservée à -20°C pour doser les protéines. Le surnageant a été utilisé immédiatement pour doser le glucose résiduel et les sulfates.

La méthode de dosage de Lowry *et al.* (1951) modifiée par Feig (1973) a été employée pour doser les protéines. Un volume de 0,75 ml de NaOH 1,0 N était ajouté à 0,75 ml de la suspension cellulaire. Le mélange était laissé à réagir à la température de la pièce durant 18 heures avant de le centrifuger et d'en prélever 1,0 ml pour effectuer le dosage comme décrit à l'Annexe F. L'absorbance des solutions a été évaluée à une longueur d'onde de 750 nm sur un spectrophotomètre UV/Vis Cary 219 (Varian).

La trousse de diagnostic Sigma #510-A pour l'analyse colorimétrique du glucose a été utilisée pour suivre l'utilisation du glucose par *S. disulfidooxidans* SD-6 en conditions de croissance autotrophe (témoin négatif), mixotrophe et hétérotrophe, et la détermination des sulfates a été effectuée par la méthode turbidimétrique approuvée par l'APHA (American Public Health Association) (1985). Les méthodologies sont décrites à l'Annexe F.

4.5 Fixation du $^{14}\text{CO}_2$ par la culture mixte des *Sulfobacillus* sp.

(SD-6 + SD-9) (expérience réalisée au Department of Microbiology, University of Alberta, Edmonton, en collaboration avec l'équipe de D^r Phillip M. Fedorak)

La fixation de $^{14}\text{CO}_2$ a été évaluée dans le milieu 9K en conditions de croissance autotrophe, mixotrophe et hétérotrophe en présence de différentes concentrations d'extrait de levure. Des Erlenmeyer de 125 ml semblables à des Erlenmeyers à vide ont été utilisés pour

cette expérience. Cependant, le bras de l'Erlenmeyers est situé à 4 cm de l'ouverture et possède un angle de 45° vers le haut (Figure 4.1).

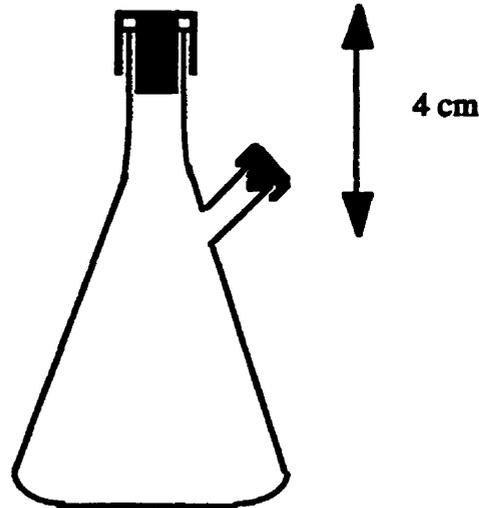


Figure 4.1 Représentation d'une fiole utilisée pour la fixation du $^{14}\text{CO}_2$ par la culture mixte des *Sulfobacillus* sp.

Un premier essai a été effectué dans ces Erlenmeyers adaptés et contenant 50 ml du milieu 9K-EL (0,01 % P/V) pH 2,25 stérile auxquels du soufre et/ou du glutamate ont été ajoutés comme substrats à une concentration finale de 0,1 % P/V. Une fiole sans extrait de levure contenant du soufre (0,1 % P/V) a aussi étéensemencée. Les inocula ont été préparés en récoltant par centrifugation les cellules des sous-cultures de la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. dans le milieu 9K-EL contenant du glutamate, du glutamate et du soufre, ou du soufre. Les cellules ont été resuspendues dans du milieu 9K pour obtenir une D.O. d'environ 0,6 à 660 nm et 1 ml de ces solutions a été utilisé pour inoculer chacun des milieux. Après que les fioles aient été inoculées, les deux ouvertures ont été fermées par des bouchons en caoutchouc permettant la pénétration d'une aiguille tout en restant étanche ("scubbaplug"). Par la suite, 1 ml d'une solution de NaHCO_3 0,02M (pH 9,6) a été ajouté à chacune des fioles à l'aide d'une seringue de 1 ml et d'une aiguille 22G x 1 1/2", puis 240 μl d'une solution de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (environ 5 $\mu\text{Ci/ml}$) à pH 9,6, dont la radioactivité avait préalablement été évaluée, ont été ajoutés (voir Annexe G pour le calcul de la quantité de CO_2 ajoutée dans les Erlenmeyers). Les cultures ont été incubées à 30°C sous agitation giratoire à 200 rpm pendant 48 heures.

Des échantillons ont été prélevés périodiquement durant 3 jours pour suivre la croissance (série non-radioactive) et la fixation du CO_2 (série radioactive). Pour la fixation du CO_2 , un volume de 2 ml a été prélevé à l'aide d'une seringue de 3 ml et filtré sur des filtres Millipore 0,22

μm de 25 mm de diamètre dans une unité de filtration en acier inoxydable, puis les cellules sur le filtre ont été rincées avec 2 ml HCl 0,05 N et 5 ml d'eau distillée. Le filtre a ensuite été transféré dans un vial à scintillation contenant 10 ml de fluor ACS (Amersham Corp.) et la radioactivité a été évaluée sur un compteur Beckmann LS 3801 selon la technique décrite par Zakharchuk *et al.* (1994) pour *S. thermosulfidooxidans*. Les volumes des cultures prélevées ont été remplacés par de l'air pour maintenir la même pression dans la fiole.

Lors du deuxième essai, les mêmes conditions de cultures, d'échantillonnages et d'analyses ont été employées. Cependant, en plus des conditions de croissance autotrophe, mixotrophe et hétérotrophe, l'effet de la concentration de l'extrait de levure sur la fixation du CO_2 a aussi été évalué en variant la concentration d'extrait de levure du milieu 9K-EL (0,005; 0,01; 0,02; 0,05 %) en présence de soufre élémentaire. Cet essai a été effectué en quadruplicata (2 séries radioactives et 2 séries non-radioactives). Les séries non-radioactives ont été utilisées pour suivre la croissance cellulaire qui a été évaluée par un dosage protéique selon la technique décrite au point 4.4.

La fixation du CO_2 par la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. (SD-6 et SD-9) a été exprimée en mole de CO_2 fixée/h/ml culture, mais aussi en nmole CO_2 fixée/h/mg de protéine pour l'essai 2 (Annexe G).

4.6 Oxydation des composés soufrés

4.6.1 Détermination de la production de polythionates et du sulfate lors de la croissance de *S. disulfidooxidans* SD-11 sur des composés soufrés

Les méthodologies utilisées pour évaluer la production des oxyanions du soufre par *S. disulfidooxidans* SD-11 ont préalablement été décrites (Dufresne, 1993). La production de thiosulfate, de trithionate et de tétrathionate lors de la croissance de *Sulfobacillus* sp. sur le soufre, le glutathion oxydé et le thianthrène a été déterminée par cyanolyse (Kelly *et al.*, 1969). Des flacons Erlenmeyers de 1L contenant 500 ml de milieu 9K-EL pH 2,5 et 0,5 g de substrat, et inoculés à partir de pré-cultures sur les substrats correspondants ont été incubés à 30°C et 200 rpm. Un volume de 40 ml des cultures a été prélevé à intervalles réguliers et centrifugé à 20 000 $\times g$ à 4°C pendant 15 min. Les échantillons ont été divisés en aliquotes de 6 ml et placés dans des Erlenmeyers de 50 ml. La procédure expérimentale développée par Kelly *et al.* (1969) pour le dosage du thiosulfate, du trithionate et du tétrathionate a ensuite été appliquée aux témoins négatifs et aux duplicatas pour chacun des substrats.

La détermination des sulfates a été effectuée par la méthode turbidimétrique approuvée par l'APHA (1985). Le milieu de culture sans sulfate de Hou et Larkin (1976) a été utilisé lors de ces essais. Comme pour le milieu 9K, de l'extrait de levure (0,02%) y a été ajouté et le pH a été ajusté à 2,5. Le soufre, le thianthrène et le glutathion oxydé (50 mg / 100 ml) ont servi de substrat pour doser les sulfates. La seule source de sulfate autre que ceux qui seront produits provenait de l'inoculum. Le dosage a été fait à partir de 1 ml du milieu de culture.

4.6.2 Détermination des métabolites produits lors de l'oxydation de composés organiques soufrés par les *Sulfobacillus* sp. (expérience réalisée au Department of Microbiology, University of Alberta, Edmonton en collaboration avec l'équipe du D^r Phillip M. Fedorak)

Pour les essais d'oxydation des composés organiques soufrés, des Erlenmeyers de 250 ml contenaient 50 ml de milieu auxquels 5 ou 125 mg des substrats suivants ont été ajoutés: DBT, thianthrène, DTBT, dibenzylsulfide. La culture de l'isolat SD-9 mixte a été effectuée dans le milieu 9K-EL (0,01 %) pH 2,3 et la culture du consortium SD-20 dans le milieu BS3 (BS4 dont le pH a été ajusté à 3,0). Les cultures ont été incubées à 30°C sous agitation giratoire à 200 rpm. Des milieux de culture non inoculés ont été effectués pour chacun des substrats et ils ont servi de témoin.

Après la croissance, les cultures ont été transférées dans des ampoules à dessiccation et les métabolites ainsi que les substrats non utilisés ont été récupérés par une extraction au dichlorométhane (3 x 20 ml). Les molécules plus polaires ont par la suite été récupérées par une extraction à l'acétate d'éthyle (3 x 20 ml) de la phase aqueuse à laquelle 14,3 g de NaCl avait préalablement été ajouté. Les phases organiques (inférieure pour le dichlorométhane et supérieure pour l'acétate d'éthyle) ont ensuite été passées à travers un filtre Whatman #2 contenant du thiosulfate de sodium anhydre granulé pour les assécher. Les extraits obtenus ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif et un bain-marie à 60°C jusqu'à ce qu'il reste moins de 2 ml. Le volume résiduel des extraits a été diminué à 0,5 ml sous un jet d'azote gazeux.

Les extraits ont ensuite été analysés par chromatographie sur couche mince (TLC), chromatographie en phase gazeuse (GC) et chromatographie en phase liquide sous haute pression (HPLC). Les TLC ont été effectuées sur des plaques de cellulose contenant un indicateur de fluorescence (Eastman Kodak Co, Rochester NY) dans un solvant composé d'éthanol, d'eau et d'hydroxyde d'ammonium dans les proportions suivantes : 20:15:1 (Kropp *et al.*, 1994). Plusieurs standards en solution dans le dichlorométhane (1 % P/V) tels l'hydroxybenzothiophène (OH-BT), le DBT sulfone, le DBT sulfoxyde, l'acide 2-

sulfobenzoïque, l'acide 2-biphényl sulfonique, l'acide benzène sulfonique, le mono- et bi-hydroxybiphényl, le phénol, le biphényl et le salicylaldéhyde (Sigma) ont été utilisés en plus des extraits, des substrats et du dichlorométhane. Les résultats obtenues par TLC ont d'abord été analysés par exposition des plaques à une lumière UV à 254 nm. Puis, les aldéhydes ont été détectés en pulvérisant une solution saturée d'*o*-dianisidine (Sigma) dans de l'acide acétique glacial sur les plaques alors que le réactif de Gibb (Sigma) suivie d'une solution aqueuse de Na₂CO₃ 10 % a été utilisé pour la détection des groupements aromatiques hydroxylés. Les analyses de GC ont été réalisées sur un chromatographe modèle 5890 Hewlett Packard en utilisant une colonne capillaire DB-5 de 30 mètres, et équipé d'un détecteur à flamme ionisante et d'un détecteur à flamme, sélectif pour le soufre (Fedorak et Grbic-Galic, 1991; Saftic et Fedorak, 1993). Pour les analyses au HPLC, les extraits solubles dans l'acétate d'éthyle ont été séchés et resuspendus dans 0,5 ml d'acétonitrile. Ils ont été analysés à l'aide d'un HPLC Hewlett Packard série 1050 sur une colonne #22 munie d'un détecteur UV à 254 nm (Fedorak et Anderson, 1992).

4.7 Analyses enzymatiques

Pour déterminer la présence des enzymes clés des sentiers métaboliques, la méthode décrite par Selander *et al.* (1986) a été utilisée. Elle consiste à faire migrer les extraits enzymatiques bactériens par électrophorèse sur gel d'amidon et, par la suite, à révéler sélectivement les enzymes recherchées. Des extraits enzymatiques des quatre bactéries suivantes, *Alb. cycloheptanicus* ATCC 49028, *E. coli* ATCC 10798, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, et *T. thiooxidans* ATCC 19377 ont été utilisés comme témoins négatif ou positif selon les cas.

4.7.1 Préparation des extraits enzymatiques

Les extraits enzymatiques ont été préparés à partir de cultures de chacun des isolats selon les paramètres retrouvés au Tableau 4.2. Le temps de croissance nécessaire a été évalué de manière à obtenir une concentration suffisante d'enzyme dans le lysat (environ 0,5 g de cellules, poids humide). Après croissance dans leurs milieux respectifs, les cellules ont été récoltées par centrifugation (15 000 x g, 10 min, 4°C) pour la croissance en bouillon ou encore récupérées par raclage à partir des milieux gélosés. Elles ont ensuite été resuspendues dans un tampon Tris 10 mM (pH 6,8) contenant 1 mM de EDTA, 0,5 mM de NADP (Boehringer) et 0,1 mM dithiothréitol pour obtenir une suspension finale de 15 % (P/V). Pour la détection de la RuBisPCase, les cellules ont été suspendues dans du tampon Tris-HCl 0,05 M (pH 7,9) contenant 12 mM β-mercaptoéthanol, 50 mM NaHCO₃ et 1,5 mM EDTA.

Les suspensions cellulaires ont été lysées aux ultrasons dans un appareil Artek (Sonic 500 dismembrator) avec une sonde intermédiaire 35-60 en plusieurs traitements d'une durée de 30 s (pour *S. disulfidooxidans* SD-11, SD-6 et la culture mixte (SD-6+SD-9) ainsi que pour SD-7 et SD-8, 6 à 8 x 30 s; pour SD-20 et *T. thiooxidans*, 6 x 30 s; et pour *E. coli*, *P. fluorescens* et *Alb. cycloheptanicus*, 4 x 30 s) dans un bain de glace.

Tableau 4.2 Conditions de croissance utilisées pour les différents isolats et les cultures témoins

Nom de l'isolat	Milieu	Source d'énergie et/ou de carbone (% P/V)	Température d'incubation (°C)
<i>S. disulfidooxidans</i> SD-11	9K-EL pH 2,25	S° (0,25)	30
		glutathion réduit (0,25)	30
		glutamate (0,25)	30
		thianthrène (0,25)	30
SD-6 pure et mixte SD-7 et SD-8	9K-EL pH 2,25	glucose + S° (0,05)	30
	MMM pH 7,1	méthanol (0,2)	30
consortium SD-20	9K-EL pH 3,0	glycérol (0,5)	30
	BS4	glucose (0,05) + S° (0,5)	30
<i>Alb. cycloheptanicus</i>	BAM-SM pH 4,5	S° (0,5)	30
<i>E. coli</i>	Peptone Medium	glucose (0,5)	48
<i>P. fluorescens</i>	Peptone Medium		35
<i>T. thiooxidans</i>	BS4	S° (0,5)	30

Les extraits bruts ainsi obtenus ont été centrifugés à 20 000 x g, 40 min, à 4°C dans une microcentrifugeuse. Les surnageants ont été transférés dans des tubes à congélation, en fraction de 0,2 ml, pour ensuite être congelés à -70°C jusqu'à leur utilisation. La concentration en protéines de chacun des surnageants a été déterminée par la méthode de Lowry *et al.* (1951). La D.O. des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde de 750 nm avec un spectrophotomètre U.V./Visible Cary 219 (Varian). Les culots ont été resuspendus dans le même volume de la solution utilisée pour la sonification et congelés.

4.7.2 Électrophorèse sur gel amidon (Andrews, 1986; Arulsekhar et Parfitt, 1986)

Pour la préparation des gels et de l'électrophorèse elle-même, les systèmes tampons apparaissant au Tableau 4.3 ont été choisis en fonction des enzymes recherchés (Tableau 4.4). Les gels d'amidon ont été préparés en suspendant 48g d'amidon (Sigma S 5651) dans 420 ml du tampon du gel dans un flacon Erlenmeyer d'un litre. Après avoir amené le tout juste au-

dessus du point d'ébullition (90°C) avec une agitation constante, la suspension a été dégazée pendant 1 min ou jusqu'à l'apparition de grosses bulles tout en agitant vigoureusement et versée immédiatement dans le moule du gel. La surface du gel a ensuite été recouverte d'une pellicule de polyéthylène et le gel a été laissé pendant 30 min à la température ambiante pour lui permettre de refroidir, puis il a été placé à 4°C jusqu'à son utilisation. Les gels ont été utilisés dans un délai inférieur à 24 heures suivant leur préparation.

Tableau 4.3 Systèmes Tampons utilisés pour les différents enzymes à l'étude

Système	Tampon d'électrodes	Tampon pour les gels	Voltage(V)
1	Tris-Citrate (pH 8,0) 83,20 g/L Tris 33,09 g/L acide citrique monohydraté	Tris-Citrate (pH 8,0) tampon d'électrodes diluées 1:29	130
2	Borate (pH 8,2) 18,50 g/L acide borique 2,40 g/L NaOH	Tris-Citrate (pH 8,7) 9,21 g/L Tris 1,05 g/L acide citrique monohydraté	250
3	Tris-Maléate (pH 7,4) 12,10 g/L Tris 11,60 g/L acide maléique 3,72 g/L EDTA-Na ₂ 2,03 g/L MgCl ₂ .6H ₂ O pH ajusté avec 5 g de NaOH	Tris-Maléate (pH 7,4) tampon d'électrodes diluées 1:9	100
4	Phosphate de potassium (pH 6,7) 18,14 g/L KH ₂ PO ₄ 2,39 g/L NaOH	Phosphate de potassium (pH 7,0) 1,06 g/L KH ₂ PO ₄ 0,25 g/L acide citrique monohydraté	100

Les électrophorèses sur gel d'amidon ont été effectuées dans un appareil d'électrophorèse horizontale Sigma (E 1013) refroidi à l'eau. Les gels ont été chargés à l'aide de morceaux (9 x 13 mm) de papier buvard de 1,2 mm d'épaisseur préalablement imbibés des différents lysats et placés sur du papier-filtre pour enlever l'excès de liquide; puis ceux-ci ont été insérés à un intervalle de 3 mm dans une fente faite par un peigne de 1 mm d'épaisseur placé dans le gel avant que celui-ci ne soit polymérisé. Des morceaux imbibés de bleu de bromophénol (0,04 % P/V dans de l'éthanol 95 %) ont été insérés à chaque extrémité pour marquer le front de migration. Une fois le gel chargé, le tampon de migration (Tableau 4.3) a été ajouté jusqu'à 1 cm au-dessous du niveau du gel. Un tissu éponge (blotting pad de VWR, 2,4 mm épaisseur) imbibé du tampon de migration (mais non détrempe), dont le bas était immergé dans le tampon et l'extrémité supérieure en contact avec le gel (1 à 1,5 cm), a été utilisé pour établir le contact entre les deux électrodes. Durant la migration un voltage constant a été

maintenu (Tableau 4.3). Le gel a été refroidi en plaçant sur le dessus du gel une pellicule de polyéthylène recouverte d'une plaque de verre surmontée d'un sac contenant de la glace concassée et renouvelée régulièrement. L'électrophorèse a été effectuée pendant une période variant de 7 à 12 heures. Après l'électrophorèse, 5 à 6 tranches horizontales de 2 mm d'épaisseur ont été coupées avec un couteau fabriqué d'une plaque d'acier inoxydable (Figure 4.2 A à C).

Tableau 4.4 Tampons utilisés lors de la préparation des gels en fonction des enzymes et lysats

Enzyme			Système Tampon
# E.C.	Nom	Symbole	
1.1.1.37	malate déshydrogénase (TCA)	MDH	1, 3
1.1.1.42	isocitrate déshydrogénase (TCA)	IDH	1
1.1.1.44	6-P-gluconate déshydrogénase (HMP)	6PG	1, 3
1.1.1.49	glucose-6-P déshydrogénase (HMP et ED)	G6P	1, 3
1.2.4.2	α -cétoglutarate déshydrogénase (TCA)	OGDH	1, 4
1.4.1.2-4	glutamate déshydrogénase	GDH	1, 2, ou 4
2.7.1.1	hexokinase	HK	1
2.7.1.11	6-phosphofructokinase (EMP)	6PFK	1
4.1.1.31	PEP carboxylase (fixation CO ₂)	PEP	1,4
4.1.2.13	fructose-1,6-diphosphate aldolase (EMP)	ALD	1
4.1.3.1	isocitrate lyase (cycle du glyoxylate)	IL	1,4
4.1.3.2	malate synthase (cycle du glyoxylate)	MS	1,4
4.1.3.7	citrate synthase (TCA)	CS	1,4

4.7.3 Détection des enzymes

L'efficacité des méthodes de détections des enzymes ont été d'abord vérifiées en microplaque (Figure 4.2 D) de même qu'une possible inhibition des activités enzymatiques après l'électrophorèse (faux négatifs).

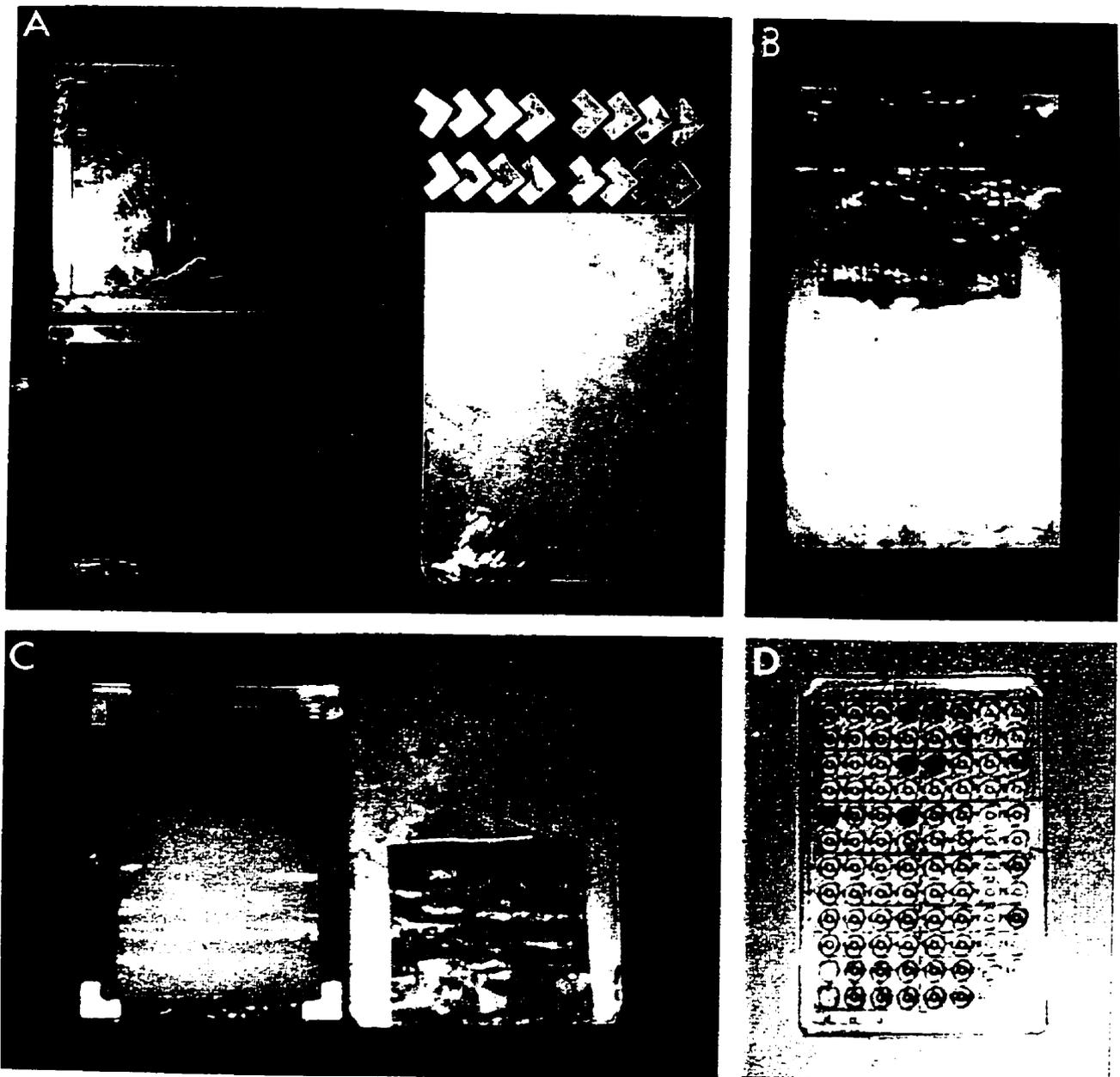


Figure 4.2 Détection de l'activité enzymatique après électrophorèse sur gel d'amidon. (A) Système employé pour couper les tranches du gel fait d'un plateau, d'un cadre, des cales de 2 mm d'épaisseur et d'une plaque d'acier inoxydable; (B) coupe d'une tranche du gel; (C) tranche du gel; (D) résultats d'essais enzymatiques en microplaque.

Pour la détection des enzymes, les tranches de gel d'amidon ont été incubées à 37°C dans différentes solutions révélatrices, pour la plupart décrites dans le "Handbook of detection of enzyme on electrophoretic gels" (Mancheko, 1994), en fonction des enzymes recherchés (voir Annexe H) jusqu'à l'apparition des bandes. Le volume des solutions est suffisant pour la détection des enzymes dans une tranche du gel. Pour les solutions révélatrices basées sur une réaction du NADP avec le PMS, une couche du gel a été révélée avec une solution sans substrat pour détecter en premier lieu la présence d'une éventuelle NADP réductase.

Après l'apparition des bandes, le gel a été rincé 3 fois à l'eau froide (Arulsekhar et Parfitt, 1986) et le Rf de chacune des bandes a été mesuré (Rf : distance parcourue par la bande / la distance parcourue par le bleu de bromophénol). De plus, certains gels ont été fixés par immersion dans une solution de glycérol à 70 °C durant quelques minutes.

4.7.4 Dosage de la RuBisPCase : Ribulose biphosphate carboxylase

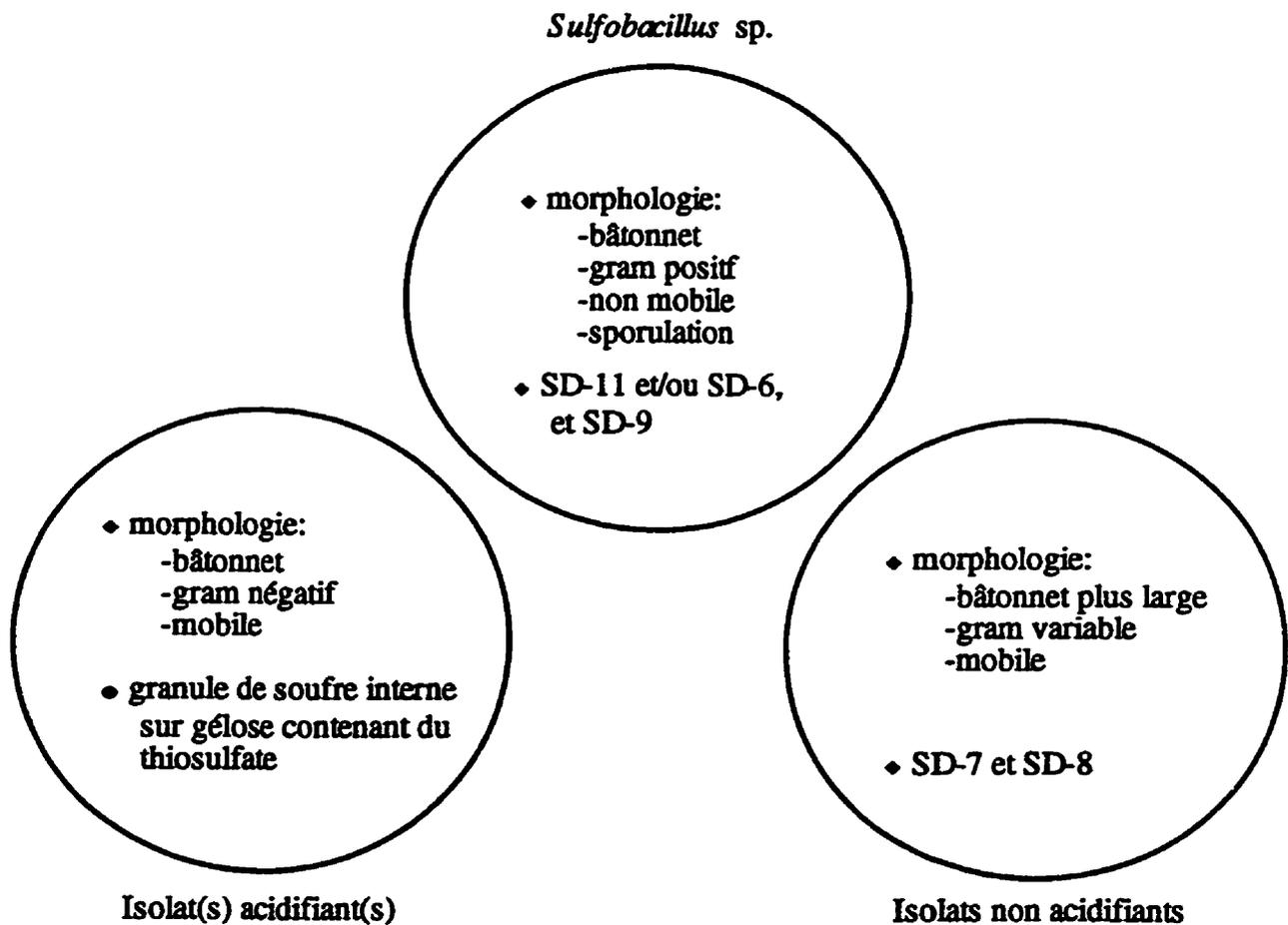
L'activité de la RuBisPCase de l'isolat SD-11 a été mesurée par la méthode décrite par Hurlbert et Lascelles (1963), et modifiée par Stukus et DeCicco (1970) retrouvée à l'Annexe I. Elle est divisée en deux parties : la première partie implique la formation de l'acide 3-phosphoglycérique (3-PGA), la deuxième partie consiste à déterminer par spectrophotométrie la quantité de 3-PGA formée lors de la première partie par l'oxydation du NADH. Une unité d'activité enzymatique a été définie comme étant la quantité d'enzymes catalysant la formation de 1 nmole de 3-PGA / min, ce qui correspond à une décroissance de la D.O. de 0,0045 / min. L'activité spécifique a été définie en unité par mg de protéine. Des extraits enzymatiques de *E. coli* et de *P. aeruginosa* ont été utilisés comme témoins négatifs alors qu'un extrait de *T. thiooxidans* a servi de témoin positif.

4.7.5 Dosage de la citrate lyase

La présence de l'ATP:citrate lyase a été déterminée par la méthode de l'hydroxamate (Takeda *et al.*, 1969) décrite à l'Annexe J. Cette méthode permet de doser l'acétyl-CoA formé lors de la réaction enzymatique par la formation d'acétylhydroxamate qui donnera un complexe coloré en présence de chlorure ferrique et d'acide trichloroacétique.

CHAPITRE 5

RÉSULTATS ET DISCUSSION: ISOLEMENT ET CULTURE DES ESPÈCES BACTÉRIENNES FORMANT LE CONSORTIUM SD-2



CHAPITRE 5

5. RÉSULTATS ET DISCUSSION: ISOLEMENT ET CULTURE DES ESPÈCES BACTÉRIENNES FORMANT LE CONSORTIUM SD-2

Lors d'un essai de déminéralisation et de désulfuration du noir de carbone pyrolytique de pneus usés, des boues d'usines d'épuration des eaux usées avaient été utilisées comme source de bactéries thio-oxydantes acidophiles (Dufresne, 1993). Après enrichissement et isolement de la flore thio-oxydante acidophile, la présence d'une seule espèce bactérienne avait été remarquée. L'isolat obtenu présentait à l'origine une bonne homogénéité au niveau de sa morphologie coloniale. Les colonies étaient rondes d'un diamètre d'environ 1 mm, bombées, de contour irrégulier, de couleur jaune pâle, translucides, mais devenant opaques avec le temps. Cependant, les colonies typiques des thiobacilles, qui apparaissaient d'abord à la surface de la gélose, semblaient subir un envahissement par une deuxième espèce bactérienne. Après quatre à cinq jours d'incubation à 28°C, les colonies étaient transparentes, puis une opacité se développait à leur surface. Leur coloration variait selon le pH révélé par le bleu de bromophénol : lorsque le pH était inférieur à 3,0, les colonies étaient jaunes avec des anneaux verdâtres apparaissant près de leur centre; par ailleurs, si le pH se maintenait aux alentours de 4,0, les colonies prenaient une teinte bleue avec des anneaux pourpres au centre. Il semblait donc évident que la coexistence de plus d'un type de bactéries avait été maintenue au cours de toutes les sous-cultures de routine et que nous avons de fait isolé un consortium bactérien constitué d'au moins deux types de bactéries.

En plus de la modification de la morphologie coloniale lors de l'incubation du consortium sur le milieu BS4, la présence de plus d'une espèce au sein des colonies a été confirmée lors des observations en microscopie photonique. Plusieurs bâtonnets de largeurs et longueurs différentes ont été observés dans la culture.

Le consortium bactérien SD-2 ainsi isolé était composé, à première vue, d'une espèce thio-oxydante acidophile et produisant un acide minéral, d'au moins une autre espèce acidophile sporulée et possiblement d'une ou plusieurs autres espèces. Ce consortium pouvait croître dans un milieu minéral liquide à pH 4,0 et à 30°C, utilisant le soufre élémentaire comme source d'énergie et le CO₂ atmosphérique comme source de carbone. Ces conditions de croissance ont été utilisées pour le maintien du consortium SD-2 durant plusieurs années.

Comme le précise Caldwell *et al.* (1997), il est important de connaître les espèces bactériennes composant une communauté ainsi que les interactions qui stabilisent cette association avant qu'elles ne soient utilisées dans un quelconque procédé biotechnologique. La première étape de cette recherche consistait à isoler, caractériser et identifier les espèces bactériennes formant ce consortium SD-2.

5.1 *Sulfobacillus* sp. SD-11

La première espèce du consortium SD-2 à avoir été isolée a été celle formant des spores, puisque la préparation d'une suspension de spores a permis de la séparer des autres espèces asporulées du consortium SD-2 (Dufresne, 1993). À ce moment, la pureté de la culture avait été vérifiée par étalement de la suspension de spores en germination sur des milieux gélosés 9K-EL à pH 2,5 et à 4,0 contenant soit du soufre, du thiosulfate, du glutathion oxydé ou du glucose. L'agar noble, l'agarose et le Gelrite avaient été utilisés comme agents gélifiants, et aucune croissance n'avait été observée. De plus, lors de l'adaptation de cet isolat à croître sur quatre substrats dont le soufre élémentaire, le glutamate de sodium, le glutathion oxydé et le thianthrène, chaque sous-culture a été inoculée sur chaque substrat pour s'assurer de la présence d'une seule espèce.

Ce premier isolat a été désigné SD-11 et formellement identifié comme une nouvelle espèce du genre *Sulfobacillus*, *S. disulfidooxidans* sp. nov. (Dufresne, 1993), puisqu'une seule autre espèce bactérienne gram-positive formant des spores, acidophile et thio-oxydante avait été décrite dans la littérature (Golovacheva et Karavaiko, 1978) : *S. thermosulfidooxidans*.

5.2 Isolement de l'isolat SD-6 et de la culture mixte contenant l'isolat SD-9

Lors de l'adaptation du consortium SD-20, obtenu après plusieurs tentatives d'isolement infructueuses de l'espèce acidifiante à partir du consortium SD-2 (voir Annexe D), sur le dibenzothiophène (DBT) dans un bouillon 9K-EL pH 2,25, deux espèces bactériennes possédant la morphologie du *Sulfobacillus* sp. SD-11 ont été observées (bâtonnet en chaînette, non mobile, formant des spores) (Figure 5.1 A). Par la suite, la présence de deux morphologies cellulaires différentes a aussi été remarquée dans les sous-cultures de l'isolat SD-11.

En novembre 1996, un nouveau milieu gélosé dont la composition reposait sur le milieu WAYE, décrit et recommandé par le D^r D.B. Johnson (Johnson, 1995), a été utilisé pour vérifier la croissance de colonies à partir des sous-cultures de l'isolat SD-11 et du consortium SD-20 adapté sur le DBT, ce qui avait été impossible jusqu'à ce moment. Le milieu WAYE a la particularité d'utiliser de l'agarose lavé à l'eau bidistillée comme agent gélifiant. Cette étape permet d'enlever les impuretés et les molécules de faible poids moléculaire qui peuvent être hydrolysées lors de la stérilisation à l'autoclave. Comme pour la culture de l'isolat SD-11 en bouillon, de l'extrait de levure à une concentration de 0,01 % au lieu de 0,02 %, spécifiée dans la méthode, a été ajoutée comme facteur de croissance. De plus, un sel de phosphate de potassium (1,5 g/L) a été ajouté à la solution minérale du milieu WAYE en plus du sulfate ferreux (1.0 g/L) utilisé pour détecter la croissance des bactéries ferro-oxydantes, du tétrathionate de sodium (0,5 g/L) pour les bactéries thio-oxydantes et du glucose (0,5 g/L) pour les espèces hétérotrophes acidophiles.

Sur ce milieu (FTG), de petites colonies d'un diamètre inférieur à 1 mm, rondes, surélevées, de couleur incolore à légèrement rose-orangée (après 14-21 jours d'incubation), translucides et possédant une surface rugueuse ont été obtenues en plus de colonies recouvertes de cristaux d'ions ferriques pour les sous-cultures de l'isolat SD-11 et la culture provenant de l'enrichissement du consortium SD-20 sur le DBT (Figure 5.2). Lorsque cultivées en milieu liquide, les bactéries de ces colonies étaient non mobiles et formaient de longues chaînes de bâtonnets minces et de longueur variable. Sur le milieu FTG, ces mêmes bâtonnets apparaissaient en général plus courts et dodus (Figure 5.1 B) ce qui démontrait un polymorphisme cellulaire assez prononcé pour ces isolats.

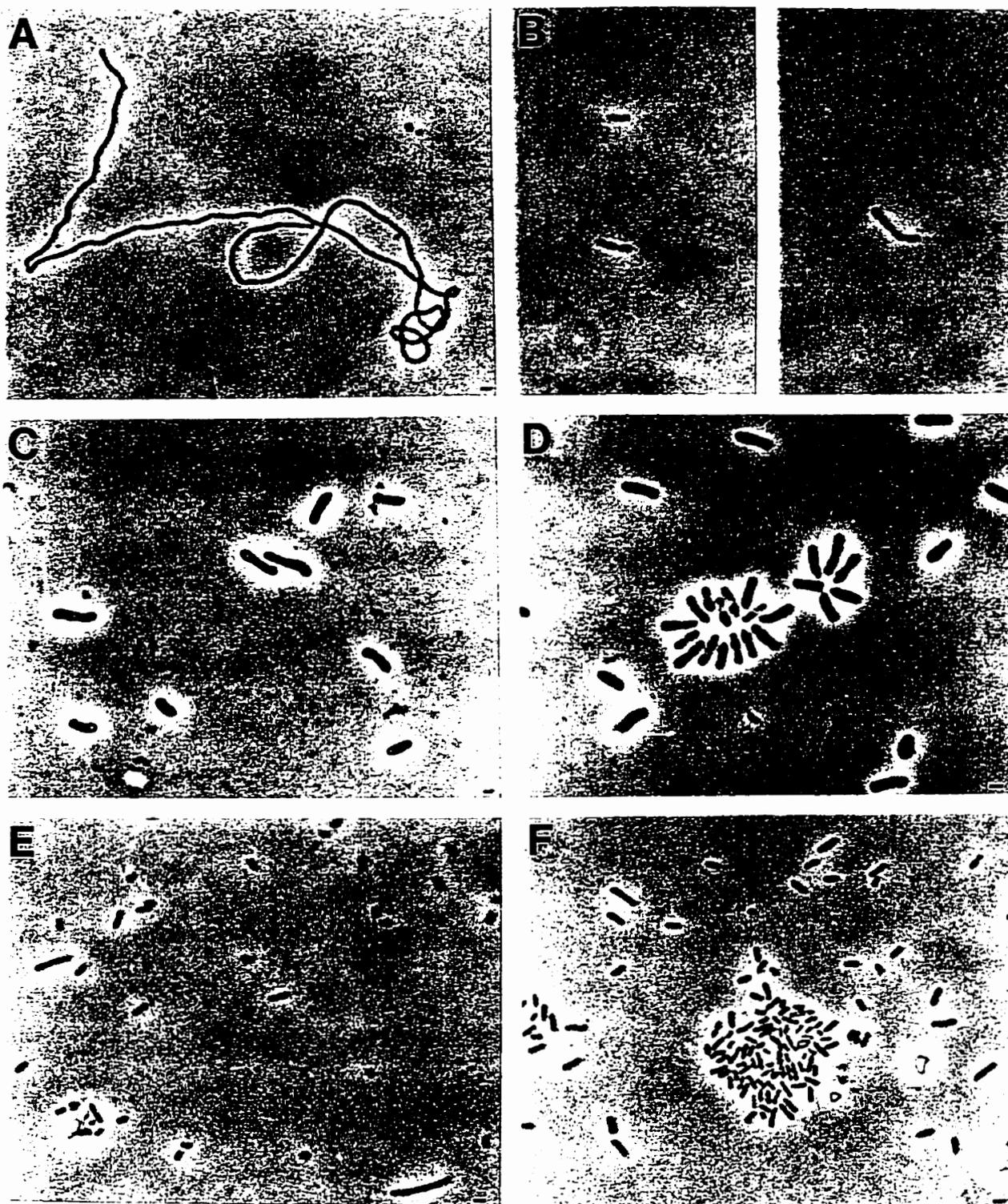


Figure 5.1 Photomicrographies photoniques en contraste de phase des *Sulfobacillus* sp. (A-B), de l'isolat SD-8 (C-D) et du consortium SD-20 (E-F) en croissance sur leur milieu respectif. (Barre = 0,5 μ m). (voir matériel et méthodes pour conditions de croissance)

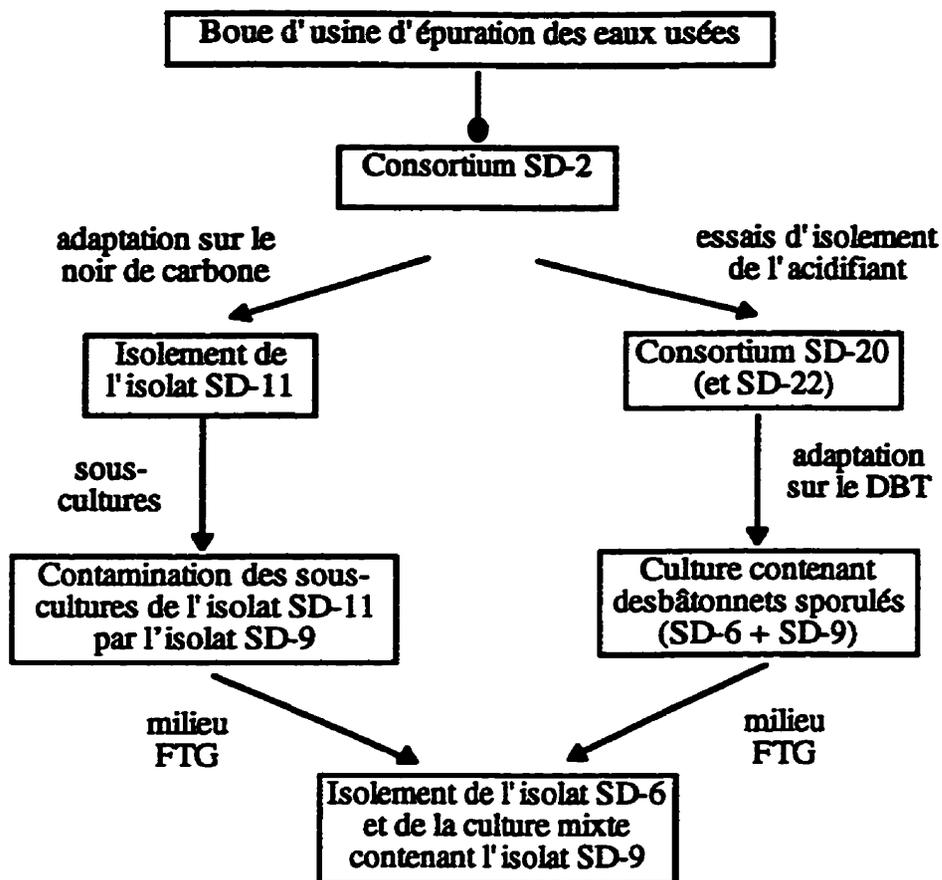


Figure 5.2 Résumé des manipulations menant à l'isolement des isolats SD-6 et SD-9

L'isolat formant les colonies rosées a été identifié comme l'isolat SD-6. Par ailleurs, les colonies recouvertes de sulfate ferrique semblaient contenir plus d'une espèce. Pour séparer ces isolats, quelques passages successifs dans un bouillon du milieu 9K-EL contenant quelques grains de sulfate ferreux, suivi de l'inoculation de géloses FTG avec et sans sulfate ferreux (milieu TG) ont été effectués. Le sulfate ferreux a été omis dans le milieu TG pour permettre la croissance de colonies sans cristaux. Nous espérons ainsi parvenir à séparer plus facilement les deux espèces. Cependant, il est devenu évident après trois passages que les deux espèces seraient difficiles à séparer. Sur le milieu TG, toutes les colonies étaient identiques, il était impossible de faire une différence entre les colonies de l'isolat SD-6 et celles de la culture mixte. En outre, les colonies sur le milieu FTG étaient toujours entourées de colonies satellites sans précipité. Ces colonies étaient formées par l'isolat SD-6 et d'un autre isolat que nous avons numéroté SD-9, malgré qu'il soit toujours en culture mixte avec l'isolat SD-6.

Ces deux isolats ont été maintenus dans le milieu 9K-EL à pH 2,25 auquel du glucose, ou un mélange de glucose et de soufre élémentaire, du soufre élémentaire, ou du glutathion oxydé y avaient été ajoutés comme sources énergétiques. Des sous-cultures (2 % V/V d'inoculum) ont aussi été effectuées dans le milieu 9K-EL sans substrat pour vérifier l'utilisation de l'extrait de levure comme substrat carboné par ces isolats. L'isolat SD-6 et la culture mixte contenant l'isolat SD-9 se sont développés dans les 4 sous-cultures consécutives effectuées dans le milieu 9K-EL sans substrat ajouté.

5.3 Isolats SD-7 et SD-8

La présence dans le consortium SD-2 de bactéries possédant un intervalle de pH de croissance plus considérable que les autres espèces du consortium a été vérifiée en inoculant des tubes contenant 2 ml du milieu 9K-m de pH 4,0 à pH 7,0 auxquels quelques grains de soufre élémentaire avaient été ajoutés. Plusieurs morphologies cellulaires ont ainsi été observées après 5 jours d'incubation. Parmi les cultures où il n'y avait pas eu d'acidification lors de la croissance, des bâtonnets de 1,0-1,5 μm de largeur et de 2,0-5,0 μm de longueur, mobiles et possédant quelques fois de grosses inclusions réfringentes en microscopie photonique ont été observés (Figure 5.1 C). Ces bâtonnets formaient des embranchements et occasionnellement des rosettes (Figure 5.1 D). Après deux passages de ces cultures liquides aux milieux gélosés 9K-m pH 5,5 et 6,25, de petites colonies roses formées par ces bâtonnets plus larges, observés précédemment dans les bouillons, se sont développées sur le milieu B-EL pH 4,0 contenant du thiosulfate. Quelques unes de ces colonies ont été resuspendues dans le milieu B-EL à pH 4,0 et des dilutions ont été effectuées avant d'inoculer des milieux gélosés B-EL contenant du glucose à pH 4,0. Deux types de petites colonies roses, bombées, de 1 à 2 mm de diamètre ont été isolés sur ce milieu. Nous les avons identifiées comme les isolats SD-7 et SD-8. Une seule différence entre ces deux isolats a été remarquée lorsque le glucose était utilisé comme substrat : les colonies de l'isolat SD-7 étaient rose foncé et translucides alors que les colonies de l'isolat SD-8 étaient rose pâle et opaques.

Ces isolats ont d'abord été conservés sur les milieux gélosés B-EL pH 4,5 contenant du glucose ou du thiosulfate puis, par la suite, sur le milieu MMM. Des sous-cultures en ont été effectuées à tous les mois.

5.4 Espèce thio-oxydante acidophile acidifiante

Lors des observations en microscopie photonique du consortium bactérien SD-2, de petits bâtonnets mobiles possédant les caractéristiques morphologiques des thiobacilles ont été observés (Figure 5.1 E). Malgré plusieurs essais axés sur l'isolement de la ou des espèces thio-oxydante(s) acidifiante(s) du consortium SD-2, aucune espèce possédant ces caractéristiques n'a été isolée en culture pure. Après chaque essai d'isolement, la présence de bactéries possédant les mêmes caractéristiques que l'isolat SD-11 a été vérifiée en inoculant un bouillon 9K-EL à pH 2,25 contenant du glutamate de sodium. Pour les isolats SD-7 et SD-8, une gélose B-EL contenant du glucose a été utilisée pour vérifier leur présence. Ces vérifications de routine nous ont permis de suivre l'évolution de ces deux isolats lors des essais de séparation de l'espèce acidifiante du consortium SD-2 et d'affirmer que les espèces SD-7 et SD-8 sont absentes des deux consortiums (consortium SD-22 et SD-20) isolés lors de l'essai de dilution en couche-mince de gélose (voir Annexe D). Lors du développement de colonies de ces deux consortiums sur les milieux gélosés utilisés, l'espèce thio-oxydante acidifiante était toujours accompagnée de longs bâtonnets plus ou moins larges qui contenaient des granules foncées à leurs extrémités et que nous assumions être des cellules des *Sulfobacillus* sp (Figure 5.1 E-F). Cependant, nous n'avons jamais observé des bâtonnets ayant les caractéristiques des isolats SD-7 et SD-8 dans le consortium SD-2, même si leur présence avait été confirmée sur le milieu B-EL pH 4,0 contenant du glucose. Les consortiums ont été cultivés sur le milieu gélosé BS4 contenant du soufre lors de sous-cultures mensuelles.

5.5 Composition du consortium SD-2

S. disulfidooxidans SD-11 fut la première espèce à avoir été isolée et caractérisée à partir du consortium SD-2 après une période d'adaptation sur le noir de carbone pyrolytique. Son identification est basée sur plusieurs critères, dont sa capacité à oxyder le soufre élémentaire. Cette caractéristique nous a permis de l'inclure dans le genre *Sulfobacillus* au lieu de celui des *Alicyclobacillus*. Les espèces du genre *Alicyclobacillus* possèdent une morphologie cellulaire semblables aux espèces du genre *Sulfobacillus*, mais ils sont hétérotrophes et non thio-oxydant.

La présence d'une deuxième espèce bactérienne dans les sous-cultures de l'isolat SD-11 a été observée seulement à partir de mars 1996. Avant ce moment, aucune observation ne nous permettait de mettre en doute la pureté de l'isolat SD-11. La présence d'une deuxième espèce a été confirmée en décembre 1996 après le développement du milieu gélosé FTG. Toutes les tentatives pour obtenir une culture pure de l'isolat SD-11 à partir de cellules lyophilisées ou de

suspensions de spores préparées avant le mois de mars 1996 se sont avérées négatives : les autres cultures lyophilisées étaient mixtes et aucune croissance n'a été obtenue à partir des suspensions de spores.

Par la suite, deux isolats (SD-6 et SD-9) possédant les caractéristiques du *Sulfobacillus* SD-11 ont été isolés à partir du consortium SD-20 et des sous-cultures de l'isolat SD-11. Nous les avons considérés comme appartenant tous deux au genre *Sulfobacillus*, puisqu'ils possédaient sensiblement les mêmes caractéristiques morphologiques et physiologiques. De plus, l'extrait de levure à 0,01% (P/V) semble être utilisé comme substrat (source de carbone et d'énergie?), en plus de fournir des facteurs de croissance; puisqu'en son absence, il n'y a aucune croissance de l'isolat SD-6 et de la culture mixte contenant l'isolat SD-9. Ce phénomène avait déjà été observé dans le cas du *Sulfobacillus* sp. SD-11. Nous étions toutefois conscients qu'il était toujours possible qu'ils fassent partie d'un autre genre bactérien.

À première vue, l'isolat SD-6, tout comme l'isolat SD-11, ne peut oxyder le sulfate ferreux. De plus, l'isolement de l'isolat SD-6 à partir de sous-cultures de l'isolat SD-11 nous permet d'émettre comme hypothèse que ces deux isolats pourraient ne former qu'une seule et même espèce.

L'absence de l'isolat SD-9 des cultures de l'isolat SD-11 avant 1996 pourrait être dû à l'adaptation sur le noir de carbone pyrolytique du consortium SD-2 préalablement à l'isolement de l'isolat SD-11. L'isolat SD-9 devait cependant se retrouver dans le consortium initial SD-2 et il est demeuré associé à l'espèce acidifiante lors des différents essais d'isolement tout comme les isolats SD-11 et/ou SD-6. L'isolat SD-9 peut avoir été introduit dans les sous-cultures de l'isolat SD-11 lors des manipulations faisant intervenir la culture du consortium SD-20 après adaptation sur le DBT. Il pourrait aussi s'agir d'une mutation ou de la perte d'un plasmide.

Pour leur part, les isolats SD-7 et SD-8 sont des bâtonnets assez gros pour des bactéries. Les cellules jeunes sont mobiles et les cellules vieillissantes possèdent plusieurs granules réfringents. La présence des isolats SD-7 et SD-8 dans le consortium SD-2 indique une forte tolérance à l'acidification, puisque le pH du milieu de culture du consortium SD-2 pouvait être inférieur à 1,0 avant que nous procédions aux sous-cultures. De plus, leur croissance sur le milieu B-EL contenant du glucose ou du thiosulfate nous permet de croire que leur besoin en azote combiné est très faible ou qu'ils ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique. Cependant, il est impossible, à ce stade, de déterminer les sources de carbone et d'énergie de ces isolats.

L'impossibilité d'isoler la ou les espèces acidifiantes du consortium SD-2 peut s'expliquer soit par l'absence de l'utilisation d'un milieu de culture approprié ou par une relation très étroite entre l'espèce acidifiante et les isolats du type *Sulfobacillus*.

Même si la morphologie cellulaire des différentes souches du consortium en culture pure a permis de les cataloguer assez facilement, leur morphologie montre une nette tendance à se modifier en fonction des conditions de culture et les rend beaucoup plus difficiles à différencier au sein du consortium. Le consortium SD-2 serait donc constitué de deux ou trois espèces bactériennes du genre *Sulfobacillus* (SD-11 et/ou SD-6, et SD-9), de deux isolats non acidifiants (SD-7 et SD-8), et d'une ou plusieurs espèces acidifiantes.

CHAPITRE 6

RÉSULTATS ET DISCUSSION: LES *ACIDOBACTER*

- ◆ Morphologie :
 - bâtonnets gram-positifs
 - en paires ou formant des chaînes
 - spore déformante subterminale
 - granule de polyphosphate
 - lipides : acides ω -cycliques
- ◆ Phylogénie
 - isolat SD-11 = SD-6 : *S. disulfidooxidans*
 - isolat SD-9 : *Sulfobacillus* sp.
- ◆ Biochimie :
 - aérobies facultatifs
 - acidophiles
 - mésophiles
- ◆ Physiologie :
 - EL : source E et C
 - mixotrophe
 - thio- et/ou ferro-oxydants
 - oxydation soufre organique et inorganique
- ◆ Taxinomie du genre *Sulfobacillus* :
 - nouveau genre : *Acidobacter*
 - *A. disulfidooxidans* gen. nov.
ATCC 51911

Acidobacter sp.

CHAPITRE 6

6. RÉSULTATS ET DISCUSSION: LES *ACIDOBACTER*

L'identification des isolats a été réalisée par étapes. Les isolats SD-6, SD-9 et SD-11 appartenant au genre *Sulfobacillus* ont été étudiés en premier, puisque le *Sulfobacillus* sp. SD-11 fut le premier à être isolé en culture pure. Nous avons d'abord analysé la morphologie de ces isolats. Puis, une étude phylogénétique a été réalisée pour confirmer l'appartenance de ces isolats au genre *Sulfobacillus*. La composition des lipides membranaires du *Sulfobacillus* sp. SD-11 a aussi été analysée. Et finalement, nous avons déterminé certains des caractères biochimiques ainsi que plusieurs des caractéristiques physiologiques des *Sulfobacillus* sp.

6.1 Caractérisation morphologique

La morphologie cellulaire du *Sulfobacillus* sp. SD-11 a déjà été décrite précédemment (Dufresne, 1993). En microscopie électronique, nous avons observé des bâtonnets qui possédaient un granule de polyphosphate à une extrémité de la cellule et parfois une spore se développait à l'extrémité opposée (Figure 6.1 B et C). Les dimensions moyennes des cellules du *Sulfobacillus* sp. SD-11 ont été déterminées à l'aide des photomicrographies électroniques à transmission. Les cellules végétatives mesuraient environ 0,34-0,45 μm de largeur par 0,94-3,55 μm de longueur. La spore était ovale, déformante et située en position sub-terminale ou terminale dans la cellule. Elle avait une forme allongée et aplatie selon les différentes mesures effectuées (Figure 6.1 C) qui variaient de 0,68-0,88 μm x 0,84-1,20 μm à partir des coupes transversales et de 0,72-0,92 μm x 1,50-1,80 μm à partir des coupes longitudinales (Figure 6.1

Insertion). La microscopie électronique à balayage a permis de mettre en évidence une division cellulaire particulière, en ce sens qu'elle semblait être variable; elle était quelques fois asymétrique (Figure 6.1 A).

À l'instar du *Sulfobacillus* sp. SD-11, les isolats SD-6 et SD-9 étaient des bâtonnets gram-positifs, non mobiles, formant des spores, et retrouvés isolés ou formant des chaînes. Les dimensions observées en microscopie photonique étaient similaires à celles obtenues pour le *Sulfobacillus* sp. SD-11. La présence d'un granule de polyphosphate à une extrémité des cellules a aussi été observée. Les spores étaient ovales, déformantes et en position sub-terminale ou terminale comme pour le *Sulfobacillus* sp. SD-11. Cependant, il était possible de différencier l'isolat SD-6 de l'isolat SD-9 dans la culture mixte, puisque les bâtonnets de l'isolat SD-9 semblaient plus larges que ceux de l'isolat SD-6.

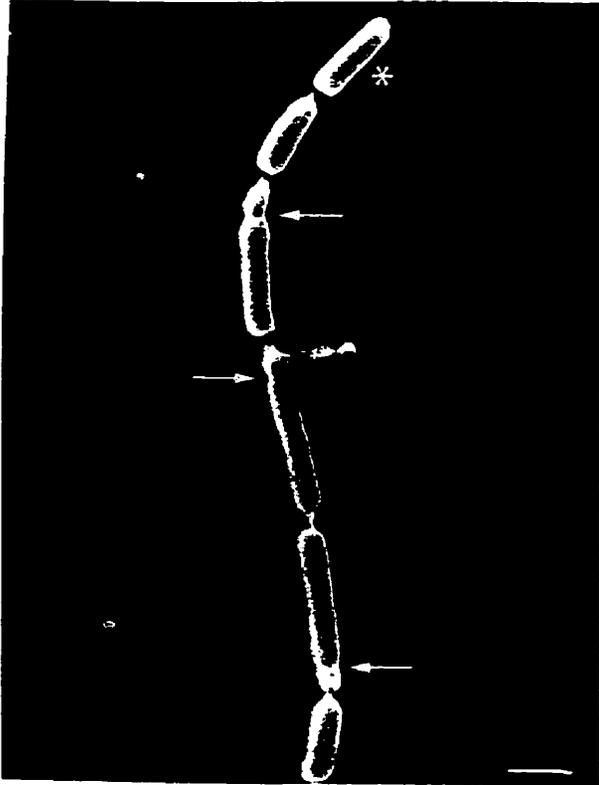
6.2 Caractérisation phylogénétique

L'étude phylogénétique du *Sulfobacillus* sp. SD-11 fut la première à être complétée. De plus, une caractérisation exhaustive a été effectuée, car nous étions en présence d'une nouvelle espèce bactérienne. Par la suite, les isolats SD-6 et SD-9 ont aussi été étudiés.

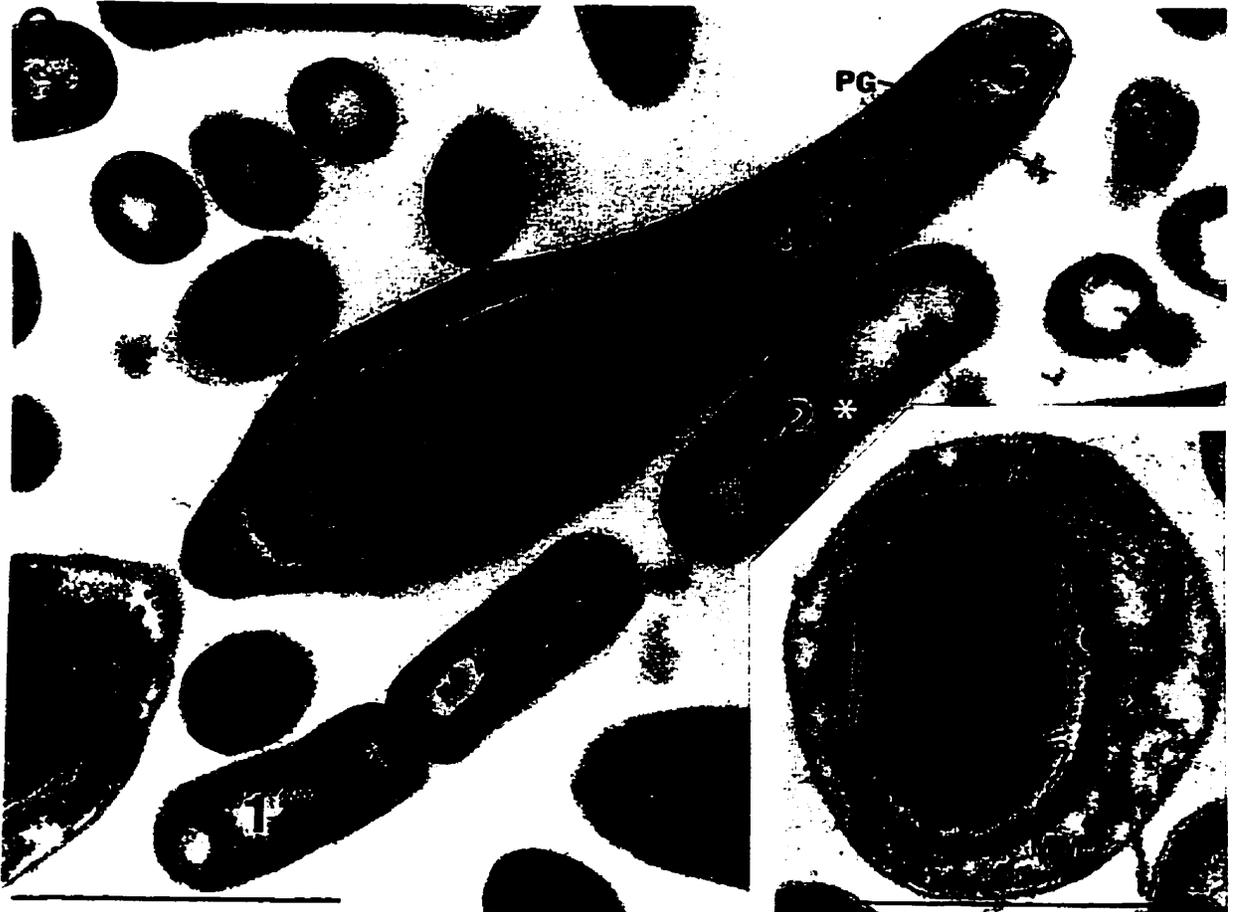
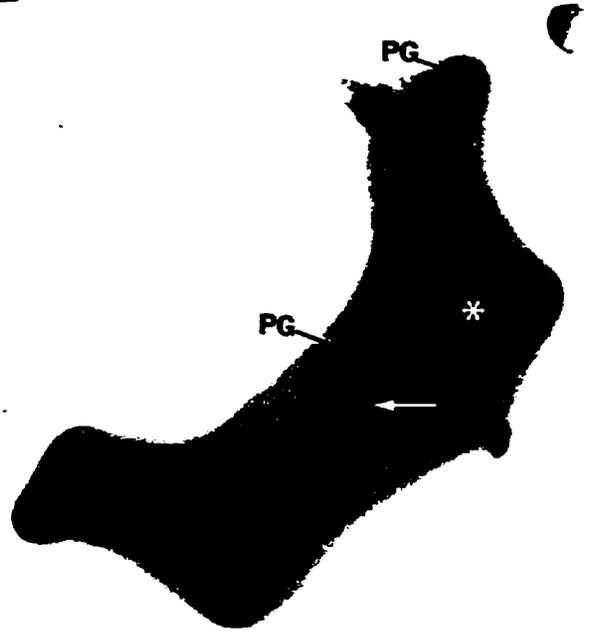
6.2.1 *Sulfobacillus* sp. SD-11

L'ADN codant pour l'ARN 16S (ADNr 16S) du *Sulfobacillus* sp. SD-11 a d'abord été amplifié par la technique du PCR, puis sa séquence nucléotidique a été déterminée. Le rapport du % G+C de l'ADNr 16S était de 59,3 mol % alors que celui de l'ADN chromosomique était de 53±1 mol %. Une analyse effectuée en utilisant le programme BLAST de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) a démontré une excellente homologie avec la séquence d'une souche identifiée à *S. thermosulfidooxidans* VKM B-1269 et déposée dans la banque de données génétiques GenBank par Tourova *et al.* en 1993 sous le numéro d'accèsion Z21979. Le *Sulfobacillus* sp. SD-11 présentait 95,5 % d'homologie avec *Alb. cycloheptanicus* et 95,2 % avec *S. thermosulfidooxidans* (Tableau 6.1). Le rapport transition/transversion du *Sulfobacillus* sp. SD-11 était de 1,3 versus *S. thermosulfidooxidans* et de 1.1 versus *Alb. cycloheptanicus*.

Figure 6.1 Photomicrographies électroniques du *Sulfobacillus* sp. SD-11. (A) Photomicrographie électronique à balayage montrant une courte chaîne de cellules en division anormales (→) et une cellule mature (*). (B) Photomicrographie électronique à transmission par coloration négative montrant les granules de polyphosphates (PG). (C) Photomicrographie électronique à transmission sur des sections à différents stades de croissance : 1-cellules végétatives en division, 2-cellule mature, 3-cellule sporulée. (Insertion) Section transversale montrant la membrane multiple (MM) et le cortex (CO) de la pré-spore. (Barre = 1,0 µm)



B



Une analyse de parcimonie standard et une analyse de neighbor-joining ont montré une relation de parenté très proche entre les genres *Sulfobacillus* et *Alicyclobacillus*. Ce regroupement a été appuyé par les valeurs élevées obtenues lors de l'analyse de ré-échantillonnage des données qui indique un degré de confiance statistiquement élevé (Figure 6.2 A-B). Peu importe la méthode d'analyse utilisée, le genre *Alicyclobacillus* n'est jamais apparu monophylétique, le genre *Sulfobacillus* étant lui-même niché à l'intérieur des *Alicyclobacillus*. La seule différence entre les deux arbres obtenus était l'emplacement du groupe *Bacillus-Sporolactobacillus-Clostridium* qui tout comme le groupe *Alicyclobacillus-Sulfobacillus* a démontré un pourcentage G+C de l'ADN chromosomique inférieur à 55 mol %. L'analyse de parcimonie a rattaché le groupe *Bacillus-Sporolactobacillus-Clostridium* au groupement *Alicyclobacillus-Sulfobacillus* (Figure 6.2 A) ce qui était en accord avec une étude précédente (Lane *et al.*, 1992). L'analyse du neighbor-joining a placé le groupe formé par les espèces ALV et BC1 possédant un % G+C entre ces deux groupes (Figure 6.2 B). Cependant, cet arrangement était supporté par une valeur de ré-échantillonnage plus faible (58 %) que celle obtenue par l'analyse de parcimonie (85 %). Pour compléter cette investigation, la phylogénie a aussi été évaluée par le programme fastDNAm1 de Gary Olsen (RDP) (Maidak *et al.*, 1994) basé sur la méthode du "maximum likelihood" (Felsenstein, 1981). La séquence de l'ADNr 16S de l'isolat C-MT1 (numéro d'accession X75270) isolé par Goebel et Stackebrandt (1994), et dont l'identification présomptive le plaçait dans le genre *Sulfobacillus*, a aussi été incluse dans cette analyse. L'arbre phylogénétique obtenu était semblable à l'arbre de l'analyse de parcimonie et l'isolat C-MT1 était retrouvé dans le groupe formé par les isolats ALV et BC1.

6.2.2 *Sulfobacillus* sp. SD-6 et SD-9

Les ADNr 16S de l'isolat SD-6 et de la culture mixte contenant l'isolat SD-9 ont été séquencés par le Dr B. Goebel. La séquence de l'isolat SD-6 était identique à celle que nous avons obtenue pour le *Sulfobacillus* SD-11, ces deux isolats n'appartiendraient donc qu'à une seule souche bactérienne. Pour la suite des expériences, nous les avons considérés de cette manière.

Selon la séquence de l'ADNr 16S de la culture mixte contenant les isolats SD-6 et SD-9, seules trois bases seraient différentes entre les deux espèces sur les 925 bases séquencées (Annexe K). La culture mixte serait donc composée de deux espèces du genre *Sulfobacillus*.

Tableau 6.1 Identité des séquences de l'ADNr 16S entre l'isolat SD-11, plusieurs bactéries gram-positives et quelques protéobactéries¹

Espèces	% identité des séquences															
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
isolat SD-11	1	95,2	95,5	93,7	93,6	87,7	87,1	83,3	84,3	83,3	82,2	81,9	83,3	81,2	79,7	79,9
<i>Sulfobacillus thermosulfidoxidans</i>	2		94,9	94,2	94,1	87,4	86,4	83,3	84,9	82,9	82,3	82,1	83,4	82,6	80,5	80,4
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	3			95,0	94,9	88,3	87,3	83,7	84,8	84,5	83,1	83,3	84,2	82,3	80,2	81,0
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	4				99,6	88,3	87,5	84,3	85,0	83,6	83,0	82,9	83,8	82,6	80,0	80,5
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	5				88,2	87,3	84,0	85,1	83,6	82,9	83,0	83,8	82,4	79,9	80,1	
<i>Bacillus subtilis</i>	6					93,1	86,4	83,7	82,4	84,2	83,0	84,3	82,3	80,9	81,7	
<i>Sporolactobacillus inulinis</i>	7						84,5	80,0	79,8	82,7	81,1	82,6	81,1	80,8	81,8	
<i>Clostridium innocuum</i>	8							80,8	80,7	79,7	80,7	82,1	80,7	79,6	79,9	
isolat BC1	9								94,5	81,4	83,2	83,3	82,3	80,0	79,6	
isolat ALV	10									81,3	81,4	82,0	79,6	79,8	78,5	
isolat TH3	11										87,3	88,6	82,6	82,0	82,4	
<i>Mycobacterium bovis</i>	12											91,7	80,9	80,1	80,2	
<i>Streptomyces lividans</i>	13												80,8	80,2	81,9	
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	14													85,1	85,6	
<i>Thiobacillus acidophilus</i>	15														82,2	
<i>Escherichia coli</i>	16															

¹ Basé sur l'alignement de 1208 nucleotides

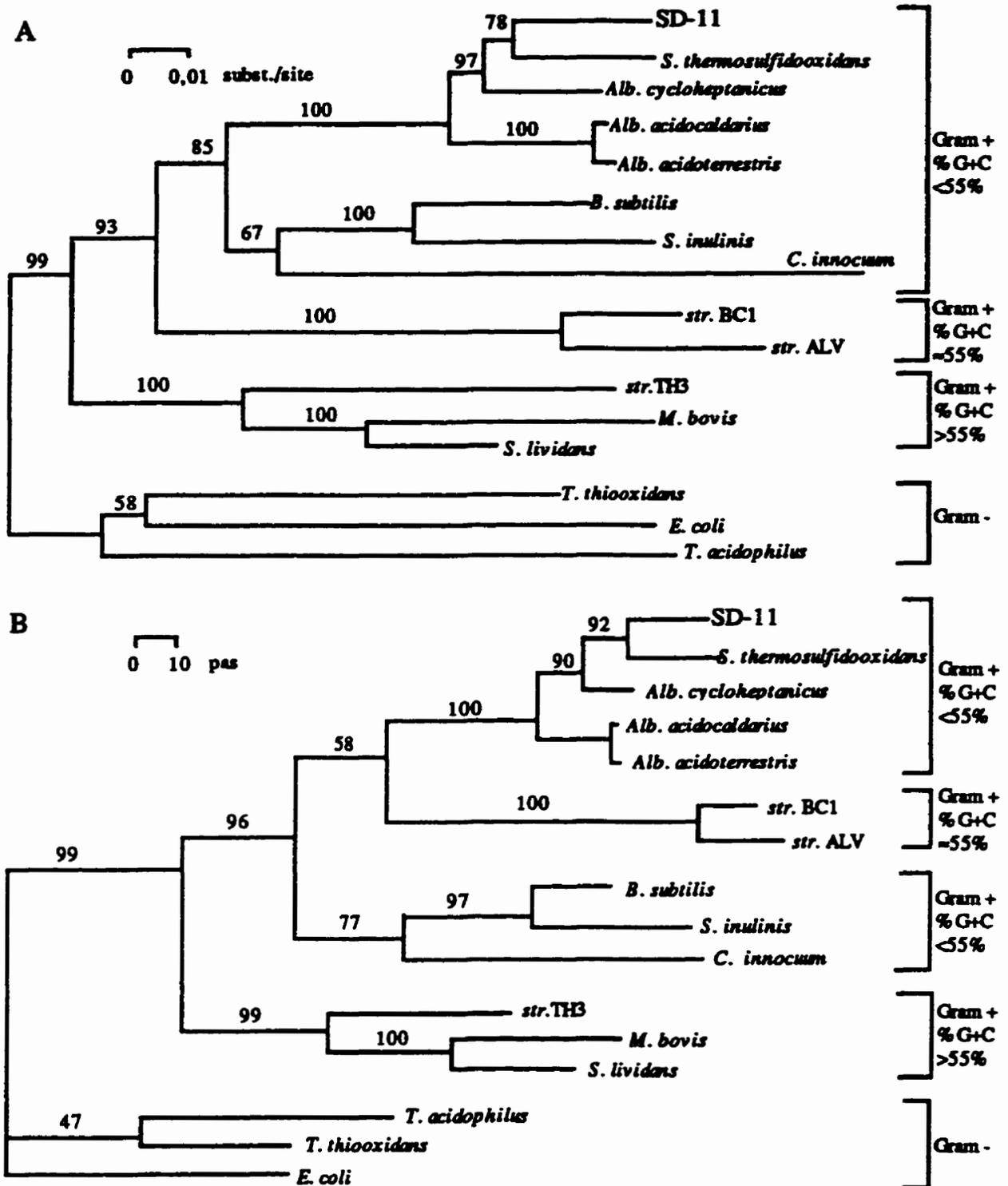


Figure 6.2 Position phylogénétique de l'isolat SD-11 parmi les bactéries gram-positives basée sur l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S. (A) parcimonie, (B) neighbor-joining. Les nombres sur les branches indiquent les valeurs obtenues lors de l'analyse du ré-échantillonnage à partir de 100 répliques. Pour les noms au complet, se référer au Tableau 6.1

6.3 Caractérisation des acides gras membranaires du *Sulfobacillus* sp. SD-11.

Le genre *Alicyclobacillus* a été créé pour tenir compte de la singularité de trois espèces du genre *Bacillus* qui possédaient des lipides membranaires particulier : des acides gras ω -cycliques (Wisotzkey et al., 1992). Une analyse des acides gras membranaires du *Sulfobacillus* SD-11 a été effectuée pour vérifier la présence de ce caractère chez cet isolat.

L'analyse sommaire des acides gras membranaires du *Sulfobacillus* sp. SD-11 par chromatographie en phase gazeuse a démontré la présence d'acide gras linéaires, ramifiés iso (i) et anteiso (a), et cycliques (Figure 6.3). Les acides gras aC₁₅ (4,753), iC₁₆ (5,703), C₁₆ (6,317), iC₁₇ (7,017), aC₁₇ (7,265), ω -cyclique C₁₇ (10,305) et ω -cyclique C₁₉ (13,475) ont été identifiés par comparaison avec le chromatogramme en phase gazeuse des acides gras isolés de *Curtobacterium pusillum* (Suzuki et al., 1981). Cependant, trois acides gras correspondant aux pics possédant les temps de rétention 8,565, 10,438 et 16, 225 min. n'ont pu être identifiés.

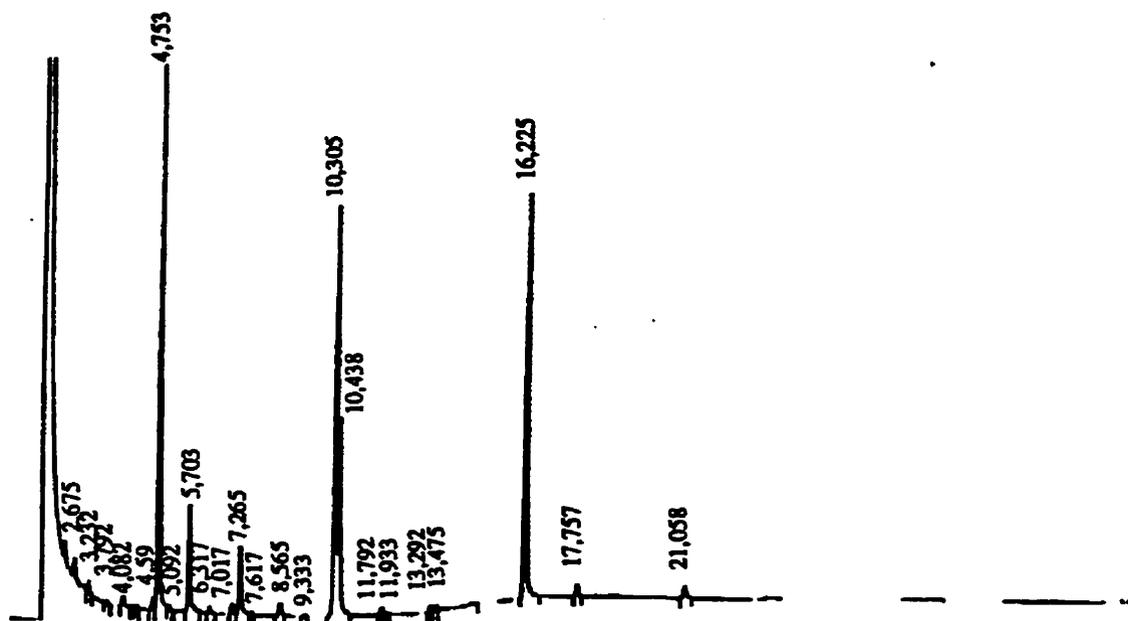


Figure 6.3 Chromatographie en phase gazeuse d'un extrait lipidique du *Sulfobacillus* sp. SD-11 (les chiffres indiquent les temps de rétention des acides gras en min).

Ces trois acides gras inconnus ainsi que le nombre d'atomes de carbone composant le cycle des acides ω -cycliques ont été identifiés lors d'une deuxième séparation des acides gras en chromatographie en phase gazeuse liée cette fois à un spectromètre de masse (un GC-MS) (Figure 6.4).

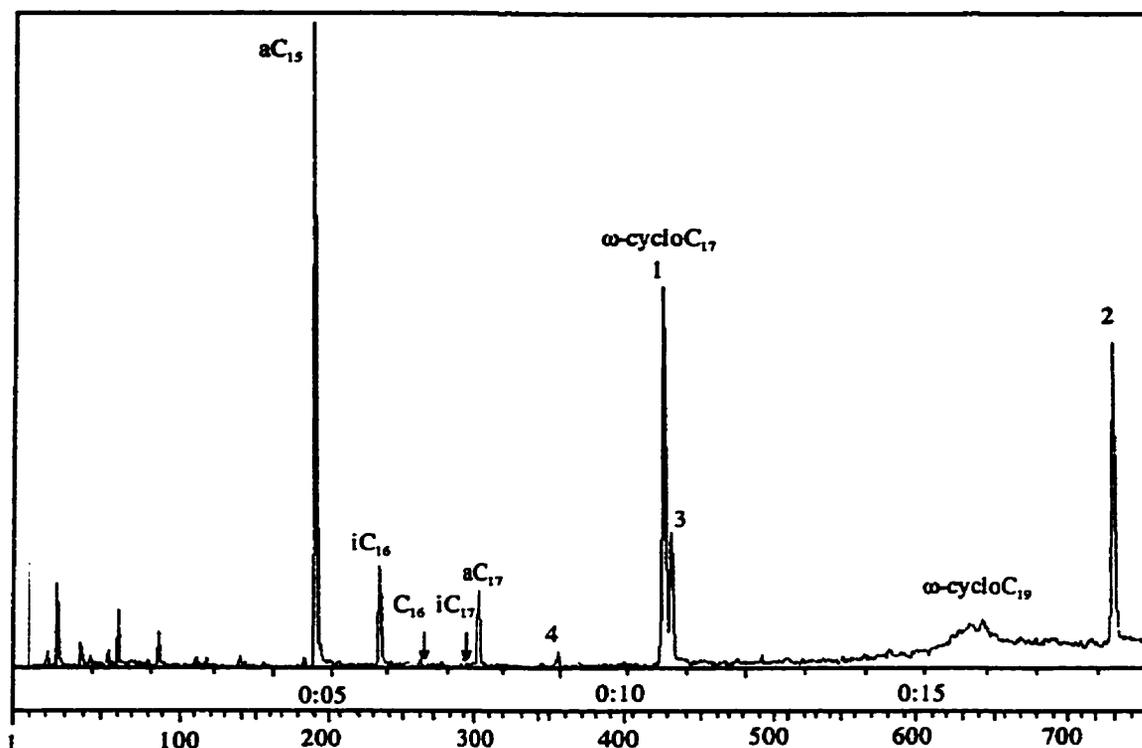


Figure 6.4 Chromatographie en phase gazeuse d'un extrait lipidique du *Sulfolobacillus* sp. SD-11. Les chiffres (1 à 4) indiquent les pics correspondant aux acides gras inconnus.

Le spectre de masse de la Figure 6.5 A a permis d'identifier le cycle de l'acide gras ω -cyclique (pic 1, position 430 sur le chromatogramme) comme un cyclohexane, puisque que les fragments d'ions à 83, 69, 55 et 41 m/z donnait une évidence de la fragmentation d'un anneau cyclohexyle. De plus, le fragment 282 m/z qui donnait le poids moléculaire de la molécule ainsi que les autres fragments étaient identiques à ceux retrouvés pour l'acide ω -cyclohexyle-undécanoïque (ω -cyclohexane C_{17}) décrits par Suzuki *et al.* (1981). Pour ce qui du spectre de masse correspondant au pic 2 (position 732-735) (Figure 6.5 B), le fragment retrouvé à 74 m/z a été déplacé jusqu'à 90 m/z . Cette différence de 16 m/z était caractéristique de la présence d'un groupement OH comme pour l'acide ω -cycloheptyle- α -hydroxyundécanoïque (Allgaier *et al.*, 1985; Poralla et König, 1983). Le dernier fragment obtenu lors de la chromatographie en phase gazeuse représentant le fragment du poids moléculaire ($298 = 282 + 16 = \omega$ -cyclohexyle-undécanoïque + OH) appuyait l'identification de cet acide gras comme l'acide ω -cyclohexyle- α -hydroxyundécanoïque (ω -cyclohexane- α -OH- C_{17}). De plus, la présence du groupement OH a été confirmé lors d'une troisième chromatographie (GC-MS) réalisée sur un extrait lipidique dont les groupements OH avaient été préalablement traités par silylation (ajout d'un groupement $Si(CH_3)_3$) résultant en une molécule plus hydrophobe et d'un poids moléculaire plus élevé (370).

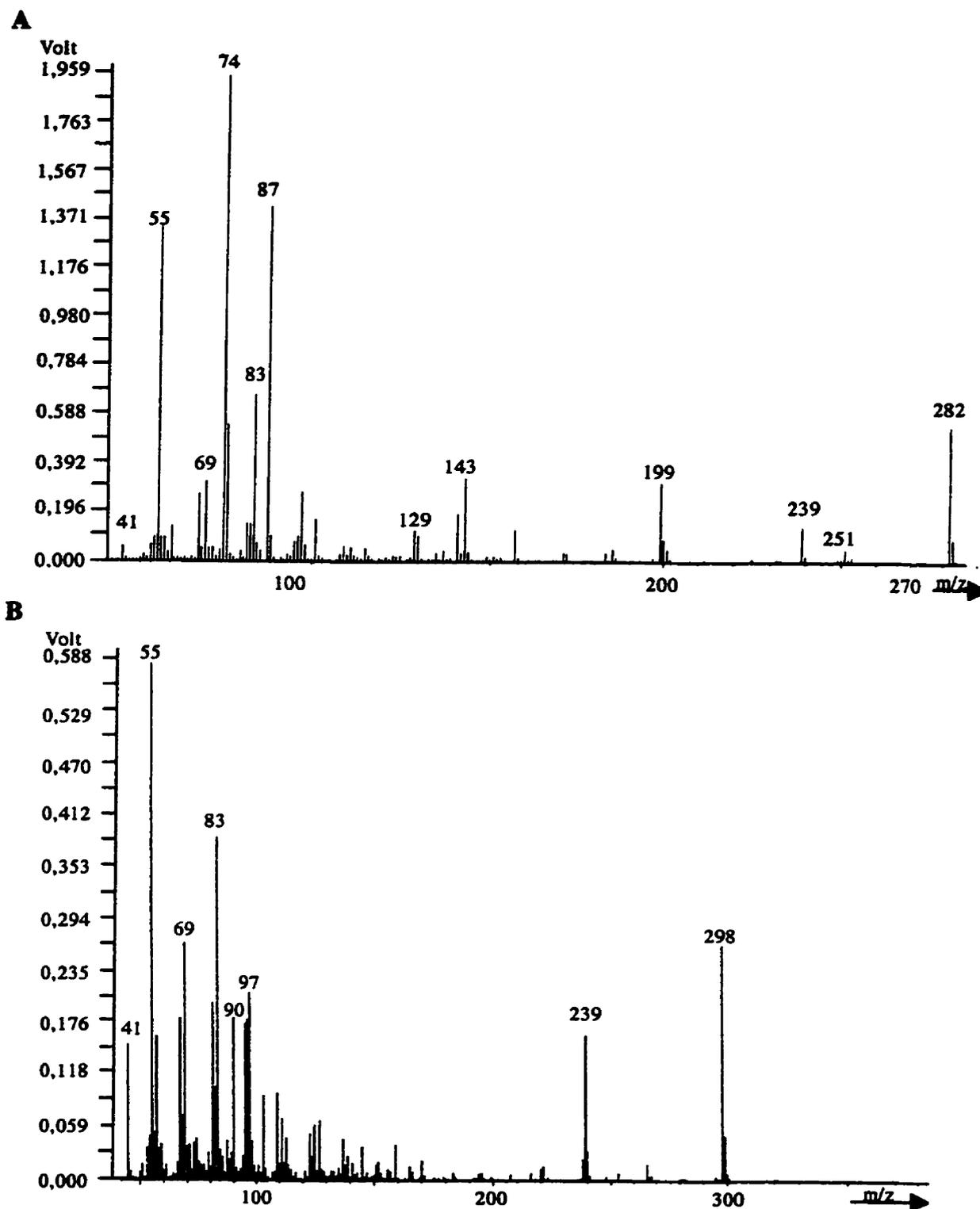


Figure 6.5 Spectres de masse des acides gras membranaires ω -cycliques retrouvés chez *Sulfobacillus* sp. SD-11 : (A) l'acide ω -cyclohexane-C₁₇, (B) l'acide ω -cyclohexane- α -OH-C₁₇

L'acide ω -cyclique C_{19} contenait aussi un anneau cyclohexyle, il a donc été identifié comme l'acide ω -cyclohexane- C_{19} . Le produit correspondant au pic 3 du chromatogramme (position 435) a été identifié comme étant l'acide ω -cyclohexyle- α -hydroxynonanoïque (ω -cyclohexane- α -OH- C_{15}), puisque les fragments caractéristiques de l'anneau cyclohexyle ainsi que celui du groupement hydroxyle ont été retrouvés dans son spectre de masse (Figure 6.6). Le produit correspondant au pic 4 n'a pas été identifié; il pourrait s'agir d'acide gras C_{18} à C_{24} linéaire ou ramifié, contenant peut-être un groupement méthyle ou hydroxyle.

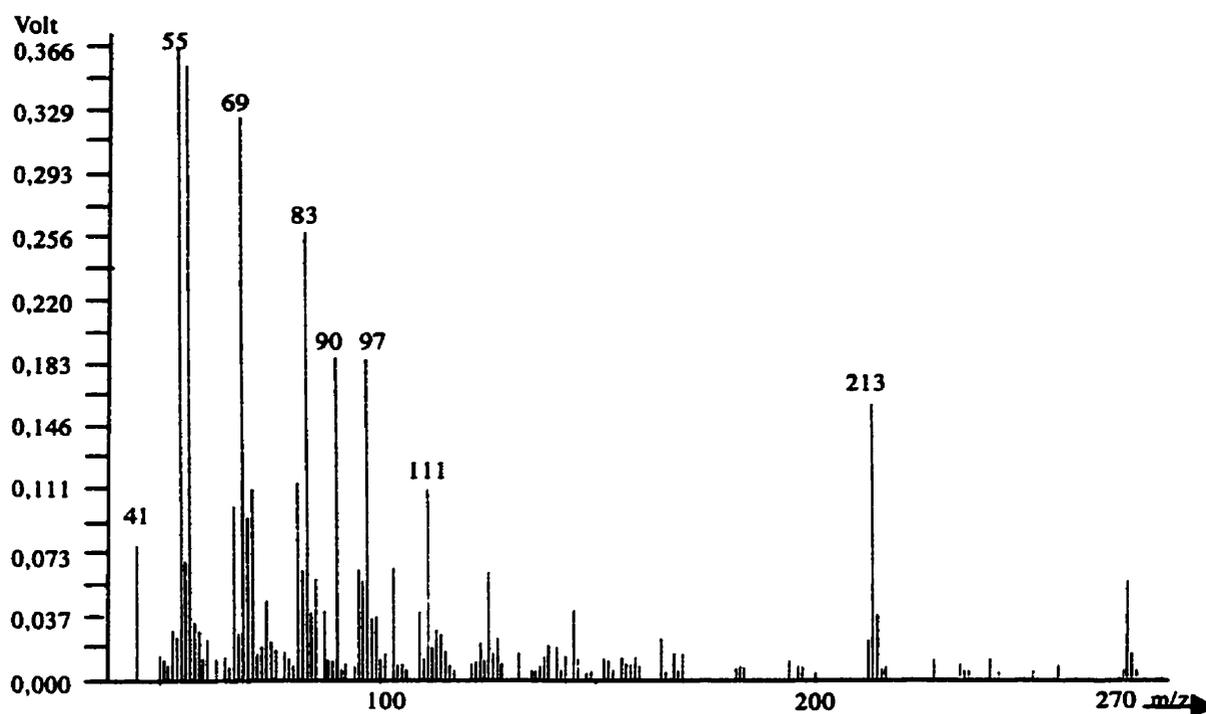


Figure 6.6 Spectre de masse de l'acide gras membranaire ω -cyclohexane- α -OH- C_{15} retrouvé chez *Sulfobacillus* sp. SD-11

Même si aucune analyse quantitative n'a été effectuée lors de l'analyse des acides gras du *Sulfobacillus* sp. SD-11, l'acide gras αC_{15} était l'acide gras majoritaire suivi de l' ω -cyclohexane C_{17} en quantité égale avec l' ω -cyclohexane- α -OH- C_{17} , suivi de l' ω -cyclohexane- α -OH- C_{15} .

6.4 Propriétés biochimiques

Le *Sulfobacillus* sp. SD-6 était catalase positive, mais oxydase négative. Les *Sulfobacillus* sp. SD-6 et/ou SD-11 ainsi que l'isolat SD-9 ne produisaient pas de H₂S à partir du thiosulfate ni de la cystéine.

6.5 Caractérisation physiologique

La physiologie des *Sulfobacillus* sp. est complexe. Elle est influencée par plusieurs conditions physico-chimiques de son environnement comme la concentration d'extrait de levure, les types de sources d'énergie et de carbone, la densité de l'inoculum, et par la présence des autres partenaires du consortium. De plus, il est très difficile d'étudier ces paramètres de manière isolée, car ils sont très intimement reliés les uns aux autres.

Pour commencer, les intervalles de pH et de température de croissance ont été évalués pour les *Sulfobacillus* sp. Par la suite, les sources énergétiques ont été déterminées. Pour ce faire, en plus des méthodes traditionnelles, la grille API 50 CH a été utilisée pour étudier l'utilisation des glucides. Et finalement, une étude plus détaillée du métabolisme du carbone et du soufre a été réalisée.

Pour l'étude détaillée de la physiologie des *Sulfobacillus* sp., nous avons utilisé les *Sulfobacillus* sp. SD-11 et SD-6. L'utilisation du *Sulfobacillus* sp. SD-6 est devenue nécessaire à partir du moment où nous avons obtenu la confirmation que nos sous-cultures du *Sulfobacillus* sp. SD-11 avaient été contaminées (voir Chapitre 5). Cependant, nous avons utilisé les résultats de certains essais effectués avec le *Sulfobacillus* sp. SD-11 préalablement à cette contamination. De plus, comme démontré aux sections 6.1 et 6.2, les *Sulfobacillus* sp. SD-11 et SD-6 possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques et phylogénétiques.

Puisque la culture mixte contenant le *Sulfobacillus* sp. SD-6 et l'isolat SD-9 avait été utilisée pour les essais de fixation du ¹⁴CO₂, nous avons réalisé des expériences avec cette culture parallèlement à celles réalisées avec la culture pure du *Sulfobacillus* sp. SD-6 pour nous permettre de mieux caractériser l'isolat SD-9.

Par ailleurs, le milieu 9K dilué 1/10 a été utilisé lors des essais qui demandaient un suivi de la concentration des sulfates. Le milieu 9K 1/10 a été choisi parmi tous les milieux expérimentés pauvres en sulfates ou sans sulfates, car il a été celui qui a donné une vitesse de croissance et un rendement cellulaire les plus près de ceux obtenus pour le milieu 9K.

6.5.1 Caractéristiques physiologiques sommaires

Les *Sulfobacillus* sp. étaient mésophiles et acidophiles (voir Tableau 6.2). Ils utilisaient l'extrait de levure comme facteur de croissance. Pour ce qui est des sources de carbone et d'énergie, les *Sulfobacillus* sp. SD-11 et/ou SD-6 ainsi que SD-9 semblaient être capables d'assimiler le CO₂, même s'ils utilisaient aussi des composés organiques comme source de carbone. En outre, ils semblaient aussi utiliser des sources d'énergie inorganique comme le soufre élémentaire. De plus, seul le milieu gélosé FTG pouvait soutenir la croissance des *Sulfobacillus* sp.

Tableau 6.2 Caractéristiques physiologiques des isolats SD-6, SD-9 et SD-11

Caractéristiques	Résultats pour:	
	SD-11 et SD-6	SD-9 ¹
Température		
intervalle de croissance	4-40 °C	n.d.
optimum	35°C	n.d.
pH		
intervalle de croissance	0,5-6,0 ²	0,5-6,0
optimum	1,5-2,5	2,5
Facteur de croissance	extrait de levure	extrait de levure
Croissance dans :		
S ⁰	+	+
Fe ²⁺	-	+
Fe ₂ S	+	n.d.
extrait de levure	+	+
Acétate	-	-
cystamine	+	n.d.
cystéine	+	n.d.
cystine	+	n.d.
DTBT	+	+
DBT	+	+
dibenzyldisulfure	+	n.d.
glucose	+	-
glutamate	+	+
glutathion	+	+
glycérol	f	n.d.
glycine	+	n.d.
thianthrène	+	+
Croissance sur :		
FeTSB	-	-
FTG	+	+
BS4	-	-
BAM	-	-

¹. Résultats déduits à partir des résultats obtenus pour les *Sulfobacillus* sp. SD-6 et SD-11, et la culture mixte contenant l'isolat SD-9

². pH 3,0-6,0, temps génération supérieur à 96 hrs

+ : croissance positive, - : aucune croissance, f : faible croissance, n.d. : non déterminé

6.5.2 Grille API 50CH

La grille API 50 CH a été utilisée avec le *Sulfobacillus* sp. SD-11 dans le but d'établir une comparaison avec les données connues pour les espèces du genre *Alicyclobacillus*. La croissance de l'isolat SD-11 a été évaluée en microscopie photonique, car la densité cellulaire était trop faible pour permettre l'évaluation de la croissance par des mesures de turbidimétrie. La présence ou l'absence de spores, la formation de chaîne ainsi que la longueur de celles-ci sont les paramètres qui ont été utilisés pour évaluer la croissance (- à +++).

Tableau 6.3 Utilisation des hydrates de carbone par le *Sulfobacillus* SD-11 d'après les résultats obtenus en utilisant la grille de culture API 50CH (BioMérieux)

#	Substrat	SD-11 ¹	#	Substrat	SD-11 ¹
0	témoin	-	25	esculine	-
1	glycérol	+	26	saliciline	-
2	érythritol	-	27	cellobiose	+
3	D-arabinose	+	28	maltose	+++
4	L-arabinose	+	29	lactose	-
5	ribose	+	30	mélibiose	+
6	D-xylose	+	31	saccharose	++
7	L-xylose	+	32	tréhalose	-
8	adonitol	+	33	inuline	++
9	β-méthyl-xyloside	-	34	mélézitose	+++
10	galactose	-	35	D-raffinose	+
11	D-glucose	++	36	amidon	++
12	D-fructose	-	37	glycogène	++
13	D-mannose	-	38	xylitol	-
14	L-sorbose	+	39	β-gentiobiose	+
15	rhamnose	-	40	D-turanose	-
16	dulcitol	-	41	D-lyxose	-
17	inositol	-	42	D-tagatose	+
18	mannitol	-	43	D-fucose	+
19	sorbitol	+	44	L-fucose	-
20	méthyl-D-mannoside	+	45	D-arabitol	+
21	méthyl-D-glucoside	+	46	L-arabitol	++
22	N-acétyl-glucosamine	++	47	gluconate	+
23	amygdaline	+++	48	2-céto-gluconate	+
24	arbutine	-	49	5-céto-gluconate	+

¹. La croissance a été évaluée selon les critères d'observation suivant pour le *Sulfobacillus* sp. SD-11:

- chaîne très pâle ou cellules sporulées seulement.
- + une cellule plus foncée dans une chaîne ou encore des cellules foncées 2 x 2
- ++ plusieurs petites chaînes de longues cellules foncées
- +++ plusieurs petites chaînes de courtes cellules foncées (division rapide)

6.5.3 Sentiers métaboliques

Lors de l'étude phylogénétique (voir 6.2), nous avons soulevé plusieurs des différences qui existent entre le genre *Sulfobacillus* et les espèces du genre qui lui sont le plus apparentées au niveau phylogénétique, les *Alicyclobacillus* sp. L'analyse des enzymes clés des principaux sentiers métaboliques a permis de déterminer les sentiers utilisés par le *Sulfobacillus* sp. SD-11 (Tableau 6.4) et de soulever d'autres différences existantes entre les *Sulfobacillus* sp. et *Alb. cycloheptanicus*.

Tableau 6.4 Enzymes clés de différents sentiers métaboliques retrouvées dans les extraits cellulaires du *Sulfobacillus* sp. SD-11 et d'*Alb. cycloheptanicus*

Enzyme	<i>S. disulfidooxidans</i> SD-11	<i>Alicyclobacillus</i> <i>cycloheptanicus</i> ATCC 49028
Malate déshydrogénase (TCA) (NAD)	0,41 ¹	0,36
Isocitrate déshydrogénase (TCA) (NADP)	0,50	0,55
6-P-gluconate déshydrogénase (HMP) (NAD)	0,67	0,82
6-P-gluconate déshydrogénase (HMP) (NADP)	- ²	-
Glucose-6-P déshydrogénase (HMP et ED) (NADP)	+	+
α -cétoglutarate déshydrogénase (TCA)	+	n.d.
Glutamate déshydrogénase	+	+
Hexokinase	+	n.d.
6-phosphofructokinase (EMP)	-	-
Fructose-1,6-diphosphate aldolase (EMP)	+	-
Malate synthase (cycle du glyoxylate)	-	+
Citrate synthase (TCA)	+	+

¹. Rf d'une enzyme spécifique après électrophorèse d'extraits cellulaires sur gel d'amidon

². Présence ou absence de l'enzyme à partir d'expérimentation en microplaques

Une activité enzymatique a été identifiée pour les enzymes suivantes du sentier HMP (Hexose MonoPhosphate) : glucose 6-P déshydrogénase et 6-P-gluconate déshydrogénase. De plus, la 6-phosphogluconate déshydrogénase du *Sulfobacillus* sp. SD-11 utilisait seulement le NAD⁺ comme cofacteur, car aucune activité n'a été notée lors de sa substitution par le NADP⁺. Par ailleurs, quelques enzymes du sentier EMP (Embden-Meyerof-Parnas) ont été retrouvées dans les extraits cellulaires du *Sulfobacillus* sp. SD-11, malgré que leur activité ait été à peine notable en croissance en présence de substrats carbonés et encore moins sur le soufre. De plus,

aucune activité de la phosphofructokinase n'a été observée. De même, les enzymes du cycle du citrate (TCA) ont été retrouvées alors que celles du cycle du glyoxylate n'ont pas été détectées.

L'électrophorèse sur gel d'amidon a été utilisée pour comparer les zymogrammes des *Sulfobacillus* sp. à celle d'*Alb. cycloheptanicus*. Les Rf des enzymes du *Sulfobacillus* sp. SD-11 et d'*Alb. cycloheptanicus*, obtenus à partir d'extraits enzymatiques que nous avons préparés, ne correspondaient pas.

6.5.4 Influence de l'extrait de levure

Le rôle joué par l'extrait de levure lors de la croissance des *Sulfobacillus* sp. est le premier facteur à éclaircir pour comprendre leur métabolisme. Est-ce qu'il fournit un ou plusieurs facteurs de croissance ? Sert-il de source de carbone organique ? Et/ou peut-il être utilisé comme source d'énergie ?

6.5.4.1 Sur la croissance du *Sulfobacillus* sp. SD-6

À première vue, l'extrait de levure devait fournir des facteurs de croissance, puisque aucune croissance n'a été observée en son absence, peu importe les conditions de culture utilisées. De plus, il n'a pu être remplacé par des solutions de vitamines, d'acides aminés, de purines et pyrimidines, et/ou de métaux en trace. Une concentration finale d'extrait de levure de 0,001 % (P/V) dans le milieu de culture était suffisante pour soutenir la croissance du *Sulfobacillus* sp. SD-6 en présence d'une autre source d'énergie et/ou de carbone (Figure 6.7 A). Néanmoins, le rendement cellulaire était de beaucoup inférieur à celui obtenu lorsque la concentration d'extrait de levure était de 0,01 % (P/V) (Figure 6.7 B). La différence dans la biomasse cellulaire a surtout été marquée pour la croissance en présence de glucose : environ 7 fois plus de biomasse cellulaire au niveau de la phase stationnaire de la courbe de croissance en présence de 0,01 % extrait de levure que de 0,001 %. Par contre, lorsque les cellules se sont développées en présence de soufre, l'augmentation de la concentration d'extrait de levure n'a pratiquement pas modifié le rendement. Deuxièmement, l'extrait de levure a probablement servi de source de carbone. À une concentration de 0,01 %, il a permis à lui seul la croissance de *Sulfobacillus* sp. SD-6 (Figure 6.7 B).

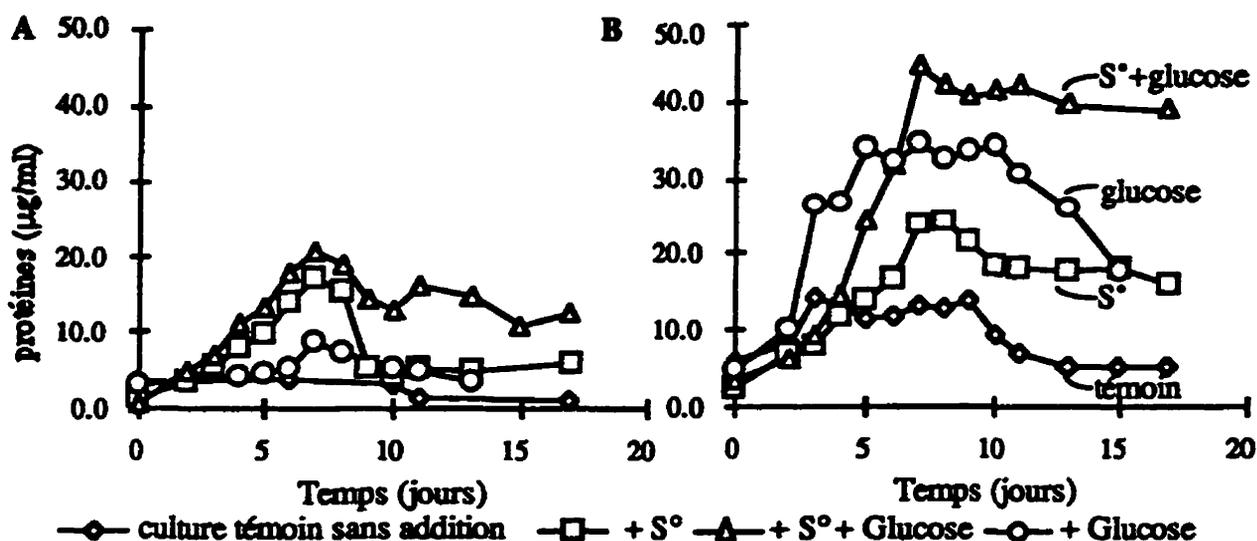


Figure 6.7 Influence de l'extrait de levure sur le rendement cellulaire lors de la croissance de *Sulfobacillus sp. SD-6* dans le milieu 9K 1/10-EL pH 2,5. (A) ajout de EL (0,001 %), (B) ajout de EL (0,01 %).

Troisièmement, l'extrait de levure a probablement agi comme source d'énergie, car il y a eu production de sulfates même en absence de soufre élémentaire (Figure 6.8). La présence de composés soufrés oxydables (0,634 % de soufre, 0,74 % de cystine et 1,05 % de méthionine) dans l'extrait de levure appuyait cette observation. Cependant, la concentration des sulfates produits était trop élevée selon nos résultats par rapport à la concentration des atomes de soufre oxydables de l'extrait de levure. Il y avait environ 4 µg d'atomes de soufre, retrouvés sous forme de soufre et d'acides aminés soufrés, par ml de milieu; alors qu'il y a eu plus de 30 µg de sulfates produits par ml, ce qui équivalait à 10 µg d'atomes de soufre oxydés. Cette valeur équivalait à une augmentation de 10 % de la concentration des sulfates du milieu de culture, car il contenait au départ environ 450 µg de sulfates / ml. Comme cette valeur de la concentration des sulfates du milieu de départ a été soustraite des données obtenues, la valeur obtenue pour la concentration des sulfates produits semblait donc significative. Il faut toutefois tenir compte de l'évaporation qui n'a pas été compensée et considérer la méthode analytique employée pour doser les sulfates. Une différence de ± 5 µg de sulfates dans un échantillon de 200 µl (équivalent à 25 µg de sulfates / ml) amenait un changement de la densité optique de 0,01 unité d'absorbance. La concentration des sulfates dans l'eau distillée utilisée pouvait, à elle seule, faire varier de 0,02 unité d'absorbance la densité optique d'un standard contenant 1 ml d'une solution standard de 100 µg de sulfates / ml et 4 ml d'eau distillée. En se basant sur ces faits, nous avons considéré non significative toute production de sulfates inférieure à 0,05 mg/ml comme le démontrent les barres d'écart-types à la Figure 6.8.

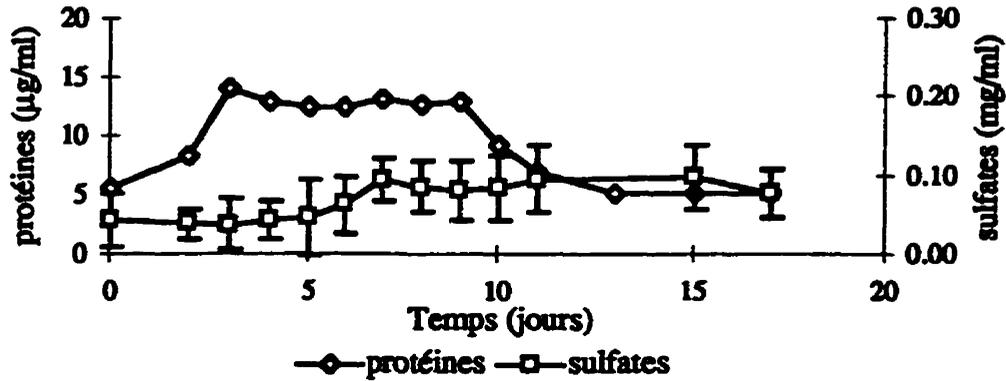


Figure 6.8 Production des sulfates et des protéines lors de la croissance *Sulfobacillus* sp. SD-6 dans le milieu 9K 1/10-EL (0,01 %) pH 2,5 sans substrat ajouté.

6.5.4.2 Sur le métabolisme de la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. (SD-6 + SD-9)

La culture mixte est constituée de deux espèces du même genre bactérien selon les résultats des analyses morphologiques, biochimiques et phylogénétiques. Le métabolisme des deux espèces devrait donc être similaire. Mais l'extrait de levure joue-t-il les mêmes rôles pour la culture mixte constituée du *Sulfobacillus* sp. SD-6 et de l'isolat SD-9 que pour la culture pure du *Sulfobacillus* sp. SD-6?

Comme pour *Sulfobacillus* sp. SD-6, une concentration de 0,01 % d'extrait de levure a soutenu la croissance de la culture mixte (Figure 6.9). Cependant, la durée de la phase stationnaire était plus courte dans le cas de la culture mixte.

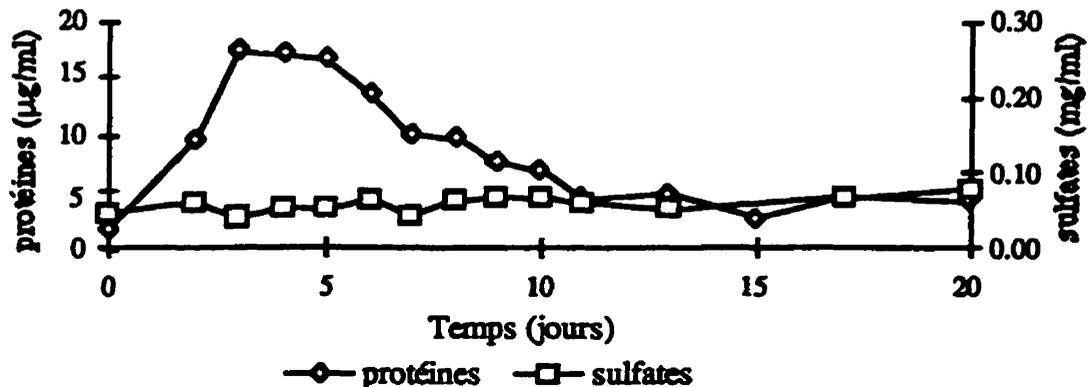


Figure 6.9 Production des sulfates et des protéines lors de la croissance de la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. dans le milieu 9K 1/10-EL (0,01 %) pH 2,5 sans substrat ajouté.

Contrairement à la culture pure du *Sulfobacillus* sp. SD-6 (et SD-11), la culture mixte pouvait se développer dans le milieu 9K pH 2,2 si une solution de vitamines était ajoutée en présence de soufre et de glucose, ou de glucose, mais pas en présence de soufre seulement (Tableau 6.5). De plus, l'ajout d'une solution d'acides aminés en plus de la solution de vitamines comme supplément d'éléments nutritifs a permis la croissance de la culture mixte en présence de soufre. Par ailleurs, la croissance dans un milieu contenant 0,001 % EL a donné un meilleur rendement en présence de la solution de vitamines qu'en son absence, pourtant il était inférieur à celui obtenu avec 0,01 % EL (Tableau 6.5). De plus, la solution de métaux en trace a eu un effet inhibiteur sur la croissance de la culture mixte.

Tableau 6.5 Croissance de la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. (SD-6 + SD-9) dans le milieu 9K pH 2,2 contenant différents facteurs de croissance

Facteurs de croissance ¹	Substrats		
	Soufre	Soufre + Glucose	Glucose
Aucun	-	-	-
Extrait de levure (0,01 %)	++	++++	+++
Extrait de levure (0,001 %)	+	++	+
Extrait de levure (0,001 %) + Vitamines	+	+++	+
Vitamines	-	++	+
Acides aminés	-	-	-
Métaux	-	-	-
Vitamines + Acides aminés	+	++	+
Vitamines + Métaux	-	-	-
Acides aminés + Métaux	-	-	-
Vitamine + Acides aminés + Métaux	+	+	++

¹. Solution de vitamines et solution de métaux en trace (Annexe B); solution d'acides aminés (hydrolyse acide de la caséine 0,01 %).

Turbidité: - à ++++

6.5.5 Utilisation des composés carbonés organiques

Après avoir étudié l'effet de l'ajout de l'extrait de levure sur la croissance du *Sulfobacillus* sp. SD-6 et de la culture mixte des *Sulfobacillus* sp., nous avons poursuivi l'étude du métabolisme en étudiant l'utilisation des composés carbonés organiques.

6.5.5.1 Par le *Sulfobacillus* sp. SD-6

Comme l'extrait de levure avait plusieurs effets sur le métabolisme du *Sulfobacillus* sp. SD-6, le milieu de base 9K1/10-EL 0,001 % a été utilisé pour étudier le métabolisme du carbone et du soufre. Cette concentration d'extrait de levure ne permettant pas la multiplication des *Sulfobacillus* sp. (Figure 6.10 A), il est plus facile d'analyser l'effet sur la croissance de l'ajout d'une source d'énergie (soufre), d'une source de carbone (glucose) ou des deux en même temps.

Lors de l'addition du glucose au milieu de culture, une faible augmentation de la biomasse cellulaire a été notée (Figure 6.10 B) bien qu'il n'y ait eu qu'une faible concentration de ce substrat carboné utilisé. Il semblait y avoir une faible production de sulfates qui pourrait correspondre à l'utilisation du glucose. Cependant, tel que présenté à la Figure 6.8, cette production était trop faible. Par ailleurs, les courbes d'utilisation du glucose en présence ou absence de soufre étaient sensiblement les mêmes (Figure 6.10 B et C).

Contrairement à la culture sur le soufre ou le glucose, la phase stationnaire de la courbe de croissance du *Sulfobacillus* sp. SD-6 en présence d'une source de carbone organique (glucose) et d'une source d'énergie (soufre) (Figure 6.10 C) s'était maintenue. De plus, il y a eu production de sulfates durant les 15 jours de suivi des cultures.

Pour la culture en présence de soufre (Figure 6.10 D), l'extrait de levure fournissait des facteurs de croissance. Il servirait aussi de source de carbone tel qu'observé précédemment (section 6.5.4, p.102), car l'apparition des sulfates ne correspondait pas à la production de la biomasse cellulaire. La production des sulfates était très faible et elle s'était arrêtée en même temps que la phase exponentielle de croissance. De plus, la biomasse obtenue en présence de soufre était plus élevée qu'en présence du glucose.

Cependant, le moment de l'arrêt de la phase de croissance exponentielle (Figure 6.10 repère a) était le même pour toutes les cultures. L'épuisement du ou des facteurs de croissance fournis par l'extrait de levure ou une inhibition causée par l'excrétion de certains métabolites pourrait expliquer l'arrêt subit de la croissance. Il pourrait aussi s'agir d'un manque d'énergie pour alimenter le transport actif du glucose ou pour la fixation du CO₂.

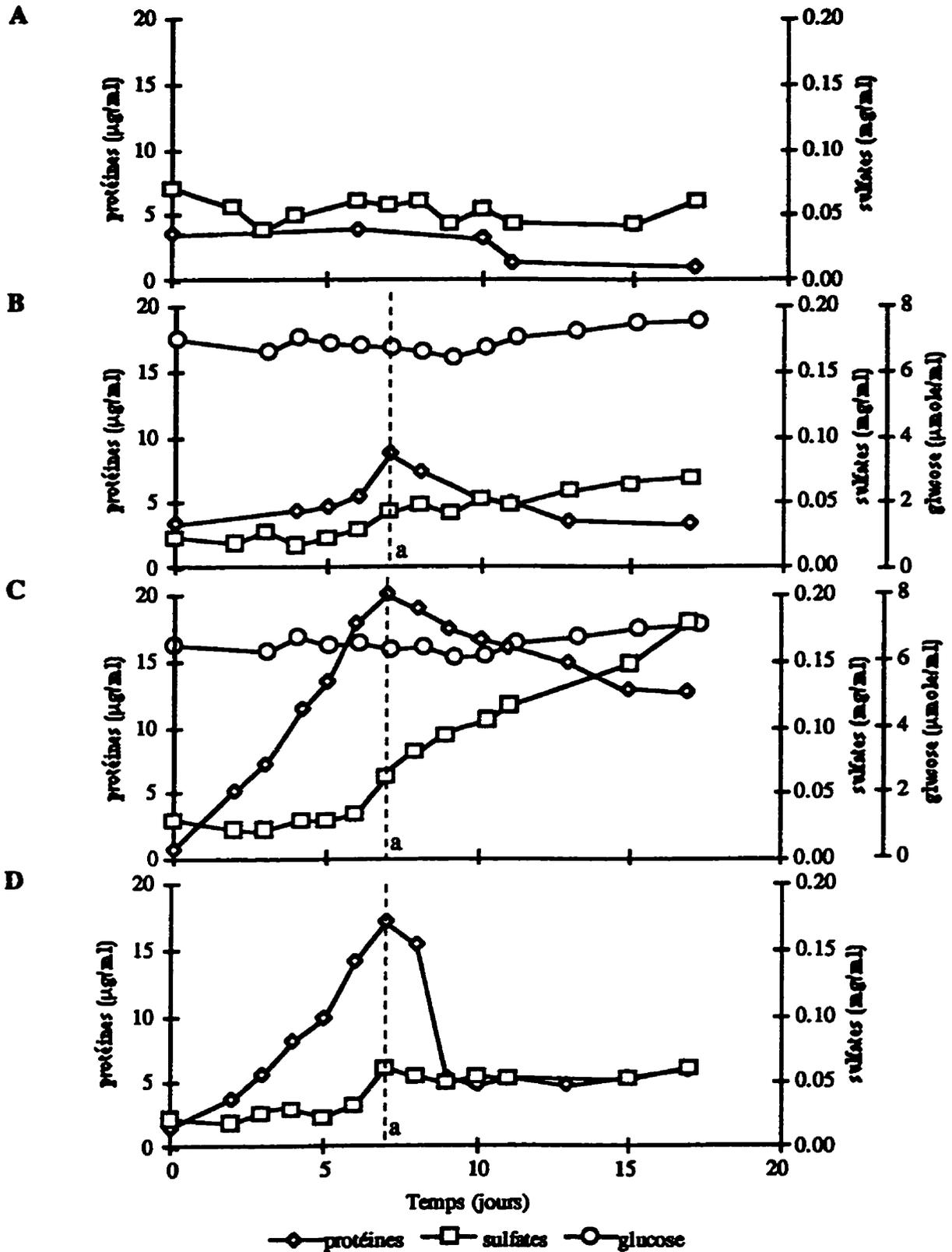


Figure 6.10 Croissance du *Sulfobacillus* sp. SD-6 dans le milieu 9K 1/10-EL 0,001 % pH 2,5. (A) culture témoin sans addition, (B) addition de glucose (1 g/L), (C) addition de glucose (1 g/L) et de soufre (1 g/L), (D) addition de soufre (1 g/L).

Une deuxième expérience a été effectuée dans le même milieu en utilisant, cette fois, une concentration d'extrait de levure optimale pour la croissance du *Sulfobacillus* sp. SD-6 (0,01 % au lieu de 0,001 %). Lors de cette expérience, une phase stationnaire de croissance a été observée pour toutes les cultures même pour celle sans substrat (Figure 6.11 A). Toutefois, contrairement aux cultures effectuées en présence de 0,001 % EL, la fin de la phase exponentielle de la courbe de croissance n'a pas été atteinte au même moment pour les quatre conditions de croissance utilisées.

L'observation de la croissance en présence de glucose (Figure 6.11 B) ne permettait pas de déterminer si la phase de décroissance de la courbe de croissance a été causé par un manque d'énergie ou par l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. Toutefois, la source d'énergie n'était pas épuisée à la fin de la phase stationnaire pour la croissance en présence de soufre et de glucose (Figure 6.11 C). Alors, il est toujours possible que l'arrêt de la croissance ait été causé par l'accumulation de métabolites. Cependant, la concentration de glucose utilisé dans ces conditions était inférieure à celle utilisée en absence de soufre.

L'augmentation de la concentration de l'extrait de levure a rendu plus évidente l'oxydation du soufre par le *Sulfobacillus* sp. SD-6 (Figure 6.11 D). Contrairement à la production non significative de sulfates observée en présence de 0,001 % EL, la concentration des sulfates produits a dépassé les 0,05 mg de sulfates / ml de milieux.

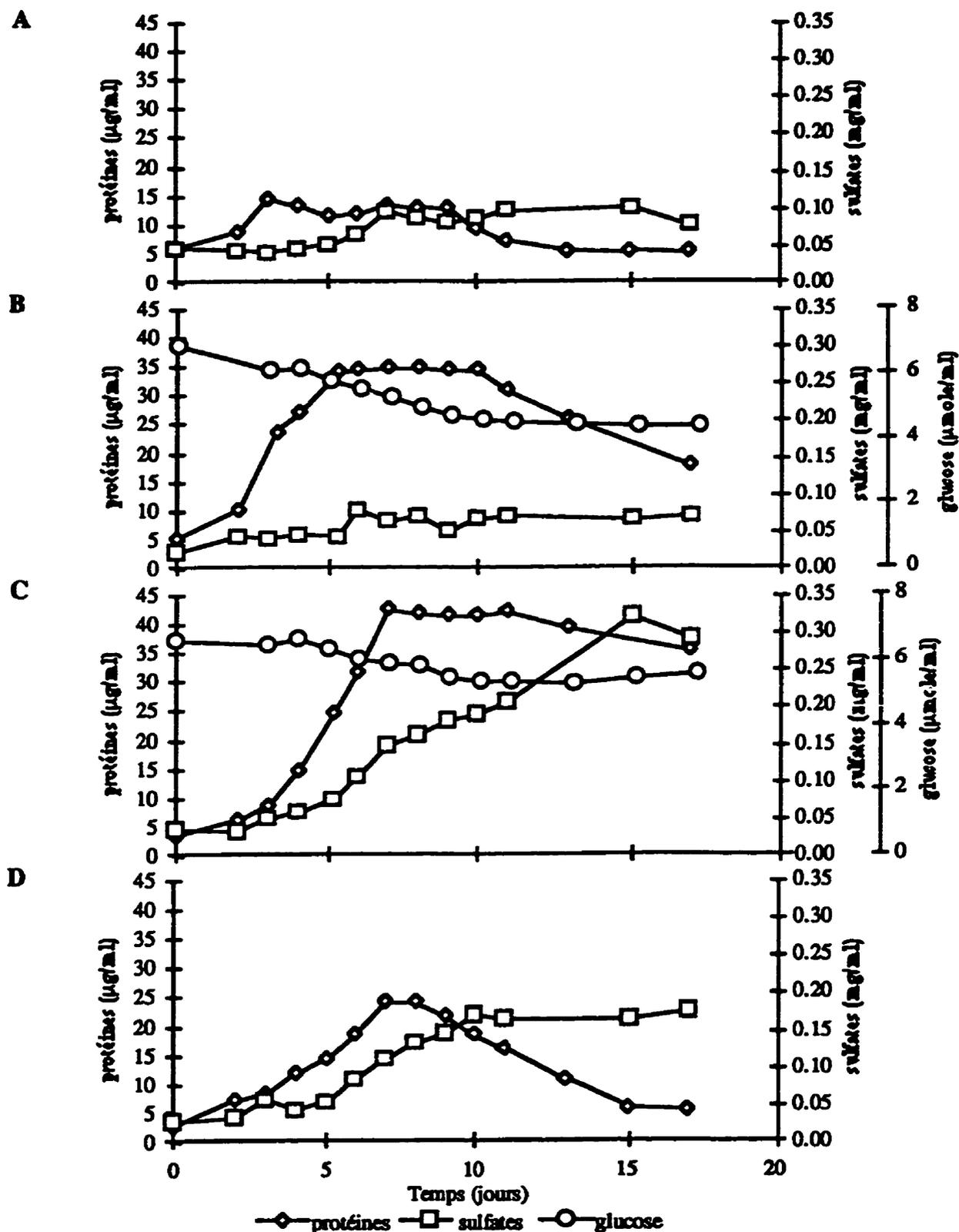


Figure 6.11 Croissance du *Sulfolobus* sp. SD-6 dans le milieu 9K 1/10-EL 0,01 % pH 2,5. (A) culture témoin sans addition, (B) addition de glucose (1 g/L), (C) addition de glucose (1 g/L) et de soufre (1 g/L), (D) addition de soufre (1 g/L).

6.5.5.2 Par la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. SD-6 et SD-9

Nous avons débuté l'étude du métabolisme du carbone des *Sulfobacillus* sp. par celui du *Sulfobacillus* sp. SD-6 pour ensuite tenter de déduire le fonctionnement de celui de l'isolat SD-9 à partir des résultats de la culture mixte et de ceux obtenus pour la culture pure du *Sulfobacillus* sp. SD-6. Est-ce que la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. suit les règles établies pour le *Sulfobacillus* sp. SD-6? Comme les deux espèces font partie du même genre bactérien, elles possèdent assurément des propriétés physiologiques communes. De plus, l'extrait de levure semblait influencer la croissance de ces deux espèces de façon similaire. Cependant, comme il nous a été impossible d'étudier seulement le comportement de l'isolat SD-9 faute d'en avoir réalisé une culture pure, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses dans son cas.

Deux différences ont été notées lors de la croissance de la culture mixte dans le milieu 9K 1/10 contenant 0,001 % d'extrait de levure par rapport à la culture pure (Figure 6.12 A et B). Premièrement, la phase stationnaire de la courbe de croissance de la culture mixte a été atteinte plus rapidement que celle de la culture pure du *Sulfobacillus* sp. SD-6. Une différence dans la densité de l'inoculum ou un temps de génération plus court pour l'isolat SD-9 pourrait expliquer ce phénomène, ou plus simplement, l'addition de la biomasse cellulaire des deux espèces. Deuxièmement, la biomasse cellulaire a été plus élevée et la phase de déclin a été ralentie pour la culture mixte en croissance en présence de glucose. Cependant, en présence de 0,001 % EL, les courbes d'utilisation du glucose et de production des sulfates étaient identiques à celles obtenues pour la culture pure.

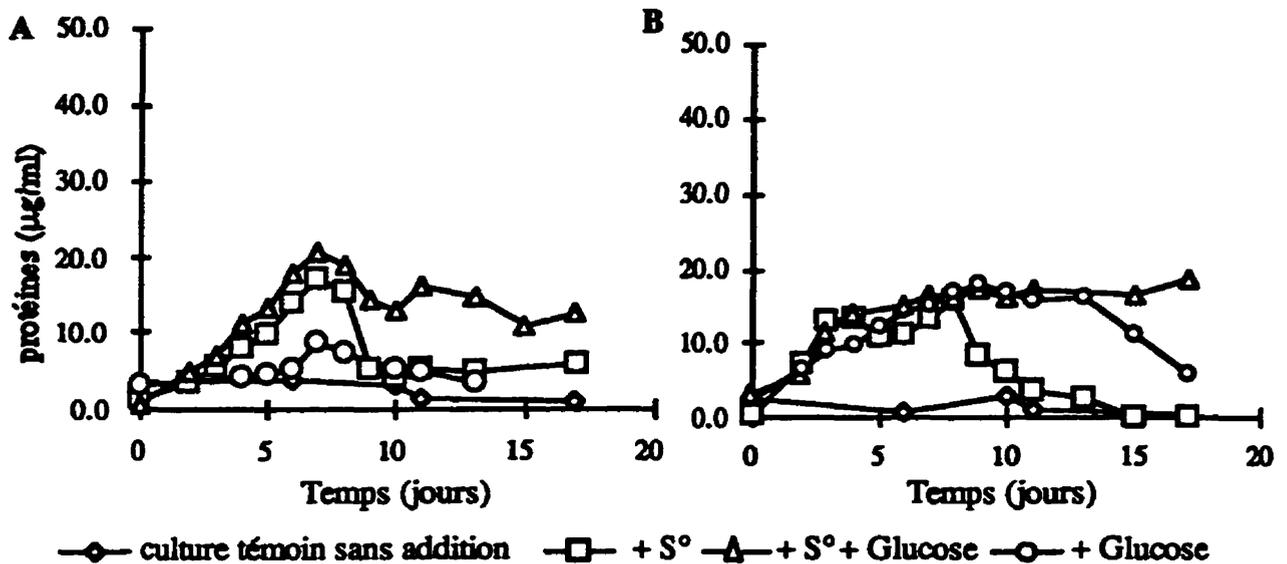


Figure 6.12 Rendement cellulaires lors de la croissance des *Sulfobacillus* sp. dans le milieu 9K 1/10-EL (0,001 %) pH 2,5. (A) culture pure du *Sulfobacillus* sp. SD-6 (B) culture mixte des *Sulfobacillus* sp. (SD-6 + SD-9).

Pour essayer d'amplifier les différences entre les deux espèces, nous avons utilisé une concentration plus élevée d'extrait de levure (0,01 %). Selon les résultats présentés à la Figure 6.13 A, la culture mixte s'est comportée de la même manière que la culture pure dans le milieu ne contenant pas d'autres sources d'énergie et de carbone que l'extrait de levure. Dans ces conditions, la production cellulaire et celle des sulfates étaient équivalentes. En présence de glucose (Figure 6.13 B), la culture mixte a utilisé sensiblement la même concentration de glucose que la culture pure. Cependant, la production cellulaire a comporté deux étapes : après le début de la première phase décroissante, une deuxième phase exponentielle est apparue. Les plus grandes différences entre les deux cultures ont été observées lorsque le soufre et le glucose étaient présents simultanément dans le milieu (Figure 6.13 C). Tout le glucose a été utilisé par la culture mixte, alors que la culture pure n'a utilisé que le dixième du glucose présent (Figure 6.11 C). De même, la production des sulfates a été continue durant toute la période de l'essai. Sur le soufre (Figure 6.13 D), la croissance de la culture mixte était beaucoup plus rapide (comme pour la culture témoin) et la durée de la phase stationnaire était plus longue que celle de la culture pure (Figure 6.11 D). De ce fait, le début de la phase de déclin a été retardé dans le cas de la culture mixte en comparaison avec celui de la culture pure. De plus, l'oxydation du soufre a été décalée par rapport à la production de la biomasse cellulaire pour les deux cultures. Les concentrations maximums de sulfates et de protéines étaient les mêmes pour les deux cultures (25 µg protéine/ml et 0,17 mg sulfate/ml pour SD-6 et SD-6 + SD-9).

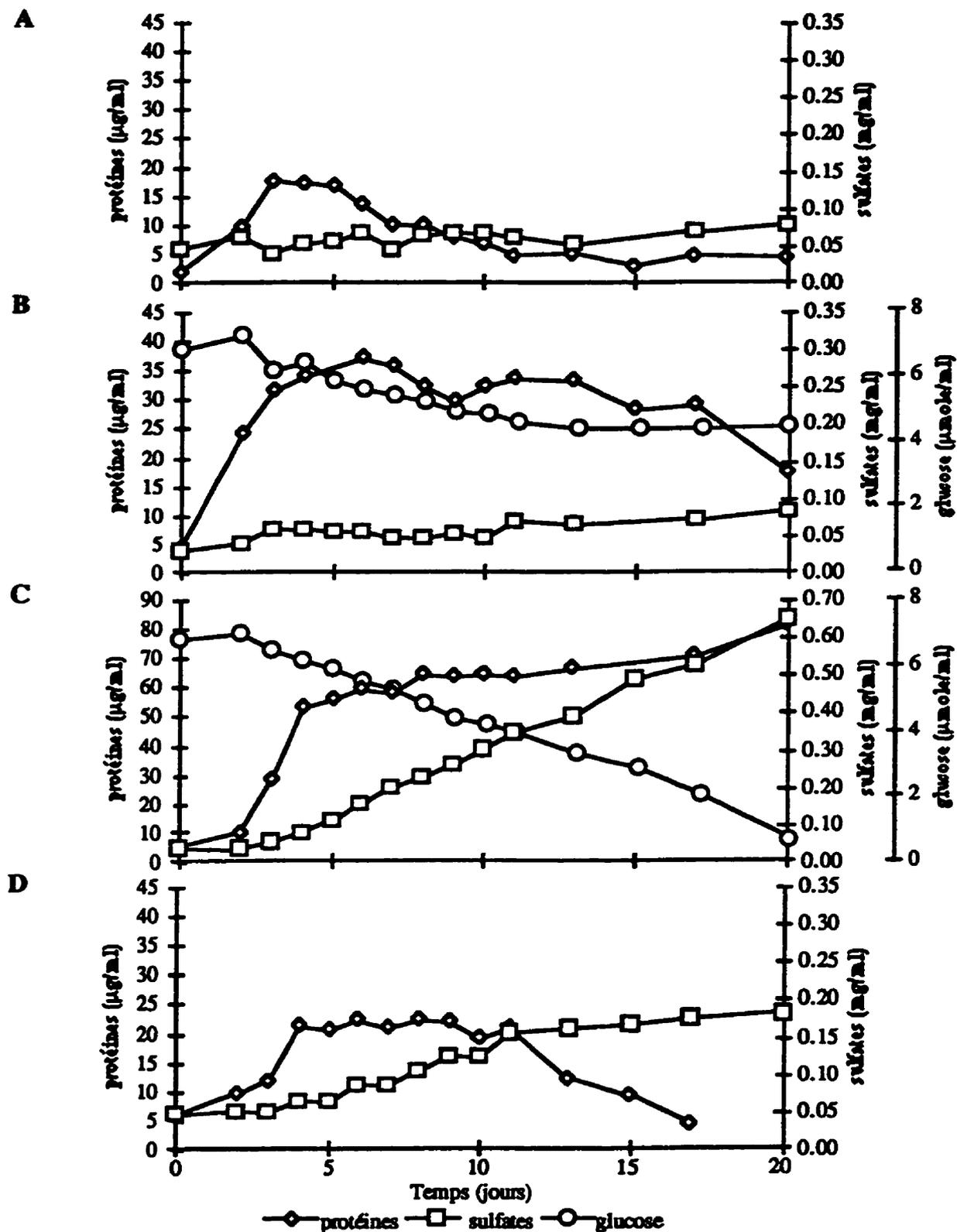


Figure 6.13 Croissance de la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. dans le milieu 9K 1/10-EL 0,01 % pH 2,5. (A) culture témoin sans addition, (B) addition de glucose (1 g/L), (C) addition de glucose (1 g/L) et de soufre (1 g/L), (D) addition de soufre (1 g/L).

6.5.6 Utilisation du CO₂ atmosphérique

Pour compléter l'étude du métabolisme des *Sulfobacillus* sp., nous avons étudié leur capacité à fixer le CO₂ atmosphérique. La présence des enzymes clés de deux sentiers principaux de fixation du CO₂ utilisés par les microorganismes a été vérifiée à partir de différents extraits cellulaires du *Sulfobacillus* sp. SD-11. Par la suite, nous avons procédé à un test de fixation du ¹⁴CO₂.

6.5.6.1 Dosage de la RuBisPCase et de l'ATP:citrate lyase

Plusieurs sentiers métaboliques peuvent être utilisés par les microorganismes non photosynthétiques pour fixer le CO₂. Cependant, les bactéries aérobies vont surtout utiliser le cycle de Calvin dont la RuBisPCase est l'enzyme clé. Nous avons donc vérifié la présence de cette enzyme chez les *Sulfobacillus* sp.

La méthode utilisée comprenait deux étapes. La première consistait à produire de l'acide 3-phosphoglycérique (3-PGA) durant une période d'incubation de 5 min à partir du ribulose diphosphate et de la RuBisPCase si elle était présente dans les extraits enzymatiques. Ensuite, la 3-PGA était dosée par une réaction enzymatique qui faisait intervenir le NADH. Les résultats de l'activité enzymatique de la RuBisPCase qui a été évaluée pour de nos différents extraits cellulaires sont regroupés au Tableau 6.6.

Tableau 6.6 Activité de la RuBisPCase dans les extraits cellulaires de bactéries appartenant à différent genre.

Espèces	Δ D.O. moyen	Activité spécifique ² (unité/mg protéine)
Témoin ¹	0,0075	1,33
<i>E. coli</i>	0,0150	2,66
<i>P. fluorescens</i>	0,0075	1,33
<i>T. thiooxidans</i>	0,3200	56,88
<i>Sulfobacillus</i> sp. SD-11	0,0250 ³	4,44 ³

¹. Témoin : extrait enzymatique sans substrat ou substrat sans enzyme.

². Une unité d'activité enzymatique a été définie comme la concentration catalysant la formation de 1 nmole de 3-PGA / min, et l'activité spécifique est définie en unité/mg de protéine.

³. Moyenne des valeurs obtenues à partir d'extraits cellulaires provenant de cellules après croissance en présence de différents substrats (glutamate, glutathion oxydé et soufre).

Même si le mélange réactionnel a été chauffé à 100°C après la première étape, il a subsisté une activité résiduelle de la NADH oxydase, car une faible activité enzymatique spécifique de la RuBisPCase a été observée chez des bactéries qui ne sont pas reconnues pour posséder cette enzyme (*E. coli*, 2,66 nmole/mg protéine·min; *P. fluorescens*, 1,33 nmole/mg protéine·min). Une activité un peu plus élevée de 4,44 nmole/mg protéine·min a été évaluée pour le *Sulfobacillus* sp. SD-11 (Tableau 6.6). Cependant, cette activité était très inférieure à celle du *T. thiooxidans* ATCC 19377 (56,88 unité/mg protéine·min) qui est une bactérie autotrophe.

Certaines bactéries qui ne possèdent pas la RuBisPCase peuvent utiliser le cycle de réduction de citrate pour fixer le CO₂. L'ATP:citrate lyase est l'enzyme clé de ce cycle. Toutes les analyses enzymatiques se sont avérées négatives pour l'ATP:citrate lyase. Cependant, nous avons détecté une activité pour la citrate lyase.

6.5.6.2 Fixation du ¹⁴CO₂ par la culture mixte (SD-9 + SD-6)

Au moment où ces expériences ont été réalisées, la présence d'une deuxième espèce du genre *Sulfobacillus* dans les sous-cultures du *Sulfobacillus* sp. SD-11 n'avait pas encore été confirmée. Les sous-cultures de l'isolat SD-11 ont été utilisées pour tous les essais de fixation du ¹⁴CO₂. Quelques mois après la fin de ces expériences, la présence d'une deuxième espèce bactérienne dans les sous-cultures du *Sulfobacillus* sp. SD-11 a été confirmée (voir l'isolement des isolats SD-6 et SD-9 au Chapitre 5). De plus, l'analyse du métabolisme de la culture utilisée pour les essais de fixation du ¹⁴CO₂ en présence de soufre et de glucose (Figure 6.14) a démontré les mêmes courbes de croissance et d'utilisation du glucose que celles obtenues pour la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. (SD6 et SD-9) (Figure 6.13 C). Les expériences de fixation du ¹⁴CO₂ ont donc été effectuées avec la culture mixte des *Sulfobacillus* sp.

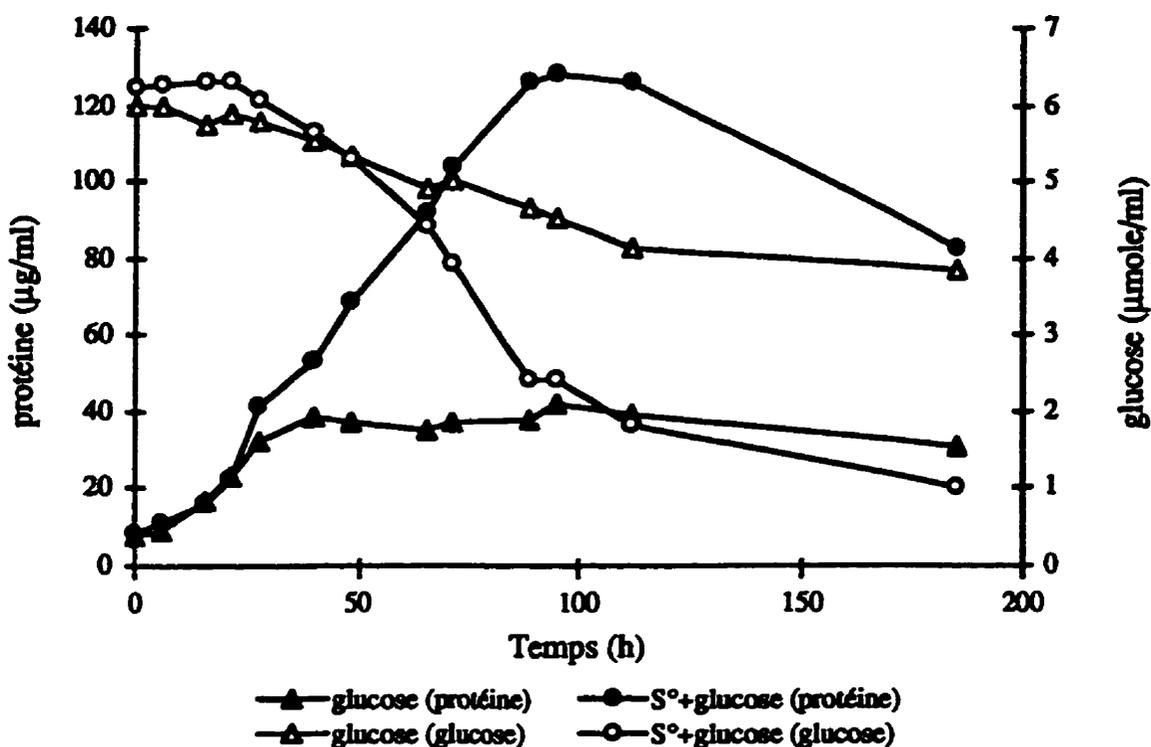


Figure 6.14 Suivi de la croissance de la culture utilisée pour la fixation du CO_2 , dans le milieu 9K-EL pH 2,25 en présence de soufre et de glucose, ou de glucose

Par ailleurs, le glutamate de sodium a été utilisé au lieu du glucose lors des essais de fixation du CO_2 . Au moment de ces expériences, le rendement cellulaire de la culture du *Sulfobacillus* sp. SD-11 en présence de glucose était très faible. Ce résultat a d'ailleurs été confirmé lors des expériences du suivi du glucose pour la culture pure et la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. (section 6.5.5). De plus, la biomasse cellulaire du *Sulfobacillus* sp. produite à partir du glutamate était plus élevée que celle obtenue à partir du glucose (Dufresne, 1993). À ce moment, le glutamate nous apparaissait comme un substrat de choix pour procéder à nos expériences.

Un premier essai a été effectué pour vérifier si nous avons vraiment une fixation du CO_2 notable et si la méthodologie employée nous permettait de suivre cette fixation. Le milieu 9K-EL (0,01 %) pH 2,25 a été utilisé pour cette expérience sauf pour une culture en présence de soufre où l'extrait de levure a été omis. De plus, seule la fixation du $^{14}\text{CO}_2$ a été suivie dans cette expérience. En l'absence de l'extrait de levure, les cellules de l'inoculum ont été incapables de fixer le CO_2 (Figure 6.15). Par ailleurs, la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ fixé en présence de glutamate était inférieure à celle obtenue en son absence (milieu 9K-EL sans substrat ajouté). Cependant, la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ fixé était supérieure en présence de soufre et de glutamate, et de soufre à celle obtenue en présence d'extrait de levure seulement.

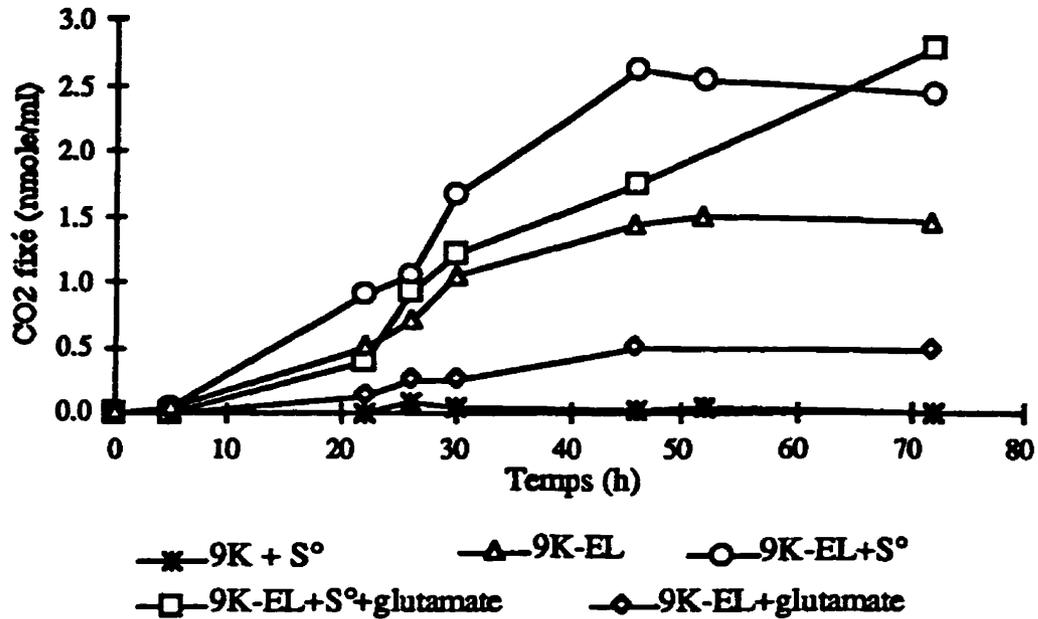


Figure 6.15 Fixation du CO_2 par les *Sulfobacillus* sp. (SD-6 + SD-9) dans le milieu 9K-EL 0,01 % à pH 2,25 en présence de soufre et/ou de glutamate

Lors du deuxième essai, l'influence de la concentration de l'extrait de levure sur la fixation du CO_2 en présence du soufre a été étudiée en plus de celle du glutamate. La croissance cellulaire a aussi été suivie lors de cette expérience pour vérifier le taux de fixation du CO_2 . Le taux de fixation diminuait lorsque la concentration de l'extrait de levure dans le milieu augmentait (Figure 6.16).

De plus, la fixation du CO_2 a été influencée autant par la présence d'une source d'énergie que par celle d'une source de carbone (Figure 6.17). Le taux de fixation du CO_2 le plus élevé a été celui obtenu en absence de substrat autre que l'extrait de levure présent dans le milieu de culture. Les trois autres conditions de croissance (présence de soufre, de glutamate, de soufre et glutamate) ont donné des taux comparables.

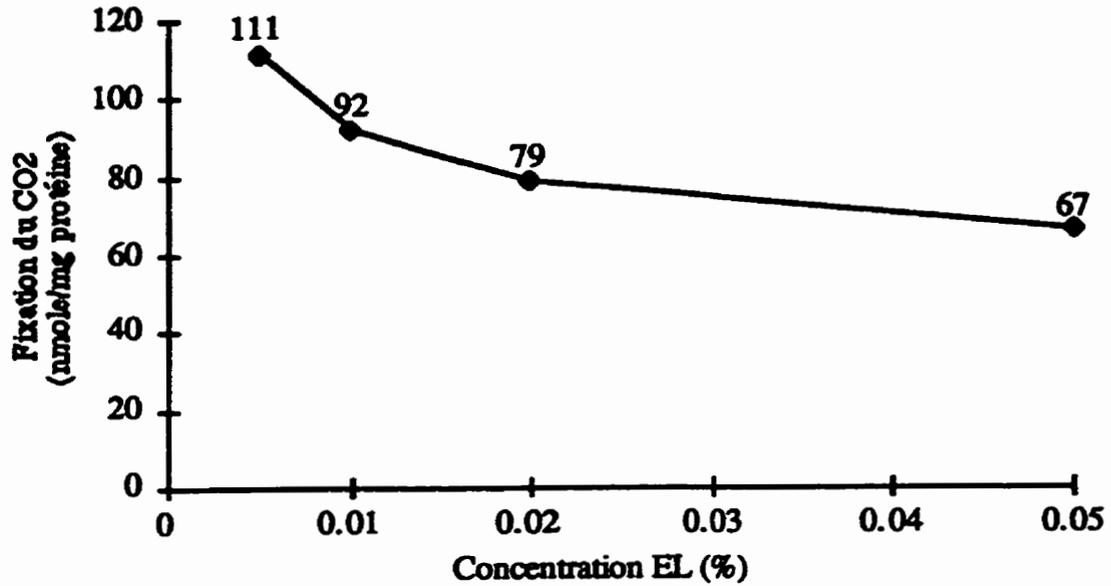


Figure 6.16 Taux de fixation du CO₂ par les *Sulfobacillus* sp. (SD-6 + SD-9) pour différentes concentrations d'extrait de levure dans le milieu 9K pH 2,25 contenant du soufre (0,1 %) (moyenne arithmétique de 5 valeurs étalées sur 32 h, correspondant à la phase exponentielle de croissance)

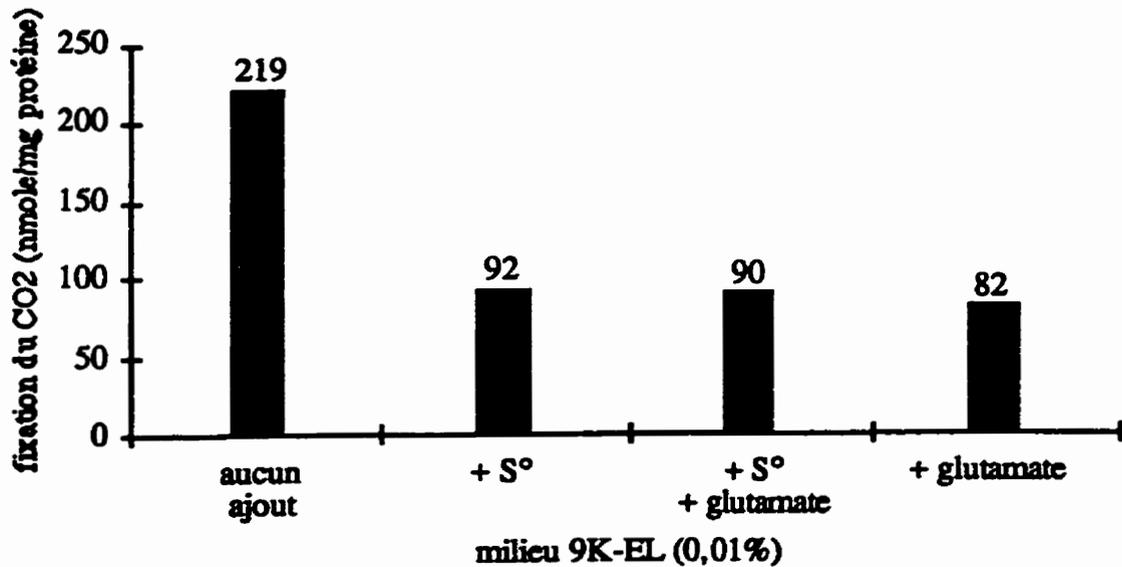


Figure 6.17 Moyenne des taux de fixation du CO₂ par les *Sulfobacillus* sp. (SD-6 + SD-9) en présence de soufre et/ou de glutamate (moyenne arithmétique de 5 valeurs étalées sur 32 h, voir plateau Figure L.1, Annexe L)

6.5.7 Oxydation des composés soufrés par le *Sulfobacillus* sp. SD-11

Lors de l'oxydation de composés soufrés, le *Sulfobacillus* sp. SD-11 a produit des métabolites intermédiaires, des oxyanions du soufre (Figure 6.18) (Dufresne, 1993). Pour toutes les courbes apparaissant sur la Figure 6.18, les valeurs témoins ont été soustraites des valeurs expérimentales afin d'alléger les représentations graphiques. La concentration des oxyanions du soufre dosées a été faussée par la trop faible concentration de ces derniers. Un volume d'échantillon plus élevé que celui recommandé dans la méthode de dosage a été utilisée afin d'éliminer les interférences du milieu de culture. L'ampleur de la déviation n'était pas connue.

Le dosage des oxyanions produits lors de la croissance du *Sulfobacillus* sp. SD-11 sur le glutathion oxydé a dû être corrigé, puisqu'un phénomène chimique l'a influencé : le glutathion oxydé ou tout autre sous-produit obtenu par réaction chimique avec un des composés du milieu réagissait lors de la cyanolyse pour être dosé sous forme de thiosulfate, tétrathionate, mais surtout sous forme de trithionate. La valeur du témoin négatif n'a pas été soustraite dans le cas du trithionate, car les valeurs de concentration après le temps 0 auraient été négatives. La concentration du témoin pour le trithionate est restée stable aux alentours de 1,6 $\mu\text{m}/\text{ml}$. Le soufre du glutathion oxydé n'était pas retrouvé au complet sous forme de trithionate, seule une partie de celui-ci réagissait pour être transformée en trithionate. Le *Sulfobacillus* sp. SD-11 se servait du sous-produit soufré du glutathion oxydé, dosé sous forme de trithionate, pour les oxyder en sulfate, thiosulfate et tétrathionate. Le tétrathionate a été retrouvé en plus grande concentration au départ que le thiosulfate; puis après la cinquième journée, la concentration en tétrathionate a diminué au profit de la concentration en thiosulfate et en sulfate. Le phénomène inverse s'était produit sur le soufre, la concentration en thiosulfate avait diminué alors que celles du tétrathionate et du thiosulfate avaient augmenté. D'une manière quelque peu inusitée, la concentration de thiosulfate détectable dans le milieu a atteint un maximum au 5 ième jour de croissance pour chuter rapidement (de 0,88 à 0,26 μmole) en moins de 24 heures par la suite.

La concentration des sulfates retrouvée dans le milieu était trop faible pour influencer la valeur du pH lors de la croissance sur le soufre, même si la concentration finale des sulfates dépasse celle des autres oxyanions. Cependant, lors de la croissance du *Sulfobacillus* sp. SD-6 et de la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. (SD-6 + SD-9) en présence de soufre et de glucose, une légère acidification a été observée (SD-6, pH final de 2,14; SD-6 + SD-9, pH final de 1,90).

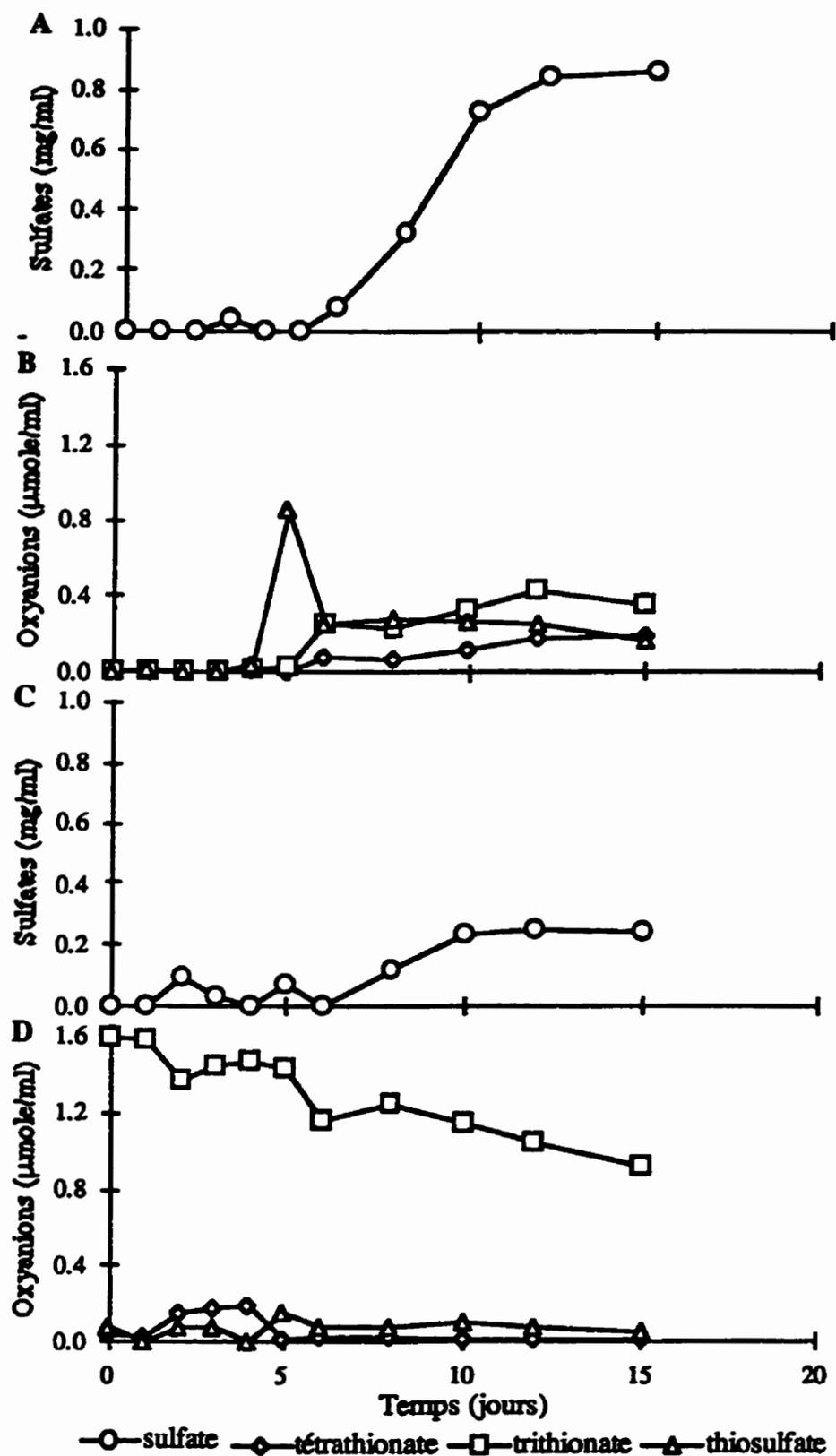


Figure 6.18 Production des oxyanions du soufre par le *Sulfolobus* sp. SD-11 en présence de 0,02 % EL. (A) et (B), soufre; (C) et (D), glutathion oxydé.

Par la suite, nous avons essayé de vérifier la présence de métabolites soufrés ou non qui résulterait de l'attaque des atomes de soufre contenus dans des composés soufrés organiques. Une extraction au dichlorométhane jumelée à une analyse des extraits sur le GC nous permettait de détecter les métabolites non polaires ou très légèrement polaires. Aucun métabolite appartenant à ces deux groupes n'a été retrouvé dans nos extraits. Nous avons ensuite procédé à une extraction à l'acétate d'éthyle pour voir si nous pouvions détecter la présence de métabolites un peu plus polaires. Ces extraits ont d'abord été analysés sur des TLC et sur le GC. Encore une fois, l'analyse sur le GC n'a pas démontré la présence de métabolites. Cependant, sur les TLC, nous avons observé quelques taches qui représentaient peut-être des métabolites; mais nous avons été incapables de les identifier, car elles étaient mélangées aux traînées formées par l'excès des substrats. Par la suite, nous sommes partis de nouvelles cultures, qui cette fois, ont d'abord été extraites au dichlorométhane, pour enlever le substrat non transformé, puis à l'acétate d'éthyle. Les extraits dans l'acétate d'éthyle ont ensuite été séchés et resuspendus dans de l'acétonitrile pour être analysés au HPLC. Aucun métabolite n'a été détecté dans les extraits provenant des cultures sur le DBT, le thianthrène et le DTBT, mais quelques pics ont été observés pour l'extrait provenant de la croissance des *Sulfobacillus* sp. sur le dibenzylsulfure. Cependant, ces molécules étaient polaires et nous n'avions aucun pour les identifier.

6.6 Discussion

6.6.1 Analyse des caractéristiques morphologiques

Les isolats SD-6, SD-9 et SD-11 sont des bâtonnets gram-positifs même si leur coloration de Gram indique le contraire. Les photomicrographies en microscopie électronique à transmission confirment le caractère positif du Gram de ces isolats. L'enveloppe cellulaire d'une bactérie à gram-positif est constituée d'une membrane cytoplasmique et d'une épaisse couche de peptidoglycan (rigide). Elle possède un aspect homogène en microscopie électronique alors que la paroi des bactéries à gram-négatif présente un aspect cérébriforme caractéristique. De plus, ces trois isolats (SD-6, SD-9 et SD-11) contiennent des granules de polyphosphate qui sont reconnus pour être denses aux électrons, avoir une dimension de 48 nm à 1 µm et quelques fois être entourés d'une membrane (Shively, 1974). L'accumulation de matériaux de réserve précède habituellement les premières étapes de la sporulation et les polyphosphates qui composent cette inclusion sont probablement utilisés par la bactérie au cours de la formation de la spore tel que rapporté dans le cas de *Bacillus thuringiensis*.

La caractérisation de la morphologie cellulaire des isolats SD-6 et SD-9 appuie leur appartenance au genre *Sulfobacillus*. De plus, nous ne pouvons exclure la possibilité que ces

trois isolats puissent faire partie du genre *Alicyclobacillus* sur la base de leurs caractéristiques morphologiques. Les *Alicyclobacillus* sont des bâtonnets gram-positifs formant des spores, non-mobiles et pouvant former des chaînes (Deinhard *et al.*, 1987a; Deinhard *et al.*, 1987b; Darland et Brock, 1971), tout comme les espèces du genre *Sulfobacillus*.

6.6.2 Analyse phylogénétique

L'isolat SD-11 est phylogénétiquement relié aux genres *Sulfobacillus* et *Alicyclobacillus* comme le démontre l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S. Les pourcentages molaires de l'ADNr 16S et de l'ADN chromosomique retrouvés pour l'isolat SD-11 sont similaires à ceux de *S. thermosulfidooxidans* (59,3 et 54±1 mol % respectivement) (Tourova *et al.*, 1994). Les séquences signatures retrouvées aux positions 513-A, 1207-C, 168-G, 906-G, 955-G, et 1167-A (selon la numérotation de *E. coli*) chez l'isolat SD-11 corroborent son emplacement dans le groupe des bactéries gram-positives ayant un % G+C bas (< 55). De plus, les 14 nucléotides décrits par Tourova *et al.* (1994) liant les genres *Sulfobacillus* et *Alicyclobacillus*, et les différenciant des autres bactéries gram-positives ayant un % G+C bas sont aussi retrouvés chez l'isolat SD-11 aux positions 154-G, 452-G, 480-A, 672-G, 734-C, 748-G, 862-G, 867-C, 122-G, 1123-T, 1150-A, 1151-A, 1297-G et 1298-T.

Pour les trois méthodes d'analyse employées, l'espèce la plus près de l'isolat SD-11 est *S. thermosulfidooxidans* malgré le fait que l'isolat SD-11 présente un degré de similitude plus élevé avec *Alb. cycloheptanicus*. Deux séquences signatures, 5'-ATGCTACGGCATCGC-3' et 5'-AACCCCTGAAAACCGC-3' aux positions 200-222 et 1279-1296 respectivement, sont retrouvées seulement chez *S. thermosulfidooxidans* et l'isolat SD-11 parmi toutes les séquences des ADNr 16S de la base de données du GenBank. La présence de ces deux séquences signatures appuie l'affinité phylogénétique observée entre *S. thermosulfidooxidans* et l'isolat SD-11. De plus, l'analyse phylogénétique démontre que le groupe formé des isolats ALV, BC1 et C-MT1, identifié sommairement comme des espèces appartenant aux genres *Sulfobacillus*, se retrouve éloigné des genres *Sulfobacillus* et *Alicyclobacillus* selon les analyses de parcimonie et de la méthode du "maximum likelihood".

Sur la base des caractéristiques morphologiques et physiologiques sommaires, l'isolat SD-11 avait déjà été proposé comme une nouvelle espèce du genre *Sulfobacillus* et appelé *Sulfobacillus disulfidooxidans* SD-11 sp. nov (Dufresne *et al.*, 1993). L'analyse phylogénétique appuie cette proposition, même si la possibilité que *S. disulfidooxidans* SD-11 appartienne au genre *Alicyclobacillus* n'est pas complètement écartée.

La séquence de l'isolat SD-6 est identique à celle que nous avons obtenue pour *S. disulfidooxidans* SD-11. De plus, l'isolat SD-6 possède les mêmes caractéristiques morphologiques et physiologiques que le *S. disulfidooxidans* SD-11. Il a donc été identifié comme *S. disulfidooxidans* SD-6.

Pour que le produit PCR d'une culture mixte puisse être séquencé, il faut que l'une des deux espèces soit en minorité, ou encore que les séquences de leur ADNr 16S respectif soient presque identiques. Il est peu probable que l'une des espèces ait été minoritaire dans la culture mixte, puisque les conditions de croissance mixotrophe employées permettaient une croissance presque simultanée des deux espèces (voir section 6.5.5.2). De plus, les similitudes notées aux niveaux de la morphologie et de la physiologie de l'isolat SD-9 et du *S. disulfidooxidans* SD-6 nous ont fait présumer que les séquences des ADNr 16S des deux espèces seraient voisines. Selon la séquence obtenue à partir du produit PCR, seules trois bases (N, base non déterminée) seraient différentes entre les deux espèces sur les 925 bases séquencées (Annexe K). La culture mixte doit donc être composée de deux espèces du même genre. Selon le D^r B. Goebel (1997), les différences observées entre les deux séquences sont trop minimes pour identifier deux patrons distincts lors d'une analyse de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Cette analyse aurait pu nous permettre de différencier les deux espèces si elle avait été concluante. Cependant, une étude approfondie des structures secondaire et tertiaire des séquences des ADNr 16S obtenues de clones nous permettrait probablement de séparer les deux espèces au niveau phylogénétique, puisque certaines différences ont été notées au niveau de leur morphologie et physiologie. La largeur des bâtonnets est différente entre le *S. disulfidooxidans* SD-6 et l'isolat SD-9. De plus, l'isolat SD-9 semble être capable d'oxyder le sulfate ferreux ce qui n'a jamais été observé chez le *S. disulfidooxidans*. L'isolat SD-9 n'ayant pas été purifié et caractérisé en profondeur, il n'a pas été identifié à l'espèce. Nous l'avons appelé *Sulfobacillus* sp. SD-9.

6.6.3 Analyse des acides gras chez le *S. disulfidooxidans* SD-11

Les acides gras identifiés dans les extraits lipidiques du *S. disulfidooxidans* SD-11 (Tableau 6.7) correspondent au Gram de cet isolat. En effet, plusieurs études déjà réalisées sur la composition cellulaire en acides gras des bactéries gram-positives ont démontré que ces bactéries contiennent trois groupes majeurs d'acides gras : les chaînes linéaires, les chaînes ramifiées et les acides gras complexes (voir Chapitre 3, section 3.2.1.2). Cependant, les acides gras ramifiés *anteiso* dont l'*anteiso-C_{15:0}* y sont retrouvés en majorité. C'est aussi l'acide gras majoritaire du *S. disulfidooxidans* SD-11. Par contre, chez certains *Bacillus* (du groupe de *B. cereus* et *B. thuringiensis*), c'est plutôt le *iso-C_{15:0}* qui est retrouvé en majorité parmi les acides

gras. Même si les bactéries gram-positives contiennent beaucoup d'acides gras ramifiés, elles peuvent contenir jusqu'à 10 % d'acides gras linéaires, mais rarement plus (Kenada, 1991).

Tableau 6.7 Liste des acides gras membranaires identifiés chez *S. disulfidooxidans* SD-11

linéaires	Acides gras membranaires		
	ramifiés <i>iso</i>	ramifiés <i>anteiso</i>	ω -cycliques
C ₁₆	C ₁₆	C ₁₅	ω -cyclohexane C ₁₇
	C ₁₇	C ₁₇	ω -cyclohexane- α -OH-C ₁₅
			ω -cyclohexane- α -OH-C ₁₇
			ω -cyclohexane C ₁₉

Les acides gras ω -cycliques sont souvent considérés comme des variantes dans la biosynthèse des acides gras ramifiés *iso* et *anteiso*, puisqu'ils sont retrouvés en concentration moins élevée que les ramifiés. Cependant, chez certaines bactéries thermo-acidophiles (DeRosa *et al.*, 1972), l'acide gras ω -cyclohexyle undécanoïque est majoritaire. Mentionnons cependant que Suzuki *et al.* (1981) ont rapporté la présence de cet acide gras chez *Curtobacterium pusillum*, une bactérie mésophile. Ce lipide pourrait jouer un rôle de stabilisation de la membrane dans les environnements extrêmes. Cette hypothèse est supportée par les travaux de Deinhard *et al.* (1987a) qui ont isolé un bacille thermo-acido-tolérant contenant un acide gras ω -cyclo-heptylique et qu'ils ont appelé *Bacillus cycloheptanicus* (renommé *Alicyclobacillus cycloheptanicus* par Wisotzkey *et al.* (1992)). De plus, lors de l'analyse des acides gras de *S. thermosulfidooxidans*, Tsaplina *et al.* (1994) ont démontré la présence de l'acide gras ω -cyclohexyle undécanoïque.

La présence d'acides gras hydroxylés peut être très utile pour appuyer la systématique bactérienne, surtout les acides gras ramifiés hydroxylés identifiés chez certaines bactéries gram-négatives. Habituellement, ce sont surtout les acides gras linéaires qui vont posséder un groupement hydroxyle. Cependant, ces acides gras sont rarement présents chez les bactéries qui possèdent majoritairement des acides gras ramifiés, bien que plusieurs espèces des genres *Bacteroides*, *Cytophaga*, et *Myxococcus* ainsi que quelques unes des genres *Flavobacterium* et *Flexibacterium* possèdent des acides gras ramifiés hydroxylés comme acides gras majoritaires. La présence d'acides gras hydroxylés doit donc être considérée lors de l'examen des chromatogrammes des bactéries dont les acides gras majoritaires sont ramifiés (Kenada, 1991). Parmi les acides gras identifiés sur le chromatogramme du *S. thermosulfidooxidans*, Tsaplina *et al.* (1994) ont retrouvé jusqu'à 3 % d'un nouvel acide gras, l'acide ω -cyclohexyle- α -

hydroxyundécanoïque (ω -cyclohexane- α -OH-C₁₇), que nous avons aussi retrouvé sur celui du *S. disulfidooxidans* SD-11, mais qui n'a jamais été identifié chez les *Alicyclobacillus* (Deinhard *et al.*, 1987a; Deinhard *et al.*, 1987b). Un autre acide cyclique hydroxylé a aussi été identifié chez le *S. disulfidooxidans* SD-11 : il s'agit de l'acide ω -cyclohexane- α -OH-C₁₅.

La comparaison de nos résultats avec ceux publiés pour *S. thermosulfidooxidans* en conditions de croissance hétérotrophe a permis de relever plusieurs différences. Premièrement, l'acide gras majoritaire est l' ω -cyclohexane C₁₇ (54,2 %) pour *S. thermosulfidooxidans*, alors que c'est l'acide *anteiso*-C₁₅ pour le *S. disulfidooxidans* SD-11. Deuxièmement, la concentration d'acide *anteiso*-C₁₅ retrouvée chez *S. thermosulfidooxidans* est très faible (0,3 %). Et finalement, l'acide ω -cyclohexane- α -OH-C₁₅ n'a pas été retrouvé chez *S. thermosulfidooxidans*. Ces différences sont peut-être dues au fait que la souche *S. thermosulfidooxidans* VKM-1269 n'est peut-être pas une souche pure. La controverse entourant cette question sera abordée à la section 6.6.8.

6.6.4 Analyse des propriétés biochimiques des *Sulfobacillus* sp.

Le pH de croissance optimum des *Sulfobacillus* sp. ainsi que leurs besoins nutritionnels complexes ont limité le nombre des analyses possibles. Plusieurs des propriétés biochimiques des *Sulfobacillus* sp. n'ont pu être évaluées faute de milieux de culture appropriés. Cependant, *S. disulfidooxidans* est aérobie facultatif. Il peut utiliser soit l'azote ammoniacal, les nitrates ou encore des composés azotés organiques comme source d'azote (Dufresne, 1993). De plus, la non production de H₂S par les *Sulfobacillus* sp. à partir des sulfates et de la cystéine est une indication de leur incapacité à réduire les composés soufrés en anaérobiose.

6.6.5 Analyse des caractéristiques physiologiques et des sentiers métaboliques des *Sulfobacillus* sp.

Tel que rapporté pour *S. thermosulfidooxidans*, les *Sulfobacillus* sp. nécessitent l'ajout de facteurs de croissance pour croître en culture pure. Cependant, contrairement à *S. thermosulfidooxidans* qui est thermotolérant avec une température de croissance optimum de 50°C et qui oxyde le soufre élémentaire en acide sulfurique, les *Sulfobacillus* sp. sont mésophiles et ils ne produisent pas d'acide sulfurique en concentration suffisante pour faire descendre le pH du milieu de culture en présence de soufre élémentaire seulement. Cependant, si une source de carbone organique comme le glucose est ajoutée, une légère acidification du milieu est observée (SD-6, pH final 2,14; SD-9 mixte, pH final 1,90). De plus, il est possible de différencier le *Sulfobacillus* sp. SD-9 du *S. disulfidooxidans* SD-6, car le *Sulfobacillus* sp.

SD-9 possède la propriété d'oxyder le fer ferreux comme le démontrent les colonies de la culture mixte qui sont recouvertes de cristaux de fer ferrique sur le milieu FTG.

Par ailleurs, les espèces gram-positives du genre *Alicyclobacillus* ont aussi la propriété d'être acidophiles, mais elles sont non thio-oxydantes. De plus, elles sont thermotolérantes et hétérotrophes. Contrairement aux *Alicyclobacillus*, le *S. disulfidooxidans* ne produit pas d'acidification au cours de la croissance sur les substrats de la grille API 50 CH et il n'utilise pas le galactose (Tableau 6.3). De plus, nos isolats étaient inhibés par une concentration de matière organique soluble supérieure à 0,5 % (Dufresne, 1993) alors que les *Alicyclobacillus* peuvent croître dans un milieu contenant plus de 1 % de matière organique.

S. disulfidooxidans possède les enzymes clés du sentier HMP qui fait partie du cycle des pentoses phosphates. Le sentier HMP est très important pour les microorganismes qui fixent le CO₂ au moyen du cycle de Calvin. Par ailleurs, le sentier HMP est lié au sentier EMP par le fructose-6-P et le glycéraldéhyde-3-P. Le cycle incomplet du sentier HMP (lorsque le fructose-6-P et le glycéraldéhyde-3-P sont transformés en pyruvate par le sentier EMP) requiert 1 mole d'ATP mais en produit 2. Des bases pyrimidiques réduites sont aussi formées et peuvent être utilisées comme donneurs finals d'électron dans la réduction de la matière organique. Ce sentier est nécessaire aux microorganismes photosynthétiques et aux autotrophes chimiosynthétiques. Par ailleurs, le sentier HMP peut-être utilisé en même temps que les sentiers ED ou EMP (glycolyse) par certaines espèces bactériennes. De plus, l'utilisation du sentier HMP permet la croissance en anaérobiose, car les enzymes de ce sentier ne sont pas dépendantes de la présence de l'oxygène et ce phénomène a été observé pour *S. disulfidooxidans* SD-11 lors d'un essai antérieur (Dufresne *et al.*, 1996). Nous avons cependant été incapables de déterminer s'il s'agissait d'une réaction de fermentation du substrat ou de respiration anaérobie liée à l'utilisation d'un composé autre que l'oxygène comme accepteur final des électrons.

S. disulfidooxidans possède aussi certains des enzymes du sentier EMP. Cependant, nous n'avons pas détecté d'activité pour la phosphofructokinase, l'une des deux seules enzymes irréversibles de ce sentier. Le sentier EMP pourrait donc jouer un rôle anabolique plutôt que catabolique dans ce cas particulier. *S. disulfidooxidans* possède aussi les enzymes clés du cycle du citrate. Par contre, les enzymes du cycle du glyoxylate ne sont pas présentes dans les conditions de croissance utilisées. Ceci n'est pas surprenant; car *S. disulfidooxidans* est incapable d'utiliser l'acétate comme substrat, et que ces enzymes sont inductibles chez les bactéries qui les possèdent et qui peuvent utiliser l'acétate comme seule source de carbone.

Wood et Kelly (1984) ont étudié partiellement le mécanisme de transport du glucose chez *Acidimicrobium ferrooxidans*, une bactérie gram-positive, mixotrophe, thermotolérante et ferroxydante. Ils ont découvert que le transport du glucose était probablement relié à un système de transport dépendant du phosphoénolpyruvate. Comme pour *S. disulfidooxidans*, ils ont trouvé que *Acm. ferrooxidans* oxyde le glucose presque exclusivement par le sentier HMP et ensuite par le cycle du citrate. L'utilisation du sentier HMP et non du cycle complet des pentoses phosphates mène à la formation de PEP qui pourra ensuite être utilisé par le système de transport dépendant du PEP. Ce système de transport pourrait être à la base de l'utilisation des composés carbonés par les *Sulfobacillus* sp. si les similitudes retrouvées aux niveaux des caractéristiques physiologiques entre les *Sulfobacillus* sp. et *Acm. ferrooxidans* sont considérées.

6.6.6 Analyse du métabolisme des *Sulfobacillus* sp.

Le métabolisme des *Sulfobacillus* sp. a été interprété en tenant compte de l'influence de l'extrait de levure. Nous avons aussi procédé à des analyses de fixation du $^{14}\text{CO}_2$ pour vérifier les capacités autotrophes des *Sulfobacillus* sp. Finalement, l'oxydation des composés soufrés organiques par les *Sulfobacillus* sp. a été étudiée.

6.6.6.1 Influence de l'extrait de levure

Le premier rôle de l'extrait de levure que nous avons étudié a été celui de source de facteurs de croissance. L'extrait de levure n'a pu être remplacé par aucune des solutions de facteurs de croissance que nous avons essayées. Il est possible que l'élément nutritif nécessaire soit une autre molécule que celles spécifiées dans la liste des composés retrouvés dans l'extrait de levure (Annexe C). Les facteurs de croissance fournis par l'extrait de levure pourraient aussi être des précurseurs de la synthèse de l'un ou de plusieurs métabolites. De plus, la bactérie est peut-être incapable d'assimiler le produit final (acides aminés, vitamines, etc) à cause de sa dimension ou encore par manque d'un système de transport approprié (Rosen, 1978).

Par ailleurs, l'un et/ou l'autre des *Sulfobacillus* sp. ont besoin d'une ou de plusieurs vitamines pour croître, puisqu'il y a croissance de la culture mixte dans un milieu sans extrait de levure en présence d'une solution de vitamines. En plus, *S. disulfidooxidans* a besoin d'un élément nutritif qui est retrouvé dans l'extrait de levure mais qui est absent des autres suppléments nutritifs utilisés. De plus, *S. disulfidooxidans* doit fournir quelque chose au *Sulfobacillus* sp. SD-9 que l'extrait de levure ne peut probablement pas remplacer, car il nous a été impossible de les séparer jusqu'à maintenant. Donc l'extrait de levure fourni un ou des facteurs de croissance aux *Sulfobacillus* sp.

Acm. ferrooxidans TH3 a aussi besoin de facteurs de croissance qui peuvent être fournis par l'extrait de levure ou qui peuvent être retrouvés dans le surnageant d'une culture de *T. ferrooxidans*, indiquant que la lyse cellulaire peut répondre aux besoins en composés organiques de cette souche (Norris *et al.*, 1980). La compensation des besoins en facteurs de croissance de *Acm. ferrooxidans* par *T. ferrooxidans* est similaire à nos observations pour les *Sulfobacillus* sp. dont les besoins sont fournis par l'isolat acidifiant thio-oxydant dans notre consortium.

London et Rittenberg (1966) ont démontré lors d'une étude portant sur l'effet de la matière organique sur la croissance de *Thm. intermedia* ("T. intermedius") que cette bactérie utilise l'extrait de levure comme source d'énergie et de carbone. Il est donc possible que l'extrait de levure, en plus de servir de source de facteurs de croissance, soit utilisé comme source de carbone et d'énergie par les *Sulfobacillus* sp.

L'utilisation potentielle de l'extrait de levure comme source de carbone a donc été analysée. Nous avons déterminé au Tableau 6.2 que *S. disulfidooxidans* peut utiliser plusieurs acides aminés tel le glutamate, la glycine, la cystine, etc... comme source de carbone et/ou d'énergie. L'extrait de levure utilisé contient 65,85 % d'acides aminés dont 21,5 % sous forme d'acide glutamique (Annexe C) ce qui équivaut à une concentration finale de 0,0014 % (P/V) d'acide glutamique dans le milieu contenant 0,01 % EL, et 17,5 % d'hydrates de carbone. Ceci équivaut à 0,0083 % (P/V) de matière organique totale possiblement assimilable par *Sulfobacillus* sp. SD-6. Il n'est donc pas surprenant qu'une légère croissance soit observée dans les témoins sans substrat ajouté. Par ailleurs, l'extrait de levure est surtout utilisé comme source de carbone primaire lorsqu'il n'y a pas d'autre substrat carboné présent dans le milieu (ex. : en croissance sur le soufre). La nécessité d'ajouter une solution d'acides aminés ou du glucose comme source de carbone pour permettre la croissance de la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. en présence de soufre dans un milieu ne contenant qu'une solution de vitamines démontre ce point (Tableau 6.5).

L'observation de la durée de la phase stationnaire obtenue pour les courbes de croissance, dans le milieu 9K 1/10-EL (0,01 %) en absence de substrat du *S. disulfidooxidans* (Figure 6.8) et de la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. (Figure 6.9), nous a permis d'émettre deux hypothèses.

1. Le *Sulfobacillus* sp. SD-9 n'a pas les mêmes préférences face aux composés carbonés de l'extrait de levure que *S. disulfidooxidans*. La phase stationnaire plus courte observée pour la culture mixte pourrait représenter un épuisement plus rapide des composés carbonés de l'extrait de levure.

2. Les deux *Sulfobacillus* sp. possèdent les mêmes besoins en substrat énergétique. Le maintien de l'activité cellulaire de la culture mixte pourrait avoir été écourté par l'épuisement plus rapide de la source d'énergie, ce qui aurait entraîné une mortalité cellulaire.

En dernier lieu, nous avons étudié la possibilité que l'extrait de levure puisse être utilisé comme source d'énergie. La concentration de sulfates produits dans le milieu 9K 1/10-EL (0,01 %) est trop faible (inférieur à 0,05 mg de sulfates produits / ml de milieu) pour que les valeurs soient significatives. Nous ne pouvons toutefois exclure la possibilité que *S. disulfidooxidans* utilise les composés soufrés de l'extrait de levure comme source d'énergie en absence d'autre source dans le milieu. Il aurait été possible de s'en assurer en suivant la production des sulfates dans un milieu contenant 0,1 % d'extrait de levure (aucune croissance si la concentration est plus élevée). Dans ces conditions, la production des sulfates aurait dû être 10 fois plus élevée et ainsi être significative.

6.6.6.2 Métabolisme des composés carbonés organiques

Maintenant que les rôles potentiels de l'extrait de levure sont connus, nous avons poursuivi l'étude du métabolisme des *Sulfobacillus* sp. Pour ce faire, nous avons commencé par suivre l'utilisation du glucose et la production des sulfates dans différentes conditions de croissance.

L'étude des paramètres de la croissance du *S. disulfidooxidans* dans le milieu 9K 1/10-EL (0,001 % et 0,01 %) a soulevé plusieurs hypothèses.

1. L'épuisement du ou des facteurs de croissance pourrait être la cause de l'arrêt simultané de la croissance du *S. disulfidooxidans* pour toutes les conditions de croissance à l'étude (Figure 6.10 repère a) dans le milieu 9K 1/10-EL (0,001 %).
2. L'utilisation de certains composés carbonés organiques par *S. disulfidooxidans* pourrait dépendre de la présence d'une source d'énergie différente du composé lui-même (ex: l'oxydation du soufre).
3. *S. disulfidooxidans* pourrait excréter des métabolites qui inhiberaient sa propre croissance en présence de glucose.
4. *S. disulfidooxidans* aurait besoin de composés carbonés organiques comme source de carbone lorsque le soufre élémentaire est utilisé comme source d'énergie.

La première hypothèse est plausible si l'on se fie au moment de l'arrêt de la croissance. Cependant, l'épuisement du facteur de croissance aurait dû arriver pour la même concentration de biomasse et non au même moment. Nous ne pouvons exclure cette hypothèse avec certitude, mais elle n'est pas la seule en cause de l'arrêt de la croissance. Nous avons effectué un deuxième essai en présence de 0,01 % d'extrait de levure. Pour que cette première hypothèse soit vraie, la concentration de la biomasse observée aurait dû être plus élevée. Cependant, à part la concentration de la biomasse de la culture en présence de glucose qui a quadruplé, celles des autres cultures n'ont fait, au mieux, que doublé. L'arrêt de la croissance n'est donc pas le résultat de l'épuisement du ou des facteurs de croissance, mais bien de l'appauvrissement de la source d'énergie ou du carbone organique selon les cas.

Nous avons élaboré les deux hypothèses suivantes (deuxième et troisième) à partir des résultats observés pour la croissance du *S. disulfidooxidans* en présence de glucose (Figure 6.10 B), et de glucose et de soufre (Figure 6.10 C). En présence de glucose, l'arrêt de la croissance peut être dû à une inhibition causée par l'excrétion de métabolites ou à l'épuisement de la source d'énergie. Cependant, l'ajout de soufre à la culture n'augmente pas de manière significative l'utilisation du glucose. Dans ces conditions, l'hypothèse mettant en cause l'épuisement de la source d'énergie n'est plus valide. L'hypothèse continue cependant à être possible en l'absence du soufre. Il reste donc la possibilité que *S. disulfidooxidans* produise des métabolites qui, à une certaine concentration, vont l'inhiber. L'essai effectué en présence de 0,01 % d'extrait de levure ne nous a pas permis de confirmer avec certitude la véracité de ces deux hypothèses.

De plus, comme l'utilisation du glucose pourrait être reliée à la présence d'une source d'énergie, nous avons supposé qu'il y aurait une plus grande concentration de glucose utilisé en présence de soufre. Cependant, le phénomène inverse a été observé lors du deuxième essai de croissance du *S. disulfidooxidans* dans le milieu 9K 1/10-EL (0,01 %) contenant du glucose en présence et en absence de soufre. Il existe deux possibilités qui peuvent expliquer ce phénomène.

- Premièrement, la présence du soufre peut avoir causé l'inhibition partielle du transport du glucose, ou de la synthèse des enzymes des sentiers cataboliques ou anaboliques du glucose; ce dernier phénomène a déjà été rapporté. Marin et Rittenberg (1970) ont démontré que la génération d'énergie à partir d'un composé organique (glucose) pouvait être empêchée par la présence d'une source d'énergie inorganique (thiosulfate) chez *Thm. intermedia* ("T. intermedius"). Une situation comparable a aussi été remarquée chez *Ralstonia eutropha* ("Hydrogenomonas-Alcaligenes eutrophus") H16 où le H₂

cause la répression des enzymes du sentier Entner-Doudoroff et prévient ainsi l'utilisation catabolique ou anabolique du fructose (Schlegel et Trüper, 1966).

- Et deuxièmement, *S. disulfidooxidans* pourrait utiliser simultanément des sources de carbone organique (glucose), inorganique (CO₂) et/ou d'énergie (soufre). La concentration de glucose utilisée en présence de soufre serait alors inférieure à celle utilisée en croissance sur le glucose seul, car la fixation du CO₂ remplirait une partie des besoins en carbone de la cellule. Matin (1978) a déjà démontré ce principe chez *T. novellus* qui est capable de bénéficier de la présence du glucose et du thiosulfate si les deux substrats sont retrouvés en concentration limitante dans un système de culture continue.

Les fondements de la quatrième hypothèse ont été élaborés à partir des paramètres de croissance du *S. disulfidooxidans* dans le milieu 9K 1/10-EL (0,001 %) en présence de soufre et qui sont très surprenants (voir Figure 6.10 D). La production des sulfates n'apparaît qu'à la fin de la phase exponentielle. Pourtant, si *S. disulfidooxidans* peut croître en autotrophie, il doit pouvoir oxyder le soufre pour en retirer l'énergie nécessaire à la fixation du CO₂ et ainsi produire le matériel cellulaire nécessaire à sa croissance. De plus, la phase stationnaire de la courbe de croissance est absente et la concentration cellulaire diminue rapidement dès la fin de la phase exponentielle, ce qui pourrait correspondre à l'épuisement des facteurs de croissance et/ou à celle de la matière organique assimilable. La diminution de la biomasse cellulaire peut aussi avoir été causée par l'incapacité du *S. disulfidooxidans* à s'attacher au soufre et à l'oxyder, un phénomène qui a déjà été observé lorsque la concentration cellulaire est trop faible (inoculum inférieur à 2 %). Ce dernier énoncé est peu probable, puisque la densité cellulaire de la culture sur le soufre était similaire à celle de la culture sur le soufre et glucose et qu'il y a eu production de sulfates dans cette dernière. *S. disulfidooxidans* ne possède donc probablement pas la capacité de croître en autotrophie complète. En présence de 0,01 % d'extrait de levure, il devient évident que l'oxydation du soufre est liée à la présence de matière organique. La production de sulfates a triplé par rapport à celle obtenue en présence de 0,001 % EL. Cependant, la croissance cesse même si la source d'énergie n'est pas épuisée. Le pH n'était pas la cause de cette inhibition, car le pH final était de 2,27 et le pH optimum de croissance sur le soufre est compris entre 2,0 et 2,5. Il est toutefois possible que l'excrétion de métabolites inhibe la croissance comme c'est le cas pour d'autres bactéries chimiolithotrophes obligatoires (Matin, 1978).

L'essai effectué en présence de 0,01 % d'extrait de levure a fait ressortir le même phénomène (Figure 6.11). La production des sulfates dans le milieu est presque toujours

décalée par rapport à celle de la biomasse cellulaire. De plus, elle continue même après l'arrêt de la croissance (fin de la phase exponentielle). Nous avons remarqué le même phénomène en ce qui a trait à l'utilisation du glucose. Certains composés de l'extrait de levure seraient donc préférés au glucose et au soufre. Cependant, comme l'utilisation du glucose nécessite de l'énergie et que l'oxydation du soufre demande la présence d'un minimum de cellules, l'extrait de levure permet de combler ces besoins. Dans ces conditions, des composés de l'extrait de levure vont servir de source de carbone alors que d'autres composés vont être utilisés comme source d'énergie. L'utilisation simultanée de deux composés carbonés, dont l'un sert surtout de source d'énergie, a déjà été observée chez certaines bactéries mixotrophes. *Pseudomonas oxalaticus* OX1 utilise le formate comme source d'énergie et de carbone (Dijkhuizen *et al.*, 1978), et l'énergie produite de l'oxydation du formate lui permet de fixer le CO₂. Cependant, la présence d'une deuxième source de carbone organique va influencer son métabolisme. Cette bactérie va utiliser le formate puis l'oxaloacétate lorsque les deux substrats sont présents et ce dernier va inhiber la fixation du CO₂. Par ailleurs, l'acétate a l'effet inverse sur le métabolisme de *P. oxalaticus* OX1. Il est utilisé de préférence au formate et la fixation du CO₂ est inhibée tant que l'acétate n'est pas épuisé. Si le milieu contient du glyoxylate et du formate, les deux composés sont utilisés sans empêcher la fixation du CO₂. Certains composés de l'extrait de levure vont donc fournir l'énergie nécessaire au transport et à l'utilisation du glucose par *S. disulfidooxidans*. Mais ils vont aussi servir de source de carbone lors de la croissance de *S. disulfidooxidans* en présence de soufre.

Donc, *S. disulfidooxidans* en croissance en présence de glucose excrète probablement des métabolites qui inhibent sa propre croissance. *S. disulfidooxidans* a aussi besoin de composés carbonés organiques comme source de carbone lorsqu'il utilise le soufre élémentaire comme source d'énergie, de même que l'utilisation de certains composés carbonés organiques dépend de la présence d'une source d'énergie différente du composé lui-même (ex: l'oxydation du soufre). Ce type de métabolisme est caractéristique des espèces mixotrophes.

Cependant, avant d'affirmer que les *Sulfobacillus* sp. sont mixotrophes, nous devons vérifier le métabolisme de la culture mixte. En général, la croissance de la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. est plus rapide que celle de *S. disulfidooxidans*. Les paramètres de croissance de la culture mixte respectent aussi les hypothèses avancées. Ils nous permettent cependant de confirmer l'inhibition de la croissance du *S. disulfidooxidans* par des métabolites, car les résultats obtenus nous portent à croire que le *Sulfobacillus* sp. SD-9 ne peut utiliser le glucose. Au départ, il se développerait aux dépens de l'extrait de levure, puis à partir des métabolites excrétés par le *S. disulfidooxidans* ou encore à partir des produits libérés par la lyse cellulaire.

La deuxième phase exponentielle observée lors de la croissance de la culture mixte dans le milieu 9K-EL (0,01 %) contenant du glucose représente probablement la croissance du *Sulfobacillus* sp. SD-9 à partir des produits de la lyse cellulaire ou des métabolites produits par le *S. disulfidooxidans* (Figure 6.13). L'utilisation du glucose était beaucoup plus lente à partir de ce moment. Cependant, si le *Sulfobacillus* sp. SD-9 utilise les métabolites produits par le *S. disulfidooxidans* et que l'inhibition de ce dernier a été causée seulement par ses produits, nous aurions dû observer une utilisation supérieure du glucose par la culture mixte, ce qui n'est pas le cas. Donc, en plus de la production des métabolites, l'épuisement de la source d'énergie joue un rôle très important lors de la croissance de la culture mixte sur le glucose tout comme pour *S. disulfidooxidans*. De plus, malgré un départ rapide de la croissance de la culture mixte, il n'y a pas eu d'utilisation du glucose correspondant à cette étape de la croissance. Ceci correspondrait à l'utilisation de l'extrait de levure par le *Sulfobacillus* sp. SD-9 comme noté en présence de 0,001 % EL.

Par ailleurs, l'utilisation complète du glucose par la culture mixte en croissance dans le milieu 9K 1/10-EL (0,01 %) en présence de glucose et de soufre appuie l'hypothèse de l'inhibition du *S. disulfidooxidans* par des métabolites excrétés dans le milieu lors de sa croissance sur le glucose, et de leur utilisation postérieure par le *Sulfobacillus* sp. SD-9.

Une question reste cependant à éclaircir : est-ce que le *Sulfobacillus* SD-9 oxyde le soufre en sulfate? Selon les résultats obtenus pour la culture mixte en croissance dans le milieu 9K 1/10-EL (0,01 %) en présence de soufre, nous pourrions conclure que le *Sulfobacillus* sp. SD-9 n'oxyde pas le soufre. Cependant, nous ne pouvons l'affirmer, car la présence du *Sulfobacillus* sp. SD-9 peut avoir influencé le développement du *S. disulfidooxidans* et ainsi avoir modifié son comportement sur les différents substrats.

Si le *Sulfobacillus* sp. SD-9 a la capacité d'oxyder le soufre, sa vitesse d'oxydation serait plus lente que celle du *S. disulfidooxidans* dans les conditions utilisées. Les renseignements fournis par le Tableau 6.8 appuient ces hypothèses. La production quotidienne de sulfate par la culture mixte en croissance sur le soufre est inférieure à celle obtenue pour la culture pure (SD-9 + SD-6 = 0,71 mg sulfate / mg protéine / jour, SD-6 = 1,02 mg sulfate / mg protéine / jour). De plus, le *Sulfobacillus* sp. SD-9 a un effet positif sur l'utilisation du glucose par le *S. disulfidooxidans* SD-6 en présence de soufre (augmentation de 36 % de la vitesse d'utilisation du glucose), effet qui est beaucoup moindre en l'absence de la source d'énergie (augmentation de 14 % de la vitesse d'utilisation du glucose).

Tableau 6.8 Cinétique de la production des sulfates et de l'oxydation du glucose par le *S. disulfidooxidans* SD-6 et la culture mixte des *Sulfobacillus* sp. (SD-6 + SD-9).

Substrats	<i>S. disulfidooxidans</i> SD-6		<i>Sulfobacillus</i> sp. (SD-6 + SD-9)	
	mg sulfate /mg protéine /jour	µmole glucose /mg protéine /jour	mg sulfate /mg protéine /jour	µmole glucose /mg protéine /jour
aucun	0,35		0,13	
soufre	1,02		0,71	
soufre + glucose	0,52	3,2	0,65	5,03
glucose	0,08	5,8	0,06	6,77

En résumé, *S. disulfidooxidans* et le *Sulfobacillus* sp. SD-9 utilisent l'extrait de levure comme source de facteurs de croissance. Ils peuvent cependant l'utiliser aussi comme source d'énergie et/ou de carbone en l'absence d'une autre source. *S. disulfidooxidans* peut utiliser le glucose comme source de carbone en présence d'une source d'énergie inorganique (ou possiblement organique). De même, il peut croître en présence d'une source d'énergie inorganique et probablement fixer le CO₂ s'il y a aussi une source de carbone organique dans le milieu. Au contraire, le *Sulfobacillus* sp. SD-9 ne semble pas utiliser le glucose. Par ailleurs, il serait capable d'utiliser certains métabolites ou résidus de la lyse cellulaire de la culture mixte comme source de carbone pour croître.

6.6.6.3 Métabolisme du CO₂

Pour vérifier que les *Sulfobacillus* sp. ont la capacité de fixer le CO₂, des essais de fixation du CO₂ ont été effectués en présence de ¹⁴CO₂. La culture mixte des *Sulfobacillus* sp. a été utilisée lors de ces expériences, car le *Sulfobacillus* sp. SD-9 a été découvert par la suite. De plus, l'analyse du métabolisme de la culture utilisée lors des expériences de fixation du ¹⁴CO₂ a confirmé la présence du *S. disulfidooxidans* et du *Sulfobacillus* sp. SD-9.

Quelques observations intéressantes ont résulté du premier essai de la fixation du ¹⁴CO₂. En l'absence de l'extrait de levure, les conditions adverses du milieu ont probablement déclenché la sporulation et l'énergie accumulée à l'intérieur des cellules a probablement été utilisée pour l'alimenter au lieu d'être utilisée pour fixer le CO₂. La présence du glutamate dans le milieu semble avoir un effet inhibiteur sur la fixation du CO₂. Malgré une densité cellulaire plus élevée

en présence de glutamate qu'en son absence, la quantité de CO₂ fixé est inférieure. Le phénomène inverse se produit en présence de soufre, la quantité de CO₂ fixé est plus élevée.

Lors du deuxième essai de fixation du CO₂, la biomasse cellulaire a été analysée pour que les taux de fixation du CO₂ soient évalués. La diminution du taux de fixation du CO₂ à mesure que la concentration en extrait de levure augmente n'est pas surprenante, puisque nous avons déjà déterminé que les *Sulfobacillus* sp. peuvent utiliser certains composés organiques de l'extrait de levure comme source de carbone. Cependant, l'écart entre la valeur obtenue pour la croissance sur le soufre en présence de 0,005 % EL, la condition de croissance se rapprochant le plus de l'autotrophie, et 0,05 % EL, représentant un environnement mixotrophe, est inférieur à ce que nous avons prévu. Chez *Thm. intermedia* ("T. intermedius"), un thiobacille autotrophe facultatif, la présence de matière organique (extrait de levure, glucose ou glutamate) abaisse le niveau de fixation du CO₂ à 15 % de celui obtenu en conditions de croissance autotrophe (London et Rittenberg, 1966). Si les *Sulfobacillus* sp. fixent le CO₂ selon les mêmes règles, nous aurions dû obtenir un taux de 17 nmoles de CO₂ fixé par mg de protéine en présence de 0,05 % d'extrait de levure au lieu de 67 nmole/mg de protéine (Figure 6.16). Cependant, nous ne connaissons pas le taux réel de fixation du CO₂ des *Sulfobacillus* sp. en autotrophie complète, puisqu'ils ne se développent pas dans ces conditions.

En absence de tout substrat autre que l'extrait de levure à 0,01 %, la cellule doit fixer le CO₂ pour pallier au manque de carbone (219 nmole de CO₂ fixé / mg de protéine); à ce moment, l'extrait de levure est probablement utilisé comme source d'énergie. Lors de l'ajout d'une source d'énergie, l'extrait de levure peut alors être utilisé comme source de carbone constitutif et ainsi diminuer le besoin en carbone provenant de la fixation du CO₂ (92 nmole de CO₂ fixé / mg de protéine). Le même phénomène est observé lors de l'ajout d'une source de carbone, puisqu'une partie du besoin en carbone constitutif est rempli par cette source de carbone externe (82 nmole de CO₂ fixé / mg de protéine). Cependant, les effets ne sont pas cumulatifs, puisque lors de l'ajout d'une source d'énergie (soufre) et d'une source de carbone (glutamate) le taux de fixation est sensiblement le même que ceux obtenus pour la croissance sur le soufre ou le glutamate (90 nmole de CO₂ fixées / mg de protéine).

L'activité de la RuBisPCase observée pour *S. disulfidooxidans* est peu concluante. L'activité enzymatique spécifique de la RuBisPCase évaluée pour *E. coli* et *P. fluorescens* aurait dû être presque nulle (*E. coli*, 2,66 nmole/mg protéine·min; *P. fluorescens*, 1,33 nmole/mg protéine·min). La qualité des extraits cellulaires peut avoir causé une instabilité du NADH qui se dégrade lentement en solution. De plus, l'activité de la RuBisPCase du *S. disulfidooxidans* est faible peu importe les conditions de croissance utilisées (moyenne de 4,44 nmole/mg

protéine·min). Il est possible que l'activité de la RuBisPCase ait été inhibée partiellement par la présence de matière organique (extrait de levure) dans le milieu de culture. Il a déjà été démontré que les bactéries chimioautotrophes facultatives possèdent un niveau d'activité de la RuBisPCase beaucoup plus élevé en condition de croissance autotrophe qu'en condition de croissance mixotrophe ou hétérotrophe (Dijkhuinen *et al.*, 1978; Gottschal et Kuenen, 1980). *P. versutus*, par exemple, possède une activité spécifique de la RuBisPCase de 75, 3, et < 0,2 nmole/mg protéine·min en conditions de croissance autotrophe, mixotrophe et hétérotrophe respectivement (Gottschal et Kuenen, 1980). La valeur obtenue pour *T. thiooxidans* 19377 (56,88 unité/mg protéine·min) est respectable. La différence observée entre notre valeur et celles de la littérature est en partie causée par la méthodologie utilisée (utilisation $^{14}\text{CO}_2$) ainsi que par la préparation des extraits enzymatiques qui n'étaient pas les mêmes. Cependant, la comparaison est plus difficile pour les autres valeurs, car selon les données obtenues pour *P. versutus*, *E. coli* et *P. fluorescens* seraient aussi des bactéries mixotrophes, ce qui n'est pas le cas.

La régulation de la RuBisPCase chez *S. disulfidooxidans* peut cependant être légèrement différente de celle des autres bactéries mixotrophes connues; car peu importe les substrats utilisés pour la croissance, l'activité enzymatique spécifique est toujours située entre 3,0 et 4,5 nmole/mg protéine·min. Si la RuBisPCase est régulée par la présence de matière organique, l'activité aurait été plus élevée en croissance en présence de soufre par rapport à celle en présence de soufre et de glucose, ou de glutamate. Un essai réalisé à partir d'un extrait provenant de cellules en croissance dans un milieu contenant seulement une faible concentration d'extrait de levure nous aurait probablement donné une activité spécifique plus élevée, même si nous savons maintenant que *S. disulfidooxidans* ne peut croître en autotrophie complète.

Vu la faible activité de la RuBisPCase, nous avons aussi regardé les autres options qui s'offraient au *S. disulfidooxidans* pour fixer le CO_2 . Nous avons découvert qu'une bactérie aérobie chimiolithotrophe, *Hydrogenobacter thermophilus*, fixe le CO_2 par le cycle de réduction du citrate dont l'ATP:citrate lyase est l'enzyme clé (Ishii *et al.*, 1989). De plus, l'activité de l'ATP:citrate lyase de *Chlorobium limicola* (Antranikian *et al.*, 1982) n'est pas influencée significativement par la présence de matières organiques comme le L-glutamate, l'acétate, le pyruvate ou le propionate. Par ailleurs, la metabactérie *Sulfolobus brierleyi*, une bactérie thiooxydante, pourrait fixer le CO_2 par ce cycle selon une expérience préliminaire (Ishii *et al.*, 1989). Nous avons donc recherché cette enzyme dans les extraits de *S. disulfidooxidans*.

L'ATP:citrate lyase n'est pas présente dans les extraits cellulaires du *S. disulfidooxidans*, la citrate lyase, cependant, l'est. Si l'ATP:citrate lyase a une fonction anabolique chez les Eucaryotes et *C. limicola*, la citrate lyase bactérienne est typiquement une enzyme catabolique (Antranikian et Giffhorn, 1987). De plus, la présence de la citrate synthase et de l' α -cétoglutarate déshydrogénase est caractéristique d'un cycle du citrate fonctionnel, et les deux cycles n'ont jamais été retrouvés chez une même bactérie. *S. disulfidooxidans* ne peut donc pas fixer le CO_2 en utilisant le cycle de réduction du citrate.

Comme, les quantités de $^{14}\text{CO}_2$ fixé par les *Sulfobacillus* sp. ne représentent que 0,3 à 1,0 % du carbone cellulaire. La fixation du $^{14}\text{CO}_2$ observée pourrait donc être le résultat d'une assimilation du CO_2 par les sentiers anaplérotiques, d'autant plus que les connaissances que nous possédons de la fixation du CO_2 par les *Sulfobacillus* sp. ne nous permettent pas d'établir avec certitude que la fixation du CO_2 est effectuée par le cycle de Calvin. Seule des études complémentaires pourraient nous permettre d'éclaircir les incertitudes existantes sur les capacités des *Sulfobacillus* sp. à réellement fixer le CO_2 .

6.6.6.4 Métabolisme des composés soufrés

L'étude du métabolisme du carbone des *Sulfobacillus* sp. a déjà démontré leur capacité à oxyder le soufre en sulfate (section 6.5.5). Cependant, *S. disulfidooxidans* n'oxyde pas le soufre seulement en sulfate, il produit aussi d'autres oxyanions du soufre (Dufresne, 1993). La présence dans le milieu de culture du trithionate et du tétrathionate nous a fait réaliser que le métabolisme du soufre de *S. disulfidooxidans* est très différent de celui des autres bactéries autotrophes. Habituellement les bactéries autotrophes en croissance en présence de soufre élémentaire ne produisent pas de métabolites intermédiaires autre que le sulfite (rarement détectable) et le sulfate lors de son oxydation ultérieure (Kelly, 1989; Smith et Strohl, 1991). Cependant, quelques moisissures et actinomycètes comme *Aspergillus* et *Streptomyces* produisent du thiosulfate et du tétrathionate à partir de soufre (Grayston *et al.*, 1986; Yagi *et al.*, 1971). Le thiosulfate disparaît du milieu après 6 jours d'incubation dans le cas d'*Aspergillus niger*.

Par ailleurs, la production des oxyanions du soufre a peut-être été causée par l'oxydation du soufre organique contenu dans l'extrait de levure (surtout la cystine). Cependant, si c'était vraiment le cas, la production des oxyanions (thiosulfate, trithionate et tétrathionate) aurait dû être similaire pour la croissance du *S. disulfidooxidans* sur le soufre, le glutathion oxydé et le thianthrène. Pourtant, lors de la croissance sur le thianthrène, seul le sulfate a été retrouvé comme métabolite dans le milieu. Comme les deux atomes de soufre retrouvés dans la molécule

sont aux extrémités opposées l'une de l'autre d'un hétérocycle, il aurait été peu vraisemblable qu'il y ait une production de thiosulfate, de trithionate ou de tétrathionate à partir de cette molécule. La seule source aurait alors été l'extrait de levure et nous avons éliminé cette option. Le système d'oxydation des composés soufrés des *Sulfobacillus* sp. est donc différent de celui des bactéries thio-oxydantes à gram-négatif ce qui peut être causé par l'absence de l'espace périplasmique chez les bactéries à gram-positif, espace qui joue un rôle très important dans l'oxydation du soufre par les bactéries gram-négatives (Norris, 1990).

De plus, les pH finals des cultures *S. disulfidooxidans* en présence de soufre étaient très près des valeurs théoriques estimées à partir d'une courbe de titrage du milieu de culture par de l'acide sulfurique lorsque nous avons converti la concentration des sulfates dosés en acide sulfurique. Cependant, aucun bilan du soufre n'a été effectué pour tenir compte de pouvoir acidifiant des oxyanions du soufre produits.

6.6.6.5 Métabolisme mixotrophe des *Sulfobacillus* sp.

Malgré des incertitudes au niveau de la fixation du CO₂, nous pouvons classer les *Sulfobacillus* sp. parmi les bactéries mixotrophes. La mixotrophie est définie comme étant soit la capacité à utiliser les composés inorganiques comme source d'énergie et les composés organiques comme source de carbone, ou la capacité à utiliser le CO₂ et les composés organiques comme source de carbone (Chapitre 2, p.24). Le métabolisme des *Sulfobacillus* sp. est conforme à la première définition, puisqu'ils utilisent le soufre comme source d'énergie et le glucose comme source de carbone. Il pourrait aussi être conforme à la deuxième définition si la capacité à fixer le CO₂ avait été prouvée avec certitude, ce qui n'est pas le cas.

Les *Sulfobacillus* sp. peuvent être classées parmi les catégories décrites par Kuenen et Bos (1989) pour les bactéries non photosynthétiques thio-oxydantes (Chapitre 2, p.30). Ils ne peuvent être considérés comme des chimiolithoautotrophes facultatifs, car ils sont incapables de croître en absence complète de matière organique (en autotrophie complète). Cependant, ils peuvent être considérés comme des chimiolithohétérotrophes. Mais si nous découvrons que les *Sulfobacillus* sp. ont la capacité de fixer le CO₂, ils répondraient alors aux deux définitions de la mixotrophie. À ce moment, ils pourraient être classés dans leur propre catégorie, les chimiolithomixotrophes : chimio, car ils tirent leur énergie de composé chimique; litho, car ils peuvent tirer leur énergie de l'oxydation de composés inorganiques, même si certains composés organiques semblent aussi pouvoir remplir ce rôle; et mixo, puisqu'ils fixeraient le CO₂ et utiliseraient simultanément une source de carbone organique exogène (Tableau 6.9).

Tableau 6.9 Liste révisée des types physiologiques des bactéries non photosynthétiques thio-oxydantes

Type physiologique	Source d'énergie		Source de carbone	
	composé soufré inorganique	composé organique	CO ₂	composé organique
Chimiolithoautotrophe obligatoire	+	-	+	-
Chimiolithoautotrophe facultatif ¹	+	+	+	+
Chimiolithomixotrophe ²	+	+	(+) ?	+
Chimiolithohétérotrophe ³	+	+	-	+
Chimioorganohétérotrophe	-	+	-	+

¹. Espèce bactérienne qui peut croître en autotrophie ou en hétérotrophie complète.

². Espèce bactérienne qui ne peut croître en autotrophie complète, et qui nécessite la présence de matière organique.

³. Espèce qui peut croître en hétérotrophie complète.

Nous sommes donc en présence de bactéries qui ont des besoins nutritifs complexes, mais qui semblent s'être adaptées aux variations de leur environnement en s'associant à des microorganismes qui peuvent leur fournir ces substances.

6.6.7 Analyse taxinomique

Selon l'analyse phylogénétique (section 6.2), le genre *Alicyclobacillus* serait celui le plus près d'un point de vue phylogénétique. De plus, les caractéristiques morphologiques (section 6.1) et l'analyse des lipides membranaires (section 6.3) nous permettraient de l'inclure dans ce genre (Tableau 6.10).

Tableau 6.10 Caractéristiques morphologiques du *S. disulfidooxidans* SD-11 et des espèces du genre *Alicyclobacillus*

Caractéristiques	<i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i> SD-11	<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> DMS 4006 ¹	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ²	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ³
Source	Boue usée de Blake Lake, Québec, Canada	Sol station service, Losheim, Saarland	Eau thermale acide et sol	Sols de forêts et de jardins
% G+C	53 ± 1	55 ± 1	61 ± 1	52 ± 1
Morphologie cellulaire				
Gram	+	+	+	+
	Bâtonnet 0,3-0,5x0,9-3,6µm; seul, en paire, ou en chaînes	Bâtonnet 0,3-0,6x2,5-4,5µm; seul, en paire, ou en chaînes	Bâtonnet 0,7-0,8x2-3µm; seul, en paire, ou en chaînes	Bâtonnet 0,6-0,8x2,9-4,3µm; seul, en paire, ou en chaînes
lipides membranaires	acide ω-cyclohexyle	acide ω-cycloheptyle	acide ω-cyclohexyle	acide ω-cyclohexyle
Motilité	-	-	n.d.	n.d.
Croissance anaérobie	+	+	-	n.d.

¹. (Deinhard *et al.*, 1987a)

². groupe d'isolats d'*Alb. acidocaldarius*, (Darland et Brock, 1971)

³. groupe d'isolats d'*Alb. acidoterrestris*, (Deinhard *et al.*, 1987b)

Cependant, les caractéristiques physiologiques de notre isolat et des trois espèces formant le genre *Alicyclobacillus* sont trop différentes pour que le *S. disulfidooxidans* et le *Sulfobacillus* sp. SD-9 soient inclus au sein de ce genre (Tableau 6.11). Les espèces du genre *Alicyclobacillus* ne peuvent croître à des températures inférieures à 40°C, contrairement à *S. disulfidooxidans* dont l'intervalle de température de croissance se situe entre 4°C et 37°C. De plus, les espèces bactériennes du genre *Alicyclobacillus* sont hétérotrophes, elles oxydent le galactose ainsi que d'autres sucres et elles produisent des acides organiques lors de leur utilisation. Contrairement à ces derniers, *S. disulfidooxidans* est mixotrophe, il n'oxyde pas le galactose, mais il oxyde les composés soufrés en oxyanions du soufre et en acide sulfurique. Nous avons aussi déterminé que le *S. disulfidooxidans* peut être inhibé par une concentration de matières organiques supérieure à 0,5 % ce qui n'est pas le cas pour les espèces du genre *Alicyclobacillus*.

Tableau 6.11 Caractéristiques physiologiques du *S. disulfidooxidans* et des espèces du genre *Alicyclobacillus*

Caractéristiques	<i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i>	<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> DMS 4006 ¹	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ¹	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ¹
pH				
optimum de croissance	1,5-2,5	3,5-5,5		
intervalle de croissance	0,5-6,0	3,0-5,5	2,0-6,0	2,2-5,8
Température				
optimum de croissance	35°C	48°C		42-53°C
intervalle de croissance	4-37°C ²	40-53°C	45-70°C	35-55°C
Facteurs de croissance	Extrait de levure	Ile, Met ou B ₁₂ , pantothénate	-	-
Croissance dans:⁴				
S ^o	+	-	n.d.	n.d.
Fe ²⁺	-	n.d.	n.d.	n.d.
S ₂ O ₃ ⁻	-	-	n.d.	n.d.
Fe ₂ S	+	-	n.d.	n.d.
extrait de levure	(+) ⁵	+	+	+
acétate	-	-	n.d.	n.d.
cystamine	+	n.d.	n.d.	n.d.
cystéine	+	+	n.d.	n.d.
cystine	+	+	n.d.	n.d.
dithio(bis)benzothiazole	+	n.d.	n.d.	n.d.
galactose	-	+	+	+
glucose	+	+ acide ³	+ acide ³	+ acide ³
glutamate	+	-	n.d.	n.d.
glutathion	+	+	n.d.	n.d.
glycérol	+	+	+	+
Croissance sur:⁶				
FTG	+	-	n.d.	n.d.
FeTSB	-	-	n.d.	n.d.
BAM agar	-	+	+	+

¹. Résultats basés sur cette étude et celle de Deinhard *et al.* (1987a); groupe d'isolats d'*Alb. acidocaldarius*, (Darland et Brock, 1971); groupe d'isolats d'*Alb. acidoterrestris*, (Deinhard *et al.*, 1987b)

². germination des spores : 4°C

³. formation d'acide lorsqu'il y a croissance sur le substrat

⁴. *S. disulfidooxidans* SD-11 : bouillon 9K-EL pH 2,25; *Alicyclobacillus* sp. : bouillon BAM pH 4,0

⁵. dépend de la concentration : - à 0,001%, + à 0,01%

⁶. FTG et BAM : voir annexe B, FeTSB : milieu contenant du sulfate ferreux et de l'extrait tryptique de soya

- : croissance négative, + : croissance positive, n.d. : non déterminé

De plus, les essais enzymatiques en microplaques ont permis de relever quelques différences au niveau des enzymes présents chez les *Sulfobacillus* sp. et *Alb. cycloheptanicus* (Tableau 6.4). Ce dernier possède les enzymes du cycle du glyoxylate. Cependant, ils ont aussi plusieurs enzymes en commun, et les essais enzymatiques en microplaques ne permettent que de vérifier la présence des enzymes et non de comparer entre elles celles de deux ou de plusieurs espèces bactériennes. Par ailleurs, il est toujours possible de purifier les enzymes pour les comparer, ce processus est cependant long et laborieux. Nous avons donc recherché une technique qui nous permettrait de comparer les enzymes de plusieurs bactéries en plus d'en vérifier la présence tout en limitant les manipulations.

La technique d'électrophorèse sur gel d'amidon possédait toutes les caractéristiques que nous recherchions. En plus d'être économique et rapide, elle garde les enzymes dans leur état natif contrairement à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dont plusieurs solutions contiennent du SDS qui dénature les protéines. De plus, les gels d'amidon peuvent être coupés en plusieurs tranches ce qui permet de réaliser plusieurs essais enzymatiques par gel. La puissance de résolution des gels d'amidon est aussi très bonne comparée aux gels de cellulose-acétate, d'agarose et de polyacrylamide, puisque la texture du gel permet une séparation des enzymes basée sur leur grosseur en plus de leur charge (Mancheko, 1994).

L'électrophorèse sur gel d'amidon a été développée pour l'étude phénotypique des isoenzymes des eucaryotes (Linstrom, 1993; Motta *et al.*, 1991), des plantes (Augustian *et al.*, 1994; Kennedy et Thompson, 1991; Marquard *et al.*, 1989), des fruits (Arulsekhar et Parfitt, 1986; Rovira *et al.*, 1993; van Heemstra *et al.*, 1991), des insectes (Yong, 1984; Yong, 1991), etc... Les zymogrammes obtenus étaient utilisés pour séparer et classer les différents organismes ou encore pour suivre l'évolution des allèles des enzymes. Depuis plusieurs années, la méthode des isoenzymes sur gels d'amidon a été utilisée pour la taxinomie des bactéries phylogénétiquement rapprochées (Engvild et Nielsen, 1985; Gardes *et al.*, 1987). Cette technique a aussi été utilisée pour étudier les enzymes des bactéries (Mancheko, 1994).

Les différences entre les zymogrammes des *Sulfobacillus* sp. et d'*Alb. cycloheptanicus* ne permettent pas à elles seules de définir un nouveau genre, puisque nous n'avons pas démontré préalablement une uniformité des patrons d'isoenzymes entre les souches d'*Alicyclobacillus*. Cependant, les *Sulfobacillus* sp. sont chimiolithohétérotrophes (ou mixotrophes) et thio-oxydants alors que les espèces bactériennes du genre *Alicyclobacillus* sont chimioorganohétérotrophes et qu'ils ne sont pas reconnues pour oxyder les composés soufrés ni pour fixer le CO₂.

Sur la base de ces caractéristiques morphologiques, biochimiques, physiologiques et phylogénétiques, l'identification du *Sulfobacillus disulfidooxidans* comme une nouvelle espèce du genre *Sulfobacillus* a été confirmée. Cette souche a par la suite été déposée à l'American Type Culture Collection sous le numéro ATCC 51911 (Dufresne *et al.*, 1996; Annexe P).

6.6.8 Controverse à propos du genre *Sulfobacillus*

Malgré une caractérisation exhaustive du *S. disulfidooxidans*, des résultats publiés en 1996 par le Dr P. Norris (Norris *et al.*, 1996) ainsi que plusieurs communications avec les Dr B. Goebel et D.B. Johnson nous ont obligé à réviser la taxinomie du *S. disulfidooxidans*. Selon ces nouveaux résultats, la séquence de l'ADNr 16S de la souche *S. thermosulfidooxidans* VKM-1269, déposée dans le GenBank par l'équipe de chercheurs Russes qui l'a isolée et caractérisée, serait celle d'un contaminant.

L'ADNr du 16S de *S. thermosulfidooxidans* VKM-1269 a été reséquencé à partir d'un produit d'amplification PCR par P. Durant (numéro d'accession X91080) en 1995. Cette fois, la séquence obtenue était semblable à celle de la bactérie thermo-acidophile BC1. De plus, Norris *et al.* (1996) ont publié de nouveau la séquence de l'isolat BC (numéro d'accession U75648) en octobre 1996 et ils ont identifié cet isolat comme étant *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* BC. Ils ont aussi nommé l'isolat ALV *Sulfobacillus acidophilus*. Les deux groupes de bactéries étant très éloignés dans l'arbre phylogénétique, il serait surprenant que *S. disulfidooxidans* SD-11 et *S. thermosulfidooxidans* VKM-1269 ainsi que *S. thermosulfidooxidans* BC et *S. acidophilus* ALV fassent partie du même genre. Une controverse a alors été introduite à savoir laquelle des deux séquences représentaient le genre *Sulfobacillus* et quel groupe devrait porter le nom du genre *Sulfobacillus* ?

Il n'y a aucun doute au niveau phylogénétique que *S. disulfidooxidans* ne fait pas partie du même genre que *S. thermosulfidooxidans* BC et *S. acidophilus* ALV. Cependant, de quel groupe l'isolat VKM-1269 fait-il partie? La réponse à cette question permettrait de déterminer qu'elles sont les espèces du genre *Sulfobacillus*.

Il faut d'abord considérer la provenance des séquences déposées dans la banque de donnée GenBank pour l'ADNr 16S de l'isolat VKM-1269. Celle déposée par Tourova *et al.* en 1993 provenait d'un clone et non directement d'un produit d'amplification PCR. Il est alors possible que leur séquence provienne d'un contaminant ou que la culture de départ ait été mixte. Au contraire, celles déposées par P. Durant en 1995 ainsi que Norris *et al.* en 1996 provenaient directement de produits d'amplification PCR. Il est assez rare que le produit d'amplification

d'une culture mixte obtenu par réaction PCR puisse être séquencé directement, à moins que ce soit deux espèces très proches l'une de l'autre, ce qui n'est pas le cas ici. Cependant, si les conditions de culture utilisées favorisaient l'une des deux espèces et que celle-ci était vraiment majoritaire comparativement à la deuxième, il est possible que le produit PCR puisse être séquencé directement et qu'il ne donne qu'une seule séquence. La provenance des séquences ne nous a pas permis de répondre à la question, mais elle a maintenu le doute que nous avons sur la pureté de l'isolat VKM-1269.

Nous avons ensuite comparé l'analyse des lipides de *S. disulfidooxidans* SD-11 avec celle de *S. thermosulfidooxidans* VKM-1269. La comparaison n'a pas été faite dans les cas de *S. thermosulfidooxidans* BC et *S. acidophilus* ALV, car l'analyse lipidique de ces espèces n'a pas encore été réalisée. Quelques différences ont déjà été notées entre l'analyse des lipides de *S. disulfidooxidans* SD-11 et de *S. thermosulfidooxidans* VKM-1269 à la section 6.6.3. De plus, en analysant les résultats obtenus lors de la croissance en conditions autotrophes de *S. thermosulfidooxidans* VKM-1269, aucun acide gras cyclique n'a été retrouvé lorsque la bactérie se développe dans un milieu contenant du sulfate ferreux (Tsaplina *et al.*, 1994). Cependant, Tsaplina *et al.* (1994) ont retrouvé 37,8 % d'acide ω -cyclohexane C₁₇ après croissance en présence de soufre. Cette différence est assez inattendue, puisque ce lipide pourrait jouer un rôle de stabilisation de la membrane dans un environnement extrême (DeRosa *et al.*, 1972). Dans le cas présent, l'acidification du milieu observé lors de la croissance en présence de soufre pourrait expliquer cette différence. Lorsque les cellules ont été cultivées dans des conditions de croissance mixotrophe en présence de sulfate ferreux ou de pyrite et d'extrait de levure, sensiblement les mêmes acides gras que ceux retrouvés lorsque les cellules étaient cultivées dans des conditions de croissance autotrophe en présence de sulfate ferreux ont été retrouvés. Cependant, en conditions d'hétérotrophie, les résultats sont similaires à ceux obtenus en conditions d'autotrophie en présence de soufre. L'acidification du milieu n'influencerait donc pas la présence ou l'absence des acides gras ω -cycliques chez *S. thermosulfidooxidans* VKM-1269. Il serait donc possible que la culture isolée par les chercheurs Russes ait été mixte. L'une des espèces serait dominante en nombre lors de la croissance en présence de sulfate ferreux ou de pyrite alors que l'autre espèce dominerait en présence de soufre ou de glucose. Une situation analogue a d'ailleurs donné lieu à l'isolement d'une nouvelle espèce de *Thiobacillus*, *T. acidophilus* à partir d'une culture soi-disant pure de *T. ferrooxidans* (Guay et Silver, 1975).

L'analyse des lipides démontre que les conditions de culture employées ont probablement favorisé la croissance d'une espèce au détriment de l'autre. Les conditions employées pour faire croître *S. thermosulfidooxidans* VKM-1269 lors des analyses

phylogénétiques ont donc joué un rôle très important. D'après le Dr B. Goebel (1997), P. Durand et Norris *et al.* ont utilisé des conditions de croissance autotrophe (extrait de levure et sulfate ferreux) alors que Tourova *et al.* ont employé des conditions de croissance hétérotrophe (glucose et extrait de levure). Cette observation confirme notre hypothèse, puisque la séquence provenant des cellules cultivées en conditions d'hétérotrophie est semblable à la nôtre alors que celles obtenues en conditions d'autotrophie sont identiques. Cependant, il y a toujours la possibilité que la culture ait été purifiée lors de sous-cultures de routine et que la souche VKM-1269 ne contienne plus que l'espèce similaire au *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* BC. Cette différence dans les conditions de cultures employées expliquerait que la culture dont l'ADNr 16S a été séquencé par P. Durand et Norris *et al.* semblait être pure et que le produit PCR ne donnait qu'une séquence, car l'autre espèce était en trop faible concentration pour influencer le PCR. Cette explication est très plausible, puisque l'ADN de notre consortium amplifié par PCR et dont le produit de réaction a été séquencé directement (350 paires de base) a donné 99 % d'homologie avec les séquences connues de *T. ferrooxidans*/*T. thiooxidans* lors du premier essai (voir section 8.?). Alors pourquoi le même phénomène ne se serait-il pas produit dans le cas de la souche VKM-1269?

Comme la description du genre *Sulfobacillus* par Golovacheva et Karavaiko (1978) était probablement basée sur une culture mixte, il est difficile de dire quelles caractéristiques proviennent de quelles espèces dans la description du genre. De plus, il existe des différences physiologiques entre les deux groupes du genre *Sulfobacillus*. *S. disulfidooxidans* SD-11 n'oxyde pas le sulfate ferreux, malgré que le *Sulfobacillus* sp. SD-9 possède cette propriété. Il ne produit pas ou peu d'acide sulfurique lorsqu'il oxyde le soufre élémentaire en condition de croissance autotrophe, mais il y a une faible production d'acide sulfurique en condition de croissance mixotrophe. De plus, nos isolats sont mésophiles. Par ailleurs, *S. thermosulfidooxidans* BC (Norris *et al.*, 1996), *S. acidophilus* ALV (Norris *et al.*, 1996) et *Acidimicrobium ferrooxidans* TH3 (Clark et Norris, 1996) peuvent fixer le CO₂, ou utiliser le glucose ou l'extrait de levure comme source de carbone. De plus, ils utilisent le fer ferreux comme source d'énergie et produisent de l'acide sulfurique en croissance en présence de soufre, et sont tous thermo-tolérants.

Cependant, malgré ces similitudes physiologiques, l'analyse phylogénétique a démontré que *S. disulfidooxidans* et le *Sulfobacillus* sp. SD-9 ne sont pas apparentés aux autres espèces du genre *Sulfobacillus* et au genre *Acidimicrobium* (Figure 6.2).

D'après les dernières observations, nous avons décidé d'un commun accord avec le Comité International de Taxonomie de classer le *Sulfobacillus disulfidooxidans* SD-11 dans un autre genre. L'appartenance de certains de nos isolats à un nouveau genre a été proposée en raison des différences physiologiques qui existent avec le genre qui leur était le plus apparenté au niveau phylogénétique, *Alicyclobacillus*. Ces différences ont été discutées à la section précédente (6.6.7) et lors de l'assignation de l'isolat SD-11 au genre *Sulfobacillus* (Dufresne *et al.*, 1996; Annexe P). Sur la base de ces nouvelles données, *S. disulfidooxidans* SD-11 ATCC 51911 a été renommé *Acidobacter disulfidooxidans* gen. nov. comb. nov.

6.6.9 Description d'*Acidobacter disulfidooxidans* gen. nov. comb. nov.

***Acidobacter* gen. nov.** *Acidobacter* (A.ci.do'bac.ter, M.L. neut.n. acidum, acide; Gr fem. n. baktêria, bâton, bactérie; M.L. masc.n. Acidobacter, reflétant les conditions de croissance acidophiles de la bactérie). Les cellules sont des bâtonnets gram-positifs, aérobies facultatifs, formant des spores ovales, déformantes en positions sub-terminales ou terminales, retrouvées seules, en paires ou en courtes chaînes. Les acides ω -cycliques hydroxylés ou non sont retrouvés parmi les lipides membranaires.

L'intervalle de pH de croissance est compris entre 0,5 et 6,0. Les membres de cette espèce peuvent être mésophiles ou thermo-tolérants. Ils nécessitent la présence de facteurs de croissance comme l'extrait de levure pour croître. Ils sont mixotrophes, car ils tirent leur énergie de l'oxydation de certains composés inorganiques comme le soufre élémentaire tout en utilisant le carbone organique comme source de carbone. Ils pourraient aussi utiliser le CO₂ comme source de carbone.

Le genre *Acidobacter* est relié au genre *Alicyclobacillus* dans le groupe des bactéries gram-positives au % G+C bas (< 55 %) selon l'analyse phylogénétique.

***Acidobacter disulfidooxidans* comb. nov.** *Acidobacter disulfidooxidans* (di.sul.fi.do.ox'i.dans. L. adj. *duplus*, double; L n. *sulfur*, soufre; M.L. v. *oxido*, oxydé; M.L. adj. *disulfidooxidans*, bactérie oxydant les disulfures) est une bactérie aérobie en forme de bâtonnet (0,3-0,5 μ m x 0,9-3,6 μ m) formant des spores ovales, déformantes, en position sub-terminale ou terminale. Les cellules sont quelques fois pléomorphes et apparaissent allongées avec l'âge. De longues chaînes apparaissent seulement dans certaines conditions de croissance. Les cellules sont non mobiles et la structure membranaire est celle des bactéries gram-positives même si la coloration de Gram est variable. Les lipides membranaires contiennent les acides ω -cyclohexane- α -OH-C₁₇, ω -cyclohexane-C₁₇, et ω -cyclohexane-C₁₅. *A. disulfidooxidans* forme

de petites colonies (1 mm), rondes, bombées, incolores à légèrement rosées sur le milieu FTG. En milieu liquide, les chaînes ont une tendance à flocculer.

Le pH optimum de croissance se situe entre pH 1,5 à 2,5, et la croissance est possible de pH 0,5 à 6,0. La température optimale est de 35°C, mais l'intervalle de croissance va de 4°C à 37°C. Elle utilise le glucose, le glutamate, le glutathion oxydé et réduit lors de la croissance en conditions d'hétérotrophie. L'extrait de levure est nécessaire comme facteur de croissance. Aucune formation d'acide n'a été observée en cours de croissance sur les hydrates de carbone (grille API 50CH). Le contenu en G+C de l'ADN déterminé par le profil de dénaturation thermique est de 53±1 %.

CHAPITRE 7

RÉSULTATS ET DISCUSSION: LES *METHYLOBACTERIUM*

- ◆ Morphologie :
 - bâtonnets gram-négatifs mobiles et pléomorphes
 - granules de poly- β -hydroxybutyrate
 - formation de rosettes
- ◆ Phylogénie :
 - SD-7 et SD-8 : deux sous-espèces
 - *Methylobacterium* sp.
- ◆ Biochimie :
 - microaérophile
- ◆ Physiologie :
 - acidotolérant
 - hétérotrophe
- ◆ Taxinomie polyphasique
 - *Methylobacterium lavalensis* ATCC 700534

Methylobacterium lavalensis

CHAPITRE 7

7. RÉSULTATS: LES *METHYLOBACTERIUM*

L'identification des isolats SD-7 et SD-8 a aussi été réalisée par étapes comme pour les *Acidobacter* sp. Nous avons d'abord analysé leur morphologie, puis nous avons procédé à une étude phylogénétique pour déterminer le genre bactérien auquel ils appartenaient. Ensuite, nous avons caractérisé certaines de leurs propriétés biochimiques, la demande en oxygène ainsi que les sources d'azote. Les caractéristiques physiologiques ont aussi été étudiées. Nous avons finalement procédé à une analyse taxinomique.

7.1 Caractérisation morphologique

Les isolats SD-7 et SD-8 étaient morphologiquement identiques. C'étaient des bâtonnets de 0,5-1,0 μm x 2,0-6,0 μm non sporulés. En condition de croissance microaérophile, un amincissement et une élongation des bâtonnets ont été observés. La coloration de Gram a souvent donné une réaction différente selon l'âge et le milieu sur lequel les cellules avaient été cultivées. Quelques fois, la coloration de Gram était variable et d'autres fois les cellules ne prenaient tout simplement pas la coloration. Ces problèmes ont aussi été observés lors des différentes techniques de coloration employées pour l'identification des granules de réserves. De ce fait, ils n'ont pu être identifiés par ces méthodes. Une zone claire autour des cellules observée en microscopie photonique, indicatrice d'une capsule, pourrait expliquer les problèmes de colorations. De plus, lors de l'extraction de l'ADN, une substance visqueuse a été retrouvée

entre la phase aqueuse et la phase organique. Cette couche était possiblement formée de molécules de la capsule insoluble dans la phase organique.

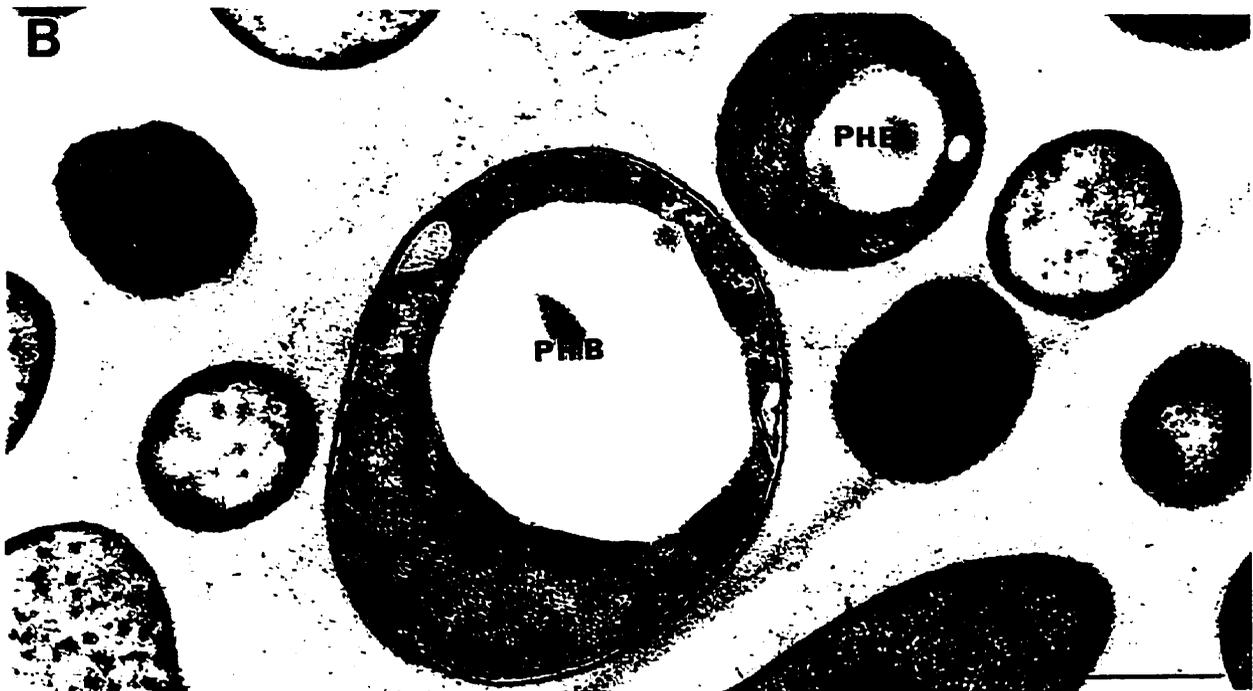
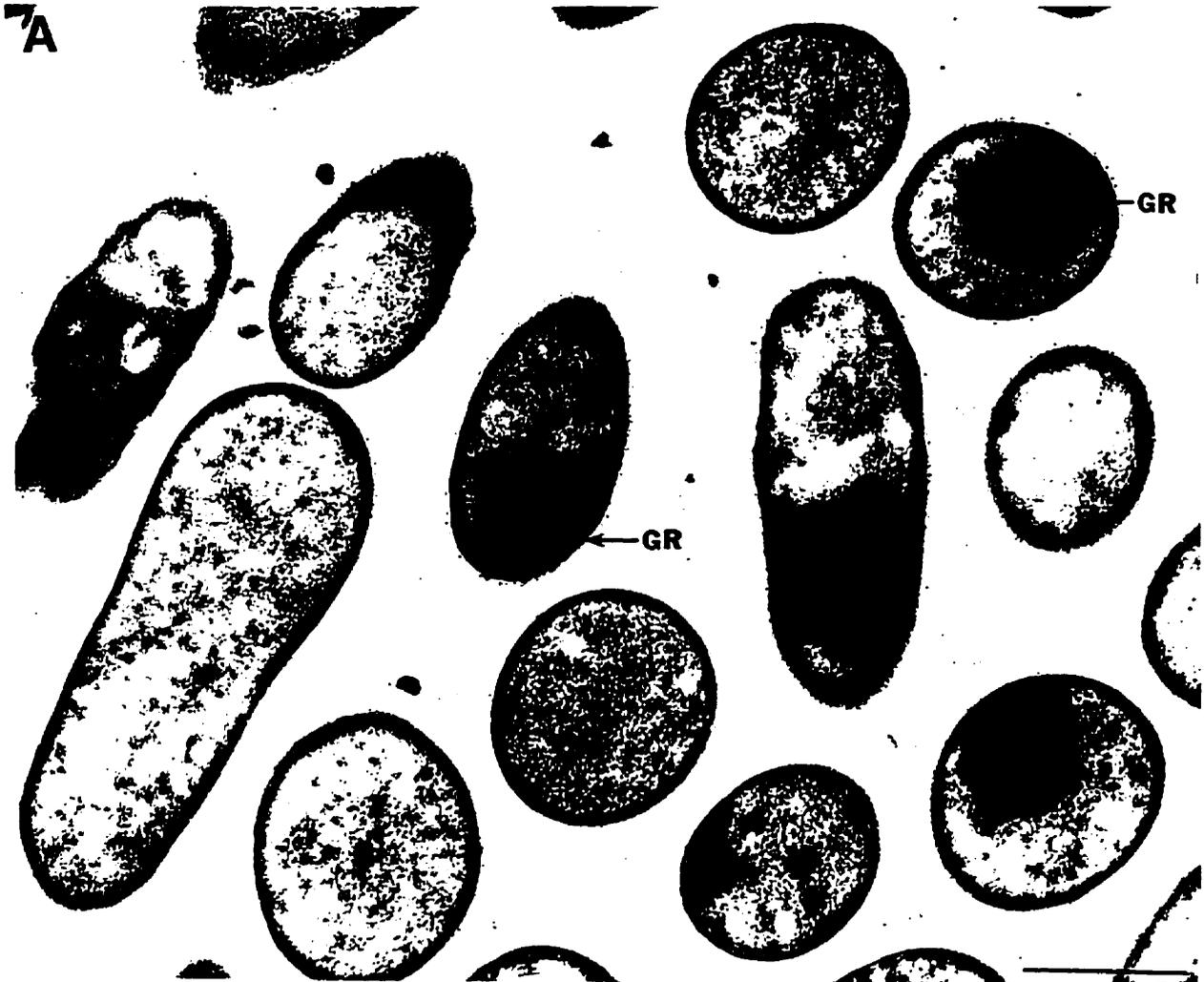
La microscopie électronique à transmission sur des sections des cellules de l'isolat SD-8 nous a permis d'identifier la nature des granules de réserves. Les granules noirs (denses aux électrons) sans membrane et observés sur les sections (Figure 7.1 A) pouvaient être composés de polyphosphate ou de glycogène. Les granules réfringents observés en microscopie photonique étaient composés de poly- β -hydroxybutyrate (PHB), car ils apparaissaient transparents et entourés d'une membrane sur les sections (Figure 7.1 B) ce qui était probablement dû à la dissolution partielle du PHB dans les solvants organiques durant la préparation des échantillons (Mayer, 1986). De plus, la propriété d'accumuler du PHB a déjà été observée chez un grand nombre de bactéries. La coloration de Gram des isolats demeurait cependant incertaine.

7.2 Séquence de l'ADNr 16S et topologie de l'arbre phylogénétique

La méthodologie employée pour identifier les *Acidobacter* a aussi été utilisée pour identifier les isolats SD-7 et SD-8.

Les séquences de l'ADNr du 16S des isolats SD-7 et SD-8 s'étant avérées identiques, l'analyse phylogénétique a donc été poursuivie avec la séquence obtenue pour l'isolat SD-8 (Annexe M). Le programme BLAST de la NCBI et la fonction SIMILARITY-RANK de la RDP ont été utilisés pour rechercher les séquences les plus parentes à la séquence de l'ADNr 16S de l'isolat SD-8 (Annexe M). L'isolat SD-8 présentait 99,5 % d'homologie avec *Methylobacterium* sp. F05 et 99,3 % avec *M. radiotolerans* (Tableau 7.1). *M. radiotolerans* était l'espèce reconnue la plus près de nos isolats (S_{ab} 0,962). Le rapport transition/transversion de l'isolat SD-8 par rapport à *M. radiotolerans* était de 1,667. Cependant, l'ordre des séquences des ADNr 16S de *M. radiotolerans* et du *Methylobacterium* sp. F37 était différent dans leur classement respectif parmi les autres séquences retenues en fonction des deux méthodes utilisées.

Figure 7.1 Photomicrographies électroniques à transmission sur des sections de l'isolat SD-8. (A). Photomicrographie montrant les granules de réserve (de polyphosphate ou de glycogène) (GR) et le polymorphisme des cellules (forme de bâtonnet et de massue). (B) Photomicrographie des granules de PHB et de la membrane. (Barre = 0,5 μm)



Présentement, il existe neuf espèces dans le genre *Methylobacterium* sur la liste de validation du périodique International Journal of Systematic Bacteriology. En plus des sept espèces dont les séquences sont retrouvées dans la banque de séquence GenBank, deux autres espèces ont été décrites dans la littérature : *M. aminovorans* (Urakami *et al.*, 1993) et *M. fujisawaensa* (Green *et al.*, 1988). Cependant, les ADN_r du 16S de ces deux espèces n'ont jamais été séquencés et ils n'ont donc pas été inclus dans l'analyse phylogénétique que nous avons réalisée pour identifier nos isolats à l'espèce.

La topologie de l'arbre phylogénétique de la séquence de l'isolat SD-8 a d'abord été estimée par le programme fastDNAm1 de Gary Olsen (RDP) basé sur la méthode du "maximum likelihood". En plus des séquences des *Methylobacterium*, nous avons inclus dans l'analyse les séquences de *E. coli* et de *T. thiooxidans* ainsi que celle de *B. indica* (numéro d'accession M59060). L'arbre phylogénétique obtenu (Figure 7.2 A) était sensiblement le même que celui publié par Hiraishi *et al* (1995) et estimé par la méthode d'analyse de neighbor-joining. Dans les deux cas, trois sous-groupes ont été retrouvés : le premier incluait *M. organophilum*, *M. zatmanii*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum* et *M. exorquens*; le deuxième était composé de *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans* et de l'isolat SD-8; alors que le troisième comprenait deux espèces isolées par Hiraishi *et al.* (1995).

Par la suite, la topologie de l'arbre a été estimée selon les deux méthodes utilisées pour l'identification de *A. disulfidooxidans*, une analyse de parcimonie et une analyse de neighbor-joining, (Figure 7.2 B) qui ont donné une topologie similaire. Cependant, la topologie de ces arbres était légèrement différente de celle obtenue par la méthode du "maximum likelihood". Les isolats du sous-groupe III ainsi que l'isolat BF10 étaient séparés en deux sous-groupes de part et d'autre du sous-groupe I. Ces différences toutefois n'influençaient pas la position de l'isolat SD-8 parmi les espèces du genre *Methylobacterium*.

Tableau 7.1 Identité des séquences de l'ADNr 16S entre l'isolat SD-8 et les espèces du genre *Methylobacterium* ainsi que quelques protéobactéries¹

	<i>Methylobacterium</i>																							
	sous-groupe II ²								sous-groupe III ²						sous-groupe I ²						non classé			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 SD-8		99,9	99,7	99,4	99,3	99,1	97,8	97,7	97,2	96,2	95,6	95,9	94,6	94,6	95,7	95,2	94,4	94,1	94,1	93,9	93,7	88,3	78,3	75,6
2 <i>M. sp.</i> F05			99,6	99,3	99,3	99,1	97,7	97,6	97,1	96,0	95,5	95,8	94,5	94,6	95,5	95,2	94,3	94,1	94,0	93,8	93,6	88,3	78,3	75,7
3 <i>M. sp.</i> F15				99,2	99,2	99,0	97,6	97,5	97,2	96,1	95,6	95,9	94,6	94,7	95,7	95,2	94,4	94,1	94,1	93,9	93,7	88,3	78,0	75,3
4 <i>M. sp.</i> F73					99,5	99,6	98,4	97,7	97,5	96,4	95,4	96,0	94,3	94,6	95,9	95,2	94,6	94,3	94,3	94,1	93,8	88,1	78,3	75,6
5 <i>M. radiotolerans</i>						99,3	98,1	97,7	97,4	96,1	95,8	96,4	94,3	94,8	96,0	95,1	94,6	94,4	94,5	94,1	93,9	88,6	78,9	74,7
6 <i>M. sp.</i> BF15							98,3	97,5	97,1	96,0	95,3	95,5	94,0	94,2	95,5	94,8	94,1	93,9	93,9	93,6	93,4	87,9	78,8	76,0
7 <i>M. sp.</i> PC3039								97,3	97,1	95,4	94,4	94,8	93,3	94,2	94,2	93,5	93,3	93,0	93,1	92,9	92,5	87,3	76,8	74,7
8 <i>M. mesophilicum</i>									99,2	95,1	94,6	95,7	94,3	94,6	95,5	94,5	94,2	94,0	94,2	94,1	93,5	89,2	77,5	76,0
9 <i>M. sp.</i> F18										95,2	94,6	95,5	94,1	94,7	95,6	95,1	94,4	94,1	94,1	94,0	93,6	88,7	77,4	75,3
10 <i>M. sp.</i> F42											93,7	94,1	94,2	94,5	94,6	92,9	93,5	93,6	93,5	93,4	92,9	87,8	77,5	74,6
11 <i>M. sp.</i> BF10												95,3	93,4	95,0	94,7	94,5	95,3	95,2	95,0	94,8	94,9	88,3	78,8	74,8
12 <i>M. sp.</i> F37													95,8	95,9	96,2	94,1	94,8	94,6	94,5	94,4	93,8	90,0	78,8	75,3
13 <i>M. sp.</i> PC3044														95,2	94,6	92,1	93,0	92,7	92,7	92,3	91,9	88,4	77,7	74,4
14 <i>M. sp.</i> F48															95,5	94,7	95,3	95,1	94,9	94,7	94,5	89,7	76,8	75,1
15 <i>M. organophilum</i>																95,9	96,8	96,6	96,6	96,2	95,7	90,1	78,2	74,7
16 <i>M. rhodinium</i>																	97,7	97,5	97,2	97,0	97,3	88,4	76,7	73,7
17 <i>M. extorquens</i>																		99,8	99,0	99,1	99,0	89,2	78,2	74,4
18 <i>M. sp.</i> GK101																			98,8	98,9	98,9	88,9	77,8	74,4
19 <i>M. rhodesianum</i>																				99,4	98,4	89,1	78,1	75,1
20 <i>M. sp.</i> GK118																					98,5	89,2	77,8	74,6
21 <i>M. zatmanii</i>																						88,5	77,2	74,2
22 <i>B. indica</i>																							75,9	76,0
23 <i>T. thiooxidans</i>																								79,7
24 <i>E. coli</i>																								

¹ Basée sur l'alignement de 1327 nucleotides (Neiborg-joining à deux paramètres de Kimura par déletion des séquences pairées)

² Hiraishi *et al*, (1995)

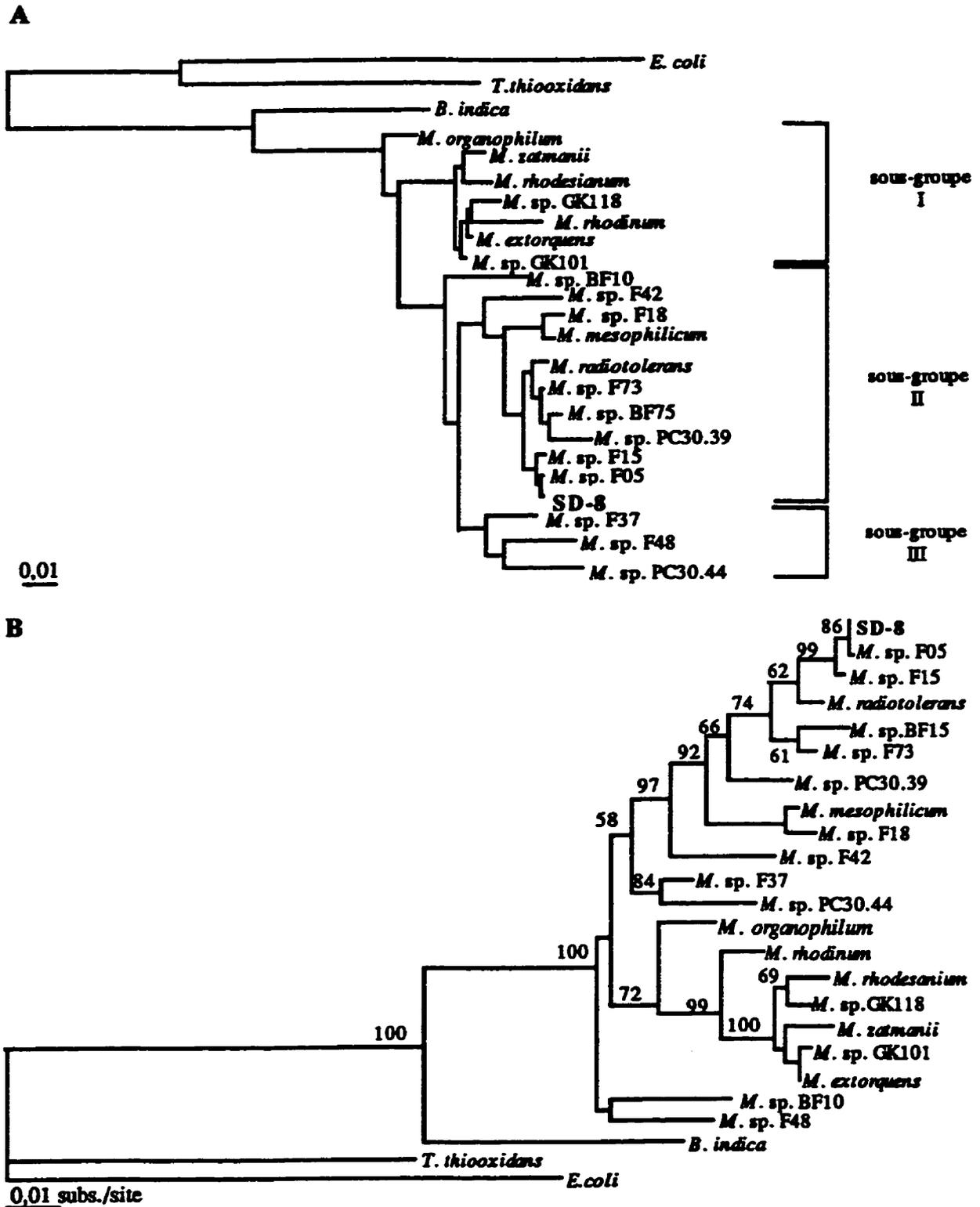


Figure 7.2 Position phylogénétique de l'isolat SD-8 parmi les bactéries du genre *Methylobacterium* obtenue par l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S. (A) "maximum likelihood", (B) neighbor-joining. Les nombres sur les branches indiquent les valeurs obtenues lors de l'analyse de ré-échantillonnage à partir de 500 répliques.

7.3 Propriétés biochimiques, demande en oxygène et source d'azote

Les isolats SD-7 et SD-8 étaient catalase positive et la réaction d'oxydase était très faible. Le test du KOH utilisé pour vérifier le Gram des isolats SD-7 et SD-8 a donné lieu à une réaction négative. Les isolats SD-7 et SD-8 ne produisaient pas de H₂S à partir du thiosulfate ni de la cystéine. Ils n'ont pas réalisé de dénitrification et ils n'ont pas produit de pigment fluorescent sur le milieu King B. Ils ont hydrolysé la tributyrine, mais ni l'amidon ni la caséine. La réaction de détection de la production d'indole ainsi que les réactions du rouge de méthyle et de Voges-Proskauer se sont toutes avérées négatives. Les isolats SD-7 et SD-8 ont démontré une croissance en région profonde dans le milieu SIM, mais la mobilité a surtout été observée dans la partie aérobie. De plus, ils ont démontré une préférence pour les conditions microaérophiles lors d'essais de culture en tube dans le milieu NF. Un anneau rose à 0,5-1,0 cm sous la surface du milieu et formé par les cellules pigmentées des isolats SD-7 et SD-8 était visible dans ces conditions (Tableau 7.2).

Les *Methylobacterium* SD-7 et SD-8 ont utilisés l'azote combiné de l'extrait de levure ainsi que l'ions ammonium comme source d'azote. Cependant, aucune croissance n'a été observée en présence de nitrate. De plus, la biomasse cellulaire observée en présence d'extrait de levure était supérieure à celle obtenue lorsque l'ions amonium était ajouté. À un pH de 4,5, une concentration en azote combiné de 500 µg N / ml a inhibé la croissance des *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8.

Tableau 7.2 Besoin en oxygène et en azote des isolats SD-7 et SD-8

Croissance milieu NF + [NH ₄ ⁺] (0,05 % agar)	SD-7		SD-8		Croissance milieu NF + [EL] (0,05 % agar)	SD-7		SD-8	
	- à +++	pH final	- à +++	pH final		- à +++	pH final	- à +++	pH final
pH de départ					pH de départ				
pH 4,0					pH 4,0				
0 µg N/ml	-		-		0 µg N/ml	-		-	
5 µg N/ml	-		-		5 µg N/ml	-		-	
50 µg N/ml	-		-		50 µg N/ml	-		+++	4,44
500 µg N/ml	-		-		500 µg N/ml	-		-	
pH 5,0					pH 5,0				
0 µg N/ml	-	4,49	-	4,25	0 µg N/ml	-	4,49	-	4,25
5 µg N/ml	+	4,15	+	4,06	5 µg N/ml	++	4,55	++	4,42
50 µg N/ml	+	4,16	+	4,09	50 µg N/ml	+++	4,80	+++	4,67
500 µg N/ml	-	3,80	-	3,62	500 µg N/ml	-	4,40	-	4,31
pH 6,0					pH 6,0				
0 µg N/ml	-	5,80	-	5,87	0 µg N/ml	-	5,80	-	5,87
5 µg N/ml	+	5,42	+	5,46	5 µg N/ml	+	5,51	+	5,46
50 µg N/ml	+	5,30	+	5,35	50 µg N/ml	+++	5,53	+++	5,57
500 µg N/ml	+	5,03	+	5,07	500 µg N/ml	++	5,80	++	5,53
pH 7,0					pH 7,0				
0 µg N/ml	-	6,96	-	6,92	0 µg N/ml	-	6,96	-	6,92
5 µg N/ml	+	6,72	+	6,71	5 µg N/ml	+	6,76	+	6,69
50 µg N/ml	+	6,56	+	6,55	50 µg N/ml	++	6,25	++	6,33
500 µg N/ml	+	5,94	+	5,85	500 µg N/ml	+++	6,39	+++	6,35
pH 8,0					pH 8,0				
0 µg N/ml	-	7,78	-	7,80	0 µg N/ml	-	7,78	-	7,80
5 µg N/ml	+	7,25	+	7,31	5 µg N/ml	+	7,51	+	7,54
50 µg N/ml	+	7,05	+	7,19	50 µg N/ml	++	6,92	++	7,16
500 µg N/ml	+	6,63	+	6,62	500 µg N/ml	+++	7,70	-	8,33

1. La croissance a été évaluée en fonction de la turbidité
2. EL : extrait de levure

7.4 Caractéristiques physiologiques

Nous avons également utilisé la grille API 50 CH pour poursuivre la caractérisation des isolats SD-7 et SD-8. Trois milieux ont été utilisés pour l'étude de ces isolats (Figure 7.3). La première fois, de l'extrait de levure a été ajouté au milieu de culture *Beijerinckia*. Par la suite, l'extrait de levure qui pouvait être utilisé comme substrat a été remplacé par une petite quantité de chlorure d'ammonium. De plus, le pH de départ n'était pas le même pour les deux milieux, le premier étant à pH 6,8 et le deuxième à pH 4,5. Le troisième essai a été effectué dans le milieu MMM (milieu minéral pH 7,1). De légères différences ont été notées lors de la lecture des résultats en fonction du milieu utilisé. Le milieu MMM a donné sensiblement les mêmes résultats que ceux obtenus pour le milieu B-EL pH 6,8. Nous avons tenu compte de l'influence de l'ajout de l'extrait de levure au milieu de culture en considérant toutes les cupules dont la densité cellulaire était égale ou moindre à celle du témoin comme négative. Les différences ont surtout été remarquées au niveau de l'acidification qui était plus marquée dans le milieu MMM. Seule l'utilisation du glucose permettait de différencier l'isolat SD-7 de l'isolat SD-8, puisque seul ce dernier a utilisé le glucose.

En plus des substrats de la grille API 50 CH, les isolats SD-7 et SD-8 pouvaient croître dans le milieu MMM (pH 7,1) en présence d'aspartate, de glutamate, d'acétate, de sébacate et de méthanol. Une faible croissance a aussi été observée en présence d'éthanol, d'acide citrique, de méthylamine et triméthylamine, de même qu'en présence de bêtaïne. Cependant, le tartrate et le DMF n'ont pu supporter la croissance des isolats SD-7 et SD-8.

Tableau 7.3 Utilisation des hydrates de carbone par les isolats SD-7 et SD-8 d'après les résultats obtenus en utilisant la grille de culture API 50CH (BioMérieux)

# puits	Substrat	SD-7 ¹			SD-8 ¹			# puits	Substrat	SD-7 ¹			SD-8 ¹		
		B-EL	B-NH ₄ Cl	MMM	B-EL	B-NH ₄ Cl	MMM			B-EL	B-NH ₄ Cl	MMM	B-EL	B-NH ₄ Cl	MMM
0	témoin	-	-	-	-	-	-	25	esculine	-	-	-	-	-	-
1	glycérol	T	a	TA	T	a	TA	26	saliciline	-	-	-	-	-	-
2	érythritol	-	-	-	-	-	-	27	cellobiose	-	-	-	-	-	-
3	D-arabinose	A	-	TA	tA	t	TA	28	maltose	-	-	-	-	-	-
4	L-arabinose	ta	A	TA	a	A	A	29	lactose	-	-	-	-	-	-
5	ribose	a	A	a	a	A	A	30	mélbiose	t	-	-	-	t	-
6	D-xylose	t	-	a	A	t	A	31	saccharose	-	-	-	-	-	-
7	L-xylose	A	-	A	A	-	A	32	tréhalose	-	-	-	-	-	t
8	adonitol	-	-	-	-	-	-	33	inuline	-	t	-	-	t	-
9	β-méthyl-xyloside	-	-	-	-	-	-	34	mélézitose	-	-	-	T	-	-
10	galactose	tA	-	A	tA	t	TA	35	D-raffinose	-	-	-	-	-	-
11	D-glucose	-	-	-	ta	t	TA	36	amidon	-	-	-	-	-	-
12	D-fructose	T	a	TA	T	-	TA	37	glycogène	-	-	-	-	-	-
13	D-mannose	-	-	-	-	-	-	38	xylitol	-	-	-	-	-	-
14	L-sorbose	-	-	-	-	-	-	39	β-gentiobiose	-	-	-	-	-	-
15	rhamnose	-	-	-	-	-	-	40	D-turanose	-	-	-	-	-	-
16	dulcitol	-	-	-	-	-	-	41	D-lyxose	a	tA	ta	ta	tA	TA
17	inositol	-	-	-	-	-	-	42	D-tagatose	-	-	-	-	-	-
18	mannitol	-	-	-	-	-	-	43	D-fucose	tA	a	A	TA	a	Ta
19	sorbitol	-	-	-	-	-	-	44	L-fucose	a	-	t	ta	-	Ta
20	méthyl-D-mannoside	-	-	-	-	-	-	45	D-arabitol	-	-	-	-	-	-
21	méthyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	-	46	L-arabitol	-	-	-	-	-	-
22	N-acétyl-glucosamine	-	-	-	-	-	-	47	gluconate	t	-	t	t	-	t
23	amygdaline	-	-	-	-	-	-	48	2-céto-gluconate	-	-	t	-	-	t
24	arbutine	-	-	-	-	-	-	49	5-céto-gluconate	a	-	-	a	-	t

¹ La croissance a été évaluée selon les critères d'observation suivants pour les *Beijerinckia* sp. SD-7 et SD-8:
a, légère acidification; A, acidification; t, turbidité très faible; T, turbidité

La présence des enzymes clés des différents sentiers métaboliques a été étudiée (Tableau 7.4). La présence de la citrate synthase et de α -cétoglutarate déshydrogénase était caractéristique d'un cycle du citrate fonctionnel lors de la croissance sur les composés contenant plus d'un atome de carbone.

Tableau 7.4 Enzymes clés de différents sentiers métaboliques retrouvées dans les extraits cellulaires de *M. lavalensis* SD-7 et SD-8

Enzyme	<i>M. lavalensis</i> SD-7	<i>M. lavalensis</i> SD-8
Malate déshydrogénase (TCA) (NAD)	0,44 ¹	0,44
Isocitrate déshydrogénase (TCA) (NADP)	+ ²	+
6-P-gluconate déshydrogénase (HMP) (NAD)	0,61	0,61
6-P-gluconate déshydrogénase (HMP) (NADP)	-	-
Glucose-6-P déshydrogénase (HMP et ED) (NADP)	0,31	0,31
α -cétoglutarate déshydrogénase (TCA)	+	+
Glutamate déshydrogénase	+	+
Hexokinase	0,10	0,10
6-phosphofructokinase (EMP)	-	-
Fructose-1,6-diphosphate aldolase (EMP)	-	-
Malate synthase (cycle du glyoxylate)	-	-
Citrate synthase (TCA)	+	+

¹. Rf d'une enzyme spécifique après électrophorèse d'extraits cellulaires sur gel d'amidon

². Présence ou absence de l'enzyme à partir d'expérimentation en microplaques

7.5 Discussion

7.5.1 Analyse des caractéristiques morphologiques

En croissance en culture pure, les bâtonnets des isolats SD-7 et SD-8 sont plus gros que ceux des autres isolats du consortium SD-2, mais cette morphologie typique n'est pas observée dans le consortium SD-2 en microscopie photonique. Cependant, la différence entre la morphologie cellulaire observée en culture pure et dans le consortium pour les *Acidobacter* sp. s'applique probablement aussi aux isolats SD-7 et SD-8. Ils pourraient être plus petits ou moins larges en présence des autres espèces du consortium et être confondus avec elles.

Le caractère du Gram des isolats SD-7 et SD-8 est lui aussi incertain selon les observations morphologiques. Tout comme pour les *Acidobacter* sp., la membrane apparaît

lisse sur les photomicrographies des sections des cellules des isolats (Figure 7.1 A-B) ce qui semble indiquer que ce sont des espèces à gram-positif. Il faut toutefois tenir compte de la présence probable d'une capsule qui protégerait les cellules lors des étapes de dessiccation et empêcherait le plissement de la membrane et l'apparition de l'aspect cérébriforme caractéristique des bactéries à gram-négatif. Nous avons observé une zone grise qui pourrait être une capsule autour des cellules sur certaines sections des photomicrographies. Cependant, les techniques utilisées pour confirmer la présence d'une capsule se sont avérées négatives. Cette hypothèse n'est pas éliminée, puisqu'il existe trois types de capsules : une capsule rigide dont la structure cohérente exclut les particules de la nigrosine, une capsule flexible suffisamment déformable et qui ne peut exclure les particules, et une capsule intégrale qui est intimement associée à la surface de la cellule (Costerton *et al.*, 1985). Les colorations employées ne pouvant détecter que la capsule rigide, il est possible que la nature de la capsule soit l'un des deux derniers types. Cependant, pour être certain de la présence d'une capsule, une stabilisation de la capsule préalablement à une coloration des sections à l'aide d'anticorps spécifiques aurait dû être employée.

Une association entre *B. lactinogenes* et *T. ferrooxidans* décrite par Tsuchiya (1978) nous a incité à croire, pendant un moment, que nous étions en présence d'espèces bactériennes du genre *Beijerinckia*. La morphologie cellulaire des isolats SD-7 et SD-8 ressemble en tous points à celle des espèces du genre *Beijerinckia*, malgré une incertitude au niveau du gram des isolats. Cependant, la morphologie coloniale est différente. Contrairement aux espèces du genre *Beijerinckia* (Barbosa et Struckel, 1985), ces deux isolats ne produisent pas de colonies mucoïdes (polysaccharides extracellulaires) dans les conditions de croissance utilisées. Toutefois, nous étions conscients que plusieurs autres genres bactériens pouvaient contenir des espèces ayant cette morphologie cellulaire.

7.5.2 Analyse phylogénétique

La séquence de l'ADNr 16S obtenue pour l'isolat SD-8 a permis de déterminer l'appartenance au Gram de ces deux isolats (SD-7 et SD-8), puisque les séquences signatures des bactéries gram-positives ne correspondent pas à leurs séquences. De plus, il est possible d'affirmer que ces isolats appartiennent à la subdivision α du grand groupe des *Proteobacteria* (regroupant les bactéries gram-négatives), car l'hélice formée par les bases correspondant aux positions 198 à 219 selon la numérotation de *E. coli* est représentative de ce groupe (Woese, 1987). Le pied de l'hélice est formé par deux paires de base contrairement aux huit paires formant la base de la même hélice pour les subdivisions β , γ et δ . Malgré toutes les indications

qui militaient en faveur de l'appartenance de ces isolats aux bactéries gram-positives, ils font bel et bien partie des bactéries gram-négatives.

Lors de l'étude phylogénétique, nous avons trouvé une séquence presque identique à celle de l'isolat SD-8; mais contrairement aux résultats attendus, nous n'étions pas en présence d'espèces du genre *Beijerinckia*, mais plutôt d'espèces du genre *Methylobacterium*. Selon les résultats obtenus en utilisant les trois méthodes d'analyses déjà mentionnées, les isolats F05 et F15 sont les plus près de l'isolat SD-8. Les degrés d'homologie entre l'isolat SD-8, et les isolats F05 et F15 sont respectivement de 99,9 % et 99,7 % (Tableau 7.1). Ces trois isolats font probablement partie de la même espèce. *M. radiotolerans* est l'espèce qui présente le pourcentage d'homologie le plus élevé avec les isolats SD-8, F05 et F15 (99,3 %). La différence observée entre cette valeur et celle obtenue par la RDP (96,2%) dépend probablement de l'alignement des séquences et des paramètres utilisés pour calculer les pourcentages d'homologie. Ces différences n'affectent en rien la validité des résultats et l'assignation des isolats SD-7 et SD-8 au genre *Methylobacterium*. Cependant, le degré de similitude élevé n'inclut pas nécessairement ces isolats dans l'espèce *M. radiotolerans*. En effet, la séquence de l'ADNr 16S de *M. extorquens* présente 99,0% d'homologie avec celles des espèces *M. rhodesianum* et *M. zatmanii*, et pourtant ce sont trois espèces différentes. Selon Stackebrandt et Liesak (1993), le degré de similitude des ADNr 16S ne peut être utilisé pour détecter de légères différences entre deux espèces très voisines, car les ribosomes sont des structures cellulaires hautement conservées. Cependant, un environnement possédant des conditions physico-chimiques très variables peut amener une évolution rapide des sentiers métaboliques sans toutefois modifier celle des macromolécules plus stables. Les boues d'usines d'épuration des eaux sont un exemple d'un tel environnement, puisque leur composition est très variable dans le temps. Les bactéries qui s'y retrouvent doivent donc posséder un métabolisme très versatile et une grande capacité d'adaptation. Ces facteurs environnementaux peuvent mener à des adaptations particulières et à des changements au niveau de certains gènes spécialisés tout en conservant l'ADN ribosomique. Le regroupement formé des isolats F05, F15 et SD-8 pourrait donc constituer une nouvelle espèce du genre *Methylobacterium*, malgré leur degré de similitude élevé avec *M. radiotolerans*.

7.5.3 Analyse des propriétés biochimiques

Les *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 sont catalase positive, ne produisent pas de pigment fluorescent. Cependant, la réaction négative obtenue pour le test du KOH sur les *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 indiquant la présence de bactéries à gram-positif ne correspond pas au Gram de ses espèces, puisque l'analyse phylogénétique a démontré que

c'était bien des bactéries à gram-négatif. De plus, les *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 hydrolysent la tributyrine pour l'utiliser ultérieurement comme source de carbone.

La culture en tube, en plus de confirmer le caractère microaérophile des *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8, a aussi démontré l'utilisation de l'azote combiné retrouvé dans l'extrait de levure et de l'ion ammonium comme source d'azote. De plus, l'extrait de levure semble également fournir des composés organiques ou des facteurs de croissance aux *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8, car la biomasse cellulaire observée est supérieure en sa présence. Par ailleurs, une concentration en azote combiné supérieur à 50 µg N / ml semble inhiber la croissance à un pH aux alentours de 4,5. Aucune influence n'est cependant observée lorsque le pH de milieu de culture est situé près de la neutralité. De plus, les *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 ne peuvent utiliser les nitrates comme source d'azote, puisque aucune croissance n'a été observée en leur présence. La présence des nitrates dans le milieu empêcherait donc la fixation de l'azote atmosphérique advenant que les *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 posséderaient cette capacité.

7.5.4 Analyse physiologique

L'intervalle de pH autorisant la croissance des *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 est très grand, comme le démontre la croissance sur le milieu gélosé MMM au méthanol qui est possible pour des valeurs de pH variant entre 3,0 et 10,0. Aucune croissance n'est observée à des températures de 4°C ou 37°C. Les *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 ne forme pas de pellicule à la surface des cultures liquides non agitées. Ils peuvent utiliser le glutamate et croître dans un milieu peptoné. Le besoin en substrats énergétiques carbonés des *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 dans le consortium SD-2 semble comblé par les métabolites probablement libérés dans le milieu par les *Acidobacter* sp. ainsi que par le *Thiobacillus* sp.

L'utilisation des hydrates de carbone de la grille API 50 CH par les *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 varie en fonction des conditions de croissance. Ce phénomène est probablement causé par la différence dans le pH du milieu au départ et au fait qu'il faut une plus grande quantité d'acide pour faire descendre le pH de 0,1 à pH 4,5 qu'à pH 7,0. Quelques sucres ne sont pas utilisés dans le milieu B-NH₄Cl comparés aux deux autres milieux même si sa composition est presque identique à celle du milieu MMM. L'âge et le milieu utilisé pour faire croître l'inoculum peuvent avoir influencé le test. De plus, l'utilisation exclusive du glucose par l'isolat SD-8 explique la différence observée au niveau de la morphologie coloniale sur le milieu B-EL au glucose. Les différences de coloration et d'opacité des colonies, qui ont permis de séparer les deux isolats, s'expliquent maintenant par ce phénomène.

Les espèces du genre *Methylobacterium* sont chimioorganotrophes et méthylotrophes facultatives. Elles assimilent les composés monocarbonés, s'ils sont dans un état plus réduit que le CO₂, par le sentier de la sérine (Hanson et Hanson, 1996). Cependant, il n'y a pas d'étude portant sur le catabolisme des composés organiques autres que les monocarbonés. Les *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 possèdent l'enzyme clé du sentier HMP, la 6-phosphogluconate déshydrogénase. Ce sentier est probablement responsable du catabolisme des composés organiques à plus d'un carbone. De plus, les enzymes du cycle du glyoxylate non pas été retrouvées. Cependant, comme ces enzymes sont inductibles, des extraits cellulaires provenant de culture en croissance sur des composés à un carbone aurait permis de détecter leur présence, car les enzymes du cycle du glyoxylate sont impliquées dans la voie de la sérine permettant l'assimilation du formaldéhyde par les *Methylobacterium*.

Par ailleurs, l'analyse de la fixation de l'azote n'a été réalisée. Cependant, nous croyons toujours que les *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8 auraient peut-être la capacité de fixer l'azote, car ils sont microaérophiles et qu'ils peuvent croître dans un milieu où l'azote combiné est retrouvé à l'état de trace.

7.5.5 Analyse taxinomique

En premier lieu, le genre *Methylobacterium* comprend un ensemble d'espèces bactériennes méthylotrophes facultatives qui produisent de petites colonies roses (pink-pigmented facultative methylotrophs = PPFM) (Green, 1992). Les *Methylobacterium* tiennent probablement leur pigmentation de leur parenté avec les bactéries pourpres soufrées, car des photopigments peuvent être produits dans certaines conditions. Ils sont donc classés parmi les bactéries phototrophes aérobies (Green, 1992) en plus d'être souvent inclus avec les méthanotrophes (Hanson et Hanson, 1996). Les *Methylobacterium* sont des bâtonnets pléomorphes (0,8-1,0 x 1,0-8,0 µm) isolés, formant quelques fois des rosettes et des embranchements. Ils sont gram-négatifs à variables, mobiles et aérobies stricts. De plus, ils démontrent une croissance polaire (formation de la membrane de la cellule fille à partir d'un seul point au lieu d'être intercalée comme pour la fission binaire). Les cellules contiennent souvent de larges granules de PHB et quelques fois des granules de vultine. Elles sont aussi catalase et oxydase positives (réaction souvent faible). La température optimale de croissance se situe aux environs de 25-30°C. Malgré le fait que le pH optimal soit près de la neutralité, quelques espèces peuvent croître à pH 4,0 et d'autres à pH 10,0. Aucune espèce ne requiert de facteur de croissance. Les espèces appartenant à ce genre ne peuvent hydrolyser la caséine, l'amidon, la gélatine, la cellulose ni l'ADN; elles ont cependant une faible activité lipolytique. Elles synthétisent de l'uréase, mais ne produisent pas d'indole ni de H₂S. Les tests du rouge de

méthyl et de Voges-Prauskauer sont négatifs, et quelques espèces peuvent réduire les nitrates en nitrites. Toutes les espèces sont capables d'utiliser la formaldéhyde, le formate et le méthanol, elles se différencient toutefois sur la base des substrats assimilables comme sources de carbone et d'énergie. L'utilisation du méthane comme seule source de carbone et d'énergie a été rapportée pour *M. organophilium* seulement et cette caractéristique a été perdue depuis l'isolement de la souche de référence (Green, 1992).

Ces données correspondent parfaitement à celles que nous avons décrites précédemment pour les *Methylobacterium* sp. SD-7 et SD-8. Ils confirment leur appartenance au genre *Methylobacterium*. Il nous reste à identifier à quelle espèce du genre ces isolats appartiennent ou encore si nous sommes en présence d'une nouvelle espèce.

Comme les espèces du genre *Methylobacterium* ont surtout été définies sur la base des sources de carbone et d'énergie utilisées, une comparaison du phénotype de l'isolat SD-8 avec ceux des autres espèces du genre *Methylobacterium* nous permettra d'établir le fondement de la création d'une nouvelle espèce si nécessaire. De plus, il faut vérifier la possibilité d'une appartenance à l'une des deux espèces dont l'ADNr 16S n'est pas disponible. Les isolats SD-8, F05, F15 ont donc été comparés à quelques isolats du sous-groupe II ainsi qu'aux 9 espèces du genre *Methylobacterium* reconnues (Tableau 7.5).

En premier lieu, les deux espèces du genre *Methylobacterium* (*M. aminovorans* et *M. fujisawaensa*), dont les séquences de l'ADNr 16S ne sont pas disponibles, ont été situées dans leur sous-groupe respectif en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques (Tableau 7.5). Selon la liste des substrats utilisés par *M. aminovorans*, ce dernier est classé dans le sous-groupe I, ce qui l'élimine comme espèce possible pour notre isolat. Pour ce qui est de *M. fujisawaensa*, sa ressemblance avec *M. mesophilicum* et *M. radiotolerans* le situe parmi le sous-groupe II, celui de nos isolats. Il s'ajoute donc à *M. radiotolerans* comme espèce possible pour ceux-ci.

Tableau 7.5 Caractéristiques permettant de différencier les espèces du genre *Methylobacterium*

Sources de carbone	<i>M.</i> <i>extor</i>	<i>M.</i> <i>orga</i>	<i>M.</i> <i>rhodi</i>	<i>M.</i> <i>rhode</i>	<i>M.</i> <i>zatm</i>	<i>M.</i> <i>amino</i>	<i>M.</i> <i>radio</i>	SD-7	SD-8	F15 ¹	FO5 ¹	<i>M.</i> <i>fuji</i>	<i>M.</i> <i>meso</i>	TK 37TK 40 ³	TK 38 ²
L-arabinose	-	-	-	-	-	-	+a	+A	+A	+	+	+A	+	+	+
D-glucose	-	-	-	-	-	-	+	-	+A	v	v	+	+	+	+
D-fructose	-	+a	+	+a	+a	+a	-	+A	+A	v	+	- ⁴	-	+a	+a
galactose	-	-	-	-	-	-	+A	+A	+A	+	+	+A	+	+a	+
D-xylose	-	-	-	-	-	-	+	+A	+A	v	v	+	+	+	+
D-fucose	-	-	-	-	-	-	f	+A	+A	+	+	+	+	+	+
éthanol	+	+	+	+	+	+	f	f	f	n.d.	n.d.	v	+	f	f
aspartate/glutamate	v	-	+	v	-	+	+	+	+	n.d.	n.d.	+	+	+	+
acide citrique	-	-	+	-	-	-	+	f	f	n.d.	n.d.	+	+	+	+
acétate	+	+	+	+	+	n.d.	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-	+	+
sébacate	-	-	-	-	-	-	+	+	+	n.d.	n.d.	+	v	-	-
méthylamine	+	+	+	+	+	+	-	f	f	n.d.	n.d.	-	-	-	-
tri-méthylamine	-	+	-	-	v	+	-	f	f	n.d.	n.d.	-	-	-	-
bétaïne	+	-	+	v	-	+	+	f	f	n.d.	n.d.	-	-	-	+
tartrate	v	-	-	-	-	+	f	-	-	n.d.	n.d.	- ⁴	-	n.d.	n.d.
lipides /tributyryne	-	-	-	-	-	-	+	+	+	n.d.	n.d.	v	-	n.d.	n.d.
TMAH	-	-	-	-	-	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-
DMF	-	-	-	-	-	+	-	-	-	n.d.	n.d.	-	-	-	-
Sous-groupe ⁶	I	I	I	I	I	I	II			II	II	II	II		

¹ Hiraishi *et al.*, 1995: FO5 fait partie du sous-groupe 16 contenant 9 isolats différents et F15 fait partie du sous-groupe 18 contenant 4 isolats

² TK 38 "*Thiobacillus rubellus*", reclassé *Methylobacterium* sp. (Urakami *et al.* 1993)

³ Urakami et Komagata (1984) 6

⁴ v selon Green *et al.* (1988)

⁵ Urakami et Komagata (1981)

⁶ Hiraishi *et al.*, (1995)

+ : positif, - : négatif, f : croissance faible, v : variable (dépend des isolats), n.d. : non déterminé

Nous avons ensuite vérifié la possibilité que les isolats SD-8, F05 et F15 soient associés à l'espèce *M. fujisawaensa*. Selon les patrons d'électrophorèse d'extraits enzymatiques, *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans* et *M. fujisawaense* font partie du même groupe (Tableau 7.6). Cependant, deux études sur le pourcentage d'hybridation ADN:ADN ont séparé *M. radiotolerans* des deux autres (Tableau 7.6) (Hood *et al.*, 1987; Urakami *et al.*, 1993). Cependant, les deux analyses se contredisent pour *M. mesophilicum* et *M. fujisawaensa* qui sont situés dans deux sous-groupes différents (2E et 2D respectivement) selon Green *et al.* (1988) et dans le même sous-groupe (G) selon Urakami *et al.* (1993). Cette dernière étude confirme une analyse phénotypique basée sur les sources de carbone utilisées par les *Methylobacterium* : sous-groupe 7 pour *M. radiotolerans*, et sous-groupe 8 pour *M. mesophilicum* et *M. fujisawaensa*. L'utilisation d'un seul substrat permet de séparer *M. fujisawaensa* de *M. radiotolerans* (bétaine) et de *M. mesophilicum* (acétate). Même si *M. mesophilicum* et *M. fujisawaensa* ont déjà été différenciés phénotypiquement par l'utilisation du D-fructose en plus de l'acétate par *M. fujisawaensa* (Green *et al.*, 1988), l'utilisation du D-fructose par *M. fujisawaensa* n'a pas été observée par Urakami *et al.* (1993). Alors, comme les caractéristiques physiologiques et les pourcentage d'hybridation ADN:ADN de *M. fujisawaensa* le relie à *M. mesophilicum*, et que ce dernier est plus éloigné de l'isolat SD-8 que *M. radiotolerans* selon la topologie de l'arbre phylogénétique (Figure 7.2); il serait surprenant que l'isolat SD-8 soit associé à l'espèce *M. fujisawaensa*.

Tableau 7.6 Regroupement des différentes espèces du genre *Methylobacterium* par différentes méthodes d'analyses

Analyses	<i>M. extor</i>	<i>M. orga</i>	<i>M. rhodi</i>	<i>M. rhode</i>	<i>M. zatm</i>	<i>M. amino</i>	<i>M. radio</i>	TK 37	TK 38 ²	TK 40 ³	<i>M. fuji</i>	<i>M. meso</i>
sources de carbone utilisées ¹	1	2	3	4	5	6	7				8	8
Patron d'électrophorèse ⁴	1	1		3	2		4	4	4		4	4
% d'hybridation ADN:ADN ⁵	1B	1H	1G	1C	1A		2B				2D	2E
% d'hybridation ADN:ADN ¹	A	B	C		D	E	F	G			G	G

¹. Urakami *et al.* (1993)

². TK 38 "*Thiobacillus rubellus*", reclassé *Methylobacterium* sp. (Urakami *et al.* 1993)

³. Urakami et Komagata (1984)

⁴. Urakami et Komagata (1981)

⁵. Hood *et al.* (1987)

De plus, selon Urakami *et al.* (1993), les isolats TK 38 ("*T. rubellus*") et TK 40 (*Methylobacterium* sp. ATCC 35064), malgré quelques différences phénotypiques, pourraient être des membres de *M. mesophilicum* ou de *M. fujisawaensa* pour les raisons suivantes : ils ont

le même patron d'électrophorèse des extraits cellulaires (enzymes) (4); ils sont dans le même sous-groupe d'homologie ADN:ADN (G); et le pourcentage d'hybridation ADN:ADN est de 68 % entre TK 38 et *M. mesophilicum*. De plus, il a été proposé que les organismes dont le pourcentage d'hybridation ADN:ADN est plus de grand que 70% fassent partie de la même espèce génomique (Stackebrandt et Liesak, 1993). L'étude de ces deux isolats suggère que l'utilisation du D-fructose par les espèces du sous-groupe II est variable en fonction des isolats et, par conséquent, ne peut être considérée comme un facteur déterminant pour séparer les espèces de ce sous-groupe.

Malgré la similarité entre les substrats utilisés par les espèces du sous-groupe II et les isolats SD-7 et SD-8, la plus grande différence se situe au niveau de l'utilisation du méthylamine et du triméthylamine par les isolats SD-7 et SD-8. Ces substrats ne sont pas utilisés par les trois autres espèces du sous-groupe II mais plutôt par ceux du sous-groupe I. Ils seraient donc situés phénotypiquement entre le sous-groupe I et le sous-groupe II; mais selon l'analyse phylogénétique, ils sont retrouvés parmi le sous-groupe II. De plus, les isolats SD-7 et SD-8 semblent être les seules espèces micro-aérophiles du genre *Methylobacterium* et elles ne forment pas de pellicule à la surface du milieu en culture sans agitation. L'intervalle de pH de croissance des isolats SD-7 et SD-8 est aussi plus étendu que celle de *M. radiotolerans*, l'espèce la plus près phylogénétiquement. Seuls quelques isolats de cette espèce peuvent croître à pH 5,0 (Bousfield et Green, 1985) alors que les isolats SD-7 et SD-8 peuvent croître de pH 4,0 à 9,0. Une autre différence entre nos isolats et *M. radiotolerans* réside dans le fait que cette espèce peut réduire les nitrates, une caractéristique absente chez les isolats SD-7 et SD-8. Il est donc probable que les isolats SD-7 et SD-8 fassent partie d'une nouvelle espèce au sein du genre *Methylobacterium* malgré la similitude observée au niveau de la séquence de l'ADNr 16S. Le principe de taxinomie polyphasique décrit par Vandamme *et al.* (1996) insiste sur la nécessité de ne pas favoriser les caractéristiques génétiques des bactéries au détriment des caractéristiques phénotypiques.

Sur la base des caractéristiques morphologiques, phylogénétiques, biochimiques et physiologiques, l'isolat SD-8 a été proposé comme une nouvelle espèce du genre *Methylobacterium* et appelé *Methylobacterium lavalensis* SD-8 sp. nov. Cette souche a par la suite été déposée à l'Américain Type Culture Collection sous le numéro ATCC 700534.

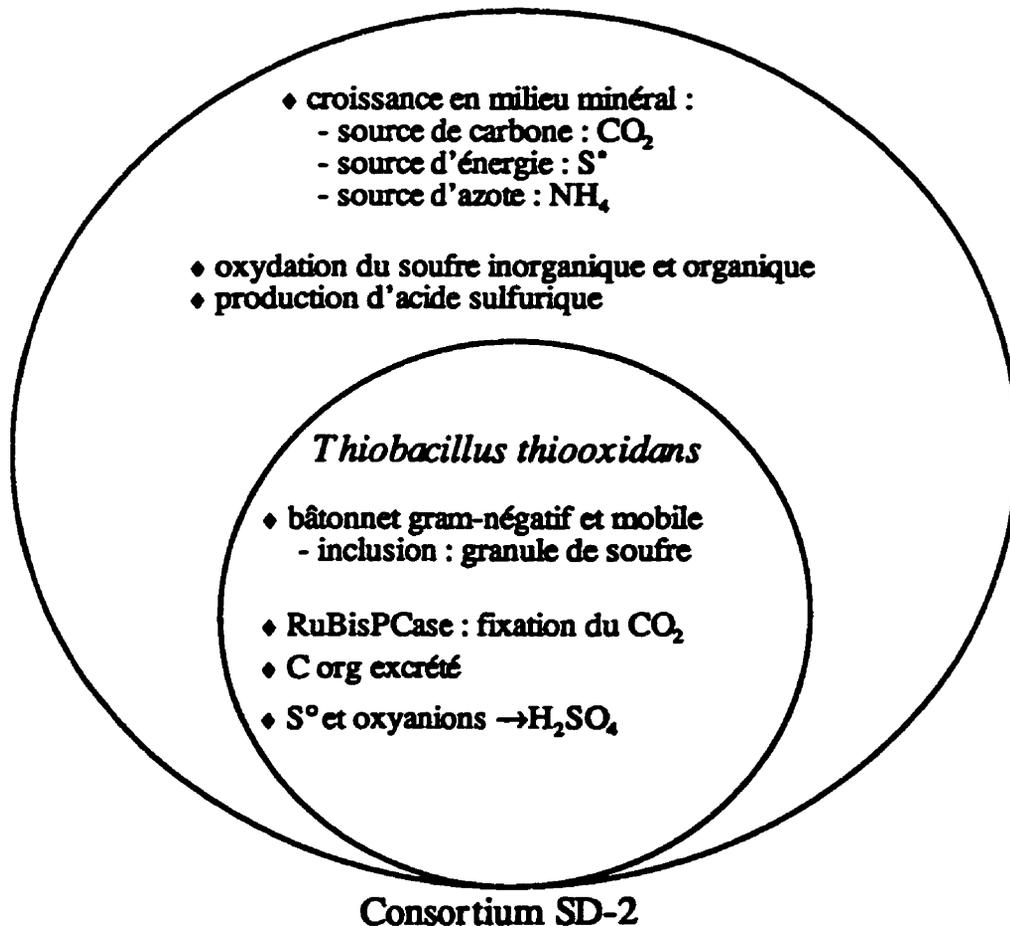
7.5.6 Description du *Methylobacterium lavalensis* sp. nov.

Methylobacterium lavalensis sp. nov. *Methylobacterium lavalensis* (la.val'en.sis, M.L. gen.n. *lavalensis*, du nom de l'Université Laval où la souche a été isolée). *M. lavalensis* est une espèce microaérophile constituée de bâtonnets mobiles contenant des granules de volutine et de PHB. Il peut croître dans des milieux ayant des pH variant entre 3,0 et 10,0, et à des températures comprises entre 25°C et 35°C. La réaction de Gram est variable. Les bactéries de cette espèce possèdent une activité de catalase et une faible activité d'oxydase.

M. lavalensis utilise le glycérol, L-arabinose, le L-xylose, le D-fructose, le galactose, le D-fucose, le ribose, l'aspartate/glutamate, l'acétate et l'acide citrique. Il croît lentement sur l'éthanol, le méthylamine et le triméthylamine, et ne peut assimiler le diméthylformamide ni le tartrate. Certains isolats peuvent utiliser le glucose et la bêtaïne comme substrats. Cette espèce ne produit pas de H₂S à partir du thiosulfate ou de la cystéine. Elle n'est pas dénitrifiante et ne produit pas de pigment fluorescent. *M. lavalensis* peut hydrolyser la tributyrine et l'utiliser comme source de carbone, mais n'hydrolyse pas l'amidon ni la caséine. Les réactions de production d'indole, du rouge de méthyl et de Voges-Proskauer sont négatives.

CHAPITRE 8

RÉSULTATS ET DISCUSSION: *THIOBACILLUS THIOOXIDANS* ET LE CONSORTIUM SD-2



CHAPITRE 8

8. RÉSULTATS ET DISCUSSION : *THIOBACILLUS THIOOXIDANS* ET LE CONSORTIUM SD-2

La caractérisation de la dernière espèce connue du consortium, l'espèce thio-oxydante acidifiante, ne peut être séparée de celle du consortium SD-2, elle n'a jamais été isolée en culture pure. Une étude de ces caractéristiques morphologiques, phylogénétiques, biochimiques et physiologiques a été réalisée comme pour les autres espèces du consortium SD-2.

8.1 Caractéristiques morphologiques

Même si nous n'avons pas réussi à isoler l'espèce thio-oxydante acidifiante en culture pure, nous savons que cette espèce était caractérisée par des bâtonnets ($0,5 \mu\text{m} \times 1-2 \mu\text{m}$) mobiles, non sporulés, sans inclusion visible, apparaissant isolés ou en paire, et dont la coloration de Gram était négative. Le Gram a été confirmé lors de l'observation des photomicrographies électroniques des sections réalisées à partir de colonies du consortium SD-20. La Figure 8.1 A a permis de bien observer la paroi plus mince ayant une structure stratifiée complexe composée de la membrane cytoplasmique, de l'espace périplasmique avec une mince couche de peptidoglycan (flexible) et de la membrane externe qui se plissait en microscopie électronique (Mayer, 1986). Le cytoplasme des cellules thio-oxydantes contenait des inclusions quelques fois vides semblables à des granules de volutine (polymétaphosphate, GR) et plusieurs inclusions de densité moyenne aux électrons dont la forme légèrement polyédrique étaient caractéristiques des carboxysomes (CB) (Figure 8.1 A et C) (Mayer, 1986).

Figure 8.1 Photomicrographies électroniques du consortium SD-20. (A) Photomicrographie électronique à transmission montrant une cellule de l'espèce acidifiante thio-oxydante. **(B)** Photomicrographie électronique à balayage après croissance sur une pastille de soufre. **(C)** Photomicrographie électronique à transmission sur des sections montrant les carboxysomes (CB), les granules de réserve (soufre ou volutine) (GR), des cellules du *Thiobacillus* sp. (T) et des *Acidobacter* sp. (A), et une pré-spore (PS). (Barre = 1,0 μm)

A



C



L'association entre les différentes espèces du consortium a été observée autant en microscopie électronique à balayage après croissance sur des granules de soufre (Figure 8.1 B) qu'en microscopie électronique à transmission sur des coupes. Ces deux méthodes nous ont permis d'observer la présence majoritaire des cellules du microorganisme thio-oxydant acidifiant (T) par rapport aux cellules des *Acidobacter* sp. (A). La présence de bactéries à gram-positif a été plus facile à remarquer sur les sections grâce à la composition différente entre les deux types de membranes et à la présence des pré-spores (PS).

De plus, lors de l'observation en microscopie photonique d'une suspension bactérienne obtenue par la dispersion d'une colonie en croissance en présence de thiosulfate dans de l'eau physiologique, nous avons observé des granules réfringents à l'intérieur des cellules. Ces granules n'étaient ni des spores ni du poly- β -hydroxybutyrate, puisque les colorations spécifiques s'étaient avérées négatives.

8.2 Caractéristiques phylogénétiques

Comme aucun essai n'a permis d'isoler l'espèce thio-oxydante acidifiante du consortium, nous avons procédé à une amplification par PCR de tous les ADNr 16S (bases 515 à 1492) du consortium. Après une digestion du produit PCR par des enzymes de restriction (RFLP), le patron obtenu à partir du RFLP a montré un nombre très faible de bandes. Le produit PCR a donc été séquencé directement. La séquence partielle de 350 paires de bases présentait 99 % d'homologie avec celles de *T. thiooxidans*/*T. ferrooxidans*. Pour identifier à quelle espèce appartenait l'isolat thio-oxydant, une librairie universelle a été préparée à partir du produit PCR. Le RFLP de ces clones a montré deux types majeurs, le premier a été séquencé au complet et l'autre sur un fragment d'environ 300 paires de base.

La séquence d'un clone du type 1 (Annexe N) démontrait que l'espèce acidifiante du consortium SD-20 était similaire au *T. thiooxidans* ATCC 19377 selon les résultats de la recherche BLAST de la NCBI effectuée à partir de la séquence partielle de l'ADNr 16S. La topologie de l'arbre phylogénétique de la séquence du clone de type 1 du consortium SD-20 a été déterminée par le programme fastDNAm1 de Gary Olsen (RDP) basé sur la méthode du "maximum likelihood" et a confirmé ces résultats (Figure 8.2).

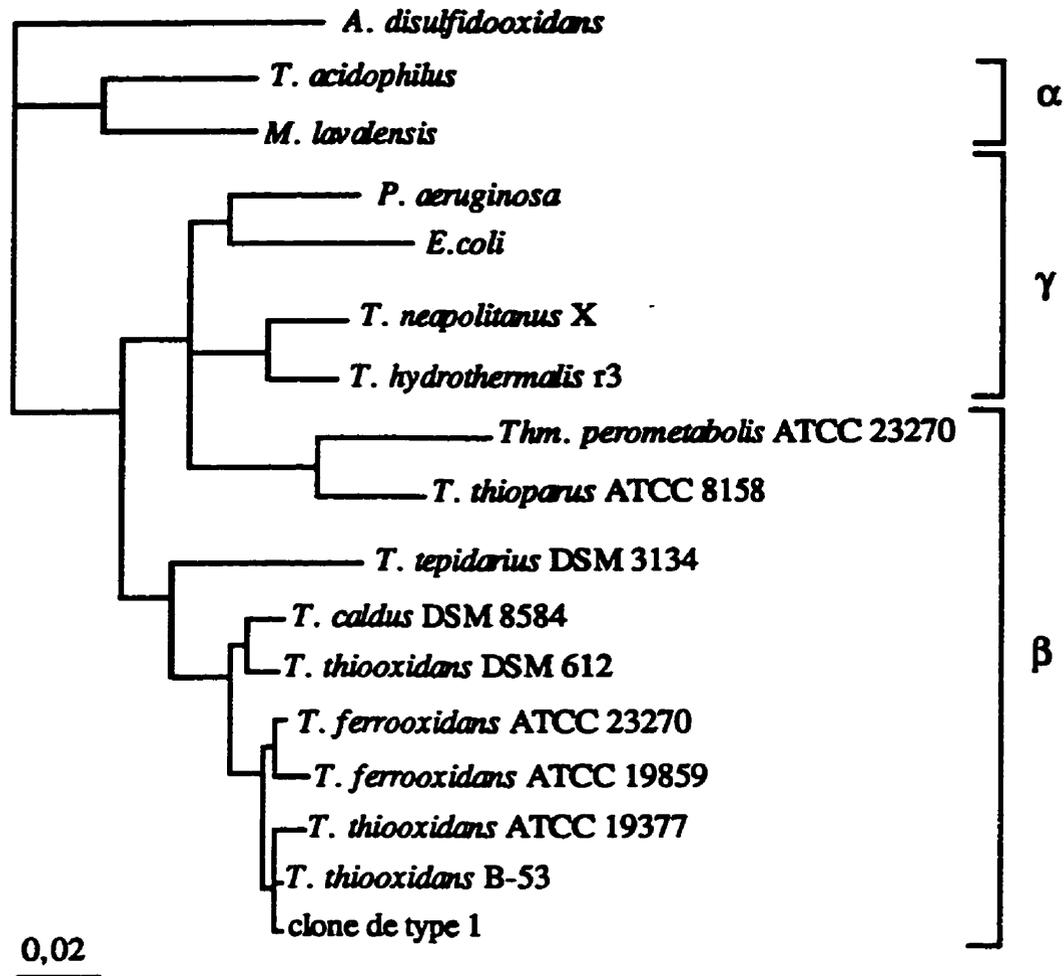


Figure 8.2 Position phylogénétique du clone de type 1 du consortium SD-20 parmi les bactéries du genre *Thiobacillus* basée sur l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S par la méthode du "maximum likelihood".

8.3 Demande en oxygène et source d'azote du consortium SD-20

Toutes les bactéries du consortium étaient aérobies. Tout comme pour *M. lavalensis*, un essai de culture en tube dans le milieu NF a été réalisé avec le consortium SD-20 en utilisant du soufre élémentaire comme substrat (Tableau 8.1). Le consortium SD-20 s'était surtout développé à la surface des milieux. Nous avons cependant remarqué une inhibition de l'espèce thio-oxydante du consortium par 500 $\mu\text{g N/ml}$ sous forme d'extrait de levure (équivalent à 0,19 % P/V) lors de la culture en tube. De plus, l'ammonium et l'extrait de levure ont été utilisés comme source d'azote par le consortium SD-20.

Tableau 8.1 Besoin en oxygène et en azote du consortium SD-20

Croissance milieu NF + [NH ₄ ⁺] (0,05 % agar)			Croissance milieu NF + [EL] (0,05 % agar)		
pH de départ	croissance - à +++ ¹	pH final	pH de départ	croissance - à +++ ¹	pH final
pH 3,0			pH 3,0		
0 µg N/ml	-	2,65	0 µg N/ml	-	2,65
5 µg N/ml	+	2,36	5 µg N/ml	+	2,14
50 µg N/ml	++	1,92	50 µg N/ml	+++	1,74
500 µg N/ml	+++	1,55	500 µg N/ml	-	3,73
pH 4,0			pH 4,0		
0 µg N/ml	-	2,92	0 µg N/ml	-	2,92
5 µg N/ml	+	2,45	5 µg N/ml	+	2,33
50 µg N/ml	++	2,06	50 µg N/ml	++	2,43
500 µg N/ml	+++	2,03	500 µg N/ml	-	4,44
pH 5,0			pH 5,0		
0 µg N/ml	-	4,73	0 µg N/ml	-	4,73
5 µg N/ml	-	4,92	5 µg N/ml	-	5,09
50 µg N/ml	-	4,93	50 µg N/ml	-	5,14
500 µg N/ml	++	1,90	500 µg N/ml	-	5,63

¹. La croissance a été évaluée en fonction de la turbidité

². EL : extrait de levure

8.4 Caractéristiques physiologiques

Les caractéristiques physiologiques du consortium ont aussi été déterminées, mais celles du *T. thiooxidans* ont été déduites à partir des résultats obtenus pour les autres isolats (voir Chapitre 6 et 7) et le consortium SD-2 ou SD-20 selon les cas (Tableau 8.2).

Les espèces formant le consortium avaient deux points majeurs en commun. En premier lieu, elles étaient toutes mésophiles et acidophiles ou acidotolérantes, même si le pH et la température optimum de croissance variaient selon les isolats. Et deuxièmement, le consortium pouvait croître dans un milieu minéral sans ajout d'extrait de levure comme facteur de croissance et subvenir à ses besoins nutritifs tant qu'une source d'énergie comme le soufre élémentaire ou un sulfure métallique lui était fourni. Lorsque toutes les espèces étaient réunies dans le consortium SD-2, aucun ajout de composés organiques n'était nécessaire pour la croissance du consortium. Pour ce qui était des sources d'énergie et de carbone, il existait une grande différence entre les espèces présentes au sein du consortium.

Tableau 8.2 Caractéristiques physiologiques du *T. thiooxidans* et du consortium

Résultats pour:		
Caractéristiques	<i>T. thiooxidans</i> ¹	Consortium ²
Température		
intervalle de croissance	20-35°C	20-35°C
optimum	25-30°C	30°C
pH		
intervalle de croissance	7-5,5	0,5-5,5
optimum	n.d.	n.d.
Facteur de croissance	n.d.	aucun
Croissance dans :		
S ⁰	+	+
Fe ²⁺	-	-
Fe ₂ S	+	+
extrait de levure	-	-
Acétate	-	-
DBT	-	-
glutathion	n.d	+
Croissance sur :		
FeTSB	+	+
FTG	+	+
MMM pH 7,0	-	-
MMM pH 4,0	-	-
BS4	+	+
BAM	-	-

¹. Résultats déduits à partir des résultats obtenus pour chacun des isolats et pour le consortium

². Résultats basés sur les consortiums SD-20 et SD-22

+ : croissance positive, - : aucune croissance, f : faible croissance, n.d. : non déterminé

S'il est presque impossible d'étudier l'activité enzymatique d'extraits cellulaires de deux bactéries en culture mixte, il est encore plus difficile d'étudier le métabolisme d'un consortium dont la composition est incertaine. L'électrophorèse sur gel d'amidon nous a permis de comparer les enzymes de deux espèces différentes (*A. disulfidooxidans* et *Alb. cycloheptanicus*); mais son rôle le plus important a cependant été de nous permettre de vérifier la présence d'une enzyme en particulier chez les différents partenaires du consortium, puisqu'elle permet de déterminer le nombre de bactéries qui possèdent une bonne activité enzymatique pour une enzyme spécifique (Tableau 8.3).

Tableau 8.3 Enzymes clés de différents sentiers métaboliques retrouvées dans les extraits cellulaires des partenaires du consortium

Enzyme	<i>A. disulfidooxidans</i>	<i>M. lavalensis</i>	Consortium SD-20	<i>T. thiooxidans</i> ATCC 19377
Malate déshydrogénase (TCA) (NAD)	0,41 ¹	0,44	+ ²	-
Isocitrate déshydrogénase (TCA) (NADP)	0,50	+	+	-
6-P-gluconate déshydrogénase (HMP) (NAD)	0,67	0,61	0,67	-
6-P-gluconate déshydrogénase (HMP) (NADP)	-	-	0,35	0,35
Glucose-6-P déshydrogénase (HMP et ED) (NADP)	+	0,31	+	+
α -cétoglutarate déshydrogénase (TCA)	+	+	+	+
Glutamate déshydrogénase	+	+	+	n.d.
Hexokinase	+	0,10	+	+
6-phosphofructokinase (EMP)	-	-	-	-
Fructose-1,6-diphosphate aldolase (EMP)	+	-	-	+
Malate synthase (cycle du glyoxylate)	-	-	-	-
Citrate synthase (TCA)	+	+	+	n.d.

¹. Rf d'une enzyme spécifique après électrophorèse d'extraits cellulaires sur gel d'amidon

². Présence ou absence de l'enzyme à partir d'expérimentation en microplaques

Dans notre cas, la 6-phosphogluconate déshydrogénase en est un bon exemple; car lors de sa détection dans les tranches du gel, nous avons observé deux bandes d'activité à partir de l'extrait enzymatique du consortium SD-20, l'une spécifique au NAD et l'autre au NADP (Figure 8.3). De plus, le Rf de la bande réagissant avec le NADP était le même que celui du *T. thiooxidans* ATCC 19377 alors que le Rf de la bande spécifique au NAD correspondait à celui obtenu pour *A. disulfidooxidans*. De plus, aucune bande n'a été observée pour la 6-phosphogluconate déshydrogénase du *M. lavalensis* dans le consortium SD-20.

Un autre exemple a été obtenu avec la malate déshydrogénase (Figure 8.3). Lors de la coloration spécifique d'une tranche du gel pour déceler son activité, aucune bande d'activité n'a été identifiée pour le *T. thiooxidans* ATCC 19377 de même que pour le *T. thiooxidans* du consortium. Cependant, une activité positive de la malate déshydrogénase a été observée pour *A. disulfidooxidans* et *M. lavalensis*.

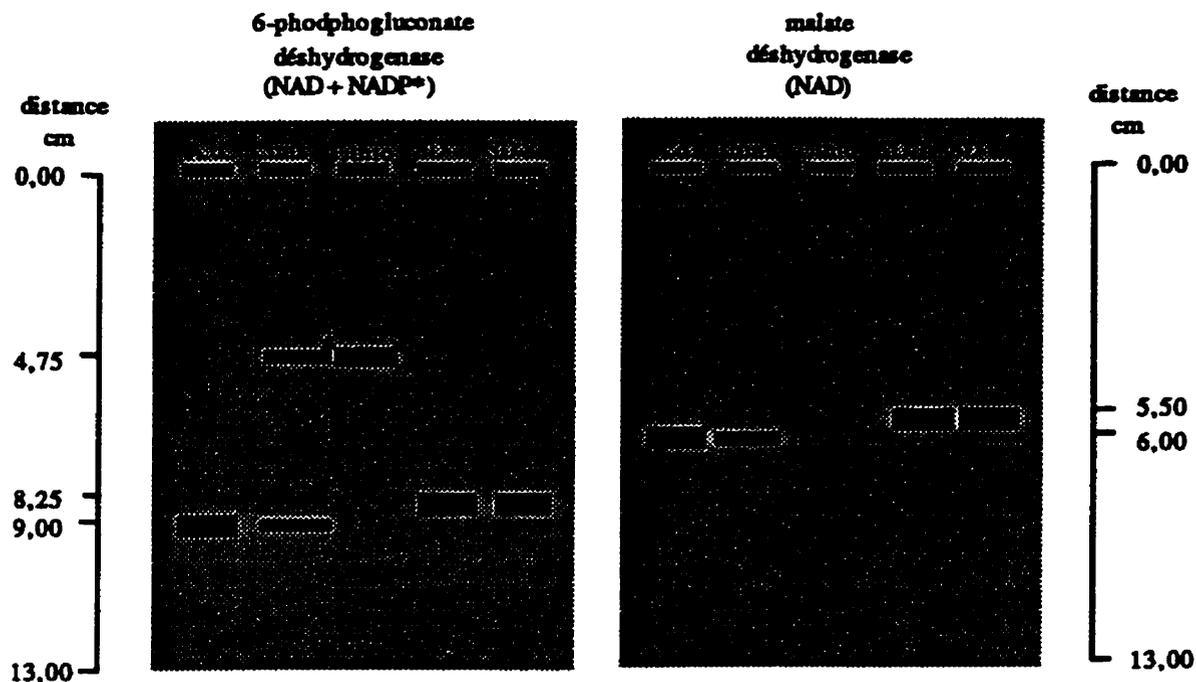


Figure 8.3 Activités enzymatiques d'extraits bactériens après électrophorèse sur gel d'amidon (A.d., *A. disulfidooxidans*; Cons, consortium SD-20; T. thio, *T. thiooxidans* ATCC 19377; SD-7 et SD-8, *M. lavalensis*)

8.5 Discussion

8.5.1 Analyses des caractéristiques morphologiques

Les conditions d'enrichissement et de culture utilisées pour isoler ce consortium ont été axées sur l'isolement des thiobacilles. Même si l'espèce acidifiante thio-oxydante n'a pas été isolée en culture pure, elle est composée de bâtonnets ($0,5 \mu\text{m} \times 1-2 \mu\text{m}$) gram-négatifs, mobiles, non sporulés, apparaissant isolés ou en paire. Cette description était attendue, car la plupart des bactéries thio-oxydantes acidifiantes comme les thiobacilles possèdent ces caractéristiques (Blais *et al.*, 1992). Le cytoplasme des cellules thio-oxydantes contient des granules de volutine (polymétaphosphate, GR) et plusieurs carboxysomes (CB) (Figure 8.1 A et C) (Mayer, 1986) qui sont caractéristiques des bactéries autotrophes. De plus, les granules réfringents observés à l'intérieur des cellules de l'espèce thio-oxydante acidifiante sont vraisemblablement des particules de soufre, car les thiobacilles sont reconnus pour produire des particules de soufre extracellulaires (entre la membrane cytoplasmique et la paroi) lors du métabolisme aérobie du thiosulfate (Kelly et Harrison, 1988; Kuenen *et al.*, 1992).

Par ailleurs, comme les thiobacilles, cette espèce avait tendance à s'agglomérer autour des particules de soufre élémentaire en culture liquide (Bryant *et al.*, 1984). De ce fait, les caractéristiques morphologiques de l'espèce acidifiante thio-oxydante n'ont fait qu'appuyer ce que nous pensions depuis le début : nous sommes en présence d'une espèce acidophile du genre *Thiobacillus* (*Thiobacillus sp.*). De plus, la concentration cellulaire du *Thiobacillus sp.* du consortium SD-2 en croissance en présence de soufre est supérieure à celle des autres espèces dans le consortium.

8.5.2 Analyse phylogénétique

La séquence de l'ADNr 16S du clone de type 1 du *Thiobacillus sp.* est presque identique à celle du *T. thiooxidans* ATCC 19377. Les deux seules différences entre les séquences sont retrouvées dans les régions des amorces. Comme ces régions sont habituellement enlevées pour les analyses phylogénétiques, l'espèce acidifiante thio-oxydante du consortium est donc similaire au *T. thiooxidans* ATCC 19377.

De plus, la séquence du clone de type 2 complète est identique à celle du clone de type 1. La présence de deux types de patrons lors du RFLP peut s'expliquer par une amplification asymétrique des inserts causée par la paire d'amorce utilisée. Il n'y a donc qu'un seul thiobacille présent dans le consortium et ce dernier est phylogénétiquement similaire au *T. thiooxidans* ATCC 19377.

L'analyse de la topologie de l'arbre phylogénétique confirme l'identification du *Thiobacillus sp.* du consortium comme étant un *T. thiooxidans*. Il se situe dans la division β des protéobactéries, division qui comprend la majorité des espèces du genre *Thiobacillus* dont les deux espèces les plus étudiées : *T. ferrooxidans* et *T. thiooxidans*.

8.5.3 Analyses des propriétés biochimiques

Les propriétés biochimiques du *T. thiooxidans* du consortium n'ont pu être évaluées. Comme pour les *Acidobacter sp.*, les milieux de cultures employés pour ces analyses ne sont pas appropriés au mode de croissance de cet isolat.

L'inhibition du *T. thiooxidans* du consortium par l'extrait de levure démontre sa sensibilité face à la matière organique. Comme pour *M. lavalensis* et les *Acidobacter sp.*, le consortium SD-20 utilise l'ammonium et l'extrait de levure comme source d'azote. D'ailleurs, une étude a déjà démontré l'utilisation d'acides aminés comme source d'azote chez *T. ferrooxidans* (Lafleur, 1993).

8.5.4 Analyse physiologique

Selon les résultats obtenus pour le consortium SD-2, les *Acidobacter* sp. et *M. lavalensis*, nous avons déduit que le *T. thiooxidans* du consortium est acidophile et mésophile. De plus, il est acidifiant, puisque aucun autre des isolats ne possède cette propriété. La capacité du consortium à croître en l'absence de toute trace de carbone organique démontre qu'il y a au moins une espèce à l'intérieur du consortium qui fixe le CO₂. La présence des carboxysomes à l'intérieur des cellules du *T. thiooxidans* du consortium démontre qu'il peut croître en condition de croissance autotrophe comme rapporté pour la plupart des espèces de ce genre (voir Chapitre 2, section 2.3). Le *T. thiooxidans* du consortium fixe donc le CO₂. De plus, le *T. thiooxidans* du consortium oxyde les composés soufrés, mais il est incapable d'oxyder le fer ferreux. Nous ne sommes donc pas en présence d'une souche ferro-oxydante.

La physiologie des thiobacilles est très variable et bien représentée par l'hétérogénéité du genre (Moreira et Amils, 1997). Chez ces bactéries, le choix des sentiers métaboliques utilisés dépend de leur métabolisme. Il y a une grande différence entre les bactéries chimiolithotrophes facultatives qui utilisent les trois sentiers majeurs connus et les bactéries chimiolithotrophes strictes qui ont tendance à n'utiliser qu'un sentier (Rittenberg, 1969). *T. thiooxidans* possède toutes les enzymes du cycle du citrate sauf l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Ce cycle joue donc un rôle purement anabolique chez cette bactérie. De plus, *T. thiooxidans* n'a pas les enzymes clés des sentiers ED et EMP, mais il a celles du sentier HMP (Matin, 1978). Les résultats obtenus avec une souche de *T. thiooxidans* ATCC 19377 concordent avec ceux de la littérature, puisque nous avons identifié la 6-phosphogluconate déshydrogénase et la citrate synthase, mais pas l'aldolase ni l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Cependant, l'absence d'une culture pure du *T. thiooxidans* du consortium nous a empêché d'étudier son métabolisme sauf pour quelques enzymes qui ont donné des résultats intéressants après électrophorèse sur gel d'amidon.

Les similitudes observées au niveau des Rf pour la 6-phosphogluconate déshydrogénase pour les extraits enzymatiques du consortium SD-20, de *A. disulfidooxidans* et du *T. thiooxidans* ATCC 19377 confirment la présence de ces deux espèces dans le consortium en proportion suffisante pour que leurs activités enzymatiques soient décelables. De plus, l'absence d'une bande possédant un Rf similaire à celui de la 6-phosphogluconate déshydrogénase du *M. lavalensis* dans le consortium SD-20 confirme nos résultats obtenus lors des essais d'isolement qui ont démontré son absence de ce consortium.

Par ailleurs, aucune bande d'activité de la malate déshydrogénase n'a été observée pour le *T. thiooxidans* ATCC 19377 de même que pour le *T. thiooxidans* du consortium. Le cycle du citrate étant incomplet chez ces bactéries, la malate déshydrogénase n'y a qu'une fonction anabolique et sa concentration est probablement trop faible pour qu'une activité soit remarquée sur le gel. Cela confirme en quelque sorte la similitude entre les deux bactéries. Au contraire, l'activité positive de la malate déshydrogénase observée chez *A. disulfidooxidans* et *M. lavalensis* confirme la fonctionnalité du cycle de l'acide citrique chez ces deux espèces bactériennes.

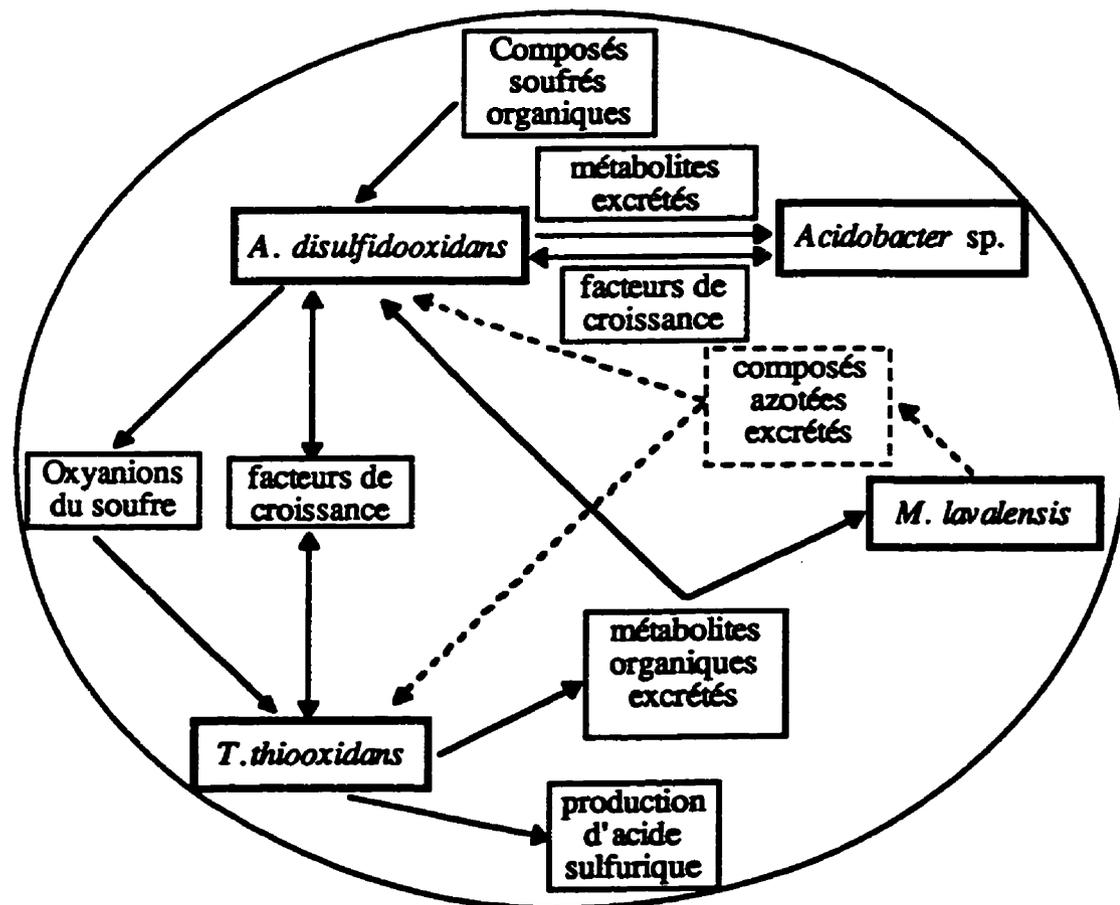
8.5.5 Analyse taxinomique

L'analyse phénotypique démontre que le *T. thiooxidans* du consortium est similaire au *T. thiooxidans* ATCC 19377. Cependant certaines différences, probablement retrouvées au niveau du phénotype, ont rendu impossible l'isolement en culture pure du *T. thiooxidans* du consortium par les techniques utilisées. Une meilleure compréhension des relations entre *A. disulfidooxidans* et ce partenaire permettrait probablement son isolement.

Par ailleurs, les méthodes d'enrichissement et de culture employées pour isoler les bactéries thio-oxydantes ont démontré que la plupart des isolats provenant des sites miniers sont similaires aux espèces déjà connues sur la base de leur physiologie (Harrison, 1984) et de l'homologie des séquences des ADNr 16S (Lane *et al.*, 1992). L'identification de l'espèce acidifiante thio-oxydante de notre consortium comme étant un *T. thiooxidans* démontre que même les thiobacilles isolés de d'autres environnements peuvent être similaires à ceux qui proviennent des sites miniers.

CHAPITRE 9

DICUSSION GÉNÉRALE: INTERACTIONS ENTRE LES ESPÈCES BACTÉRIENNES DU CONSORTIUM SD-2



Consortium SD-2

CHAPITRE 9

9. DISCUSSION GÉNÉRALE: INTERACTIONS ENTRE LES ESPÈCES BACTÉRIENNES DU CONSORTIUM SD-2

Le consortium SD-2 est donc composé de *A. disulfidooxidans*, d'une autre espèce du genre *Acidobacter*, de deux sous-espèces de *M. lavalensis* et de *T. thiooxidans*. Après l'isolement et la caractérisation de ces espèces formant le consortium SD-2, une étude de leurs interactions a été réalisée. Cependant, les interactions déduites ne sont dans plusieurs cas que des hypothèses, puisque le temps a été insuffisant pour les prouver hors de tout doute. Nous avons d'abord décrit les interactions entre les espèces bactériennes du consortium SD-2 selon le système de classification suggéré par Slater et Bull (1978), basé sur les mécanismes biologiques (Chapitre 3, section 3.3.2). Puis, nous avons distingué les espèces du consortium selon les termes définis par Brock (1966) et Slater et Bull (1978) (Chapitre 3).

9.1 Classification basée sur les mécanismes biologiques

Comme une communauté peut démontrer les effets de plus d'une classe d'interaction, nous avons aussi décrits les interactions entre les espèces bactériennes du consortium selon les effets sur la croissance (compétition, antagonisme, commensalisme et mutualisme) (Chapitre 3, section 3.3.1).

9.1.1 Échange de facteurs de croissance

L'analyse de l'influence de l'extrait de levure sur le métabolisme des *Acidobacter* sp. lors de la croissance de la culture mixte en présence d'extrait de levure et/ou des solutions de vitamines, d'acides aminés et de métaux en trace lèvent une partie du voile sur les liens entre les deux *Acidobacter* sp. (SD-6 et SD-9) (section 6.6.6.1). Elle permet d'établir qu'il existe une interaction mutualiste basée sur l'approvisionnement d'un élément nutritif (facteur de croissance) entre les deux *Acidobacter* sp. (Figure 9.1). Le facteur de croissance fourni par l'*Acidobacter* sp. à *A. disulfidooxidans* peut être remplacé par l'extrait de levure. Cependant, l'inverse n'est probablement pas vrai, car aucune croissance de l'*Acidobacter* sp. en culture pure n'a été obtenue.

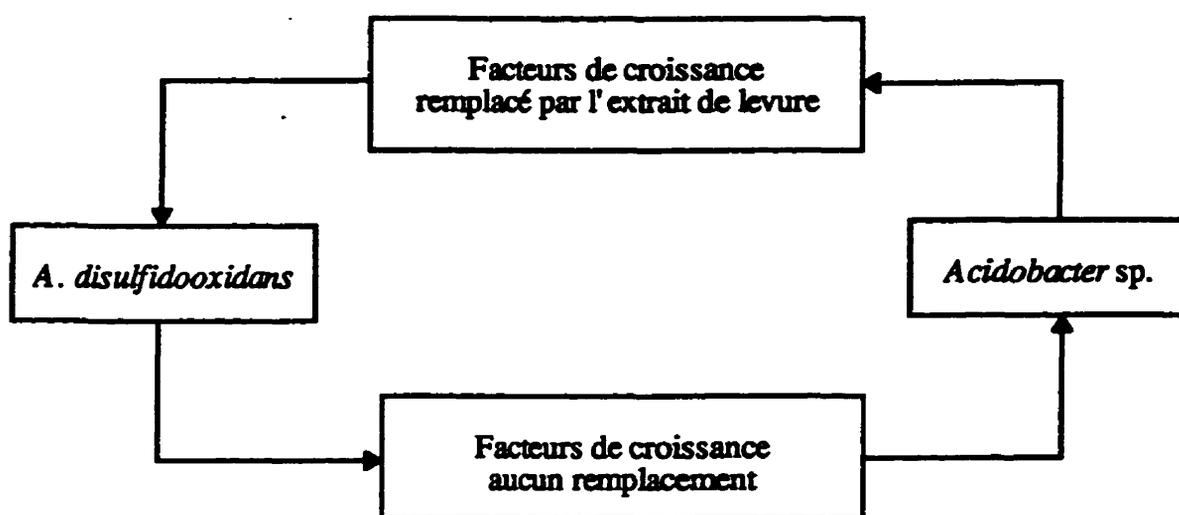


Figure 9.1 Échange de facteurs de croissance entre les deux *Acidobacter* sp.

Lors de la croissance du consortium dans le milieu BS4 sans extrait de levure, *T. thiooxidans* fournit les facteurs de croissance nécessaires au développement des *Acidobacter* sp. De même, les *Acidobacter* sp. doivent suppléer des éléments nutritifs au *T. thiooxidans*. Il existe donc une relation mutualiste entre les *Acidobacter* sp. et le *T. thiooxidans*. Alors, il n'est pas surprenant qu'ils possèdent des liens si étroits l'un avec l'autre et qu'il ait été impossible de les séparer.

9.1.2 Approvisionnement d'un élément nutritif

Aucune espèce du genre *Methylobacterium* n'a été rapportée comme fixatrice d'azote. Cependant, le genre *Methylobacterium* est situé dans la sous-classe α -2 des *Proteobacteria* entre certains genres bactériens fixateurs d'azote (*Rhizobium* et *Azorhizobium*) et les bactéries pourpres soufrées (*Rhodopseudomonas* et *Rhodoplanes*) (Hiraishi *et al.*, 1995). De plus,

Green (1992) a été rapporté que des PPFM ont été isolés de nodules stérilisés. Donc, il est apparemment que des associations symbiotiques ou mutualistes pourraient exister entre certaines espèces du genre *Methylobacterium* et des plantes (Green, 1992). Rien n'empêche alors que le même type d'association puisse exister entre les *Methylobacterium* et d'autres espèces bactériennes. L'éventualité que *M. lavalensis* puisse être diazotrophe n'est donc pas écartée, puisque ce dernier est microaérophile et que plusieurs espèces méthylotrophes sont reconnues pour fixer l'azote atmosphérique lorsque le niveau d'oxygène dissout est faible (Hanson et Hanson, 1996). Cependant, la seule certitude existante se situe au niveau de la compétition entre les espèces du consortium pour les composés azotés du milieu de culture (Figure 9.2).

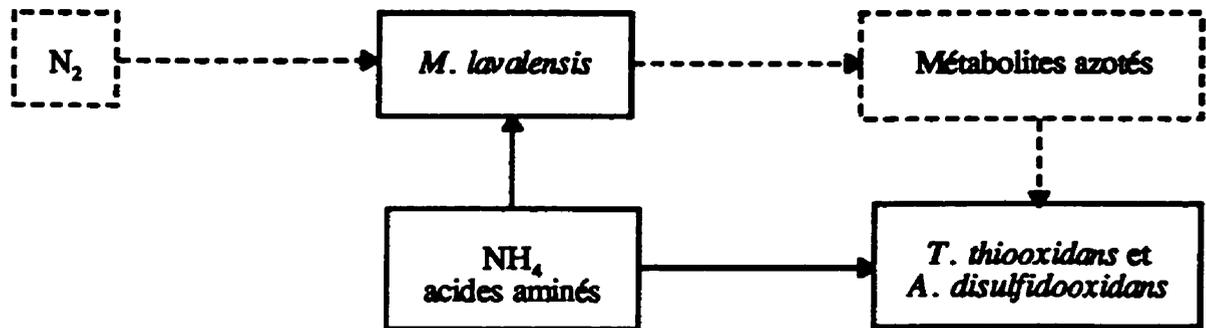


Figure 9.2 Métabolisme de l'azote par le consortium SD-2

9.1.3 Diminution de l'inhibition de croissance

Les *Acidobacter* sp. et *M. lavalensis* ont établi une relation commensale avec le *T. thiooxidans* basée sur la diminution de l'inhibition de croissance du *T. thiooxidans*, en utilisant les métabolites organiques excrétés par ce dernier (Figure 9.3). Cependant, l'utilisation de ces métabolites par *M. lavalensis* et les *Acidobacter* sp. les fait vraisemblablement entrer en compétition.

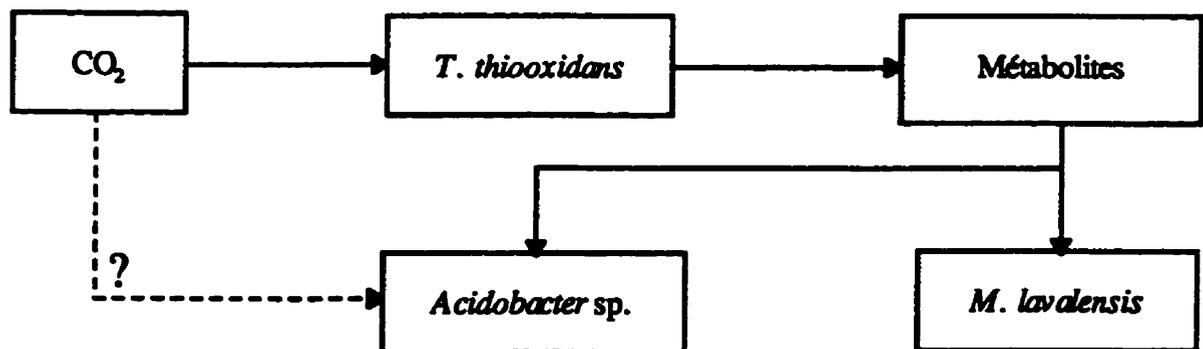


Figure 9.3 Production de métabolites par *T. thiooxidans*

Une relation de mutualisme basée sur une diminution de l'inhibition de la croissance est aussi observée entre *A. disulfidooxidans* et l'*Acidobacter* sp. lorsqu'ils sont cultivés en présence de glucose et de soufre (Chapitre 6, section 6.6.6.2). Les métabolites produits par *A. disulfidooxidans* à partir du glucose sont utilisés ultérieurement par l'*Acidobacter* sp. De cette manière, l'inhibition causée sur *A. disulfidooxidans* par ces métabolites dans le milieu de culture est diminuée (Figure 9.4).

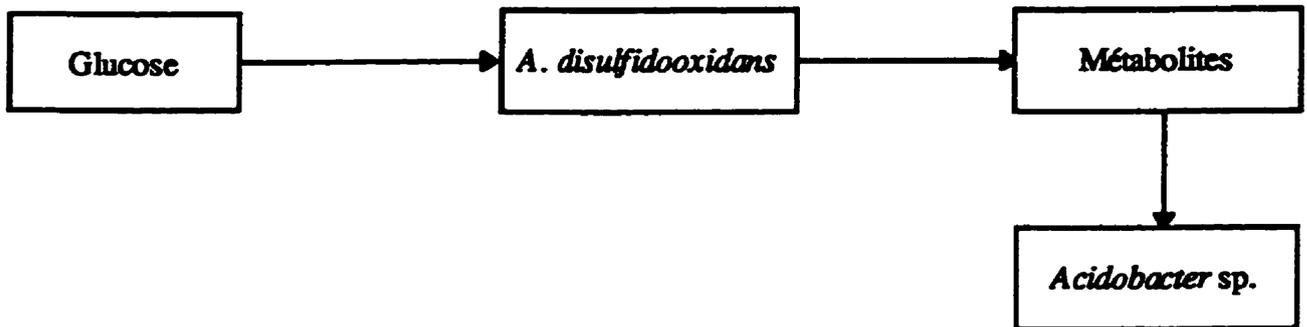


Figure 9.4 Métabolisme du glucose par les *Acidobacter* sp.

9.1.4 Cométabolisme des composés soufrés organiques

Lors de l'utilisation de composés soufrés organiques, les *Acidobacter* sp. oxydent partiellement les atomes de soufre en oxyanions du soufre (Chapitre 6, section 6.6.6.4) qui sont par la suite oxydés par le *T. thiooxidans* (Chapitre 8). À ce moment, Nous sommes probablement en présence d'une relation mutualiste entre ces deux espèces bactériennes. Cependant, *T. thiooxidans* a une relation d'antagonisme avec les autres espèces du consortium causé par sa production d'acide sulfurique (Figure 9.5).

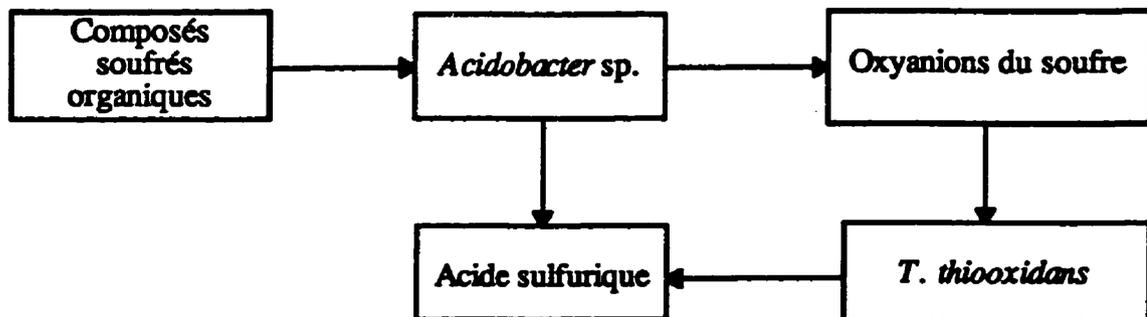


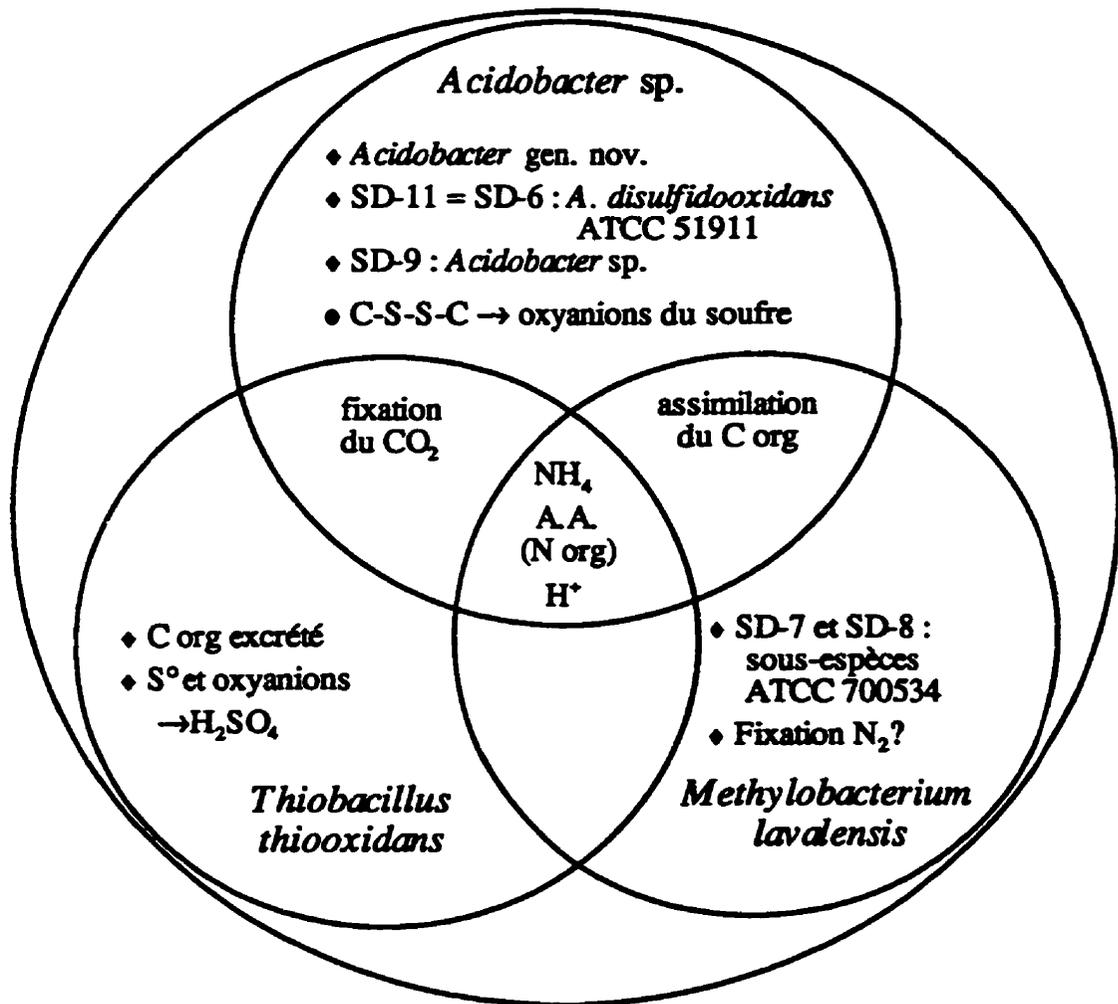
Figure 9.5 Métabolisme des composés soufrés organiques par le consortium

9.2 Distinction des espèces bactériennes du consortium SD-2 basée sur leurs fonctions

Au départ, les *Acidobacter* sp. ont été choisis comme espèces dominantes, puisqu'ils peuvent croître seules et malgré que l'espèce acidifiante semble représenter une population plus abondante dans la culture liquide. Contrairement aux *Acidobacter* sp., l'espèce acidifiante a absolument besoin de leur présence pour croître dans les conditions de culture utilisées, elle serait donc une espèce associée. *M. lavalensis* pourrait être une espèce incidente, car aucun changement visible n'a été remarqué dans le consortium SD-20 où ils sont absents par rapport à celui au consortium SD-2.

Après l'analyse de tous nos résultats, le *T. thiooxidans* est l'espèce dominante du consortium même s'il a absolument besoin des *Acidobacter* sp. pour croître alors que ces dernières seraient des espèces associées. Le *T. thiooxidans* et les *Acidobacter* sp. sont tous des utilisateurs primaires du soufre élémentaire; mais en présence de composé soufré organique, les *Acidobacter* sp. sont les utilisateurs primaires et le *T. thiooxidans*, l'utilisateur secondaire. Par ailleurs, *M. lavalensis* reste une espèce incidente du consortium, sauf s'il s'avérait être un fixateur d'azote. Il pourrait alors devenir une espèce associée au même titre que les *Acidobacter* sp. De plus, *M. lavalensis* et les *Acidobacter* sp. jouent aussi le rôle d'utilisateurs secondaires, car ils utilisent les métabolites ou les produits de la lyse cellulaire pour croître.

CONCLUSIONS



Consortium SD-2

CONCLUSIONS

Lors des essais de désulfuration du noir de carbone pyrolytique, nous avons observé une oxydation des composés soufrés par le consortium bactérien SD-2 isolé à partir de boues d'usine d'épuration des eaux usées. Au départ, nous considérons l'oxydation du soufre comme le résultat exclusif de bactéries thio-oxydantes tels les thiobacilles présentes dans le consortium. Cependant, le soufre du noir de carbone pyrolytique étant retrouvé à 96 % sous forme organique et les thiobacilles n'étant pas reconnus pour l'oxyder, l'objectif initial de ce projet de recherche était donc de caractériser l'oxydation du soufre organique en acide sulfurique par ce consortium

Cependant, il est très difficile d'étudier un consortium si les microorganismes participants et leurs interactions sont inconnues. La première étape a donc consisté à isoler les espèces bactériennes du consortium, puis à les identifier et les caractériser. Par la suite, nous avons analysé leurs propriétés phénotypiques de manière à mieux comprendre les interactions qui les relient potentiellement à l'intérieur d'un consortium.

Nous avons déterminé que le consortium bactérien est composé d'*Acidobacter disulfidooxidans* gen. nov. comb. nov. (SD-11 et SD-6), de *Methylobacterium lavalensis* sp. nov. (SD-8), de *Thiobacillus thiooxidans*, d'une autre espèce appartenant au genre *Acidobacter* (*Acidobacter* sp. SD-9), puis finalement d'une sous-espèce de *M. lavalensis* (SD-7). Toutes ces espèces ont la propriété d'être acidophiles ou acidotolérantes. De plus, leur température optimale de croissance se situe entre 20 et 37°C. Lorsqu'elles sont regroupées à l'intérieur du consortium, elles n'ont besoin pour croître que d'une seule source d'énergie qui peut être fournie par le soufre élémentaire.

Les *Acidobacter* sp. sont des bactéries gram-positives en forme de bâtonnets, non mobiles mais formant des spores. Elles sont chimiolithohétérotrophes, puisqu'elles ont besoin d'une source d'énergie inorganique ou organique différente de leur source principale de carbone pour se développer, tout en ayant peut-être la capacité de fixer le CO₂. Ces isolats ont d'abord été identifiés comme des espèces du genre *Sulfobacillus* sur la base de leurs caractéristiques morphologiques, phylogénétiques et physiologiques. Cependant, une controverse a été soulevée sur la pureté de la culture de *S. thermosulfidooxidans*, souche de référence du genre

Sulfobacillus découverte en 1977 et sur laquelle nous avons basé notre comparaison. La caractérisation phénotypique de cette espèce a probablement été réalisée à partir d'une culture mixte. À la suite de cette découverte, l'appartenance de certains de nos isolats à un nouveau genre a été proposée en raison des différences physiologiques qui existaient avec le genre *Alicyclobacillus* qui leur était le plus apparenté au niveau phylogénétiques.

Methylobacterium lavalensis est un bâtonnet polymorphe à gram-négatif, mobile, méthylotrophe, phototrophe et chimioorganotrophe. De plus, les caractéristiques biochimiques et physiologiques ne correspondant à aucune des espèces connues du genre *Methylobacterium*, nous l'avons nommé *M. lavalensis*, puisqu'il a été découvert à l'Université Laval.

L'espèce acidifiante du consortium a été identifiée comme un *T. thiooxidans* directement à partir du consortium par des techniques de biologie moléculaire, puisqu'elle n'a pas été obtenue en culture pure. De plus sa morphologie était typique d'un bâtonnet à gram-négatif, mobile, thio-oxydant et acidifiant.

Pour identifier les espèces du consortium, nous avons donc dû nous baser sur le principe de la taxinomie polyphasique qui intègre les informations de nature phénotypique, génotypique et phylogénétique (Vandamme *et al.*, 1996); puisque qu'aucune de ces espèces bactériennes n'aurait pu être identifiée correctement par l'utilisation d'un seul de ces outils. D'une part, l'étude physiologique a été déterminante lors de la classification de l'isolat SD-11 dans un nouveau genre (*Acidobacter*), car *A. disulfidooxidans* aurait pu être inclus dans le genre *Alicyclobacillus* sur la base de sa morphologie, de l'analyse lipidique et de la phylogénie. De même, les caractéristiques physiologiques de l'isolat SD-8 permettaient d'affirmer que nous étions en présence d'une nouvelle espèce du genre *Methylobacterium*, *M. lavalensis*. En outre, c'est l'analyse phylogénétique du consortium qui nous a permis de confirmer la présence et l'identité du *T. thiooxidans* dont nous supposons la présence sur la base du phénotype du consortium. Par ailleurs, nous avons adapté une technique déjà existante, l'électrophorèse sur gel d'amidon, à l'étude de certaines enzymes clés des sentiers métaboliques d'un consortium. Cette méthodologie permet d'identifier quelques caractéristiques physiologiques du consortium en absence de l'identité de ses partenaires bactériens.

Une fois l'identification et la caractérisation des espèces bactériennes formant le consortium complétées, il a été possible d'émettre des hypothèses sur les interrelations qui les reliaient à l'intérieur d'un consortium bactérien. À l'analyse de tous nos résultats, le *T. thiooxidans* serait l'espèce dominante du consortium même s'il a absolument besoin des *Acidobacter* sp. pour croître, et ces dernières seraient des espèces associées. Le *T. thiooxidans*

et les *Acidobacter* sp. sont tous des utilisateurs primaires du soufre élémentaire. Cependant, en présence de composé soufré organique, le *T. thiooxidans* devient un utilisateur secondaire. Par ailleurs, *M. lavalensis* serait plutôt une espèce incidente du consortium, sauf s'il s'avérait être un fixateur d'azote. Il pourrait alors devenir une espèce associée au même titre que les *Acidobacter* sp. De plus, *M. lavalensis* et les *Acidobacter* sp. jouent aussi le rôle d'utilisateurs secondaires, car ils utilisent probablement les métabolites ou les produits de la lyse cellulaire pour croître.

Nous avons aussi noté plusieurs types d'interactions. *T. thiooxidans* a une relation d'antagonisme avec les autres espèces du consortium causé par sa production d'acide sulfurique. Il manifeste aussi une relation mutualiste avec les *Acidobacter* sp. qui est basée sur l'approvisionnement d'un élément nutritif (facteur de croissance). Par ailleurs, *M. lavalensis* et les *Acidobacter* sp. ont probablement établi une relation commensale avec le *T. thiooxidans* basée sur la diminution de l'inhibition de croissance du *T. thiooxidans*, en utilisant les métabolites organiques excrétés par ce dernier. Cependant, l'utilisation de ces métabolites par *M. lavalensis* et les *Acidobacter* sp. les fait vraisemblablement entrer en compétition.

Les recherches peuvent être poursuivies dans plusieurs directions. En premier lieu, l'isolement et la caractérisation du deuxième *Acidobacter* sp. permettraient une meilleure description du genre et confirmeraient les différentes hypothèses que nous avons émises à propos de sa physiologie. Deuxièmement, l'isolement du *T. thiooxidans* du consortium amènerait peut-être la découverte du facteur de croissance que lui fournissent les *Acidobacter* sp. Troisièmement, nous n'avons pas éliminé la possibilité que *M. lavalensis* puisse fixer l'azote. Il serait intéressant de pouvoir infirmer ou confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, nous n'avons fait que survoler l'oxydation des composés soufrés organiques et inorganiques par les *Acidobacter* sp. Nous avons soulevé quelques questions auxquelles nous n'avons pu trouver de réponse. Il nous apparaît évident qu'une étude plus approfondie des mécanismes d'oxydation des composés soufrés serait nécessaire à une meilleure compréhension du métabolisme du soufre par ces bactéries.

L'oxydation du soufre organique par le consortium n'a pas été résolue complètement. Cependant, nous savons maintenant que les *Acidobacter* sp. utilisaient vraisemblablement certaines molécules carbonées du noir de carbone pyrolytique comme source de carbone en plus d'utiliser les composés soufrés comme source d'énergie. Avant d'utiliser ce consortium pour la décontamination de noir de carbone pyrolytique, il serait important d'étudier les modifications engendrées à l'intégrité du squelette carboné du noir de carbone pyrolytique par les *Acidobacter* sp. Par ailleurs, la composition du consortium ainsi que les rôles de chacun des partenaires ont été élucidés en grande partie. L'étude des consortiums en est à ses débuts, car les technologies

qui peuvent servir à suivre des populations microbiennes vivant dans un même environnement sont peu nombreuses. L'adaptation ou le développement de nouvelles méthodologies amèneront probablement plusieurs découvertes intéressantes dans les prochaines années.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Alexander, M. 1971. *Microbial ecology*. John Wiley & Sons, New York. 533 pages.
- Allgaier, H., K. Poralla et G. Jung. 1985. ω -Cycloheptyl- α -hydroxyundecanoic acid, a new fatty acid from a thermo-acidophilic *Bacillus* species. *Liebigs Ann. Chem.* 0:378-382.
- Amann, R.L., W. Ludwig, et K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59:143-169.
- Andrews, A.T. 1986. *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications*. 2ième édition. Clarendon Press, Oxford. p.332-339.
- Antranikian, G. et F. Giffhorn. 1987. Citrate metabolism in anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 46:175-198.
- Antranikian, G., C. Herzberg et G. Gottschalk. 1982. Characterization of ATP citrate lyase from *Chlorobium limicola*. *J. Bacteriol.* 152:1284-1287.
- APHA, AWWA et WPCF. 1985. *Standard methods for examination of water and wastewater*. APHA, Washington, D.C., USA. p.464-488.
- Arulsekhar, S. et D.E. Parfitt. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. *HortSci.* 21:928-933.
- Augustian, A., C. Mohammed, J.J. Guillaumin et B. Botton. 1994. Discrimination of some african *Armillaria* species by isozyme electrophoretic analysis. *New Phyto.* 128:135-143.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith et K. Struhl. 1992. *Short Protocol in Molecular Biology, A compendium of methods from current protocols in Molecular Biology*. p.2-10 et 2-11.
- Atlas, R.M. 1993. *Handbook of microbiological media*, L.C. Parks (Éditeur). CRC Press Inc, Boca Raton, Floride. 1017 pages.
- Atlas, R.M. et R. Bartha. 1987. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. The Benjamin / Cumming Publishing Compagny, Inc., USA. 513 pages.
- Bacon, M. et W.J. Ingledew. 1989. The reductive reactions of *Thiobacillus ferrooxidans* on sulphur and selenium. *FEMS Microbiol. Lett.* 58:189-194.
- Barbosa, H.R. et Y.F. Struckel. 1985. Slime production by *Beijerinckia derxii*: effects of cultural conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17: 731-732.
- Barton, L.L. et J.M. Shively. 1968. Thiosulfate utilisation by *Thiobacillus thiooxidans* ATCC 8085. *J. Bacteriol.* 95: 720.
- Beijerinck, M.W. 1904. Phénomènes de réduction produits par les microbes. *Arch. Sci. Exactes Nat.* 9:131-157.
- Beudeker, R.F. et J.G. Kuenen. 1981. Carboxisomes: "Calvinosomes"? *FEBS Lett.* 131:269-274.
- Blais, J.F., J.C. Auclair et R.D. Tyagi. 1992. Cooperation between two *Thiobacillus* strains for heavy-metal removal from municipal sludge. *J. Can. Microbiol.* 38:181-187.

- Bousfield, I.J. et P.N. Green.** 1985. Reclassification of the bacteria of the genus *Protomonas* Urakami and Komagata 1984 in the genus *Methylobacterium* (Patt, Cole, and Hanson) Emend. Green and Bousfield 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:209.
- Brannan, D.K. et D.E. Caldwell.** 1980. *Thermotrix thiopara*: growth and metabolism of a newly isolated thermophile capable of oxidizing sulfur and sulfur compounds. *Appl. Envir. Microbiol.* 40:211-216.
- Brilon, C., W. Beckmann, M. Hellwig et H.-J. Knackmuss.** 1981. Enrichment and isolation of naphthalenesulfonic acid utilizing Pseudomonads. *Appl. Envir. Microbiol.* 42:39-43.
- Brock, T.D.** 1966. Principles of microbial ecology. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J. 306 pages.
- Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko et J. Parker.** 1994. Biology of microorganisms. 7ième édition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 909 pages.
- Brosius, J., M.L. Palmer, P.J. Kennedy et H.F. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:4801-4805.
- Brune, D.C.** 1989. Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 975:189-221.
- Bryant, R.D., K.M. McGroarty, J.W. Costerton et E.J. Laishley.** 1983. Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*). *Can. J. Microbiol.* 29:1159-1170.
- Bryant, R.D., J.W. Costerton et E.J. Laishley.** 1984. The role of *Thiobacillus albertis* glycocalyx in the adhesion of cells to elemental sulfur. *Can. J. Microbiol.* 30:81-90.
- Bull, A.T. et J.H. Slater.** 1982. Microbial interactions and community structure. *dans* Microbial interactions and communities Vol. 1, A.T. Bull et J.H. Slater (Éditeurs). Academic Press, Toronto. p.13-44.
- Caldwell, D.E., G.M. Wolfaardt, D.R. Korber et J.R. Lawrence.** 1997. Cultivation of microbial consortia and communities. *dans* Manual of environmental microbiology, C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach et M.V. Walter (Éditeurs). ASM Press, Washinton, D.C., USA. p.79-90.
- Cantin, P.** 1995. La lixiviation du phosphore de l'apatite par l'acide sulfurique produit par l'oxydation microbiologique du soufre élémentaire. M.Sc. Université Laval, Ste-Foy. 75 pages.
- Chen, K., H. Neimark, P. Rumore et C.R. Steinman.** 1989. Broad range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 57:19-24.
- Clark, D.A. et P.R. Norris.** 1996. *Acidimicrobium ferrooxidans* gen.nov., sp.nov. mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology-UK.* 142:785-790.
- Cook, A.M. et R. Hütter.** 1982. Ametryne and prometryne as sulfur sources for bacteria. *Appl. Envir. Microbiol.* 43:781-786.
- Costerton, J.W., T.J. Marrie et K.-J. Cheng.** 1985. Phenomena of bacterial adhesion. *dans* Bacteria adhesion, D.C. Savage et M. Fletcher (Éditeurs). Plenum Publishing Corporation, New York. p. 3-43.

- Darland, G. et T. Brock. 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 67:9-15.
- Dawes, I.W. et I.W. Sutherland. 1992. Microbial physiology. 2ième édition. Basic microbiology Series Vol. 4. Blackwell Scientific Publications, Boston. 289 pages.
- Dean, A.M. 1985. The dynamics of microbial commensalisms and mutualisms. *dans* The biology of mutualism, ecology and evolution. D.H. Boucher (Éditeur). Croom Helm, London. p.270-304.
- Deinhard, G., J. Saar, W. Krischke et K. Poralla. 1987a. *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing w-cycloheptane fatty acids. *Syst. Appl. Microbiol.* 10:68-73.
- Deinhard, G., P. Blanz, K. Poralla and E. Altan. 1987b. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Syst. Appl. Microbiol.* 10:47-53
- DeRosa, M., A. Gambercorta, L. Minale et J.D. Bu'Lock. 1972. The formation of ω -cyclohexyl fatty acids from shikimate in an acidophilic thermophilic *Bacillus*. *Biochem. J.* 128:751-754.
- Dijkhuinen, L., M. Knight et W. Harder. 1978. Metabolic regulation in *Pseudomonas oxalaticus* OX1, autotrophic and heterotrophic growth on mixed substrates. *Arch. Microbiol.* 116:77-83.
- Döbereiner, J. et F.O. Pedrosa. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants, Science Tech Publishers, Madison, Wisconsin. p.63-105.
- Doelle, H.W. 1975. Bacterial metabolism. 2ième édition, Academic Press Inc., New York, USA. 738 pages.
- Doetsh, R.N. 1981. Determinative methods of light microscopy. *dans* Manual of methods for general bacteriology, P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg et G.B. Phillips (Éditeurs). ASM, Washington, DC. p.21-33.
- Dooley, J.E., D.E. Hirsch et C.J. Thompson. 1974. Analyzing heavy end of crude oil. *Hydrocarbon Process.* 53:141-146.
- Dorch, M. et E. Stackebrandt. 1992. Some modifications in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA. *J. Microbiol. Methods* 16:271-279.
- Dufresne, S. 1993. Biotransformation de composés soufrés par *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov. M.Sc. Université Laval, Ste-Foy. 109 pages.
- Dufresne, S., J.-F. Blais et R. Guay. 1993. Municipal waste water treatment plant sludges: a source of organic carbon-tolerant, sulfur-oxidizing *Thiobacillus* and *Sulfobacillus* strains. *dans* Biohydrometallurgical technologies Vol. II, A.E. Torma, M.L. Apel et C.L. Brierley (Éditeurs). The Minerals, Metals, & Materials Society, Warrendale, Pennsylvania. p.267-275.
- Dufresne, S., J. Bousquet, M. Boissinot et R. Guay. 1996. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:1056-1064.
- Durand, P., A.-L. Reyenschach, D. Prieur et N. Pace. 1993. Isolation and characterization of *Thiobacillus hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Fiji Basin. *Arch. Microbiol.* 159:39-44.
- Engvild, K.C., et G. Nielsen. 1985. Strain identification in *Rhizobium* by starch gel electrophoresis of isoenzymes. *Plant Soil*, 87: 251-256.

- Evans, H.J. et R.H. Burris. 1992. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. *dans* Biological nitrogen fixation, G. Stacey, R.H. Burris et H.J. Evans (Éditeurs). Chapman & Hall, New York. p.1-42.
- Faison, B.D., T.M. Clark, S.N. Lewis, C.Y. Ma, D.M. Sharkey et C.A. Woodward. 1991. Degradation of organic sulfur compounds by a coal solubilizing fungus. *Appl. Biochem. Biotech.* 28/29:237-251.
- Fedorak, P.M. et J.T. Anderson. 1992. Decomposition of two methylbenzothiophene sulphoxides in a commercial gaz chromatography unjection port liner. *J. Chromatogr.* 592:362-366.
- Fedorak, P.M. et D. Grbic-Galic. 1991. Aerobic microbial cometabolism of benzothiophene and 3- methylbenzothiophene. *Appl. Envir. Microbiol.* 57:932-940.
- Feig, S. 1973. Effects of supplementary aeration on the growth of *Thiobacillus thiooxidans* in shaken cultures. *Can. J. Microbiol.* 19:306-307.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees for DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17:368-376.
- Friedrich, C.G. et G. Mitrenga. 1981. Oxidation of thiosulfate by *Parcoccus denitrificans* and other hydrogen bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 10:209-212.
- Fuchs, G. 1989. Alternative pathways for autotrophic CO₂ fixation. *dans* Autotrophic bacteria, H.G. Schlegel et B. Bowien (Éditeurs). Science Tech Publishers, Madison, Wisconsin, USA. p.365-382.
- Gardes, M., J. Bousquet, et M. Lalonde. 1987. Isozyme variation among 40 *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:1596-1603.
- Gherna, R., P. Pienta et R. Cote. 1992. Catalogue of bacteria and phages. American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. p.694.
- Goebel, B. 1997. Communication personnelle.
- Goebel, B.M. et E. Stackebrandt. 1994. Cultural and phylogenic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1614-1621.
- Golovacheva, R.S. et G.I. Karavaiko. 1978. A new genus of thermophilic spore-forming bacteria, *Sulfobacillus*. *Microbiology.* 47:658-665.
- Gottschal, J.C. et J.G. Kuenen. 1980. Mixotrophic growth of *Thiobacillus* A2 on acetate and thiosulfate as growth limiting substrates in the chemostat. *Arch. Microbiol.* 126:33-42.
- Gray, K.A., O.S. Pogrebinsky, G.T. Mrachko, L. Xi, D.J. Monticello et C.H. Squires. 1996. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil-fuels. *Nature biotechnology.* 14:1705-1709.
- Grayston, S.J., W. Nevell et M. Wainwright. 1986. Sulphur oxidation by fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 87:193-198.
- Green, P. 1992. The genus *Methylobacterium*. *dans* The Prokaryotes Vol. III, A. Balows, H.G. Trüpper, M. Dworkin, W. Harder et K.-H. Schleifer (Éditeurs). Springer-Verlag. p.2342-2349.
- Green, P.N., I.J. Bousfield et D. Hood. 1988. Three new methylobacterium species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zatmanii* sp. nov., and *M. fujisawaense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:124-127.

- Guay, R., J. Ghosh et A.E. Torma. 1989 . Kinetics of microbiological production of ferric ion for heap and dump leaching. *dans* Biotechnology in Minerals and Metal Processing. B.J. Scheiner, F.M. Doyle et S.K. Kawatra (Éditeurs). Society of Mining Engineers, Inc. Littleton, Colorado. p.95-106
- Guay, R. et M. Silver. 1975. *Thiobacillus acidophilus* sp. nov.; isolation and some physiological characteristics. *Can. J. Microbiol.* 21:281-288.
- Habashi, F. 1980. Principles of extractive metallurgy Vol. 2 Hydrometallurgy, Gordon and Breach Science Publishers, New York, USA. p.8-11.
- Hallberg, K.B. et E.B. Lindström. 1994. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology U.K.* 140:3451-3456.
- Hanson, R. et T.E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60:439-471.
- Harrison, A.P., Jr. 1981. *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:327-332.
- Harrison, A.P., Jr. 1983. Genomic et physiological comparisons between heterotrophic thiobacilli and *Acidiphilium cryptum*, *Thiobacillus versutus* sp. nov., and *Thiobacillus acidophilus* nom rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:211-217.
- Harrison, A.P., Jr. 1984. The acidophilic thiobacilli and others acidophilic bacteria that share their habitat. *Ann. Rev. Microbiol.* 38:265-292.
- Hederstedt, L. 1993. The Krebs citric acid cycle. *dans* *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria, A.L. Sonenshein, J.A. Hoch et R. Losick (Éditeurs). American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.181-197.
- Hippchen, B., A. Roell et K. Poralla. 1981. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Arch. Microbiol.* 129:53-55.
- Hiraishi, A., K. Furuhashi, A. Matsumoto, K.A. Koike, M. Fukuyama et K. Tabuchi. 1995. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2099-2107.
- Hobbie, J.E., R.J. Daley et S. Jasper. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1225-1228.
- Hood, D.W., C.S. Dow et P.N. Green. 1987. DNA:DNA hybridization studies on the pink-pigmented facultative methylotrophs. *J. Gen. Microbiol.* 133:709-720.
- Hou, T.A. et A.I. Larkin. 1976. Microbial conversion of dibenzothiophene. *Dev. Ind. Microbiol.* 17:351-362.
- Howard Slater, J. et D. Lovatt. 1984. Biodegradation and the significance of microbial communities. *dans* Microbial degradation of organic compounds, D.T. Gibson (Éditeur). Marcel Dekker Inc., New York. p. 439-485.
- Huber, H. et K.O. Stetter. 1989. *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal-mobilizing bacteria isolated from marine geothermal field. *Arch. Microbiol.* 151:479-485.
- Huber, H. et K.O. Stetter. 1990. *Thiobacillus crepinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:315-322.
- Hurlbert, R.E. et J. Lascelles. 1963. Ribulose diphosphate carboxylase in thiorodaceae. *J. Gen. Microbiol.* 33:445-458.

- Hutchins, S.R., M.S. Davidson, J.A. Brierley et C.L. Brierley. 1986. Microorganismes in reclamation of metals. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:311-336.
- Isbister, J.D. et E.A. Kobylinski. 1985. Microbial desulfurization of coal. *dans* Processing and utilization of high sulfur coals Vol. 9, Y.A. Atia (Éditeur). Elsevier, Amsterdam. p.627-641.
- Ishii, M., Y. Igarashi et T. Kodama. 1989. Purification and characterization of ATP:citrate lyase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J. Bacteriol.* 171:1788-1792.
- Izumi, Y., T. Ohshiri, H. Ogino, Y. Hine et M. Shima. 1994. Selective desulfurisation of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:223-226.
- Jensen, V. 1981. Heterotrophic micro-organisms. *dans* Nitrogen fixation Vol. I, W.J. Broughton (Éditeur). Clarendon Press, Oxford. p.30-56.
- Johnson, D.B. 1997. Communication personnelle.
- Johnson, D.B. 1995. Selective media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 23:205-218.
- Johnston, F. et L. McAmish. 1973. A study of the rates of sulfur production in acid thiosulphate solutions using S-35. *J. Colloid. Interf. Science.* 42:112-119.
- Jones, K. 1976. Nitrogen fixing bacteria in the canopy of conifers in a temperate forest. *dans* Microbiology of aerial plant surfaces, C.H. Dickinson et T.F.P. (Éditeurs). Academic Press, New York. p.451-463.
- Jones, R.D. 1997. Phosphorus cycling. *dans* Manual of environmental microbiology, C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach et M.V. Walter (Éditeurs). ASM Press, Washinton, D.C., USA. p.343-348.
- Jordan, D.C. et P.J. McNicol. 1978. Identification of *Beijerinckia* in the high arctic (Devon Island, Northwest Territories). *Appl. Environ. Microbiol.* 35:204-205.
- Karavaiko, G.I., R.S. Golovacheva, T.A. Pivovarova, I.A. Tzaplina et N.S. Vartanjan. 1987. Thermophilic bacteria of the genus *Sulfobacillus*. *dans* BioHydroMetallurgy Proceeding of the International Symposium. Warwick Technology Letters, Antony Rowe Ltd. p.29-41
- Karavaiko, G.I. et T.A. Pivovarova. 1977. Mechanism of oxidation of reduced sulphur compounds by thiobacilli. *dans* Conference bacterial leaching, Proceeding, W. Schawrtz (Éditeur). p.37-45
- Kargi, F. et J.M. Robinson. 1983. Microbial oxydation of dibenzothiophene by thermophilic organism *Sulfolobus acidophilus*. *Biotech. Bioeng.* 24:687-690.
- Katayama, Y., A. Hiraishi et H. Kuraishi. 1995. *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiology -UK.* 141:1469-1477.
- Kelly, D.P. 1968. Biochemistry of oxidation of inorganic sulphur compounds by microorganismes. *Aust. J. Sci.* 31:165-173.
- Kelly, D.P. 1977. Microbial Ecology. *dans* The oil industry and microbial ecosystems, K.W.A. Chater et H.J. Somerville (Éditeurs). Heyden et Son Ltd, London. p.12-27.

- Kelly, D.P. 1989. Physiology and biochemistry of unicellular sulfur bacteria. *dans* Autotrophic bacteria, H.G. Schlegel et B. Bowien (Éditeurs). Science Tech Publishers, Madison, Wisconsin, USA. p.193-217.
- Kelly, D.P. et A.P. Harrison. 1988. Genus *Thiobacillus*. *dans* Bergey's manual of determinative bacteriology Vol. 3, J.G. Holt, J.T. Staley, M.P. Bryant et N. Pfennig (Éditeurs). Williams & Wilkins Co., Baltimore, M.D. p.1842-1858.
- Kelly, D.P., L.A. Chambers et P.A. Trudinger. 1969. Cyanolysis and spectrophotometric estimation of trithionate in mixture with thiosulfate and tetrathionate. *Anal. Chem.* 41:898-901.
- Kenada, T. 1991. Iso- and Anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55(2): 288-302.
- Kennedy, A.C. 1994. Carbon utilization and fatty acid profiles for characterization of bacteria. *dans* Methods of soils analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties. R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, et A. Wollum (éditeurs). Soil Science Society of America, Inc., Madison. p.543-553.
- Kennedy, L.S. et P.G. Thompson. 1991. Identification of sweetpotato cultivars using isozyme analysis. *HortSci.* 26: 300-302.
- Kieft, T.L., D.B. Ringelberg, et D.C. White. 1994. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:3292-3299.
- Kilbane II, J.J. 1990a. Sulfur specific microbial metabolism of organic compounds. *Ressources, Conservation, and Recycling.* 3:69-79.
- Kilbane II, J.J. 1990b. Microbial removal of organic sulfur from coal: current status and research needs. *dans* Bioprocessing and Biotreatment of coal, D.L. Wise (Éditeur). Northeastern University, Boston, USA. p.487-506.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Knecht Jr., A.T. 1961. Dissertation, ordre No.621235. Louisiana State University.
- Kodama, K., S. Nakatami, K. Umehara, K. Shimizu, Y. Minoda et K. Yamada. 1970. Microbial conversion of petro-sulfur compounds part.III: Isolation and identification of products from benzothiophene. *Agri. Biol. Chem.* 34:1320-1324.
- Krawiec, S. 1990. Transformation of dibenzothiophene by axenic cultures *Sulfolobus acidocaldarius* and other bacteria: a critique. *dans* Bioprocessing and Biotreatment of coal., D.L. Wise (Éditeur), Northeastern University, Boston, USA. p.569-601.
- Kropp, K.G., J.A. Gonçalves, J.T. Andersson et P.M. Fedorak. 1994. Bacterial transformations of benzothiophene and methylbenzothiophenes. *Environ. Sci. Technol.* 28:1348-1356.
- Kuenen, J.G. 1989. Comparative ecophysiology of the non phototrophic sulfide-oxidizing bacteria. *dans* Microbial mats, Physiology ecology of benthic microbial communities, Y. Cohen et E. Rosenberg (Éditeurs). American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.349-365.
- Kuenen, J.G. et R.F. Beudeker. 1982. Microbiology of thiobacilli and other sulphur-oxidizing autotrophs, mixotrophs and heterotrophs. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 298:473-497.

- Kuenen, J.G. et P. Bos. 1989. Habitats and ecological niches of chemolitho(auto)trophic bacteria. *dans* Autotrophic bacteria, H.G. Schlegel et B. Bowien (Éditeurs). Science Tech Publishers, Madison, Wisconsin, USA. p.53-80.
- Kuenen, J.G. et J.C. Gottschal. 1982. Competition among chemolithotrophs and methylotrophs and their interactions with heterotrophic bacteria. *dans* Microbial interactions and communities Vol. 1, A.T. Bull et J.H. Slater (Éditeurs). Academic Press, Toronto. p.153-187.
- Kuenen, J.G., J. Boonstra, H.G.J. Schröder et H. Veldkamp. 1977. Competition for inorganic substrates among chemoorganotrophic and chemolithotrophic bacteria. *Microb. Ecol.* 3:119-130.
- Kuenen, J.G., L.A. Robertson et O.H. Tuovinen. 1992. The genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, and *Thiosphaera*. *dans* The Prokaryotes Vol. III, A. Balows, H.G. Trüper, M. Duorkin, W. Harder et K.-H. Schleifer (Éditeurs). Springer-Verlag, New York, USA. p.2638-2657.
- Kumar, S., K. Tamura et M. Nei. 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania.
- Laborde, A.L. et D.T. Gibson. 1977. Metabolism of dibenzothiophene by *Beijerinckia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:783-790.
- Laishley, E.J., K. Rae, A.M. Dillman et R.D. Bryant. 1988. Characterization of a new less acidophilic *Thiobacillus* isolate (*Thiobacillus capsulatus*). *Can. J. Microbiol.* 34:960-966.
- Lane, D.J., A.P.H. Jr., D. Stahl, B. Pace, S.J. Giovannoni, G.J. Olsen et N.R. Pace. 1992. Evolutionary relationship among sulfur and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* 174:269-279.
- Lappin-Scott, H.M., M.P. Greaves et J.G. Slater. 1986. Degradation of the herbicide Mercoprop by microbial community. *dans* Microbial communities in soil. V.Jensen, A. Kjoller et L.H. Sorensen (Éditeurs). Elsevier Applied Science Publishers, New York, USA. p.211-218.
- LaRivière, J.W.M. et K. Schmidt. 1992. Morphologically conspicuous sulfur-oxidizing eubacteria. *dans* The Prokaryotes Vol. IV, A. Balows, H.G. Trüper, M. Duorkin, W. Harder et K.-H. Schleifer (Éditeurs). Springer-Verlag, New York. p.3934-3947.
- Lee, M.L. et R.A. Hites. 1976. Characterization of sulfur-containing polycyclic aromatic compounds in carbon blacks. *Anal. Chem.* 48:1890-1893.
- Lee, M.L., M. Novotny et K.D. Bartle. 1976. Gas chromatography / mass spectrometric and nuclear magnetic resonance determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulates. *Anal. Chem.* 48:1566-1572.
- Linstrom, S.C. 1993. Inter- and intrapopulation genetic variation in species of *Porphyra* (Rhodophyta: Bangiales) from British Columbia and adjacent waters. *J. Appl. Phyco.* 5:53-62.
- London, J. 1963. *Thiobacillus intermedius* nov. sp., a novel type of facultative autotroph. *Arch. Microbiol.* 46:328-337.
- London, J. et S.C. Rittenberg. 1966. Effects of organic matter on the growth of *Thiobacillus intermedius*. *J. Bact.* 91: 1062-1069.
- London, J. et S.C. Rittenberg. 1967. *Thiobacillus perometabolis* nov. sp., a non-autotrophic *Thiobacillus*. *Arch. Microbiol.* 59:218-225.

- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr et R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Maidak, B.L., N. Larsen, G.J. Olsen, M.J. McCaughey, R. Overbeek, T.J. Macke, K. Fogel, J. Blandy et C.R. Woese. 1994. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* 22:3485-3487.
- Malik, K.A. et D. Claus. 1976. 5 ième Int. Ferment. Symp. Berlin. (résumé)
- Mancheko, G.P. 1994. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press Inc., Boca Raton, USA. 420 pages.
- Marquard, R.D., J.L. Tipton et R.G. Skorpenske. 1989. Isozyme variation among desert willow cultivars. *HortSci.* 24:350-351.
- Matin, A. 1978. Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 32:433-468.
- Matin, A. et S.C. Rittenberg. 1970. Regulation of glucose metabolism in *Thiobacillus intermedius*. *J. Bacteriol.* 104:239-246.
- Mc Lean, H.C. 1917. The oxidation of sulfur by microorganisms in its relation to the availability of phosphates. *Soil Science.* 5:251-290.
- Miller, K.W. 1992. Reductive desulfurization of dibenzyl disulfide. *Appl. Envir. Microbiol.* 58:2176-2179.
- Miller, K.W. et J.B. Risatti. 1986. Rates of microbial removal of organic and inorganic sulfur from Illinois coals chars. Annual Report to the Illinois Coal Development Board, Center for research on sulfur in coal. Champaign, Ill.
- Mizoguchi, T., T. Sato et T. Okabe. 1976. New sulfur-oxidizing bacteria capable of growing heterotrophically, *Thiobacillus rubellus* nov. sp. and *Thiobacillus delicatus* nov. sp. *J. Ferment. Technol.* 54:181-191.
- Monticello, D.J. et W.R. Finnerty. 1985. Microbial desulfurization of fossil fuels. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:371-389.
- Moreira, D. et R. Amils. 1997. Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:522-528.
- Motta, M.C.M., A.M.S. Cava, P.M.F. Silva, J.E. Fiorini, M.J. Soares et W.D. Souza. 1991. Morphological and biochemical characterization of the trypanosomatids *Crithidia desouzai* and *Herpetomonas anglusteri*. *Can. J. Zool.* 69:571-577.
- Moyer, C.L., F.C. Dobbs, et D. Karl. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:871-879.
- Norris, P.R. 1990. Acidophilic bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation. *dans* Microbial mineral recovery, H.L. Ehrlich et C.L. Brierley (Éditeurs), McGraw-Hill Publishing Company, Inc., New York, USA. p.3-27.
- Norris, P.R., D.A. Clark, J.P. Owen et S. Waterhouse. 1996. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulfide-oxidizing bacteria. *Microbiology-UK.* 142:775-783.
- Norris, P.R. et D.P. Kelly. 1978. Dissolution of pyrite (FeS₂) by pure culture and mixed cultures of some acidophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 4:143-146.

- Norris, P.R. et D.P. Kelly. 1982. The use of mixed microbial cultures in metal recovery. *dans* Microbial interactions and communities Vol. 1, A.T. Bull et J.H. Slater (Éditeurs). Academic Press, Toronto. p.443-474.
- Norris, P.R., J.A. Brierly et D.P. Kelly. 1980. physiological characteristics of two facultatively thermophilic mineral-oxidising bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 7:119-122.
- Omori, T., L. Monna, Y. Saiki et T. Kodama. 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1. Appl. Environ. Microbiol. 58:911-915.
- Paerl, H.W., K.L. Webb, J. Baker et W.J. Wiebe. 1981. Nitrogen fixation in waters. *dans* Nitrogen fixation Vol. I, W.J. Broughton (Éditeur). Clarendon Press, Oxford, England. p.193-240.
- Palleroni, N.J. 1993. Structure of bacterial genome. *dans* Handbook of new bacterial systematics, M. Goodfellow et A.G. O'Donnell (Éditeurs). Academic Press, Toronto. p.51-113.
- Parker, C.D. et J. Prisk. 1953. The oxidation of inorganic compounds of sulphur by various sulphur bacteria. J. Gen. Microbiol. 8:344-364.
- Pati, B.R., S. Sengupta et A.K. Chandra. 1994. Studies on the amino acids released by phyllosphere diazotrophic bacteria. Microbiol. Res. 149:287-290.
- Pedrosa, F.O., J. Dobreiner et M.G. Yates. 1980. Hydrogen-dependant growth and autotrophic carbon dioxide fixation in *Derxia*. J. Gen. Microbiol. 119:547-551.
- Poralla, K. et W.A. König. 1983. The occurrence of ω -cycloheptane fatty acids in a thermo- acidophilic bacillus. FEMS Microbiol. Lett. 16:303-306.
- Postgate, J. 1987. Nitrogen fixation. 2ième édition, Edward Arnold Publishers, Baltimore, Maryland, USA. 69 pages.
- Pronk, J.T., R. Meulenberg, W. Hazeu, P. Bros et J.G. Kuenen. 1990. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. FEMS Microbiol. Rev. 75:293-306.
- Pronk, J.T., R. Meulenberg, D.J.C.v.d. Berg, W.B.-v.d. Vegte, P. Bos et J.G. Kuenen. 1990. Mixotrophic and autotrophic growth of *Thiobacillus acidophilus* on glucose and thiosulfate. Appl. Environ. Microbiol. 56:3395-3401.
- Rittenberg, S.C. 1969. The roles of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria. Adv. Microbial Physiol. 3:159-196.
- Rosen, B.P. 1978. Bacterial transport. Macel Dekker Inc., New York, USA. 684 pages.
- Rovira, M., N. Aletà, E. Germain et P.Arùs. 1993. Inheritance and linkage relationships of ten isozyme genes in hazelnut. Theor. Appl. Genet. 86:322-328.
- Roy, A.P.A. et B. Trudinger. 1970. The biochemistry of inorganic compounds of sulfur, Cambridge University Press. 373 pages.
- Roy, C., B. Labrecque et B.D. Caumia. 1990. Recycling of scrap tires to oil and carbon black by vacuum pyrolysis. Resources, Conservation and Recycling. 4:203-213.
- Saftic, S. et P.M. Fedorak. 1993. Transformations of methylbenzothiophenes by three *Pseudomonas* isolates. Environ. Sci. Technol. 27:2577-2584.
- Saier Jr., M.H. 1987. Enzymes in metabolic pathways: a comparative study of mechanism, structure, evolution, and control. Harper & Row Publishers, New York, USA. p.147-208.

- Saitou, N. et M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sayler, G.S., et A.C. Layton. 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. *Ann. Rev. Microbiol.*, 44:625-648.
- Sayler, G.S., M.S. Shields, E. Tedford, A. Breen, S. Hooper, K. Sirotkin, et J. Davis. 1985. Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:1295-1303
- Schlegel, H.G. et H.G. Trüper. 1966. Repression of enzyme formation in *Hydrogenomonas* strain H16G+ by molecular hydrogen and by fructose. *Ant. van. Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 32:277-292.
- Schleifer, K.H., W. Ludwig, et R. Amann. 1993. Nucleic acid probes. *dans Handbook of new bacterial systematics*, M. Goodfellow et A.G. O'Donnell (Éditeurs). Academic Press, Toronto. p.464-510.
- Schreiner, R.P., S.E.S. Jr et M. Tien. 1988. Oxidation of thianthrene by lignase of *Phnerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1858-1860.
- Selander, R.K., D.A. Caugant, H. Ochman, J.M. Musser, M.N. Gilmour et T.S. Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:873-884.
- Shiba, H., T. Kawasumi, Y. Igarashi, T. Kodoma et Y. Minoda. 1985. The CO₂ assimilation via the reductive tricarboxylic acid cycle in an obligately autotrophic aerobic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. *Arch. Microbiol.* 141:198-203.
- Shivers, D.W. et T.D. Brock. 1973. Oxidation of elemental sulfur by *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* 114:706-710.
- Shooner, F., J. Bousquet et R.D. Tyagi. 1996. Isolation, phenotypic characterization, and phylogenetic position of a novel, facultatively autotrophic, moderately thermophilic bacterium, *Thiobacillus thermosulfatus* sp.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:409-415.
- Silverman, M.P. et D.G. Lungren. 1959. Studies of the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans* I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.* 77: 642.
- Sinha, D.B. et C.C. Walden. 1966. Formation of polythionates and their interrelationships during oxidation of thiosulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Can. J. Microbiol.* 12:1041-1054.
- Slater, J.H. 1977. The role of microbial communities in the natural environment. *dans The oil industry and microbial ecosystems*, K.W.A. Chater et H.J. Somerville (Éditeurs). Heyden et Son Ltd, London. p.137-154.
- Slater, J.H. et A.T. Bull. 1978. Interactions between microbial populations. *dans Companion to microbiology*, A.T. Bull et P.M. Meadow (Éditeurs). Longman, London. p.181-206.
- Smibert, R.M. et N.R. Krieg. 1994. Phenotypic characterization. *dans Methods for general and molecular bacteriology*. P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood et N.R. Krieg (Éditeurs). ASM. p.607-631.
- Smith, D.W. et W.R. Strohl. 1991. Sulfur-oxidizing bacteria. *dans Autotrophic life*, J.M. Shively et L.L. Barton (Éditeurs), Academic Press, Toronto. p.121-146.

- Smith, V.H. 1993. Implications of resource-ratio theory for microbial ecology. *Adv. Microbial Ecology*. 13: 1-37.
- Sober, H.A. 1970. CRC handbook of biochemistry, selected data for molecular biology. The Chemical Rubber Co, Cleveland, Ohio.
- Stackebrandt, E. et W. Liesak. 1993. Nucleic acids and classification. *dans* Handbook of new bacterial systematics, M. Goodfellow et A.G. O'Donnell (Éditeurs). Academic Press, Toronto. p.151-194.
- Starkey, R.L. 1934. Cultivation of organism concerned in the oxidation of thiosulphate. *J. Bacteriol.* 28:365-386.
- Steudel, R., G. Holdt, T. Göbel et W. Hazeu. 1987. Chromatographic separation of higher polythionates SnO_6^{2-} ($n=3\text{...}22$) and their detection in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*; molecular composition of bacterial sulfur secretions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26:151-153.
- Strirling, L.A. et R.J. Watkinson. 1977. Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons: isolation and properties of a cyclohexane-degrading bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 99:119-125.
- Stukus, P.E. et B.T. DeCicco. 1970. Autotrophic and heterotrophic metabolism of *Hydrogenomonas*: regulation of autotrophic growth by organic substrates. *J. Bacteriol.* 101:339-345.
- Suzuki, I. 1974. Mechanisms of inorganic oxidation and energy coupling. *Ann. Rev. Microbiol.* 28:85-101.
- Suzuki, K., M. Goodfellow, et A.G. O'Donnell. 1993. Cell envelopes and classification. *dans* Handbook of new bacterial systematics, M. Goodfellow et A.G. O'Donnell (Éditeurs). Academic Press, Toronto. p.195-250.
- Suzuki, K., K. Saito, A. Kawaguch, S. Okuda et K. Komagata. 1981. Occurrence of omega-cyclohexyl fatty acids in *Curtobacterium pusillum* strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27(3): 261-266.
- Swofford, D.L. 1993. PAUP-phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1, Natural History Survey, Champlain, Illinois.
- Takeda, Y., F. Suzuki et H. Inoue. 1969. ATP citrate lyase (citrate-cleavage enzyme). *Methods Enzymol.* 13:153-160
- Temple, K.L. et A.R. Colmer. 1951. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 62:605-611.
- Thurnheer, T., T. Köhler, A.M. Cook et T. Leisinger. 1986. Orthamic acid and analogues as carbon sources for bacteria: growth, physiology and enzymic desulphonation. *J. Gen. Microbiol.* 132:1215-1220.
- Tiessen, H. et J.W.B. Stewart. 1985. The biogeochemistry of soil phosphorus. *dans* Planetary ecology. D.C. Caldwell, J.A. Brierley et C.L. Brierley (Éditeurs). Van Nostrand Reinhold Co., New York. p. 463-472
- Tourova, D.P., A.B. Poltoraus, I.A. Lebedeva, I.A. Tsaplina, D.I. Bogdova et G.I. Karavaiko. 1994. 16S ribosomal RNA (rDNA) sequence analysis and phylogenetic position of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *System. Appl. Microbiol.* 17:509-512.
- Tsaplina, L.A., G.A. Osipov, T.I. Bogdanova, T.P. Nedorezova et G.I. Karavaiko. 1994. Fatty acid composition of lipids in thermoacidophilic bacteria of the genus *Sulfobacillus*. *Microbiology.* 63: 459-464.

- Tsuchiya, M.H. 1978. Microbial leaching of Cu-Ni sulfide concentrate. *dans* Metallurgical applications of bacterial leaching and related microbiological phenomena, L.E. Murr, A.E. Torma et J.A. Brierley (Éditeurs). p.365-373.
- Turner, S., E.F. DeLong, S.J. Giovannoni, G.J. Olsen, et N.R. Pace. 1989. Phylogenetic analysis of microorganisms and natural populations by using rRNA sequences. *dans* Microbial mats, Physiology ecology of benthic microbial communities, Y. Cohen et E. Rosenberg (Éditeurs). American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.390-401.
- Tuttle, J.H., P.E. Holmes et H.W. Jannash. 1974. Growth rate stimulation of marine Pseudomonads by thiosulphate. *Arch. Microbiol.* 99:1-14.
- Urakami, T., H. Araki, K.-I. Suzuki et K. Komagata. 1993. Further studies of the genus *Methylobacterium* and description of *Methylobacterium aminovorans* sp.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:504-513.
- Urakami, T. et K. Komagata. 1981. Electrophoretic comparison of enzymes in the Gram-negative methanol-utilizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27:188-201.
- Urakami, T. et K. Komagata. 1984. *Protomonas*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:188-201.
- Van Afferden, M., S. Schacht, J. Klein et H.G. Trüper. 1990. Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. *Arch. Microbiol.* 153:324-328.
- Van Es, F.B., H.J. Laanbroek et H. Veldkamp. 1984. Microbial ecology: an overview. *dans* Aspects of microbial metabolism and ecology. G.A. Codd (Éditeur). Harcourt Brace Javanovich, Montréal. p. 1-33.
- van Heemstra, M.L., L.P. Bruederle et N. Vorsa. 1991. Inheritance and linkage of thirteen polymorphic isozyme loci in diploid blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116:89-94.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P.d. Vos, K. Kersters et J.Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-438.
- Veldkamp, H. 1976. continuous culture in microbial physiology and ecology. Microbiology Series, J.G. Cook (Éditeur). Meadowfield Press Ltd, Bushey, Angleterre. 68 pages.
- Veldkamp, H. 1977. Ecological studies with the chemostat. *Adv. Microbial Ecology.* 1:59-94.
- Wainwright, M. 1978. Microbial sulphur oxidation in soil. *Sci. Prog. Oxf.* 65:459-475.
- Wainwright, M. 1984. Sulfur oxidation in soils. *Adv. Agronomy.* 37:349-396.
- Waksman, S.A. et J.S. Joffe. 1922. The chemistry of the oxidation of sulfur by microorganisms to sulfuric acid and transformation of insoluble phosphates into soluble forms. *J. Bio. Chem.* 50:35-45.
- Wang, P., A.E. Humphrey et S. Krawiec. 1996. Kinetics analyses of desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in continuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3066-3068.
- Wang, P. et S. Krawiec. 1996. Kinetics analyses of desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in batch and fed-batch cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1670-1675.
- Williams, R.A.D. et D.S. Hoare. 1972. Physiology of a new facultatively autotrophic thermophilic *Thiobacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 70:555-566.

- Wilkinson, T.G., H.H. Topiwala et G. Hamer. 1974. Interactions in mixed bacterial population growing on methane in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 16:41-47.
- Wimpenny, J.W.T. et P. Waters. 1984. Growth of micro-organism in gel-stabilized two-dimensional diffusion gradient systems. *J. Gen. Microbiol.* 130:2921-2926.
- Wittich, R.M., H.G. Rast et H.-J. Knackmuss. 1988. Degradation of naphthalene-2,6- and naphthalene-1,6-disulfonic acid by a *Moraxella* sp. *Appl. Envir. Microbiol.* 54:1842-1847.
- Whittenbury, R. et D.P. Kelly. 1977. Autotrophy: a conceptual phoenix. *dans* *Microbial energetics* Vol. 27. p.121-149.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1977. Heterotrophic growth of *Thiobacillus* A2 on sugars and organic acids. *Arch. Microbiol.* 113: 257-267.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1981. Mixotrophic growth of *Thiobacillus* A2 in chemostat culture on formate and glucose. *J. Gen. Microbiol.* 120:333-345.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1984. Growth and sugar metabolism of a thermoacidophilic iron-oxidizing mixotrophic bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 130:1337-1349.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1985. Physiological characteristics of a new thermophilic obligately chemolithotrophic *Thiobacillus* species, *Thiobacillus tepidarius*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:434-437.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1988. Isolation and physiological characterisation of *Thiobacillus aquaesulis* sp. nov., a novel marine facultatively autotrophic moderate thermophile. *Arch. Microbiol.* 149:333-343.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1989. Isolation and Physiological characterisation of *Thiobacillus thyasiris* sp. nov., a novel marine facultative autotroph and the putative symbiont to *Thyasira flexuosa*. *Arch. Microbiol.* 152:160-166.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1991. Isolation and characterisation of *Thiobacillus halophilus* sp. nov., a sulphur-oxidizing autotrophic eubacterium from a Western Australian hypersaline lake. *Arch. Microbiol.* 156:277-280.
- Wood, A.P. et D.P. Kelly. 1993. Reclassification of *Thiobacillus thyasiris* as *Thiomicrospira thyasirae* comb. nov., an organism exhibiting pleomorphism in response to environmental conditions. *Arch. Microbiol.* 159:45-47.
- Wood, H.G. 1989. Past and present of CO₂ utilization. *dans* *Autotrophic bacteria*, H.G. Schlegel et B. Bowien (Éditeurs). Science Tech Publishers, Madison, USA. p.33-52.
- Yagi, S., S. Kitai et T. Kimura. 1971. Oxidation of elemental sulfur to thiosulfate by *Streptomyces*. *Appl. Microbiol.* 22:157-159.
- Yanigita, T. 1990. Natural microbial communities, ecological and physiological features. Springer-Verlag, New York. 485 pages.
- Yeoh, H.T., H.R. Bungay et N.R. Krieg. 1968. A microbial interaction involving a combined mutualism and inhibition. *Can. J. Microbiol.* 14:491-492.
- Yong, H.S. 1984. Isocitrate dehydrogenase and phosphogluconate dehydrogenase polymorphism in the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* (insecta, tephritidae) from peninsular malaysia. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B:555-558.
- Yong, H.S. 1991. Biochemical genetic differentiation in the *Trigona atripes* species group of malaysian stingless bees (insecta: hymenoptera: apidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 99B:625-628.

- Zakharchuk, L.M., I.A. Tsaplina, E.N. Krasil'nikova, T.I. Bogdanova et G.I. Karavaiko. 1994. Carbon metabolism in *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Microbiology. 63:324-328.**
- Zürcher, D., M.A. Cook et T. Leisinger. 1987. Microbial desulfonation of substituted naphthalenesulfonic acids and benzenesulfonic acids. Appl. Environ. Microbiol. 53:1459-1463.**

ANNEXE

Annexe A . Schémas récapitulatifs des principaux sentiers métaboliques de dégradation des hydrates de carbone

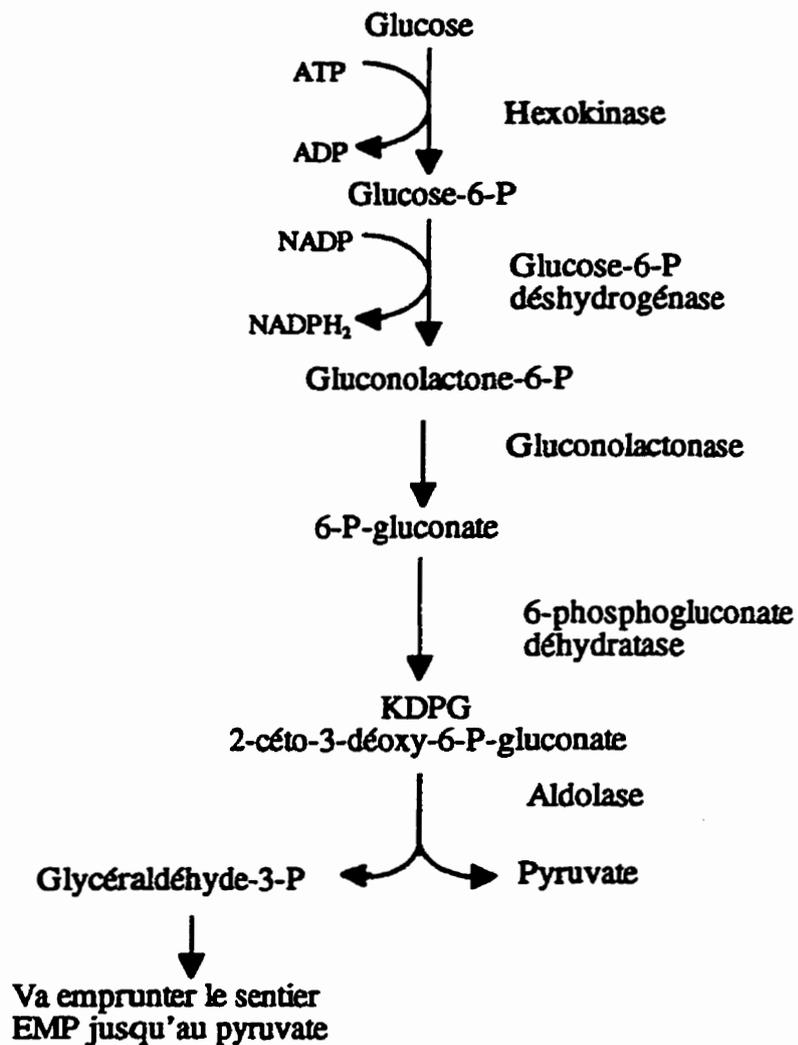


Figure A.1. Sentier métabolique Entner-Doudoroff (ED)

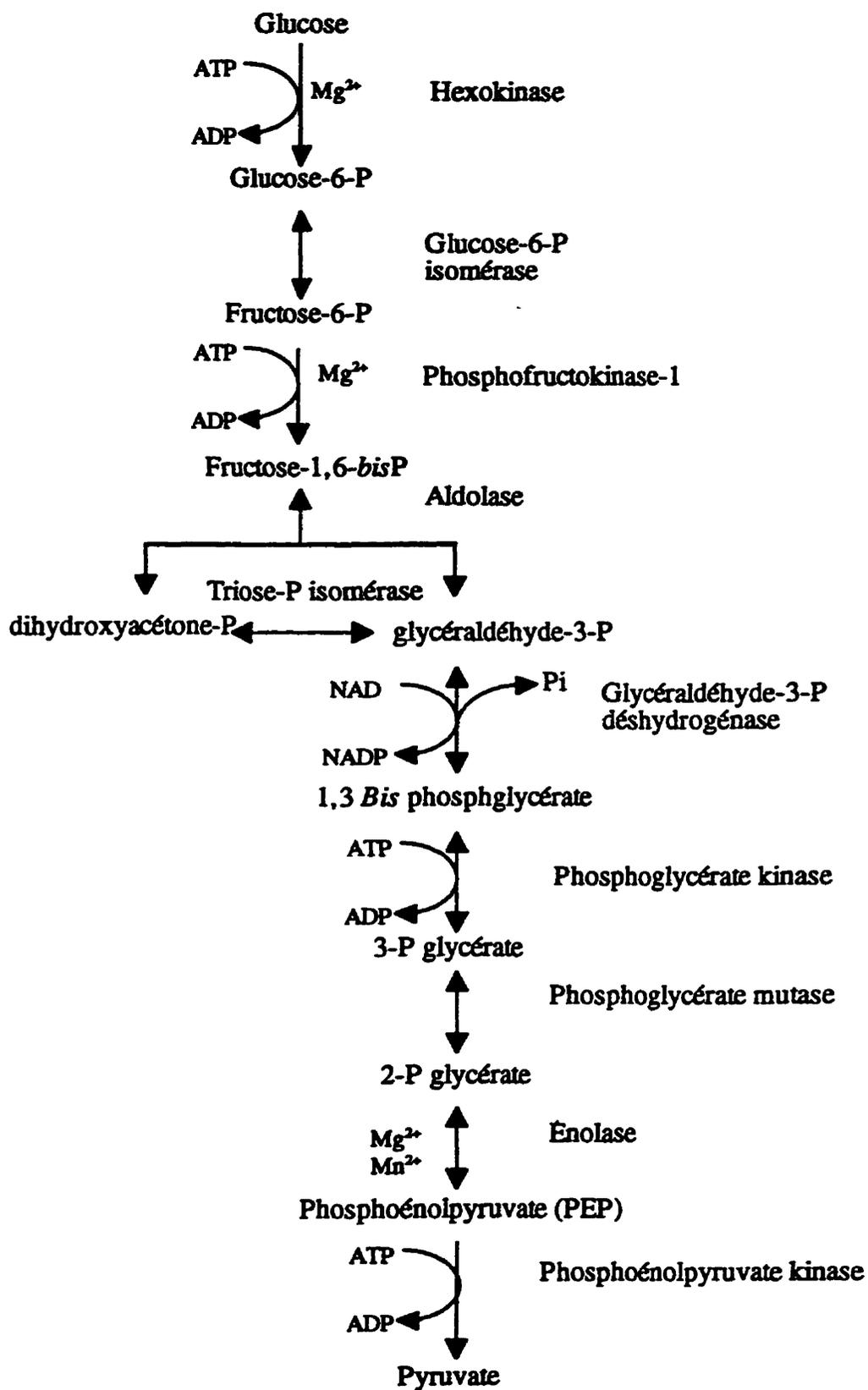


Figure A.2. Sentier métabolique Embden-Meyerof-Parnas (EMP)

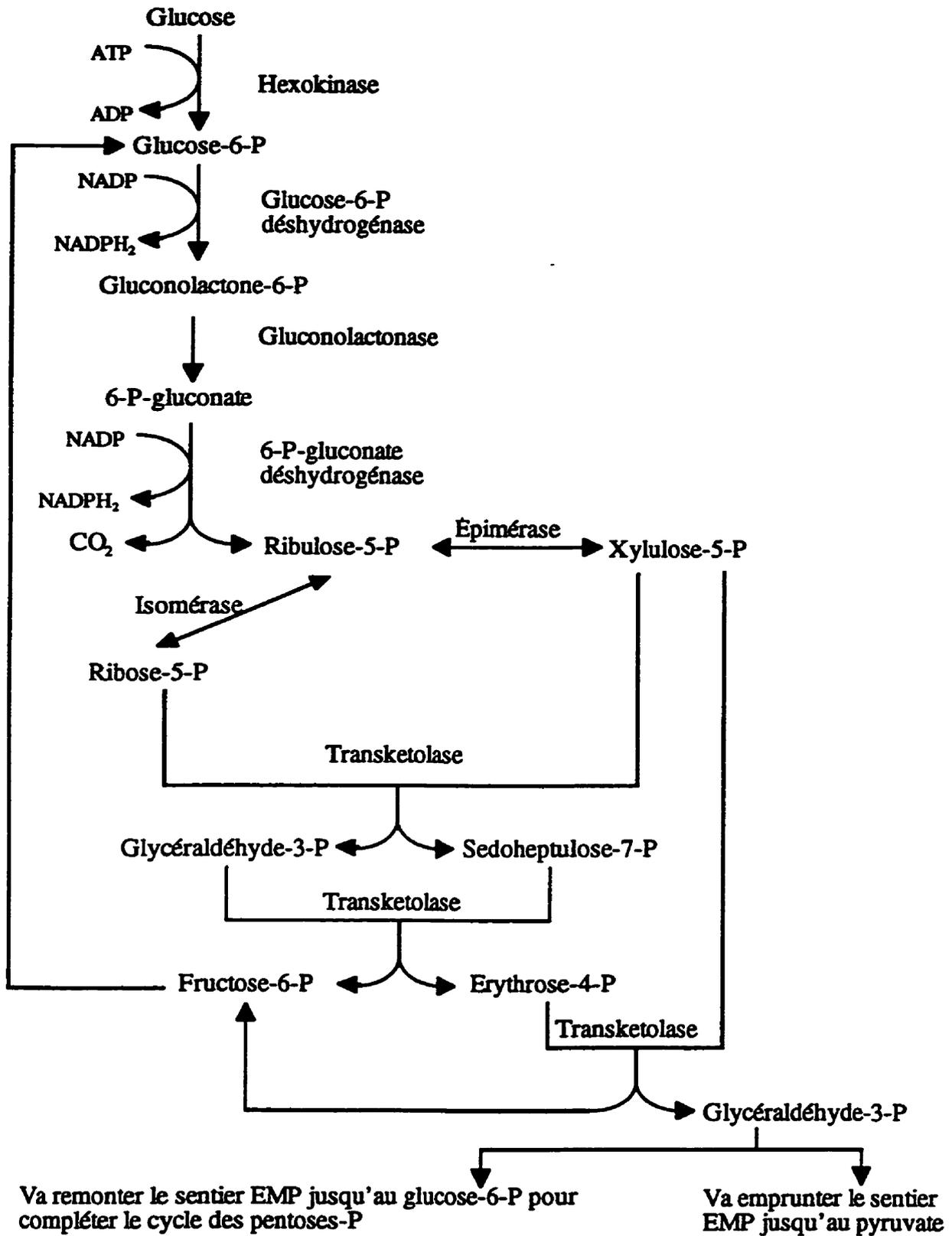


Figure A.3. Sentier métabolique des Hexoses Monophosphate (HMP)

Annexe B . Milieux de culture

9K sans sulfate ferreux (Silverman et Lungren, 1959)

sels	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0
KH_2PO_4	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
KCl	0,1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,015
eau distillée	1000 ml

- Ajuster le pH à 2,25 avec de l'acide sulfurique concentré et autoclaver.
- Ajouter la source d'énergie : concentration finale 0,5 % (P/V).
- Pour les milieux gélosés, préparer une solution de sels 2X ainsi qu'une solution d'agar 3%. Autoclaver les deux séparément, les mélanger ensuite et y ajouter la source d'énergie.
- Milieu utilisé pour les sous-cultures du consortium SD-2 (lorsque le pH était ajusté à 4,0) durant les deux premières années et lors des essais de dégradation des composés soufrés organiques.

9K-EL (Dufresne, 1993)

- Milieu 9K auquel 0,01% (P/V) d'extrait de levure a été ajouté.
- Milieu utilisé pour la croissance de *Sulfobacillus disulfidooxidans*.
- Source d'énergie ajoutée à une concentration finale de 0,05% (P/V) : glutathion oxydé ou réduit, glutamate de sodium, glucose, soufre élémentaire, thianthrène, dithio(bis)benzothiazole, dibenzothiophène.

9K-m

- Milieu 9K où le KH_2PO_4 est remplacé par deux sels phosphatés en fonction du pH voulu selon les quantités retrouvées au Tableau B.1.
- Un indicateur pH universel a aussi été ajouté (voir Tableau B.1 page suivante).

9K 1/10

- Milieu 9K dilué 1/10 auquel 1 g/L de NaCl a été ajouté
- Utilisé pour doser la production de sulfate par l'isolat SD-11

Tableau B.1. Quantité de sels phosphatés retrouvés dans le milieu 9K-m en fonction du pH désiré

Sels / pH	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	7,0
KH_2PO_4 (g/l)	3,0	2,8	2,6	2,4	2,2	1,8
Na_2HPO_4 (g/l)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,2

Acidiphilium (Harrison, 1981)

sels	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
KH_2PO_4	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
KCl	0,1
TSB (tryptic soy broth)	0,1
Glucose ou citrate de sodium	1,0
eau distillée	1000 ml

- Ajuster le pH à 3,0 avec de l'acide sulfurique 1,0 N.
- Autoclaver le glucose et le citrate de sodium séparément.
- Pour les milieux gélosés, préparer une solution de sels 2X ainsi qu'une solution d'agar 3%. Autoclaver les deux séparément, les mélanger et y ajouter la source d'énergie.

B, B-EL, B-NH4 (milieu Beijerinckia d'Atlas (1993) modifié)

sels	g/L
K_2HPO_4	0,2
KH_2PO_4	0,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,050
eau distillée	1000 ml

- Ajuster le pH à 4,5 pour SD-7 et SD-8 avec de l'acide sulfurique 1,0 N.
- Autoclaver et ajouter la source de carbone et d'énergie (0,5%) (arabinose ou glycérol pour SD-7 et SD-8).
- Pour SD-7 et SD-8, ajouter une faible quantité d'azote (5,0 à 50 μg N/ml milieu) sous forme organique (extrait de levure : 47-470 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou inorganique ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 19-190 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

BAM-SM (milieu ATCC 1656) (Gherna *et al.*, 1992)

sels	g/L
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,25
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2
KH ₂ PO ₄	3,0
extrait de levure	6,0
glucose	5,0
solution de métaux en trace	1,0 ml
eau distillée	1000 ml

- Ajuster le pH à 4,0 avec de l'acide sulfurique concentré.
- Pour les milieux gélosés, préparer une solution de sels 2X ainsi qu'une solution d'agar 3%. Autoclaver les deux séparément, les mélanger ensuite.
- Utilisé pour la croissance d'*A. cycloheptanicus*.

BS (Barton et Shively, 1968)

sels	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4
KH ₂ PO ₄	3,0
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,5
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	0,01
CaCl ₂ • 4 H ₂ O	0,2
eau distillée	1000 ml

- Ajouter 1 ml indicateur universel.
- Ajuster le pH à 4,0 avec de l'acide sulfurique concentré et autoclaver.
- Ajouter la source d'énergie à concentration finale de 0,5 % (P/V) : le soufre élémentaire pour la culture liquide et le thiosulfate de sodium pour le milieu gélosé.
- Pour les milieux gélosés, préparer une solution de sels 2X ainsi qu'une solution d'agar 3%. Autoclaver les deux séparément, les mélanger et y ajouter la source d'énergie.
- Milieu utilisé pour le maintien du consortium SD-2.

FT(G) (sulfate ferreux, tétrathionate, glucose) basé sur le milieu WAYE de Johnson (1995)

• Solution A :

sels	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,5
KH_2PO_4	1,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5,0
KCl	0,1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,1
eau distillée	1000 ml

• Solution B :

7,0 g agarose Type I : low EEO (Sigme # A-6013 lot 102H06101) ajoutés à un litre eau bidistillée. Agiter 30 min, puis laisser décanter 15 min. Enlever le surplus d'eau, centrifuger le reste (environ 200 ml). Resuspendre le culot dans 250 ml d'eau bidistillée. Autoclaver séparément.

• Solution C :

10 ml solution A

65 ml eau

100 µl extrait levure 10% (P/V)

ajuster le pH à 2,5 avec de l'acide sulfurique 1,0 N, et autoclaver

• Préparation du milieu :

Ajouter 25 ml de la solution B à la solution C

Ajouter 62 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Ajouter 50 mg tétrathionate de sodium

Ajouter 100 µl solution glucose 50% (P/V) lorsque désiré

Indicateur universel No.1 (Sober, 1970)

- Dissoudre 60 mg de jaune de méthyl, 80 mg de rouge de méthyl, 80 mg de bleu de bromothymol, 100 mg bleu de thymol, et 20 mg de phénolphtaléine dans 100 ml d'éthanol et ajouter assez de NaOH 0,1 N pour obtenir une couleur jaune.

LSMM (low sulfate mineral medium, basé sur le milieu 9K)

sels	g/L
NH ₄ Cl	3,0
KH ₂ PO ₄	0,5
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	0,5
KCl	0,1
Ca(NO ₃) ₂ • 4 H ₂ O	0,01
eau distillée	1000 ml

- Ajuster le pH à 2,25 avec de l'acide sulfurique 1 M (4,0 à 5,0 ml / L de milieu).
- Utilisé lors des essais d'oxydation des composés soufrés.

MMM (methanol mineral salt medium) modifié (Green, 1992)

sels	g/L
K ₂ HPO ₄	1,20
KH ₂ PO ₄	0,60
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,20
NaCl	0,10
CaCl ₂ • 6 H ₂ O	0,05
FeCl ₃ • 7 H ₂ O	0,001
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	0,001
eau distillée	1000 ml

- Ajuster le pH à la valeur désirée avec du H₂SO₄ ou du NaOH.
- Ajouter 0,1-0,2 % méthanol stérilisé par filtration, ou un autre substrat.
- Ajouter 15 g/L agar pour les milieux gélosés.
- Utilisé pour la croissance des *Methylobacterium* sp.

NF (nitrogen free medium) (Pedrosa *et al.*, 1980)

sels	g/L
K ₂ HPO ₄	0,8
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,2
NaCl	0,2
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,02
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	0,002
solution métaux en trace	2 ml
biotine	10 µg
eau distillée	1000 ml

- Ajuster le pH à la valeur désirée avec du H₂SO₄ 1,0 N ou du NaOH 1,0 N.
- Ajouter la source d'énergie (0,5%) après avoir autoclavé le milieu.
- Pour les milieux gélosés dont le pH est inférieur à pH 6,0, préparer une solution de sels 2X ainsi qu'une solution d'agar 3%. Autoclaver les deux séparément, les mélanger ensuite et y ajouter la source d'énergie.
- Pour les autres, ajouter 15 g/L agar directement à la solution de sels.

Peptone Medium (Atlas, 1993)

sels	g/L
Peptone (Oxoid)	10
eau distillée	1000 ml

- Utilisé pour la croissance de *E.coli* et *P. fluorescens* pour les essais enzymatiques.

PGA (peptone-glycérol-agar) (Green, 1992)

sels	g/L
Peptone (Oxoid)	10
Glycérol	10
Agar	15
eau distillée	1000 ml

- Ajuster le pH à 7,0 avec de l'acide sulfurique 1,0 N ou du NaOH 1,0 N.
- Utilisé pour la croissance des *Methylobacterium*.

SFMM (Omori *et al.*, 1992)

sels	g/L
NH ₄ NO ₃	2,8
KH ₂ PO ₄	3,0
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	0,01
Ca(NO ₃) ₂ • 4 H ₂ O	0,01
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	0,01
eau distillée	1000 ml

- Ajuster le pH avec du HCl concentré.
- Ajouter la source d'énergie (0,5%) après avoir autoclavé le milieu.
- Pour *S. disulfidooxidans*, ajouter 0,01% d'extrait de levure, ajuster le pH à 2,5 et ajouter seulement de 0,125 à 0,250 % de substrat organique.
- Ajouter 0,14 g (NH₄)₂SO₄ pour obtenir une concentration finale de 100 mg/L de SO₄²⁻.

Solution de métaux en trace

sels	g/L
EDTA-Na ₂	50
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	22
CaCl ₂	5,54
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	5,06
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	4,99
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	1,10
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	1,57
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	1,61
eau distillée	1000 ml

- Ajuster le pH à 6,0 avec du KOH en pastille.
- Garder congelé à -70°C en aliquotes de 1,0 ml.

Solution de vitamines

Solution stock :

vitamine	mg/100ml
B12	0,2
acide p-aminobenzoique	4
biotine	2
acide folique	4
pyridoxine	10
acide panthothénique	10
acide nicotinique	15
riboflavine	10
thiamine	10

- Vérifier le pH pour qu'il soit près de la neutralité, puis stériliser par filtration.
- Garder à l'obscurité à 4°C.
- Ajouter 50 µl de la solution stock à 100 ml du milieu lorsque précisé.
- Une solution stock de chacune des vitamines peut aussi être préparée séparément.

Annexe C . Composition de l'extrait de levure Difco

Caractéristiques physiques		Acides aminés (%)	Vitamines (µg/g)	Inorganiques (%)
cendre (%)	11,2	alanine 5,36	biotine 3,3	calcium 0,013
clarté, sol 1% (NTU)	1,5	arginine 3,02	choline 300,0	chlore 0,380
perte au séchage (%)	3,1	aspartate 6,69	cyanocobalamine <0,1	cobalt <0,001
filtration (g/cm ²)	2,7	cystine 0,74	acide folique 1,5	cuivre <0,001
pH, solution 1%	6,7	glutamate 14,20	inositol 1400,0	étain <0,001
		glycine 3,25	acide nicotinique 597,9	fer <0,001
Carbohydrates (%)		histidine 1,20	PABA 763,0	plomb <0,001
total	17,5	isoleucine 3,23	acide pantothénique 273,7	magnésium 0,075
		leucine 4,69	pyridoxine 43,2	manganèse <0,001
Azote (%)		lysine 5,15	riboflavine 116,5	phosphate 3,270
total	10,9	méthionine 1,05	thiamine 529,9	potassium 3,195
amino	6,0	phénylalanine 2,53	thymidine 217,5	sodium 1,490
		proline 2,60		soufre 0,634
		sérine 2,84		sulfate 0,091
		thréonine 2,95		zinc 0,011
		tryptophane 1,36		
		tyrosine 1,20		
		valine 3,79		
		Total 65,85	4.3 mg (0,004%)	Total 9,165

a.a. sulfuré : 1,79%
reste environ 5% de composé inconnus.

Annexe D . Essais d'isolement infructueux des partenaires formant le consortium

Essai 1 : Tampons

Le premier essai d'isolement a consisté à utiliser différents tampons pour maintenir le pH du milieu près de 3,5 et ainsi empêcher la croissance du *S. disulfidooxidans* SD-11 (croissance pH 1,0 à 3,0 sur le soufre). L'essai consistait à ajouter soit 1, 2 ou 5 ml de tampon au milieu 9K pH 3,5. Deux tampons ont été essayés :

Tampon 1 : β -alanine - H_2SO_4 0,1 M (pH 3,5)

Tampon 2 : acide citrique - Na_2HPO_4 0,1 M (pH 3,5)

Aucune croissance n'a été obtenue en utilisant de cette méthode. Les tampons semblaient inhiber toutes les espèces du consortium.

Essai 2 : Agents inhibiteurs

Des agents inhibiteurs des bactéries Gram + ont été utilisés dans le but d'éliminer *S. disulfidooxidans* SD-11 du consortium SD-2. Quatre agents inhibiteurs ont été utilisés : l'éosine, le bleu de méthylène, les sels biliaires et la pénicilline G (β -lactame). Pour les essais, des fioles Erlenmeyers de 50 ml stériles contenant 20 ml du milieu 9K pH 4,0 et 1% de soufre élémentaire (P/V) ont été inoculées, de même que les milieux gélosés correspondant en présence de thiosulfate de sodium (1% P/V) au lieu du soufre. À ces milieux, différentes quantités d'agents inhibiteurs avaient été ajoutées selon le Tableau D.1 suivant :

Tableau D.1 Concentrations des agents inhibiteurs utilisés

Agents inhibiteurs	Concentrations
sels biliaires	1,0 ; 2,0 ; 5,0 ; 10,0 g/L
éosine	0,1 ; 0,2 ; 0,4 g/L
bleu de méthylène	0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,06 g/L
éosine (0,4 g/L) + bleu de méthylène	0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,06 g/L
bleu de méthylène (0,06 g/L) + éosine	0,1 ; 0,2 g/L
pénicilline G	1 ; 2 ; 5 ; 10 unité/ml

Après les observations, plusieurs colonies ont été repiquées en milieu liquide avec ou sans agents inhibiteurs (bleu de méthylène et éosine). Ces cultures ont ensuite été étalées sur des géloses avec ou sans agents inhibiteurs contenant différents substrats tel le thiosulfate de sodium

(1% P/V), le glucose (0,1% P/V) ou le glutamate de sodium (0,1% P/V). De plus, l'extrait de levure à une concentration de 0,005% (P/V) a été ajouté comme sources de facteur de croissance pour certains essais. Par la suite, des colonies ont été repiquées dans le milieu liquide correspondant.

Dix cultures liquides ont été retenues de cet essai pour la suite des essais d'isolement. Elles ont été appelées les consortiums SD-101 à SD-110 (voir Figure D.1). La description des milieux de cultures utilisés pour la culture de ces 10 consortiums secondaires est retrouvée au Tableau D.2. Pour tous les consortiums, le soufre élémentaire à une concentration de 0,5% (P/V) a été utilisé comme substrat.

Tableau D.2 Description des milieux utilisés pour la culture des consortiums SD-101 à SD-110

NUMERO	MILIEU
SD-101	9K pH 3,8 + bleu de méthylène 0,02 g/L
SD-102	9K pH 3,8 + bleu de méthylène 0,02 g/L
SD-103	9K pH 3,8
SD-104	9K pH 3,8
SD-105	9K pH 3,8 + bleu de méthylène 0,02 g/L
SD-106	9K pH 3,8 + bleu de méthylène 0,06 g/L + éosine 0,1 g/L
SD-107	9K-EL pH 3,8
SD-108	9K pH 3,8
SD-109	9K pH 3,8 + bleu de méthylène 0,02 g/L
SD-110	9K pH 3,8

Essai 3 : Gradients pH

Des milieux gélosés ont été fabriqués de manière à obtenir un gradient de pH pour séparer les bactéries dont le pH optimum de croissance peut être légèrement différent. La méthode de Wimpenny et Waters (1984) a été utilisée avec quelques modifications. La technique consistait en 3 couches de 10 ml du milieu 9K pH 7,0 contenant deux indicateurs pH, soit le *m*-crésol pourpre (0,01 g/L) et le bleu de bromophénol (0,01 g/L), avec, comme agent gélifiant, 15 g/L d'agar Bi-Tek Difco. Les trois préparations de 10 ml ont été autoclavées séparément dans des tubes et gardées à 45°C jusqu'à leur utilisation. À la couche du fond était ajouté un volume (200, 400 ou 500 µl) d'acide sulfurique 0,1N. Cette couche était laissée gélifier dans le pétri avec une élévation d'environ 3 mm d'une extrémité de celui-ci. La couche

centrale contenait un volume (25, 50, 100 μ l) de NaOH 1N. Cette couche était ajoutée, le pétri à plat. La troisième couche contenait 0,5 % de thiosulfate de sodium (P/V). Après avoir laissé le gradient pH s'équilibrer pendant 24 heures, les géloses ont été inoculées par étalement de 25 μ l du consortium SD-2.

Cette méthode n'a pas permis de séparer les partenaires du consortium, puisque la stabilité du gradient pH ne durait que 2 à 3 jours. Après cette période, le pH était le même sur toute la surface du pétri.

Essai 4 : Gradients d'agents inhibiteurs et de substrats

À partir des consortiums SD-101 à SD-110 des inocula de 50 μ l des dilutions 10^{-4} et 10^{-7} ont été étalés sur les différents milieux gélosés suivant contenant 1% P/V de thiosulfate de sodium :

- 9K pH 3,8
- 9K pH 3,8 + 0,01 % extrait de levure
- 9K pH 3,8 + 0,02g/L de bleu de méthylène
- 9K pH 3,8 + 0,02g/L de bleu de méthylène et 0,01 g/L d'éosine
- 9K pH 3,8 + 0,06g/L de bleu de méthylène et 0,1 g/L d'éosine

Suite à l'étalement, les milieux ont été divisés en cinq parties au centre desquelles un morceau de gélose a été enlevé à l'aide d'une pipette pasteur pour former un puits. Ensuite 2,5 μ l des cinq solutions suivantes : glucose 25g/L, glutamate 25 g/L, tétrathionate de sodium 50 g/L, extrait de boue pH 2,27 1/10 (V/V) et extrait de boue chaulée pH 7,2 1/10 (V/V) ont été déposés dans les puits. L'extrait de boue a été préparé en passant à l'autoclave 15 min 121°C 20 ml de boues auxquels 80 ml d'eau distillée avaient été ajoutées. Ensuite, le mélange a été centrifugé dans des tubes de 50 ml à 18 000 rpm 15 min. Le surnageant a été prélevé et utilisé comme extrait de boue.

Des dilutions (10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) des consortiums SD-104, SD-107, et SD-110 ont été étalées selon le même procédé sur le milieu 9K pH 3,8. Dans les puits, 4 μ l des solutions suivantes ont été déposés : éosine 4 g/L, bleu de méthylène 2g/L, éosine 1g/L + bleu de méthylène 2 g/L, éosine 5g/L + bleu de méthylène 2 g/L et pénicilline G.

Une sous-culture de l'isolat SD-11 sur le soufre a servi lors du même procédé mais sans dilution sur les milieux utilisés pour SD-101 à SD-110 ainsi qu'un milieu 9K pH 2,25 contenant 7 g/L d'agarose (type I : Low EEO de Sigma) comme agent gélifiant et soit : 5 g/L de glutamate

de sodium, 5 g/L de thiosulfate de sodium, 0,01 g/L d'éosine ou 0,02 g/L de bleu de méthylène. Ces milieux ont été divisés en deux et 4 µl des extraits de boue chaulée ou non ont été déposés dans les puits. De plus, après l'étalement de l'isolat SD-11 sur les milieux 9K et 9K-EL (contient 0,1 g/L extrait de levures) pH 3,8, 4 µl des solutions suivantes : éosine 4 g/L, bleu de méthylène 2 g/L, éosine 1g/L + bleu de méthylène 2 g/L, éosine 5g/L + bleu de méthylène 2 g/L, et différents volumes (0,5; 1; 2; 3; 4 µl) d'acide sulfurique 1M ont été déposés dans les puits. Encore une fois, cette méthode n'a pas permis d'isoler aucun des partenaires.

Essai 6 : Utilisations d'ions et de sulfures métalliques comme agents sélectifs

Après l'isolement des isolats non-acidifiants (sur le soufre) SD-7 et SD-8 lors de l'essai 5 (voir Figure D.2), un autre essai a été élaboré pour inhiber le *S. disulfidooxidans* SD-11 et ces deux isolats. Pour ce faire, 4 colonies (3, 12, 19, 21) ayant produit une forte acidification ont été inoculées dans des bouillons 9K pH 3,0 avec soit la pyrite (0,1%), la sphalérite (0,5%) ou l'arsénopyrite (0,5%) comme substrats; ou encore le KSCN 1% dans du 9K-m pH 5,5. Puis, trois sous-cultures ont été effectuées. La culture sur le ZnS a été la seule culture ayant une croissance après les trois transferts. Une gélose du milieu BS4 a donc été inoculée et deux colonies ont été prélevées pour la suite des essais d'isolement en plus de la sous-culture de la colonie 19 dans le bouillon BS4 (sans adaptation sur les sulfures métalliques).

Essai 7 : Variation de la concentration en azote du milieu et utilisation de l'acétate comme agent inhibiteur

Des milieux BS4 (+ EL ou acétate 0,01%) ont été inoculés à partir de chacune des cultures obtenues de l'essai 6 (19-1, 19-2, 19). Quatre colonies ont été retenues de cet essai : 19-2-1, 19-2-2, 19-4, 19-2-3. Plusieurs passages successifs du milieu solide à liquide ont été effectués à partir de ces isolats. Les milieux gélosés BS4 (1,9 g/L ou 9,4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) contenant en leur centre un puits fait selon la méthode décrite à l'essai 4 ont été inoculés avec 20 µl des isolats. Les puits contenaient soit 10 µl acétate 10%, 10 µl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25% ou 10 µl d'une solution de Cu^{2+} 0,5 M. Les colonies les plus résistantes à l'ammonium et à l'acétate ont été choisies pour la suite des essais.

Essai 8 : Dilution en couche mince

Après avoir resuspendu les colonies 12 à 24 de l'essai 7 dans 1 ml du milieu BS4, une dilution 1:9 a été effectuée et des volumes de 5 µl ou 50 µl de cette dilution ont été ajoutés à 3 ml du milieu BS4 contenant 0,2% d'agarose conservé à 55°C. Après agitation, la gélose molle a été

versée sur un milieu BS4 contenant du thiosulfate 1%. Les colonies 25 à 29 prélevées dans la couche molle de gélose ont été resuspendues dans 1 ml de BS4 et 10 µl de la suspension ont été étalées sur une gélose BS4. Puis, les colonies 51 à 55 ont été à nouveau diluées dans une mince couche de gélose molle (agarose 0,35 % cette fois) pour obtenir les colonies #56 à 59. Après quelques transferts de la colonie 59, le consortium 22 et SD-20 ont été obtenus (voir Figure D.3). Les autres manipulations ont été effectuées à partir de ces deux cultures.

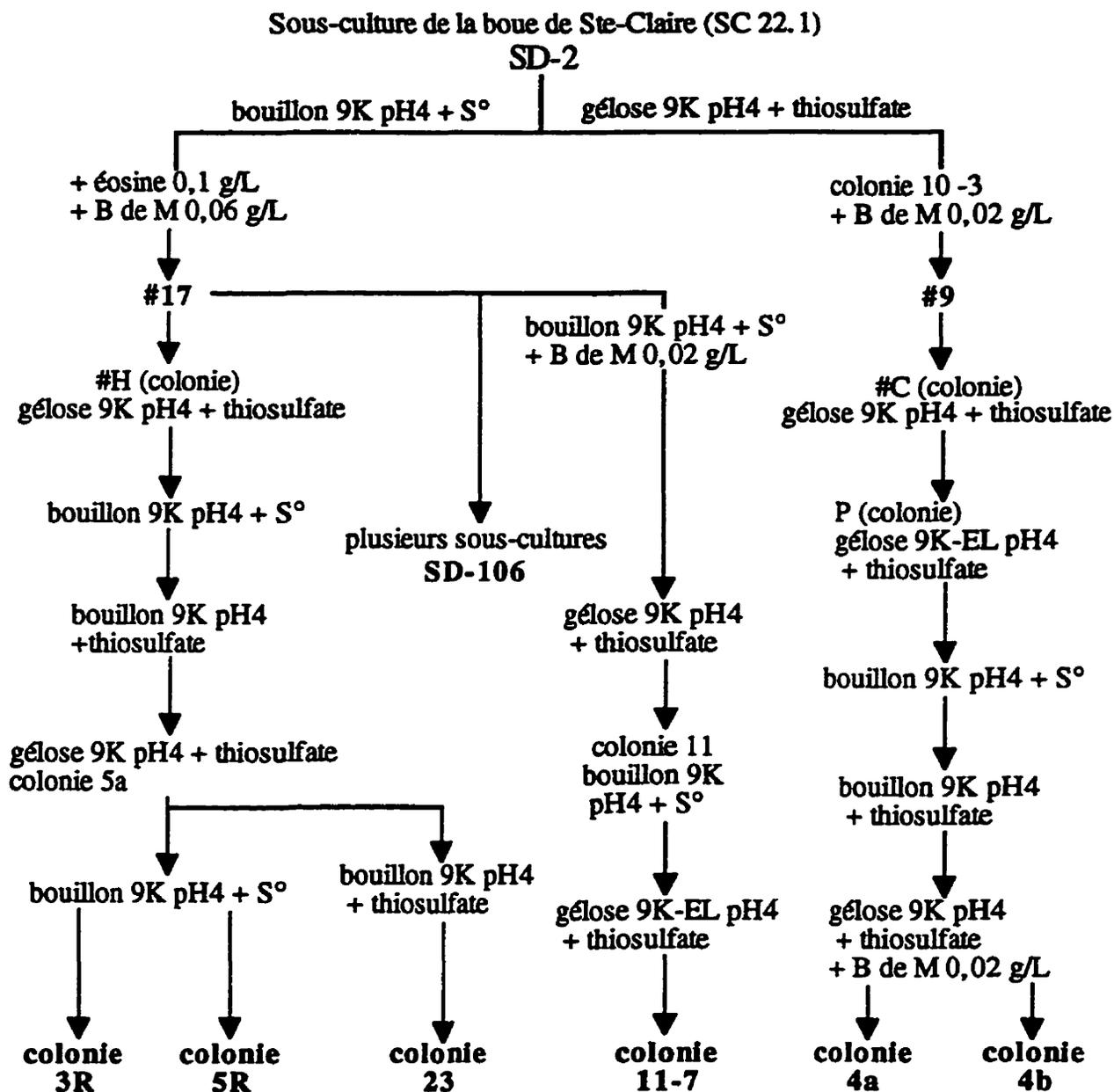


Figure D.1 Résumé des manipulations des essais d'isolement 2 à 4

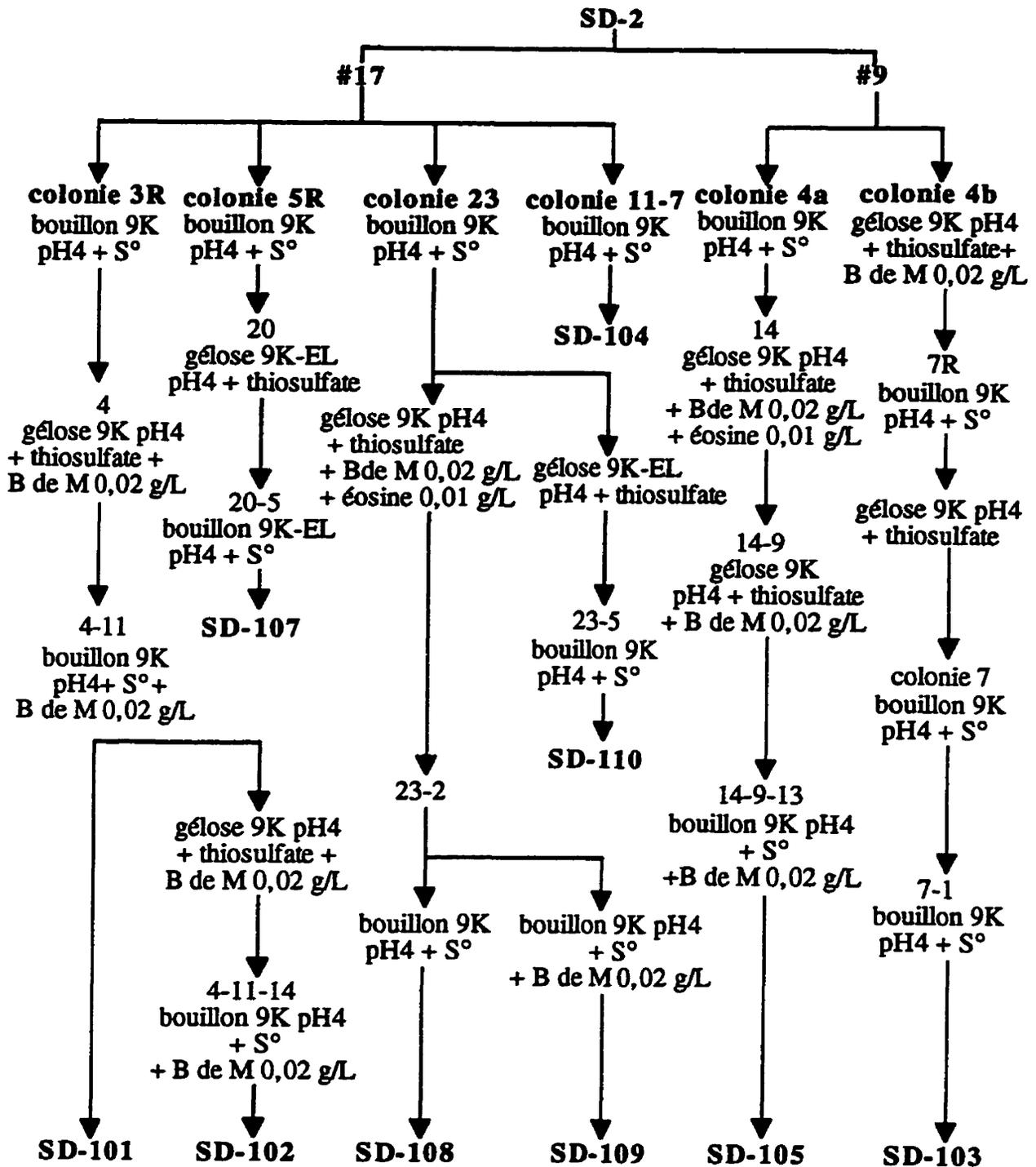


Figure D.1 Résumé des manipulations des essais d'isolement 2 à 4 (suite)

Essai 5: variation des pH initiaux des milieux**Série 1:**

- inoculer avec les consortiums SD-101 à SD-110
- isolement des colonies 1 à 12
- dilution des colonies et inoculation des milieux gélosés 9K-m pH 5,5 et 6,25, et BS4
- utilisation des colonies provenant de ces milieux pour inoculer la série 2

Série 2 (BS4, et 9K-m pH 5,5 et 6,25)

- tubes acidifiés: colonies 1 à 8, et 30
- tubes légèrement acidifiés: colonies 9 à 20
- tubes non acidifiés: colonies 21 à 29

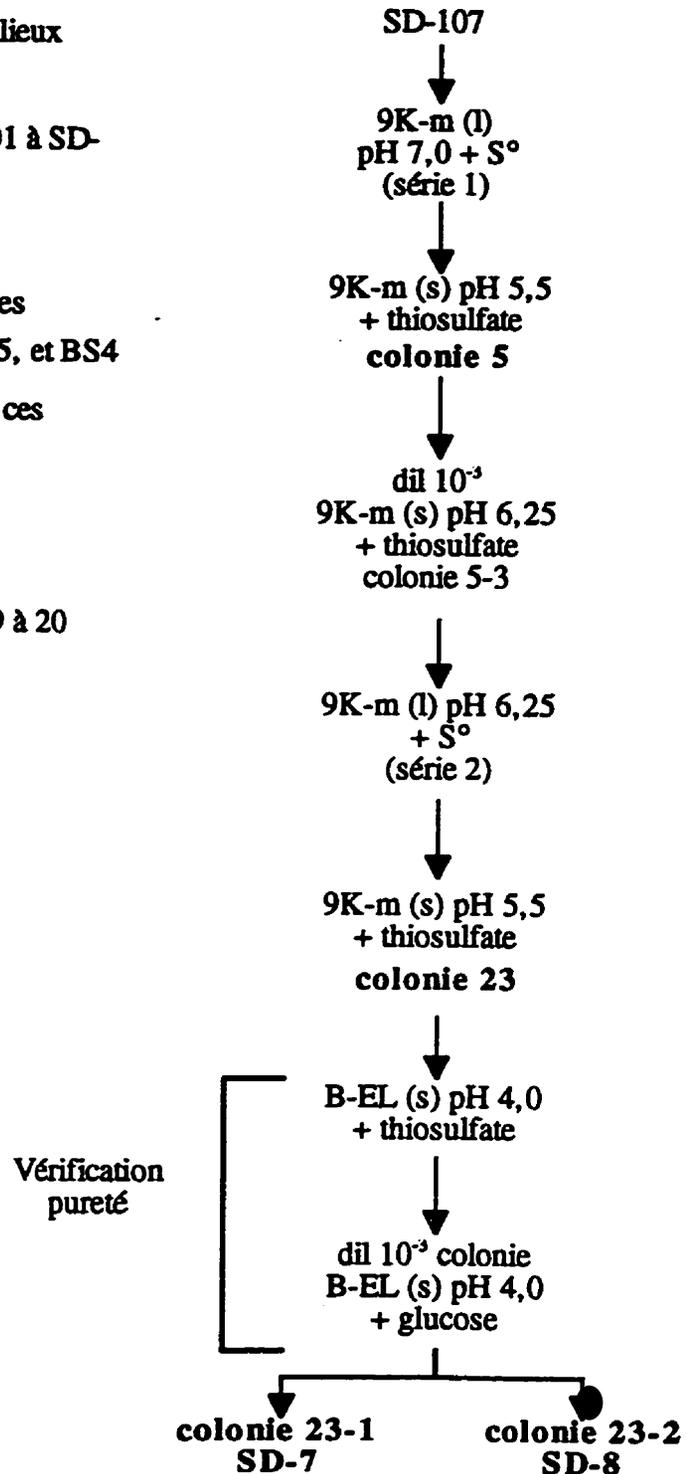


Figure D.2 Résumé de l'essai d'isolement 5 et purification des isolats SD-7 et SD-8

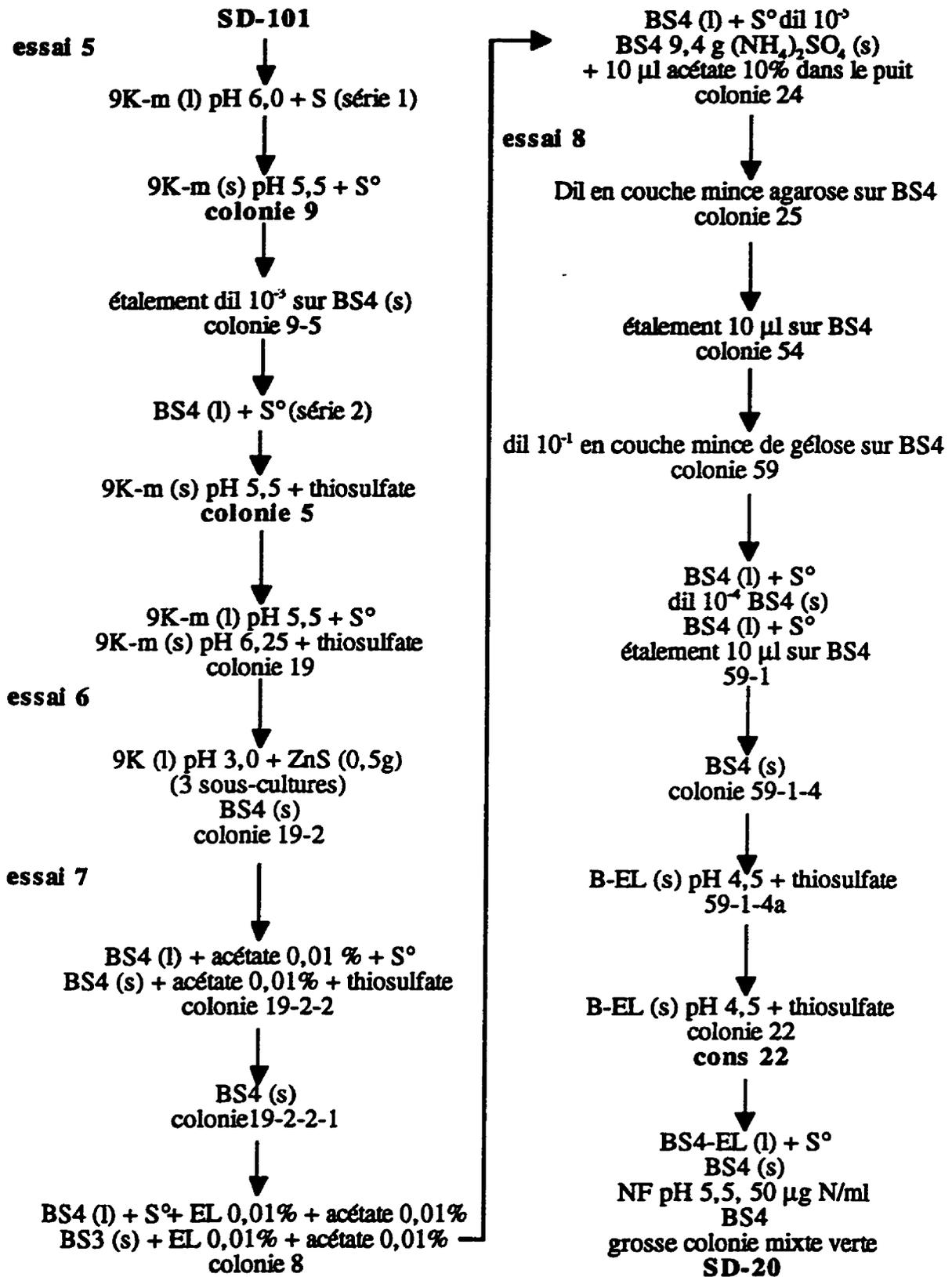


Figure D.3 Essai d'isolement du ou des partenaire(s) acidifiant(s)

Annexe E . Coloration de Gram (communication personnelle, secteur environnement, CRIQ))

Préparation des solutions

- crystal violet : 0,25 g crystal violet par 100 ml d'eau distillée.
- bicarbonate de sodium : 1,25 g de bicarbonate de sodium par 100 ml eau distillée.
- iode : 2 g iode sublimé dans 10 ml NaOH 1 N, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- décolorant : 25 ml éthanol + 75 ml acétone.
- fushin basique : 0,1 g de fushin basique dans 10 ml éthanol, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée puis filtrer.

Méthodologie

- fixer une suspension bactérienne à la chaleur.
- saturer la lame avec la solution de crystal violet et la solution de bicarbonate de sodium (environ 1:1) durant 1 minute.
- rincer la lame à l'eau puis saturer avec la solution d'iode 1 minute.
- rincer avec la solution décolorante jusqu'à ce que la solution reste claire (10 à 30 secondes).
- saturer avec la solution de fushin basique 1 minute, rincer à l'eau et laisser sécher.

Observation

- les bactéries Gram + seront bleues très foncées, et les bactéries Gram - seront rouges.

Annexe F . Dosage des protéines, du glucose et du sulfate

Pour le dosage des protéines selon la méthode de Lowry.

- Préparation des solutions :

solution 1 : dissoudre 50 g de NaCO_3 dans 1 litre eau distillée.

solution 2 : dissoudre 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml eau distillée.

solution 3 : dissoudre 2 g de NaKtartrate dans 100 ml eau distillée.

solution de Folin : dilué le réactif de Folin 1:1 avec de l'eau distillée (avant de l'utiliser).

Mélange réactionnel : ajouter 1 ml des solutions 2 et 3 à 50 ml de la solution 1

- Méthodologie :

Ajouter 2,5 ml du mélange réactionnel à 1,0 ml de la solution de protéine hydrolysée (0,75 ml culture + 0,75 ml NaOH 1N) et laisser réagir 10 min. Ajouter 0,5 ml de la solution de Folin, agiter et laisser réagir 30 min avant de lire la D.O. à 750 nm.

- Courbe standard :

protéine (BSA) ($\mu\text{g} / 0,5 \text{ ml}$)	0	10	20	30	40	50
solution standard 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (μl)	0	37,5	75	112,5	150	187,5
eau (μl)	750	712,5	675	637,5	600	562,5
moyenne D.O. à 750 nm (BSA)	0,0000	0,0529	0,1115	0,1669	0,2233	0,2758
moyenne D.O. à 750 nm (BSA + S°)	0,0254	0,0760	0,1508	0,1888	0,2587	0,2976

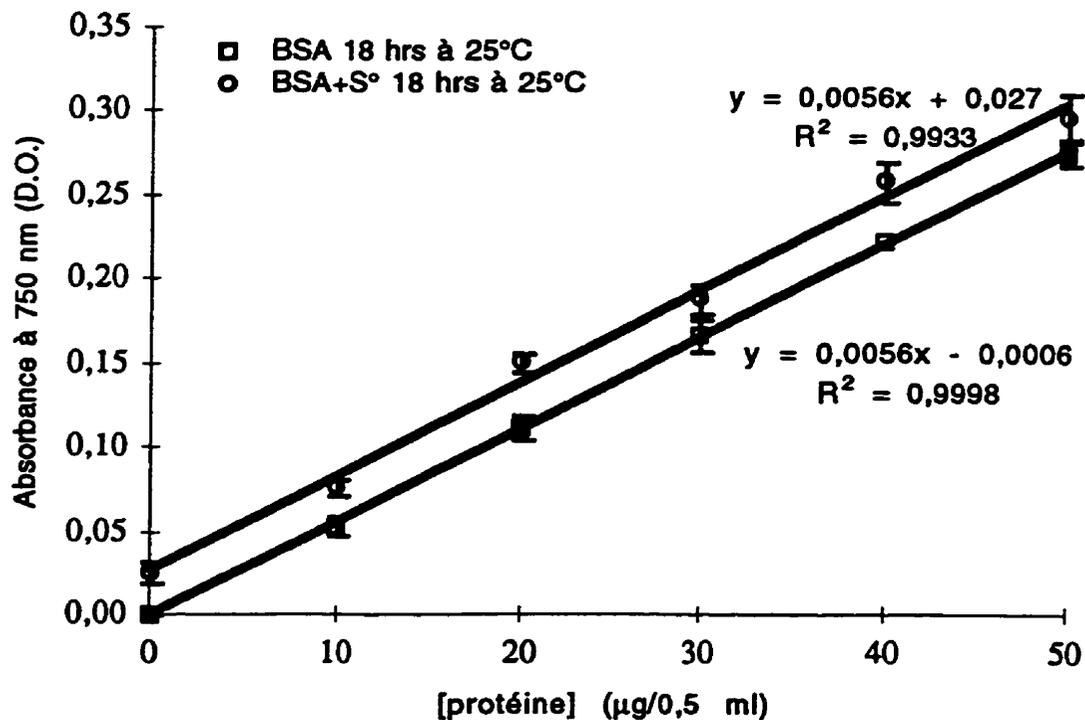


Figure F.1 Courbe standard du dosage des protéine avec et sans soufre

Pour le glucose, la trousse de diagnostique de Sigma à été utilisée.

- **Préparation des solutions :**

Solution standard de glucose 1mg/ml fournit avec la trousse

Solution enzymatique : dissoudre le contenu d'une capsule dans 100 ml d'eau distillée (conservé à 4°C 1 mois).

Solution d'*O*-dianisidine : ajouter 20 ml d'eau distillée à la solution concentrée

Solution révélatrice : ajouter 1,6 ml de la solution d'*O*-dianosidine à 100 ml de la solution enzymatique (stable 1 mois à 4°C).

- **Méthodologie :**

Ajouter 1,0 ml de la solution révélatrice à 100 µl de l'échantillon. Incuber 30 min à 37°C, puis lire la densité optique à 475 nm.

- **Courbe standard :**

glucose (µg/ml)	0	40	100	200
solution standard (µl)	0	4	10	20
eau (µl) ou milieu 9K	100	96	90	80
moyenne D.O. 475 nm	0,00	0,18	0,47	0,89

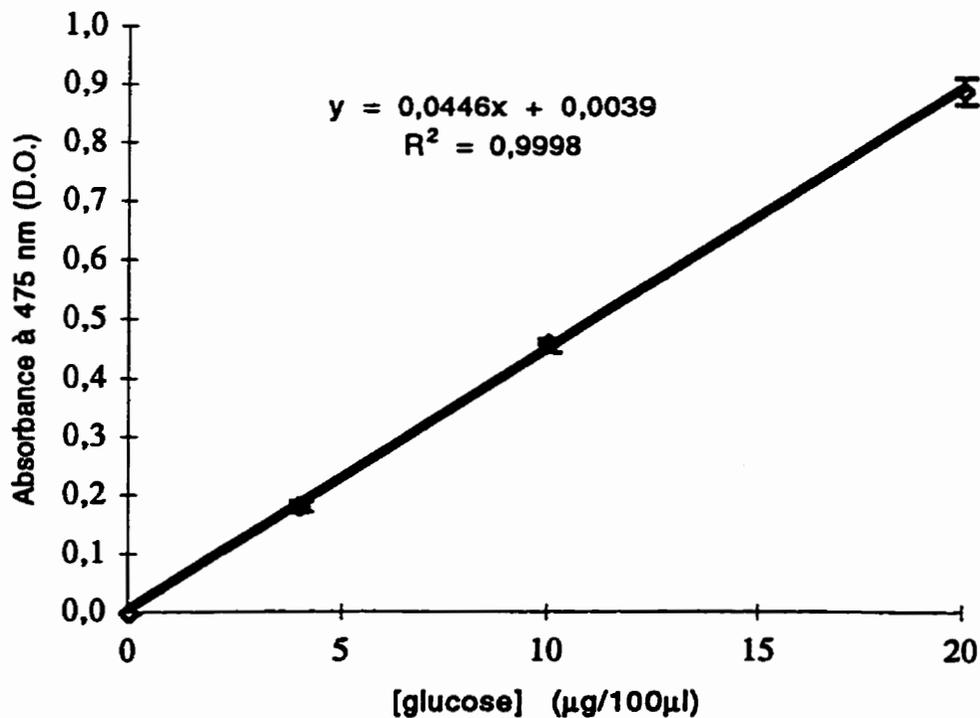


Figure F.2 Courbe standard du dosage du glucose

Pour les sulfates, la méthode décrite dans l'APHA a été utilisée.

- Préparation des réactifs et étalons :

Solution Tampon A : Dissoudre 30 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 g de CH_3COONa , 1,0 g de KNO_3 , et 20 ml d'acide acétique (99%) dans 500 ml d'eau et compléter à 1000 ml.

Solution standard de sulfates (100 mg/L) : dans une fiole jaugée de 100 ml contenant 50 ml d'eau, ajouter 10,4 ml d'acide sulfurique 0,0200N et compléter à 100 ml; ou dissoudre 0,147 g de sulfate de sodium anhydre (une nuit à 105°C, puis placer au dessiccateur) à 1000 ml d'eau.

- Méthodologie

Mettre 0,5 ml d'échantillon (on peut se rendre à 5 ml, réajuster le volume d'eau en conséquence) dans un Erlenmeyer de 10 ml, Ajouter 4,5 ml d'eau. Puis ajouter 1 ml de tampon et agiter. Ajouter ensuite environ 0,01 g de $BaCl_2$ et agiter 60 ± 2 sec. Lire la densité optique à 420 nm à $5 \pm 0,5$ min

- Courbe standard :

mg SO_4 / L	0	10	20	30	40
mg SO_4 / 5ml	0	0,05	0,1	0,15	0,20
Volume standard (100 mg/l)	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Volume eau	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0
moyenne D.O. 420 nm	0,000	0,09	0,22	0,33	0,4300

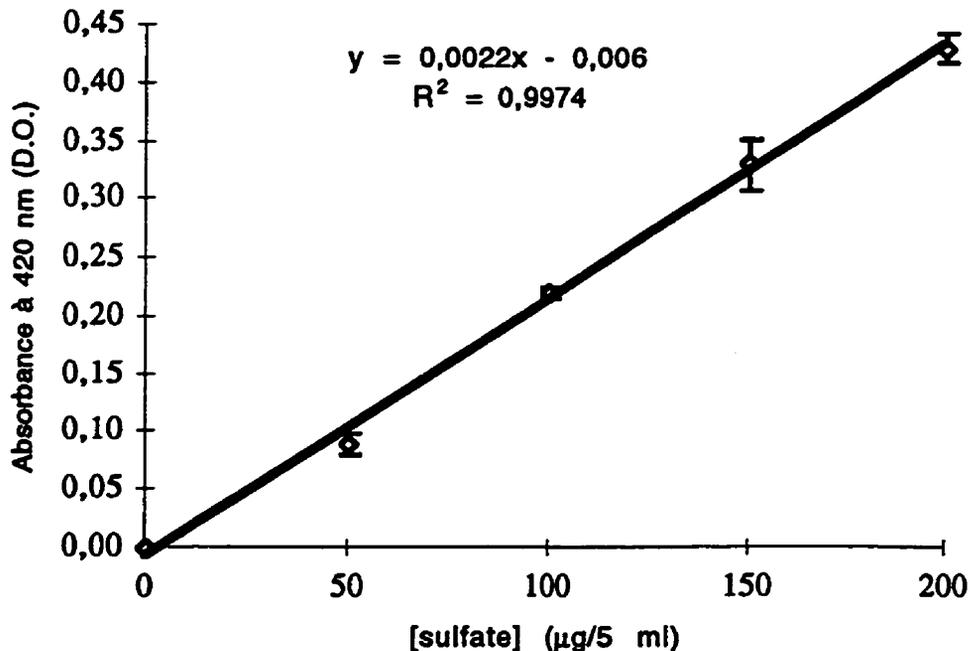


Figure F.3 Courbe standard du dosage des sulfates

Annexe G . Radioactivité ^{14}C

- Solution de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$: 50 μg dans 1 ml d'eau distillée pH 9,5 donnant environ 5 μCurie (μCi).
- 1 $\mu\text{Ci} = 2,2 \times 10^6$ dpm
- Le soufre se dissout dans le fluor ACS et, en grande quantité, il peut diminuer les valeurs obtenues lors des lectures de radioactivité. Lors d'un essai effectué en triplicata avec la solution de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ en présence et en absence de soufre, nous avons obtenu une moyenne de 72 593 dpm sans soufre et de 56 148 dpm avec soufre pour 10 μl de la solution dont la valeur théorique en dpm calculé était de 72 550. Cependant en très faible quantité, comme retrouvé sur les filtres, il n'y a pas eu de problème d'interférence.
- La méthodologie décrite par Zakharchuk *et al.* (1994) a été utilisée. Cependant, nous avons dû ajouter 1 ml d'une solution non-radioactive de NaHCO_3 de 0,02M, car la concentration de la solution radioactive n'était que de $5,95 \times 10^{-4}$ M comparé à 0,1 M pour celle utilisée par Zakharchuk *et al.* (1994). Nous avons ensuite ajouté un volume de la solution de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ équivalent à 1 μCi .
- Au pH du milieu de culture (2,25), le NaHCO_3 est transformé en Na^+ , H_2O , et CO_2 ; puisque le pK du H_2CO_3 est de 6.

Essai 1

- Lors de cette essai, nous avons ajouté 1 ml de NaHCO_3 0,02 M ($2,00 \times 10^{-5}$ mol CO_2) et 240 μl de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ($1,43 \times 10^{-7}$ mol CO_2) ce qui équivaut à une concentration totale de $2,014 \times 10^{-5}$ mol CO_2 .
- Pour chaque dpm, la culture fixe $8,2 \times 10^{-14}$ mol $^{14}\text{CO}_2$:

$$\frac{10 \mu\text{l NaH}^{14}\text{CO}_3}{72\,593 \text{ dpm}} \times \frac{50 \mu\text{g NaH}^{14}\text{CO}_3}{1000 \mu\text{l}} \times \frac{1 \text{ mol NaH}^{14}\text{CO}_3}{84,01 \times 10^6 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ mol }^{14}\text{CO}_2}{1 \text{ mol NaH}^{14}\text{CO}_3} = 8,20 \times 10^{-14} \text{ mol }^{14}\text{CO}_2 / \text{dpm}$$
- et pour chaque dpm, elle fixe aussi $1,15 \times 10^{-11}$ mol de CO_2 non-radioactif

$$\frac{2 \times 10^{-5} \text{ mol CO}_2}{1,43 \times 10^{-7} \text{ mol }^{14}\text{CO}_2} \times \frac{8,2 \times 10^{-14} \text{ mol }^{14}\text{CO}_2}{\text{dpm}} = 1,15 \times 10^{-11} \text{ mol CO}_2 / \text{dpm}$$

Essai 2

- Lors de cette essai, nous avons ajouté 1 ml de NaHCO_3 0,02 M ($2,00 \times 10^{-5}$ mol CO_2) et 297 μl de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ($1,77 \times 10^{-7}$ mol CO_2) ce qui équivaut à une concentration totale de $2,0177 \times 10^{-5}$ mol CO_2 .
- Pour chaque dpm, la culture fixe $8,55 \times 10^{-14}$ mol $^{14}\text{CO}_2$:

$$\frac{10 \mu\text{l NaH}^{14}\text{CO}_3}{69\,601 \text{ dpm}} \times \frac{50 \mu\text{g NaH}^{14}\text{CO}_3}{1000 \mu\text{l}} \times \frac{1 \text{ mol NaH}^{14}\text{CO}_3}{84,01 \times 10^6 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ mol }^{14}\text{CO}_2}{1 \text{ mol NaH}^{14}\text{CO}_3} = 8,55 \times 10^{-14} \text{ mol }^{14}\text{CO}_2 / \text{dpm}$$

- et pour chaque dpm, elle fixe aussi $0,966 \times 10^{-11}$ mol de CO_2 non-radioactif

$$\frac{2 \times 10^{-5} \text{ mol CO}_2}{1,77 \times 10^{-7} \text{ mol }^{14}\text{CO}_2} \times \frac{8,55 \times 10^{-14} \text{ mol }^{14}\text{CO}_2}{\text{dpm}} = 0,966 \times 10^{-11} \text{ mol CO}_2 / \text{dpm}$$

Quantité de CO_2 fixée par les *Sulfobacillus* sp.

- Lors de l'essai 1 :

$$\frac{y \text{ dpm} \times (8,20 \times 10^{-14} \text{ mol }^{14}\text{CO}_2 / \text{dpm} + 1,15 \times 10^{-11} \text{ mol CO}_2 / \text{dpm})}{2 \text{ ml culture}} = z \text{ mol CO}_2 / \text{ml culture}$$

- Lors de l'essai 2 :

$$\frac{y \text{ dpm} \times (8,55 \times 10^{-14} \text{ mol }^{14}\text{CO}_2 / \text{dpm} + 0,966 \times 10^{-11} \text{ mol CO}_2 / \text{dpm})}{2 \text{ ml culture}} = z \text{ mol CO}_2 / \text{ml culture}$$

Pour la fixation du CO_2 par mg de protéine, les valeurs ont été divisées par les quantités de protéines évaluées au temps correspondant (μg protéine / ml).

$$\frac{z \times 10^{-11} \text{ mol CO}_2 / \text{ml}}{y \times 10^{-3} \text{ mg protéine} / \text{ml}} = a \times 10^{-9} \text{ mol CO}_2 / \text{mg protéine} = a \text{ nmole CO}_2 / \text{mg protéine}$$

Annexe H. Essais enzymatiques sur gel

Préparation des tampons pour la préparations des extraits enzymatiques

Tampon Tris 10 mM pH 6,8	trizma-base (Sigma T-1503)	1,42 g/L
	EDTA-Na ₂ (Fisher)	372,0 mg/L
	dithiotréitol (0,1mM)	15,4 mg/L
	2-mercaptoéthanol (5 mM)	390,7 mg/L
	NADP (0,5mM) (Boehringer)	370,7 mg/L

Tableau H.1 Solutions révélatrices pour les différents enzymes recherchés (volume suffisant pour révéler une tranche du gel).

enzyme	solutions	
6-phosphogluconate déshydrogénase (6PG)	6-phosphoglucinic acid	3 mg
	Tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0) ^a	5 ml
	MgCl ₂ 0,1 M ^e	100 µl
	MTT ^b	100 µl
	PMS ^c	50 µl
	NAD ^d	200 µl
glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P) 1 hr à 37°C	Glucose-6-P (sels de sodium hydratés)	10 m g
	Tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)	5 ml
	MgCl ₂ 0,1 M (essayé MnCl ₂ réf 438)	100 µl
	MTT	100 µl
	PMS	50 µl
	NADP ^d	100 µl
glutamate déshydrogénase (GDH)	Tris-HCl 0,2M (pH 8,0)	5 ml
	L-glutamate	169 mg
	MTT	100 µl
	PMS	50 µl
	NADP	100 µl
malate déshydrogénase (MDH) 1 hr à 37°C	Tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)	5 ml
	L-malic acid	12,5 mg
	MTT	100 µl
	PMS	50 µl
	NAD	200 µl
isocitrate déshydrogénase (IDH)	Tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)	5 ml
	Isocitric acid	5 mg
	MgCl ₂ 0,1 M	100 µl
	MTT	100 µl
	PMS	50 µl
	NADP	100 µl

Tableau H.1 Solutions révélatrices pour les différents enzymes recherchés (suite).

enzyme	solutions	
α-cétoglutarate déshydrogénase (OGDH) méthode 1	A. Tampon phosphate 0,1 M (pH 7,0) ^a	5 ml
	α-cétoglutarate	5 mg
	MgCl ₂ 0,1 M	100 µl
	Coccarboxylase (Thiamine pyrophosphate)	50 µl
	DCPIP ^b	100 µl
	B. 200µl MTT dans 4 ml du tampon tris-HCl 0,1M (pH 7,0)	
malate synthétase (MS) méthode 1	A. Tampon Tris-HCl 0,1M (pH 7,5)	2,0 ml
	Sodium glyoxylate	2,5 mg
	MgCl ₂ 0,1 M	100 µl
	Acetyl-CoA 10 mM ^m	25 µl
	DCPIP ^b	500 µl
	B. 200µl MTT dans 4 ml du tampon tris-HCl 0,1M (pH 7,6)	
citrate synthétase (CS) méthode 1	A. Tampon Tris-HCl 0,1M (pH 7,5)	2,0 ml
	Oxaloacetate 10 mM ^l	50 µl
	Acetyl-CoA 10 mM	25 µl
	DCPIP	500 µl
	B. 200µl MTT dans 4 ml du tampon 0,1M tris-HCl pH 7,6	
OGDH méthode 2	Tampon Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0)	4 ml
	MgCl ₂ 0,1 M	500 µl
	EDTA 0,1M	50 µl
	Coccarboxylase (Thiamine pyrophosphate)	50 µl
	α-cétoglutarate	5 mg
	CoA 0,1 mM	0,4 mg
	AMP 0,5mM	1,2 mg
	NAD	200 µl
	PMS	50 µl
	MTTou NBT	100 µl
MS méthode 2	Tampon Tris-HCl (ou PO ₄) 0,1M (pH 7,6)	420 µl
	eau bidistillée	2,32 ml
	MgCl ₂ 0,1 M	1 ml
	sulfate de cuivre 50 mM	420 µl
	potassium ferricyanide 15 mM	420 µl
	sodium potassium tartrate 100 mM	420 µl
	Acetyl-CoA 10 mM ^m	25 µl
Sodium glyoxylate	4,7 mg	
CS méthode 2	Tampon Tris-HCl (ou PO ₄) 0,1M (pH 7,6)	420 µl
	eau bidistillée	2,32 ml
	sulfate de cuivre 50 mM	420 µl
	potassium ferricyanide 15 mM	420 µl
	sodium potassium tartrate 100 mM	420 µl
	Acetyl-CoA 10 mM	25 µl
	Oxaloacetate 10 mM	50 µl

Tableau H.1 Solutions révélatrices pour les différents enzymes recherchés (suite).

enzyme	solutions	
glucose oxidase (GO)	Tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)	5 ml
	β -D-glucose	33 mg
	MTT	100 μ l
	PMS	50 μ l
aldolase (ALD)	Fructose-1,6-diphosphate	10 mg
	Glycéraldéhyde-3-P- déshydrogénase	6,25 μ l
	Triosphosphate isomérase(pas nécessaire)	1 μ l
	NAD	200 μ l
	Tampon Tris-acétate 0,1 M (pH 7,5) ^f	5 ml
	Na ₂ HAsO ₄ • 7 H ₂ O	10 mg
	PMS	50 μ l
	MTT	100 μ l
phosphofruktokinase (PFK)	Fructose-6-phosphate	10 mg
	Aldolase	1 μ l
	Glycéraldéhyde-3-P- déshydrogénase	6,25 μ l
	Triosphosphate isomérase	1 μ l
	NAD	200 μ l
	Tampon Tris-acétate 0,1 M (pH 7,5)	5 ml
	Na ₂ HAsO ₄ • 7 H ₂ O	10 mg
	PMS	50 μ l
MTT	100 μ l	
hexokinase (HK)	Tampon Glycine-glycine 0,1 M (pH 7,5) ^P	5 ml
	D-glucose	20 mg
	Glucose-6-P déshydrogénase	1 unité (2 μ l)
	ATP	5 mg
	MgCl ₂ 0,1 M	200 μ l
	MTT	100 μ l
	PMS	50 μ l
	NADP	100 μ l
isocitrate lyase (IL)	A Tampon phosphate pH 7,5 0,1M	5 ml
	EDTA 0,1 M	50 μ l
	MgCl ₂ 0,1 M	100 μ l
	dithiothéitol	23 mg
	Isocitrate	13 mg
	B Schiffs reagent ^o : à mettre dans la solution A	0,3 ml
	Faire un témoin négatif sans MgCl ₂ et isocitrate	

Tableau H.1 Solutions révélatrices pour les différents enzymes recherchés (suite)

enzyme	solutions	
PEP carboxylase	A. Tampon Tris-HCl 0,1M (pH 8,5)	2,0 ml
	Phosphoenolpyruvate	5 mg
	MgCl ₂	100 µl
	Acetyl-CoA 10 mM	25 µl 0,5 mM
	KHCO ₃	20 mM
	B. 1 mg / ml Fast Violet B (ou Fast blue B ou BB) Incuber le gel dans la solution A à Température pièce 30 min , puis mettre dans la solution B jusqu'à l'apparition de bande coloré	
KDGP aldolase + 6PGD (en tube)	Tampon Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5)	5 ml
	6-phosphogluconate	5 mg
	FeSO ₄ • 7 H ₂ O 6 mM	3 mg
	glutathion réduit 3 mM	5 mg
	ortho-aminobenzaldéhyde 25 mM (2 mg dans 10 ml)	250 µl
	Coloration jaune lorsque réaction positive, en tube seulement	

- a. Tampon Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 : 24,2 g / L eau bidistillée, pH ajusté avec du HCl
- b. MTT : 1,25 g / 100 ml d'eau bidistillée, garder à la noirceur et à 4°C.
- c. PMS : 1,0 g / 100 ml d'eau bidistillée
- d. NADP : 1,0 g / 100 ml d'eau bidistillée, garder à 4°C
- e. MgCl₂ 0,1 M : 2,03 g MgCl₂ • 6 H₂O dans 100 ml d'eau bidistillée
- f. Tampon Tris-acétate 0,1 M pH 7,5 : 12,11 g Tris / L eau distillée, pH ajusté à 7,5 ou 8,5 avec de l'acide acétique glacial. Ajouter ensuite 19,63 g acétate de potassium, 333 mg de chlorure de cobalt, 35,2 mg hydrochlorure de L-cystéine
- g. Tampon glycine-KCl :
- h. DPIP : 40 mg dans 100 ml d'eau
- k. EDTA-Na₂ 0,1M : 0,36 g dans 10 ml d'eau
- l. Oxaloacetate 10 mM : 1,3 mg dans un ml tampon
- m. Acetyl-CoA 10 mM : 0,2 mg dans 25 µl
- n. Tampon phosphate 0,1 M pH 7,0 : mélanger des parts égales d'un solution de 13,8 g/L NaH₂PO₄ • H₂O et une autre de 26,8 g/L de Na₂HPO₄ • 7 H₂O
- o. Schiffs reagent : ajouter 500 ml d'eau distillée tiède à 0,25 g de fushin basic, agiter et filtrer. Ajouter au filtrat 5 ml HCl 1 N, puis 0,125 ml HCl conc. Ajouter finalement 0,5 g de sodium metabisulfite. Garder à la noirceur à 4°C
- p. Tampon glycine-glycine 0,1 M pH 7,5 : 11,3 g de glycine dans 1L eau, pH ajusté avec du KOH 1M
 cocarboxylase : 4 mg dans 1 ml d'eau bidistillée acidifié à pH 2,6 avec du HCl
 sulfate de cuivre 50 mM : 0,125 g / 10 ml
 sodium potassium tartrate 100 mM : 0,282 g / 10 ml
 potassium ferricyanide 15 mM : 0,049g / 10 ml

Pour certains enzymes, il est important d'utiliser un extrait qui n'a jamais été décongelé précédemment (surtout ALD, mais aussi HK et G6P si possible)

Annexe I . Dosage de la RuBisPCase

Préparation du mélange réactionnel #1 (pour 10 ml) :

préparer du tampon Tris-HCl pH 7,9 1,5 M : pour 100ml (sans EDTA) :18,6 g Tris,
ajuster pH avec HCl prendre (100 μ m / ml) 667 μ l du tampon, mettre dans une
fiolle jaugée de 10 ml

ajouter 67 mg NaHCO₃ (6,72 mg = 80 μ m /ml),

ajouter 37 mg glutathion réduit (3,67 mg = 12 μ m) /ml

ajouter 3 mg ribulose diphosphate (0,3 mg = 1 μ m /ml)

Préparation du mélange réactionnel #2. (pour 600 μ l)

prendre 400 μ l tampon tris-HCl pH 7,9 1 M (150 μ m) (+ 200 μ l eau)

ajouter 25 mg MgSO₄ (4,2 mg = 17 μ m / 100 μ l)

ajouter 14,5 mg L-cystéine (2,4 mg = 20 μ m / 100 μ l)

ajouter 6,6 mg ATP (1,1 mg = 2 μ m / 100 μ l)

ajouter 1,68 mg NADH (0,4 μ m = 0,284 mg / 100 μ l) : solution 10 mg/ml dans
tampon Na-bicarbonate pH 9,0

Méthode : mettre 500 μ l du mélange réactionnel #1 dans un vial à congélation de 1,5 ml,
ajouter un volume de l'extrait enzymatique correspondant à 0,5 mg de protéines et compléter à 1
ml avec de l'eau bidistillée. Incuber le vial à 37 °C 5min puis 3 min à 100°C pour arrêter la
réaction. Laisser refroidir dans la glace. Filtrer la solution. Pour la réaction 2, mettre 500 μ l du
filtrat dans une cuvette à spectrophotomètre, ajouter 50 μ l de mélange réactionnel #2, 11 μ l (210
 μ g) de 3-P-glycérate déshydrogénase. Mélanger et ajouter 5 μ l (2,2 μ g, 3-PGA kinase 0,6 μ l
dans 24,4 μ l tampon phosphate pH 7,0 10 mM) de la 3-P-glycérate kinase pour débiter la
réaction. Suivre la baisse de D.O. à 340 nm

Annexe J. Dosage de l'ATP citrate lyase (EC 4.1.3.8)

Réaction de l'enzyme :



Préparation des réactifs

Tampon Tris 0,5 M pH 8,4 : pour 100 ml, dissoudre 6,06g de Tris et ajuster le pH avec du HCl.

MgCl₂ 0,1 M : utiliser la solution préparée pour le test enzymatique

2-mercaptoéthanol 0,2 M : 13,9 µl /ml.

citrate de potassium 0,2 M :

CoA 0,2 mM : 1,5 mg/ml

Hydroxylamine 2 M pH 8,4 : pour 50 ml, dissoudre 6,949 g dans environ 30 ml d'eau distillée, puis ajuster le pH à 8,4 avec du KOH et compléter le volume à 50 ml.

ATP 0,1 M : 55 mg/ ml

acide trichloroacétique 20% : 20 g / 100 ml

FeCl₃ 2 M : 5,4 g/ 10 ml

Méthodologie :

Mettre 400µl du tampon dans un tube, ajouter 100µl MgCl₂, 50 µl 2-mercaptoéthanol, 133 µl citrate, 50 µl CoA, 100 µl hydroxylamine ainsi que l'enzyme et compléter à 950 µl. Pour débiter la réaction, ajouter 50 µl d'ATP. Incuber a 37 °C 30 min, puis ajouter 1,2 ml d'acide trichloroacétique et 300 µl de FeCl₃. Lire la D.O. à 520 nm.

Annexe K . Séquence de l'ADNr 16S des isolats SD-6 et SD-9

Isolat SD-6

La séquence partielle de l'isolat SD-6 obtenue par le Dr B. Goebel est identique à celle que nous avons obtenue pour l'isolat SD-11. Les deux isolats font donc partie de la même espèce : *Acidobacter disulfidooxidans*.

Séquence partielle de la culture mixte contenant l'isolat SD-9

```
CCAGCNGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTGTT
GTGGGTCTGAGGTGAAAGGTTCGGGGCTCAACCCTGAGAATGCCTTGGAAGTGAAGACTTGAGTGCTGGAGAGG
CAAGGGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGCCTTGCTGG
ACAGTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
GATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGGTACCACCCTCAGTGCCGAACGAAACCCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCCCAGACGGGTGTAGAGATACACCGTCCCTTCGGGGCTGGGGAG
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTCGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGA
TCGGTGTACCAGCGGTAAAGGCGGGGACTCACCGGTGACTGCCGTCGTAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACG
TCAAATCATCATGCCCCCTATGTCTCTGGGCGACACACGTGCTACAATGGGCGGCACAACGGGACGCGAGAGAGNA
ATCTGGAGCCAACCCCTGAAAACCGNTCGTAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTG
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATCCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCTCACACCACGAGA
GTCGACAACACCCGAAGTCGGTGGG
```

Identification de l'isolat SD-9

La séquence de l'ADNr 16S de la culture mixte de l'isolat SD-9 a été alignée et comparée avec celle de l'isolat SD-11 par la fonction BLAST de la NCBI. Le résultat nous permet de conclure que l'isolat SD-9 de la culture mixte fait partie du genre *Acidobacter* et que cet isolat est très proche au niveau phylogénétique de l'isolat SD-6 et SD-11. Les bases qui n'ont pas donné de lecture précise (identifié par un N) lors du séquençage du produit PCR de la culture mixte représentent probablement les sites différents entre l'isolat SD-6 et l'isolat SD-9

```
gb|U34974|SDU34974 Sulfobacillus disulfidooxidans 16S ribosomal RNA
gene, complete sequence
Length = 1496
```

```
Score = 4604 (1272.2 bits), Expect = 0.0, P = 0.0
Identities = 922/925 (99%), Positives = 922/925 (99%), Strand = Plus / Plus
```


Annexe L . Courbes de Fixation du $^{14}\text{CO}_2$, en fonction du temps

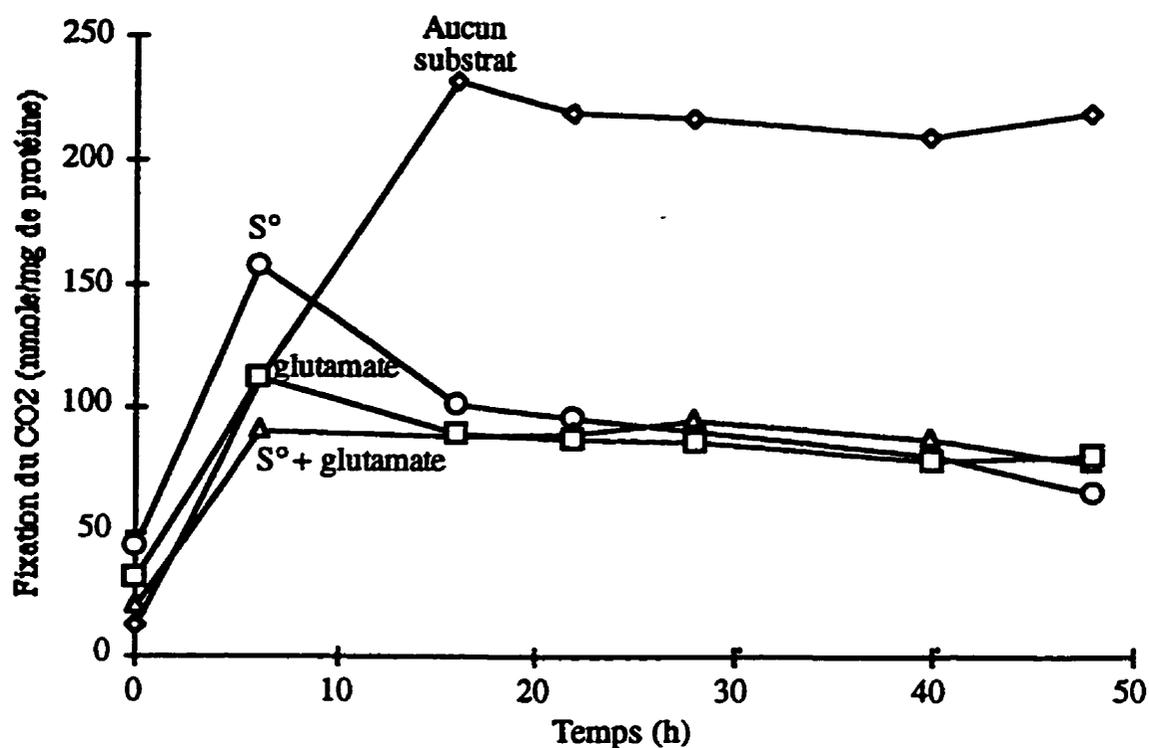


Figure L.1 Taux de fixation du CO_2 par les *Acidobacter* sp. (SD-6 + SD-9) dans le milieu 9K-EL (0,01%) pH 2,25 contenant du soufre et/ou du glutamate

Annexe M .Séquence de l'ADNr 16S de l'isolat SD-8

Séquence complète de l'ADNr 16S de l'isolat SD-8

AGCGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGACCTTTTCGGGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCC
 TTCGGTTTCGGAAATAACCTTGGGAAACTAGGGCTAATACCGGATAACGCCCTTATGGGGAAAGGTTTACTGCGGGAAGATCGGCCCGCGTCT
 GATTAGCTAGTGTGGTGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGTGAAGGCCTTAG
 GGTGTAAAGCTCTTTTATCCGGGACGATAATGAOGGTACCGGAGGAATAAGCCCGGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGGGTAATACGAA
 GGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGCGGTTTTAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCCACAGAA
 TGGCCTTCGATACTGGGACGCTTGTAGTATGGTAGAGGTTGGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATAATTCGCAAGAACACCG
 GTGGCGAAGGCGCCAACTGGACCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCGG
 TAAACGATGAATGCCAGCTGTGGGGTGCCTGCAACCGCAGTAGCGCAGCTAACGCTTTGAGCATTCCGCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGAT
 TAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCATCCTTTGAC
 ATGGCGTGTATCCAGAGAGATTGGGGTCCACTTCGGTGGCGCGCACAGGTCGTCATGGCTGTGCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCATCAATCAGTTGGGCACCTTAGGGAGACTGCOGGTGATAAGCCCGGAG
 GAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGATGGGCTACACACGCTACAAATGGCGGTGACAGTGGGACCGGAAGGAGCG
 ATCTGGAGCAAATCCCCAAAGCGTCTCAGTTTCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCA
 GCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTTGGTCTTACCGGACGGCGCTGCGCCAACCGC
 AAGGAGGCAGCGC

Tableau M.1 Classification des espèces les plus ressemblantes à l'isolat SD-8
 selon le program BLAST de la NCBI (valeur S_ab obtenue lors de
 l'analyse de la RDP)

Espèces bactériennes	# accession	S_ab
<i>Methylobacterium</i> sp. F05.	D32231	0.995
<i>Methylobacterium</i> sp. F15.	D32232	0.980
<i>Methylobacterium</i> sp. F73.	D32237	0.971
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	D32227	0.962
<i>Methylobacterium</i> sp. BF15.	Z23160	0.929
<i>Methylobacterium Mesophilicum</i>	D32225	0.910
<i>Methylobacterium</i> sp. PC30.39.	Z23158	0.895
<i>Methylobacterium</i> sp. F18.	D32233	0.877
<i>Methylobacterium</i> sp. F42.	D32235	0.850
<i>Methylobacterium</i> sp. F37.	D32234	0.841
<i>Methylobacterium organophilum</i> str. XX.	D32226	0.825
<i>Methylobacterium</i> sp. BF10.	Z23156	0.820
<i>Methylobacterium</i> sp. F48.	D32236	0.807
<i>Methylobacterium rhodinum</i>	D32229	0.806
<i>Methylobacterium</i> sp. GK118.	D25306	0.792
<i>Methylobacterium</i> sp. GK101.	D25305	0.791
<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	D32228	0.786
<i>Methylobacterium zatmanii</i>	D32230	0.780
<i>Methylobacterium extorquens</i>	D32224	0.760
<i>Methylobacterium</i> sp. PC30.44.	Z23159	0.756
<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	D32228	0.741

Alignement

LOCUS	Mlb. spF05	1405 bp	rRNA	RNA	22-MAY-1997
Mlb. spF05	1	AGCGAACGCTUGGCGGCAGGCUUAAACAUGCAAGUCGAGOGGACCTUUCGGGGUCAGCGGGC			
SD-8	1	AGCGAACGCTUGGCGGCAGGCUUAAACAUGCAAGUCGAGOGGACCTUUCGGGGUCAGCGGGC			
+++++++1	0	-----			
Mlb. spF05	63	GACGGGUGAGUAACGCGUGGGAACGUGCCUUCGGUUCGGAUAACCCUGGGAAACUAGGGC			
SD-8	63	GACGGGUGAGUAACGCGUGGGAACGUGCCUUCGGUUCGGAUAACCCUGGGAAACUAGGGC			
+++++++1	0	-----			

Annexe N . Séquence de l'ADNr 16S de l'espèce thio-oxydante du consortium SD-20

Séquence de l'ADNr 16S d'un clone de type 1 provenant du consortium SD-20

```
GTGCCAGCCCGCCGGTAATACGGGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTG
CATTAGGTCTGTCGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGGTGGAAACCGGTGTACTAGAGTATGGGAGAG
GGTGGTGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCCGCCACCTGG
CCCAATACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACG
ATGAATACTAGATGTTGGTGCCAAGCGTACTGAGTGTCTAGCTAACCGGATAAGTATTCCGCCTGGGAAGTACG
GCCGCAAGGTTAAAAC TCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAAC
GCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGGAAATCAGAACA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTC
TTAGTTGCCAGCGGTCGGCCGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCCTCATGGCTTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGAAGCCAAGCCGCGAGGT
GGAGCAGACCCAGAAAGCGCGTCTAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGAT
TGTACCAGAAGCCGTTAGCCTAACCTTCGGGAGGGCGATGACCACGGTATGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAA
CAAGGTAACC
```

Recherche BLAST de la NCBI

Database: Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences
320,920 sequences; 490,159,100 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Smallest Sum		
		High Score	Probability P(N)	N
emb Y11596 TT11596	T.thiooxidans 16S rRNA gene, isolate...	4972	0.0	1
emb X98210 TS16SRDNA	Thiobacillus sp. 16S ribosomal DNA	4867	0.0	1
emb Y11595 TF11595	T.ferrooxidans 16S rRNA gene, isolat...	4806	0.0	1
emb Z29975 TC16SRRNA	T.caldus (DSM 8584) gene for 16S rib...	4526	0.0	1
emb X75269 TFB16SRRN	T.ferrooxidans (B-S3) gene for 16S r...	4291	0.0	1
emb X75267 TF16SRNA	T.ferrooxidans (N-Fe4) gene for 16S ...	4225	0.0	1
emb X75268 TFN16SRRN	T.ferrooxidans (N-Fe3) gene for 16S ...	4222	0.0	1
emb X75266 TF16SRRN	T.ferrooxidans (N-Fe2) gene for 16S ...	4109	0.0	1
emb X86769 BS16SRRN1	Bacterial species 16S rRNA gene, clo...	4077	0.0	1
emb X72851 TT16SRNA	T.thiooxidans gene for 16S ribosomal...	2117	0.0	2
gb M79401 TFERRDI	Thiobacillus thiooxidans (DSM 612) 1...	1690	0.0	4

emb|Y11596|TT11596 T.thiooxidans 16S rRNA gene, isolate ATCC 19377
Length = 1472

Score = 4972 (1373.9 bits), Expect = 0.0, P = 0.0

Identities = 996/998 (99%), Positives = 996/998 (99%), Strand = Plus / Plus

```
Query:      1 GTGCCAGCCCGCCGGTAATACGGGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAA 60
            |||
Sbjct:     475 GTGCCAGCAGCCCGCGTAATACGGGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAA 534

Query:     61 GGGTGCCTAGGCGGTGCATTAGGTCTGTCTGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGC 120
            |||
Sbjct:     535 GGGTGCCTAGGCGGTGCATTAGGTCTGTCTGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGC 594
```


**Annexe O . International Journal of Systematic Bacteriology,
Oct. 1996, 46:1056-1064**

Sulfobacillus disulfidooxidans sp. nov., a New Acidophilic, Disulfide-Oxidizing, Gram-Positive, Spore-Forming Bacterium

S. DUFRESNE,¹ J. BOUSQUET,² M. BOISSINOT,¹ AND R. GUAY^{1*}

Département de Microbiologie¹ and Centre de Recherche en Biologie Forestière,²
Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada G1K 7P4

An acidophilic, disulfide-oxidizing, mesophilic, aerobic bacterium was isolated from wastewater sludge. The new organism is a gram-positive sporulated rod. It can use elemental sulfur and pyrite as sole energy sources and grows on organic substrates such as glutamate and glucose. It also grows on the following organic sulfur substrates: oxidized and reduced glutathione, cysteine, cystine, and dithio(bis)benzothiazole and clearly shows a preference for disulfide bond-containing substrates. The optimal pH of growth is between 1.5 and 2.5, depending on the substrate used, and the growth temperature range varies from 4 to 40°C, with an optimal value at 35°C. The G+C chromosomal DNA content was measured at 53 ± 1 mol%. Phylogenetic analysis of 16S genes coding for rRNA sequences places the new isolate in the genus *Sulfobacillus*. In addition, unique phenotypic and physiologic characteristics and DNA homology values assign the isolate to a new species in the genus. Therefore, this new isolate has been named *Sulfobacillus disulfidooxidans* and has been assigned ATCC number 51911.

Many facultatively heterotrophic bacteria are known for their ability to grow under highly acidic conditions. Some of these within the genera *Sulfolobus* (5) and *Acidianus* (31) are extremely thermophilic archaeobacteria. They obtain their energy by the oxidation or reduction of elemental sulfur or from organic substrates. Others are mesophilic gram-negative bacteria belonging to the genus *Acidiphilium* (2, 18) and are able to use organic substrates at pH 3.0 or belong to the genus *Thiobacillus*, such as *Thiobacillus acidophilus* (17), which is also known for its ability to grow with elemental sulfur or glucose at pH 2.5.

However, the only acidophilic, facultatively autotrophic, gram-positive, spore-forming bacillus so far characterized is *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (16), together with two subspecies ("thermotolerans" and "asporogenes") that do not produce spores (19). Golovacheva and Karavaiko (16) first described the genus *Sulfobacillus* in 1978 as gram-positive, spore-forming bacteria growing on elemental sulfur, ferrous iron, and other metal sulfides. The rod-shaped cells were described as fairly pleomorphic. The spores were spherical or slightly oval, terminal, subterminal, or paracentral. *S. thermosulfidooxidans* is a typical acidophilic, thermotolerant, and facultatively autotrophic bacterium. Since then, four isolates which are gram-variable, thermotolerant acidophiles have been recovered from mines: ALV (27), BC (27), C-MT1 (15), and TH3 (4), and have been described as belonging presumably to this genus. Some other gram-positive bacteria from the genus *Alicyclobacillus* (7-9) can also grow under acidic conditions, but they are heterotrophic bacteria.

This work reports on the isolation and characterization of a new facultatively autotrophic, mesophilic, acidophilic, gram-positive, spore-forming bacterium (SD-11) that could belong to the genus *Sulfobacillus*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The acidophilic strain SD-11 was isolated from a mixed culture obtained after enrichment of wastewater sludge of Blake Lake City, Québec, Canada, with elemental sulfur and further plating on thiosulfate agar adjusted to pH 4.0 (11). *Escherichia coli* K-12 ATCC 10798 was

used for reference purposes with regard to molecular DNA analysis. Modified 9K medium (9K-EL) (32) was used as the basalt growth medium for strain SD-11, and the ferrous sulfate used as the energy source in 9K medium was replaced by organic and inorganic substrates at a final concentration of 2.5 g liter. Yeast extract was added (0.1 g liter) as a growth factor. The pH of the liquid medium was adjusted to 2.25 with 2 N H₂SO₄. Four different substrates were tested: sodium glutamate, oxidized and reduced glutathione (Aldrich Chemical Co.) sterilized by filtration, and tyndallized elemental sulfur. They were added to autoclaved 250-ml flasks containing 100 ml of basalt salt medium 9K-EL. The isolate was cultured at 30°C for 7 days in a gyratory incubator shaker at 200 rpm. *E. coli* was cultured in Trypticase soy broth (BBL) overnight at 37°C. All chemical reagents used in this study were analytical grade.

Phenotypic characterization. The pH and temperature range for growth were determined for three different substrates (sulfur, sodium glutamate, and oxidized glutathione). The growth was monitored by measurement of the protein content determined according to the method of Lowry et al. (23) as modified by Fieg (12) for culturing on sulfur. Growth was also estimated in 9K-EL with oxidized glutathione as the substrate in an anaerobic chamber at 30°C after 10 and 20 days of incubation. No electron acceptor besides oxidized glutathione, sulfates, or traces of nitrate was added during anaerobic incubation.

The commercially available API 50 CH system (BioMérieux), described by Deinhard et al. (8) for the biochemical profile characterization of *Alicyclobacillus acidoterrestris*, was used with minor modifications to evaluate carbohydrate utilization by strain SD-11. The 9K-EL at pH 2.25, to which bromophenol blue was added as a pH indicator, replaced the *Bacillus acidocaldarius* medium. The inoculated medium was incubated at 30°C, and growth was monitored by examining turbidity and/or acidification every 3 days for 15 days.

Cellular morphology was recorded with a Nikon Optiphot phase-contrast microscope. Polyphosphate granules were stained with Loeffler's methylene blue solution (28). Fine morphological features were revealed by transmission and scanning electron microscopy. A washed cell suspension of strain SD-11 was fixed in a 5.0% glutaraldehyde solution in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2), followed by post-fixation in a 3% OsO₄ solution. Dehydration was carried out in a graded ethanol series. Cells were embedded in LR white resin, and cell sections were obtained with a Reichert OM V2 ultramicrotome. They were stained with lead hydroxide (5%) and uranyl acetate (5%) solutions and examined on a Philips EM 300 transmission electron microscope at 80 kV. Negative staining was carried out as follows: 5 µl of a culture suspension was allowed to air dry on a formvar-coated copper grid (size 200 HH). 5 µl of sodium phosphotungstate solution (2% [pH 7.2]) was added, and the grid was dried on filter paper. The specimens were examined by transmission electron microscopy at 60 kV. Scanning electron microscopy was performed on a deposit obtained from a sample of culture (100 µl) passed through a 13-mm polycarbonate (0.1 µm pore size) Nucleopore filter. The filters were treated according to the procedure of Blais et al. (3), and the fixed specimen was examined with a JEOL JMS-T330A electron scanning microscope.

DNA base composition. Genomic DNA was extracted and purified according to the method of Marmur (25), and G+C content was determined from the thermal melting profile (midpoint temperature) (26).

16S rDNA phylogenetic analyses. *E. coli* and SD-11 cells were harvested and washed and nucleic acids were extracted by a previously published procedure (1).

* Corresponding author.

TABLE 1. Positions of the primers used for PCR amplification of 16S rDNA

Primer	Position ^a	Sequence	Reference
SSU 27	8-27	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	10
SSU 785'	785-805	5'-GGACTACCAGGGTATCTAATC-3'	This study
SSU 536	515-536	5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAATAC-3'	This study
SSU 1175'	1175-1195	5'-GACGTCATCCCCTCCTTCTC-3'	This study
SSU 926	908-926	5'-AAACTYAAAKGAATTGACGG-3'	This study
SSU 1492'	1492-1508	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	10

^a Relative to *E. coli* 16S rDNA sequence.

Genes coding for 16S rRNA (rDNA) fragments corresponding to the positions 8 to 1510 of *E. coli* 16S rDNA (6) were amplified by PCR. The later sequence was amplified in overlapping fragments with the three sets of primers described in Table 1. DNA amplification was conducted in a Perkin-Elmer Cetus GenAmp PCR System 9600 under the following conditions: a preheating cycle at 98°C for 1 min, followed by 30 amplification cycles with profiles for DNA denaturation, primer annealing, and primer extension steps of 98, 62, and 72°C for 10, 5, and 15 s, respectively; for the SSU 27-SSU 785' primer pair and 98, 55, and 72°C for 10, 5, and 15 s for the other two primer pairs. After 30 cycles, the reactions were stopped, and PCR products were purified by QIA quick-spin column chromatography (QIAGEN, Chatworth, Calif.). Both strands were sequenced with an ABI 372 automated sequencer with *Taq* dyedexy cycle sequencing (PE-ABI, Foster City, Calif.).

The 16S rDNA sequence of strain SD-11 was first aligned with one of its most similar sequences, the 16S rDNA of *S. thermosulfidooxidans* by the ALIGNMENT procedure of the Ribosomal Database Project (24). The SD-11 sequence was aligned manually on the already available alignment of 16S rDNA sequences from 15 species, including *S. thermosulfidooxidans*, obtained from the Ribosomal Database Project (SUBALIGN procedure). Ambiguous regions (positions 1 to 225, 452 to 481, 998 to 1044, and 1510 to 1546) were removed, and the resulting alignment of 1,208 nucleotides was submitted to phylogenetic analyses. Standard parsimony analysis was conducted with the heuristic algorithm of PAUP, version 3.1.1 (34), in which minimal gaps were considered as missing values. Sequences were submitted in 100 different random orders. Pairwise sequence identities were also estimated and transformed in rates of substitution by the two-parameter method of Kimura (20), which takes into account transitions and transversions. The resulting matrix of substitution rates was submitted to neighbor-joining analysis (30) with MEGA, version 1.0 (21). Confidence levels for the tree topologies obtained were estimated by a bootstrap procedure (14) with 100 replicates for both parsimony (PAUP) and neighbor-joining analysis (MEGA). In all cases, the gram-negative *E. coli*, *T. acidophilus*, and *T. thiooxidans* were used as outgroups for rooting the gram-positive tree.

Nucleotide sequence accession number. The 16S rDNA sequence of strain SD-11 obtained in this study has been deposited in the GenBank nucleotide sequence database under accession number U34974. The accession numbers used as reference sequences are as follows: *Alicyclobacillus acidoculdarum*, X60742; *Alicyclobacillus acidoterrestris*, X60743; *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, X51928; *Bacillus subtilis*, K00637, M10606, and X00007; *Clostridium innocuum*, M23732; *E. coli*, J01695; *Mycobacterium bovis*, M20940; *Sporolactobacillus inulinus*, M58838; *Streptomyces lividans*, Y00484; strain ALV, M79375, M79376, and M80290; strain BC, M79380 to M79382; strain TH3, M79433 and M79434; *Thiobacillus thiooxidans*, X75269; and *Thiobacillus acidophilus*, M79399 and M79400.

RESULTS

Isolation and growth. The new species was isolated from a mixed culture obtained after enrichment from a Blake Lake City sludge sample with elemental sulfur and further plating on thiosulfate agar adjusted to pH 4.0 (11). A pure culture of SD-11 was obtained through micromanipulation of tiny colonies of the isolated mixed culture and further grown in enrichment broth 9K-EL supplemented with oxidized glutathione at pH 2.25. Since strain SD-11 showed active sporulation after prolonged growth on the latter liquid medium, the mixed population was subjected to heat treatment. Mixed suspensions of cells were therefore boiled for 30 min, after which spore preparations were left to cool at room temperature. Successful germination could only be reached after storage at 2 to 4°C for 18 to 24 h. Culture purity was verified by plating of a 10- μ l inoculum on a thiosulfate agar surface and on other solidified media. It should be noted that under the indicated conditions,

strain SD-11 could not be grown in pure culture on solidified media. The growth on solid medium was obtained only when a thiosulfate-oxidizing, acidophilic bacterium was cocultivated with strain SD-11. Absence of growth when a pure culture inoculum was used indicated the absence of contaminating bacteria. Pure culture flocculated when grown in liquid media.

Morphology and ultrastructure. Isolate SD-11 is a pleomorphic, rod-shaped, spore-forming, nonmotile bacterium; it has been impossible to obtain a satisfactory Gram staining of a fixed or unfixed bacterial cell suspension, even if the preparation originated from a young and active culture. Under electron microscopy, it exhibits the typical smooth texture of the membrane of gram-positive bacteria (Fig. 1A and B). The cells occur singly and often in pairs when grown on sulfur, or they tend to form filaments when grown on oxidized glutathione (Fig. 1A and B). Cellular divisions seem to be atypical, as shown on Fig. 1A; asymmetric divisions and mini-cell-like structures were regularly observed under various growth conditions. Polyphosphate granules and spores were also observed at opposite ends of the cells; polyphosphate granules seem to disappear slowly when the sporulation process is initiated (Fig. 1B and C).

Physiological and biochemical characteristics. Isolate SD-11 appears to be an aerobic microorganism; even if strain SD-11 grows poorly under anaerobic conditions, only one fifth of the cellular yield obtained in aerobiosis was achieved in the absence of oxygen with oxidized glutathione as the energy source. Strain SD-11 is a mixotroph and uses a wide variety of organic and inorganic substrates as described in Table 2. Growth yields were measured with inorganic substrates, such as elemental sulfur and pyrite, and with organic substrates such as glucose, glutamic acid, and oxidized glutathione. Among organic sulfur compounds, those containing disulfide bonds were preferred over the thiol groups (—SH). On the basis of total protein content, generation time varied from 6 to 49 h. Culture of the bacteria on yeast extract as sole substrate was not possible. However, when yeast extract was added to the culture media at a final concentration of 0.1 g/liter, it enhanced growth by providing essential growth factors. Table 3 presents results on growth and utilization of various carbohydrates by isolate SD-11 in the API 50 CH galleries: only a few substrates, including amygdalin, glucose, maltose, and melezitose, could support fast growth. However, glucose was the sole substrate on which the organism was able to achieve a noticeable growth. No decrease in pH was observed for any of the 49 other substrates.

Temperature and pH conditions allowing growth were tested in 9K-EL supplemented with elemental sulfur, sodium glutamate, or oxidized glutathione. Growth was possible from 4 to 40°C, with an optimum at 35°C; no growth was detected above 40°C. Isolate SD-11 grew between pH 0.5 and 6.0, and the optimum value varied between 1.5 and 2.5, depending on

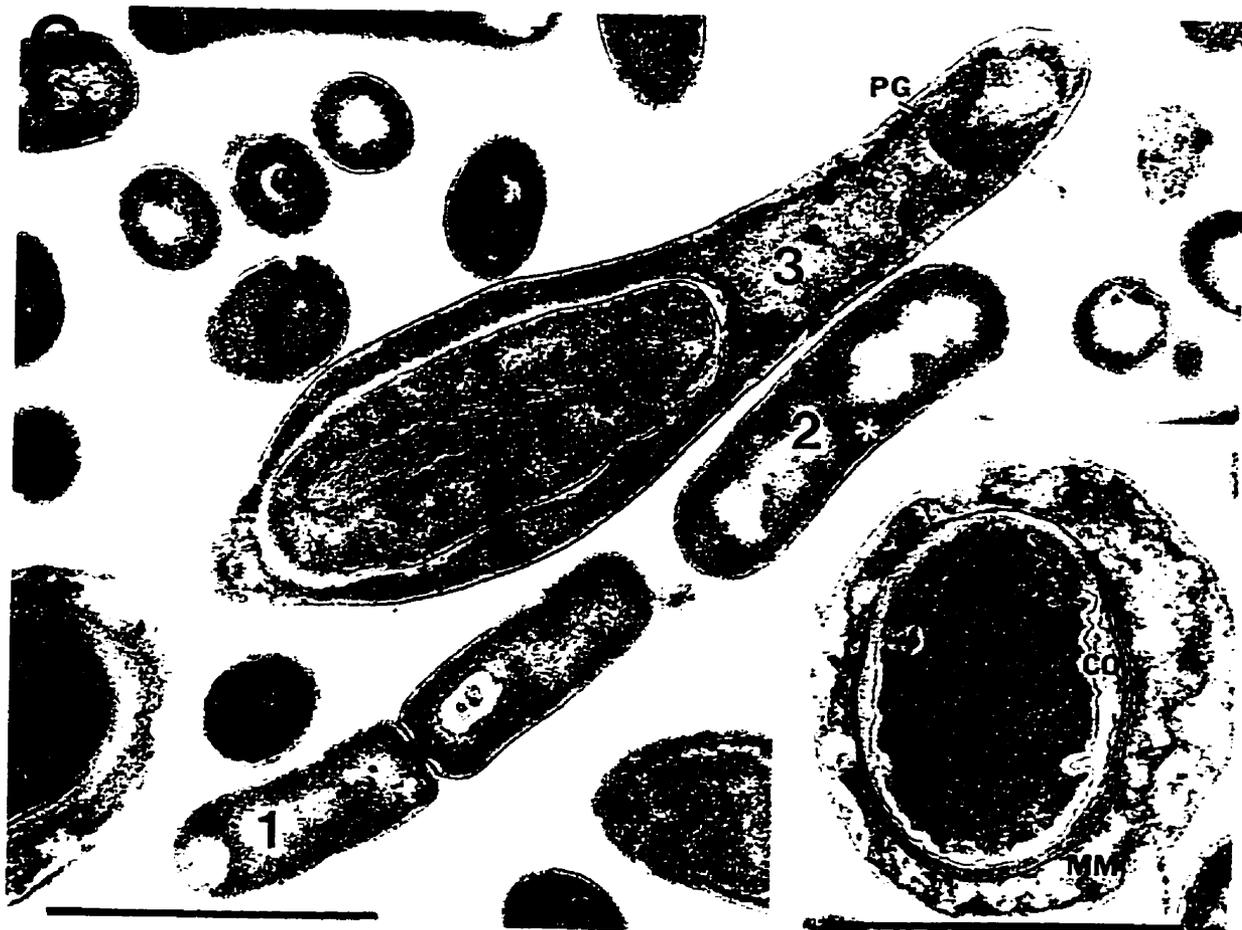
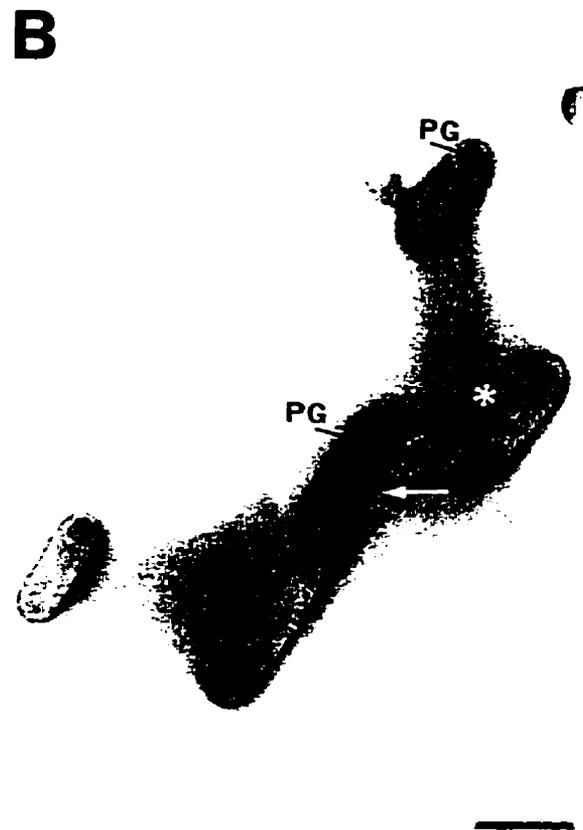
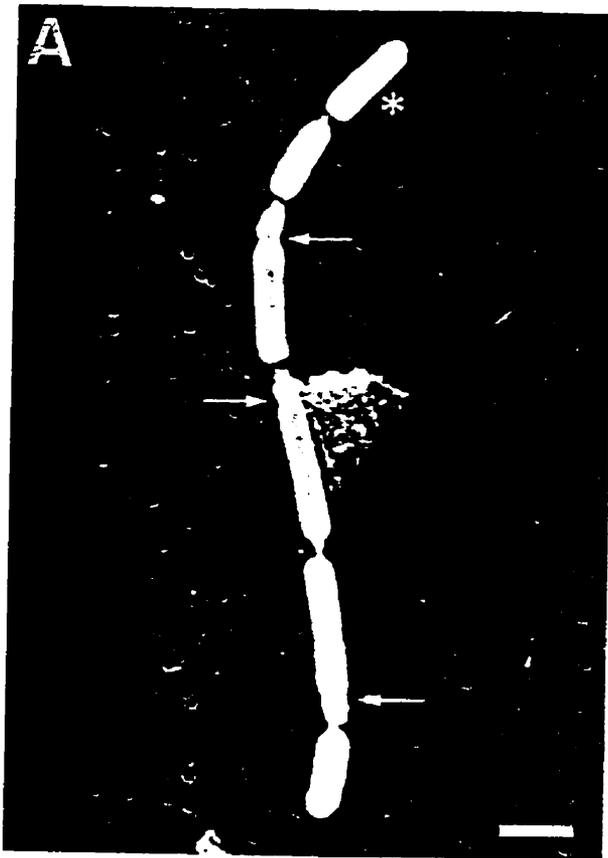


FIG. 1. Electron micrographs of SD-11 isolates. (A) Scanning electron micrograph showing a short chain of abnormally dividing (arrows) and normal-length (*) cells. (B) Transmission electron micrograph of negatively stained preparation showing the polyphosphate granules (PG) both in abnormally dividing (white arrow) and normal-length (*) SD-11 cells. (C) Transmission electron micrographs of ultrathin longitudinal and transverse sections of SD-11 cells at different stages of growth: 1. dividing vegetative cells; 2. mature vegetative cell (normal length [*]); 3. sporulating cell with polyphosphate granule and highly deforming prespore at opposite end. (Insert) Transverse section of sporulating SD-11 cell showing prespore multilamellar membrane (MM) and cortex (CO). Bar. 1 μ m.

the substrate used. The initial pH of the culture media did not change during growth.

DNA analyses and phylogenetic relationships. The genomic DNA G+C content of strain SD-11 was 53 ± 1 mol%, and the G+C nucleotide ratio of the 16S rDNA was 59.3 mol%. From 16S rDNA nucleotide sequence data, isolate SD-11 shares 95.5% homology with *A. cycloheptanicus* and 95.2% homology with *S. thermosulfidooxidans* (Table 4). The transition/transversion ratios were 1.3 for strain SD-11 versus *S. thermosulfidooxidans* and 1.1 for strain SD-11 versus *A. cycloheptanicus*.

The tree topologies estimated from both standard parsimony and neighbor-joining analyses of two-parameter substitution rates showed close relatedness between the genera *Sulfobacillus* and *Alicyclobacillus*. This group was supported by a high bootstrap value, which indicates the degree of statistical confidence (Fig. 2). In both analyses, the genus *Alicyclobacillus* did not appear monophyletic, because its taxa were intermingled with the genus *Sulfobacillus*. This arrangement was supported by high bootstrap values. The only topological difference between parsimony and neighbor-joining trees was the placement of the *Bacillus-Sporolactobacillus-Clostridium* group, which shows low percentage G+C content together with the *Sulfobacillus-Alicyclobacillus* group. Parsimony placed both groups together, and this was supported by a bootstrap value of 85% (Fig. 2A); this topology is in accordance with previous studies (22). Neighbor-joining analysis placed the *Sulfobacillus-Alicyclobacillus* group next to the intermediate-percentage-G+C-content group formed by the strains BC and ALV (Fig. 2B). However, this alternative arrangement was supported by a lower bootstrap value (58%). To further investigate this lack of congruence, the phylogeny was estimated with Gary Olsen's fastDNAm1 program (Ribosomal Database Project) (24), which is based on the maximum-likelihood approach (13). The 16S rDNA sequence of the strain C-MT1 (GenBank entry X75270), isolated by Goebel and Stackebrandt (15) and presumably identified as a member of the genus *Sulfobacillus* on preliminary physiological analysis, was also included. The max-

imum-likelihood tree obtained was very similar to the parsimony tree, and the strain C-MT1 clustered with the strains BC and ALV. The newly isolated strain SD-11 was found with the low-percentage-G+C strains of the genera, which were re-grouped by the analysis.

DISCUSSION

This study has provided phenotypic and genotypic information about the newly isolated strain SD-11. This strain, isolated from a wastewater sludge treatment plant, is a gram-positive, mesophilic, acidophilic, and aerobic bacterium. However, the organism may grow as a facultative anaerobe, since oxidized glutathione seems to be used as a substrate under anaerobiosis. Under the anaerobic growth conditions used during the experiments, we favor the anaerobic respiration hypothesis, although no significant data support it except for the very low cellular yield during incubation. We estimated that only 20% of the anaerobiosis cellular yield was reached after 20 days of culturing under anaerobiosis. Its morphological features and mixotrophic metabolism suggest that strain SD-11 most likely belongs to the genus *Sulfobacillus*. The morphological characteristics of isolate SD-11 are similar to those described for *S. thermosulfidooxidans* (Table 5). Both are gram-positive, non-motile, rod-shaped bacteria which form chains or straight or interwoven filaments (*S. thermosulfidooxidans* subsp. "*asporogenes*"). SD-11 exhibits subterminal, deforming spores. The analysis of the fatty acid composition in bacteria belonging to the genera *Alicyclobacillus* and *Sulfobacillus* revealed the pres-

TABLE 2. Generation time of strain SD-11 grown on different substrates in 9K-EL liquid medium at pH 2.25 at 30°C

Substrate	Mean generation time (h)	Growth (%) ^a
Inorganic		
Elemental sulfur	13 (6 h at 35°C)	66
Pyrite	16	56
Ferrous sulfate	25	30
Organic		
Glutamate	12	68
Glycine	26	12
Glucose	16	88
Oxidized glutathione (—S—S)	12 (7 h at 35°C)	100
Reduced glutathione (—SH)	28	72
Thiourea (—S—S—, =S)	24	61
Cystamine (—S—S—)	28	54
Cystine (—S—S—)	42	53
Cysteine (—SH)	49	17

^a Recorded as percentage of growth relative to oxidized glutathione at pH 2.25 and 30°C.

TABLE 3. Relative growth of strain SD-11 on the different substrates of the API 50 CH system

Substrate on which relative growth is ^a :			
—	+	++	+++
Control	Adonitol	Starch	Amygdalin
Arbutin	D- and L-Arabinose	L-Arabitol	Glucose
Dulcitol	D-Arabitol	N-Acetyl-glucos-amine	Maltose
Erythritol	Cellobiose	Glycogen	Melezitose
Fructose	Esculin	Inulin	
L-Fucose	D-Fucose	Sucrose	
Galactose	Gentiobiose		
Inositol	Glycerol		
Lactose	Gluconate		
D-Lyxose	2-Keto-gluconate		
Mannitol	5-Keto-gluconate		
Mannose	α -Methyl-D-glucoside		
Rhamnose	Melibiose		
Salicin	α -Methyl-D-mannoside		
Trehalose	Ribose		
D-Turanose	Raffinose		
Xylitol	Sorbitol		
β -Methyl-D-xyloside	Sorbose		
	D-Tagatose		
	D and L-Xylose		

^a Growth was evaluated visually under phase-contrast microscopy in the absence of turbidity. —, presence of sporulated cells only or no growth; +, few isolated cells; ++, short chains of long cells; +++, chains of short cells (fast dividing cells).

TABLE 4. 16S rDNA sequence identities between isolate SD-11 and various gram-positive bacteria and proteobacteria^a

Species or strain	% Sequence identity with:														
	<i>S. thermosulfidooxidans</i>	<i>A. cycloheptanicus</i>	<i>A. acidocaldarius</i>	<i>A. aciditerrstris</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. inditius</i>	<i>C. immetrium</i>	Strain BC	Strain ALV	Strain TH3	<i>M. bovis</i>	<i>S. lividans</i>	<i>T. thiooxidans</i>	<i>T. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>
SD-11	95.2	95.5	93.7	93.6	87.7	87.1	83.3	84.3	83.3	82.2	81.9	83.3	81.2	79.7	79.9
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>		94.9	94.2	94.1	87.4	86.4	83.3	84.9	82.9	82.3	82.1	83.4	82.6	80.5	80.4
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>			95.0	94.9	88.3	87.3	83.7	84.8	84.5	83.1	83.3	84.2	82.3	80.2	81.0
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>				99.6	88.3	87.5	84.3	85.0	83.6	83.0	82.9	83.8	82.6	80.0	80.5
<i>Alicyclobacillus acidocentrus</i>					88.2	87.3	84.0	85.1	83.6	82.9	83.0	83.8	82.4	79.9	80.1
<i>Bacillus subtilis</i>						93.1	86.4	83.7	82.4	84.2	83.0	84.3	82.3	80.9	81.7
<i>Sporodactobacillus inulnitis</i>							80.0	80.0	79.8	82.7	81.1	82.6	81.1	80.8	81.8
<i>Clostridium immetrium</i>							84.5	80.8	80.7	79.7	80.7	82.1	80.7	79.6	79.9
Strain BC									94.5	81.4	83.2	83.3	82.3	80.0	79.6
Strain ALV										81.4	81.4	82.0	79.6	79.8	78.5
Strain TH3											87.3	88.6	82.6	82.0	80.2
<i>Mycobacterium bovis</i>												91.7	80.9	80.1	81.9
<i>Streptomyces lividans</i>													80.8	80.2	85.1
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>															82.2
<i>Thiobacillus acidophilus</i>															
<i>Escherichia coli</i>															

^a Based on an alignment of 1,208 nucleotides.

ence of ω-cyclohexane acids (or ω-cycloheptane in *A. cycloheptanicus*) (8, 9, 36), which are rarely seen in other bacteria. The fatty acid composition for strain SD-11 closely resembles that of *S. thermosulfidooxidans*. The presence of ω-cyclohexane C₁₇ and C₁₆ was revealed in this new organism (29). The G+C contents were found to be 53 ± 1 mol% and 54 ± 1 mol%, respectively, for SD-11 and *S. thermosulfidooxidans*, and were identical at 59 ± 1 mol% for their 16S rDNA sequences (35).

However many physiological differences were noted between isolate SD-11 and *Sulfobacillus* sp. and *Alicyclobacillus* sp. The species of the genera *Sulfobacillus* and *Alicyclobacillus* grow better at temperatures above 45°C, whereas isolate SD-11 is more typical of a mesophilic species (35°C). The new isolate does not grow on solid media, even with the use of phytagel, agarose, silicate gel, or starch as solidifying agents. It grows autotrophically on elemental sulfur and on pyrite with the production of sulfur oxyanions, including sulfate, in contrast with *S. thermosulfidooxidans*, which oxidizes sulfur to sulfuric acid. It can also grow heterotrophically on carbohydrates like glucose, without any production of acidic end products, and also on amino acids like glutamate. The new organism shows a net preference for organic sulfur substrates (Table 6). The API 50 CH system was also used to compare the utilization of carbohydrates by isolate SD-11 and by strains from the genus *Alicyclobacillus*, the major difference again being the lack of acidification observed after growth of isolate SD-11 (8, 9). As a consequence of the differences in phenotypic and physiological characteristics, the isolate SD-11 may be classified as a new species of the genus *Sulfobacillus*.

The analysis of the 16S rDNA sequences showed that strain SD-11 is phylogenetically closely related to the genera *Sulfobacillus* and *Alicyclobacillus*. Even if the genera *Sulfobacillus* and *Alicyclobacillus* possess a number of distinctive phenotypic features that could justify their separation into two genera (Table 7), phylogenetic analyses confirm their close proximity (35). Since *A. cycloheptanicus* is found to be more related to *Sulfobacillus* strains than to other *Alicyclobacillus* strains, and because both groups share growth factor requirements (Table 7), a revision of the taxonomic nomenclature of the group at the genus level may be necessary, but this will require the description of additional species.

Signature sequences (513-A, 1207-C, 168-G, 906-G, 955-G, and 1167-A according to the *E. coli* numbering convention) support the assignment of strain SD-11 as a gram-positive organism of the low-percentage-G+C subdivision (22). The 14 conserved nucleotide positions reported by Tourova et al. (35), which link the genera *Alicyclobacillus* and *Sulfobacillus* and differentiate them from the other low-percentage-G+C gram-positive groups were also found in isolate SD-11 (154-G, 452-G, 480-A, 672-G, 734-C, 748-G, 862-G, 867-C, 1122-G, 1123-T, 1150-A, 1151-C, 1297-G, and 1298-T). However, the clade formed by strains ALV, BC, and C-MT1 was shown by parsimony and maximum-likelihood methods to be quite remote from the genera *Sulfobacillus* and *Alicyclobacillus* (22, 35), even if the isolate BC has been described as a gram-negative rod-shaped bacterium (15, 27).

For every type of phylogenetic analysis (neighbor joining, parsimony, and maximum likelihood), the closest strain to the isolate SD-11 was *S. thermosulfidooxidans*, and this is supported by the high bootstrap values (Fig. 2). Two signature sequences, 5'-ATGCTACGGCATCGC-3' and 5'-AACCCTGAAAACCGC-3' at positions 200 to 222 and 1279 to 1296, were found only in both *S. thermosulfidooxidans* and strain SD-11. This further reinforces the very high phylogenetic affinity observed between the Golovacheva's *Sulfobacillus* isolate

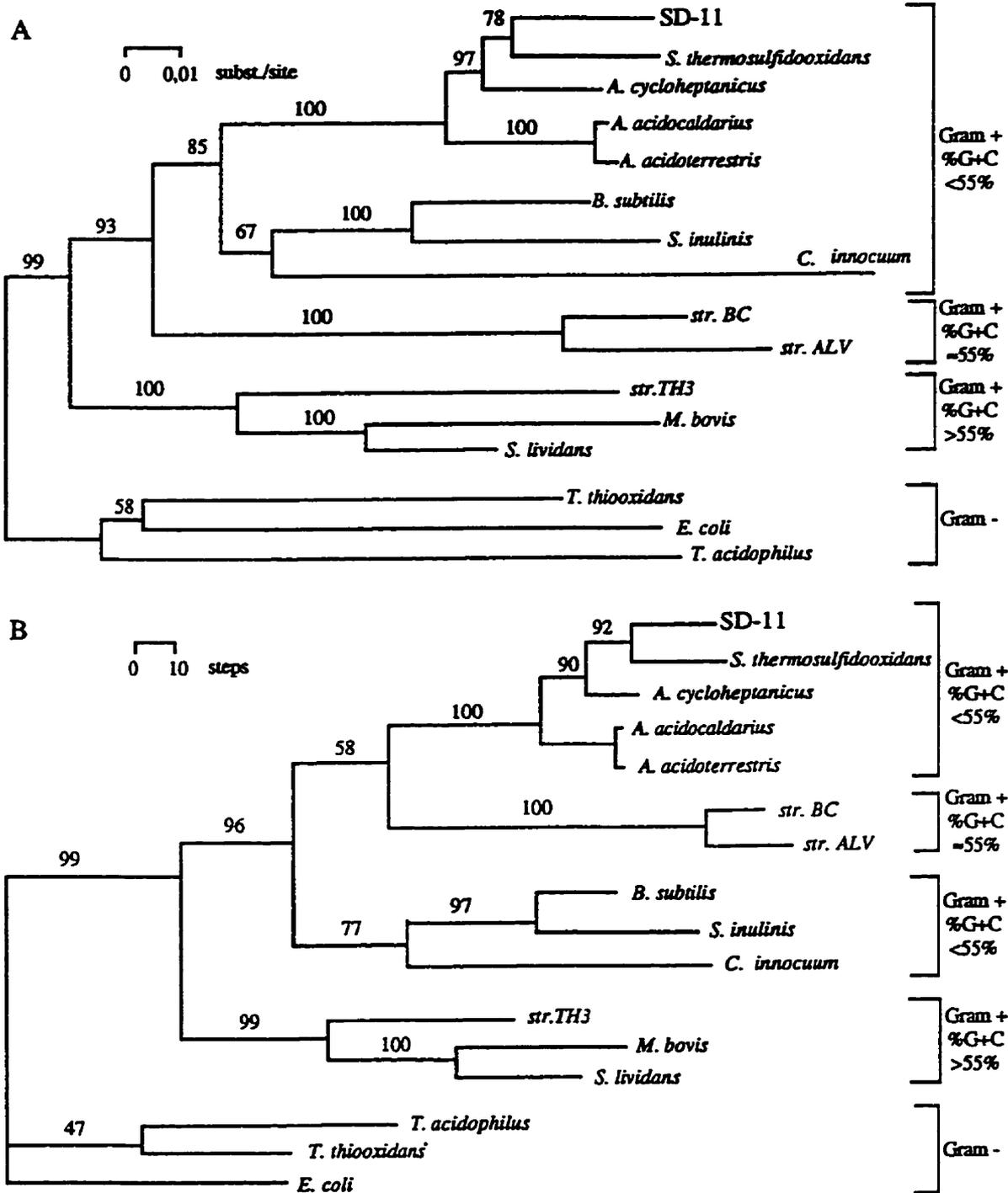


FIG. 2. Phylogenetic relationships among gram-positive bacteria and position of strain SD-11 based on analysis of 16S rDNA gene sequences. Gram-negative strains were used as outgroup to root the gram-positive tree. (A) Tree obtained from neighbor-joining analysis of two-parameter substitution (subst.) rates. (B) Tree obtained from standard parsimony analysis. Numbers on branches indicate bootstrap estimates from 100 replicates. For full names of strains, refer to Table 4. str., strain.

and the bacterium SD-11 isolated from a completely different environment.

Given that the highest 16S rDNA sequence homology of strain SD-11 compared with the other bacteria is less than 97.0% (Table 4), total DNA will not reassociate to more than 60% with any other piece of DNA from different bacterial strains, no matter which hybridization method is used (33).

Indeed, the highest 16S rDNA sequence homology values observed with *A. cycloheptanicus* and *S. thermosulfidooxidans* were less than 96%. Therefore, the isolate SD-11 should be considered formally as a distinct species both from the 16S rDNA composition and homology perspective, even if formal DNA-DNA reassociation studies were not conducted.

On the basis of all phenotypic, genotypic, and phylogenetic

TABLE 5. Morphological and chemotaxonomical characteristics of the genera *Sufobacillus* and *Allycycobacillus*

Characteristics	Origin	% G+C	Cell morphology (gram positive)	Wall lipids	Menquinones	Spore: Presence or absence	Morphology	Motility
<i>S. thermosulfidovorans</i> VKM B-1269 ^a	Spontaneous thermogenesis zones of the leached dump of the Nikolayev cop-per-zinc-pyrite deposit, Eastern Kazakhstan	54 ± 1	Straight rods, 0.6-0.8 by 1-3 µm; single, paired, in short chains; palisade, Y-shaped cells and other forms	ω-Cyclohexane fatty acids	ND	+	Spherical, 0.7 by 0.7-0.8 µm; subterminal or terminal dilated sporangia	-
<i>S. thermosulfidovorans</i> subsp. <i>thermolerans</i> ^b	Dumps of oxidizing lead-zinc ores, Uzbeck SSR	49 ± 1	Straight rods, 0.9-1.0 by 2-4 µm; single, paired, short chain, filamentous cells which are interwoven	ND ^c	ND	+	Oval, terminal slightly dilated sporangia	-
<i>S. thermosulfidovorans</i> subsp. <i>asporogenes</i> ^c	Drainage waters of the polymetal sulfide deposit of Armanis, Armenian SSR	46 ± 1	Straight rods, 0.5-0.9 by 2-4 µm; single, paired, short chain, filamentous cells which are interwoven	ND	ND	-	-	-
<i>A. cyclohexanicus</i> DMS 4006	Soil from car service station, Lashem, Saarland, Germany	55 ± 1	Rods, 0.3-0.6 by 2.5-4.5 µm; single, pair or short chain	ω-Cycloheptane fatty acids	MK-6, MK-7, MK-9	+	Oval, 0.75 by 1.0 µm; subterminal slightly bulging sporangia	-
<i>A. actinokadans</i> ^d	Thermal acid water and soil	61 ± 1	Rods, 0.7-0.8 by 2-3 µm; single, pair or short chain	ω-Cyclohexane fatty acids	MK-7, MK-8	+	Ellipsoidal, subterminal or terminal, not swollen sporangia	ND
<i>A. actinokadans</i> ^e	Forest and garden soils	52 ± 1	Rods, 0.6-0.8 by 2.9-4.3 µm; single, pair or short chain	ω-Cyclohexane fatty acids	MK-6, MK-7	+	Oval, 0.9-1.0 by 1.5-1.8 µm; subterminal or terminal slightly bulging sporangia	ND

Result for:

^a Golovcheva and Karaviko (16).^b Karaviko et al. (19).^c Deinhard et al. (9).^d Group of *A. actinokadans* isolates; Darland and Brock (7).^e Group of *A. actinokadans* isolates; Deinhard et al. (8).

/ ND, not determined.

TABLE 6. Physiological characteristics of the genera *Sulfobacillus* and *Alicyclobacillus*

Characteristic	Result for:						
	SD-11	<i>S. thermosulfidooxidans</i> VKM B-1269	<i>S. thermosulfidooxidans</i> subsp. <i>thermotolerans</i>	<i>S. thermosulfidooxidans</i> subsp. <i>asporogenes</i>	<i>A. cycloheptanicus</i> DMS 4886	<i>A. acidocaldarius</i>	<i>A. acidoterrestris</i>
Anaerobic growth	+	-	-	-	-	-	-
pH							
Optimum	1.5-2.5	1.9-2.4	2.5-2.7	1.6-2.5	3.5-5.5		
Growth range	0.5-6.0	1.5-5.5	1.2-4.2	1.5-4.5	3.0-5.5	2.0-6.0	2.2-5.8
Temp							
Optimum (°C)	35	50	37-42	50	48		42-53
Growth range (°C)	4-40 ^a	20-60	20-50	20-60	40-53	45-70	35-55
Growth factor	Yeast extract	Yeast extract	Yeast extract	Yeast extract	Ile Met or B ₁₂ pantothenate	-	-
Growth in ^b :							
S ⁰	+	+	+	+	ND ^c	ND	ND
Fe ²⁺	(+)	+	+	+	ND	ND	ND
S ₂ O ₃ ²⁻	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
Fe ₂ S	+	+	+	+	ND	ND	ND
Yeast extract	-	+	+	+	+	+	+
Acetate	-	+	ND	ND	-	ND	ND
Casamino Acids	ND	+	ND	+	+	ND	ND
Cystamine	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cysteine	+	+	ND	+	ND	ND	ND
Cystine	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dithio(bis)benzo- thiazole	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Galactose	-	-	ND	ND	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+ acid ^d	+ acid ^d	+ acid ^d
Glutamate	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
Glutathione	+	ND	ND	-	ND	ND	ND
Glycerol	+	ND	ND	ND	+	+	+
Meat peptone	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
Growth on:							
FeTSB	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
<i>B. acidocaldarius</i> medium agar	ND	ND	ND	ND	+	+	+

^a Spore germination at 4°C.^b *Sulfobacillus* sp. strain SD-11 was grown in liquid medium at pH 2.25. *Alicyclobacillus* sp. was grown in liquid medium at pH 4.0.^c ND, not determined.^d Acid formation when growth occurs with the substrate.

evidence, the present isolate is formally proposed as a new species within the genus *Sulfobacillus*.

Description of *S. disulfidooxidans* sp. nov. *S. disulfidooxidans* (di.sul.fi.do.ox'i.dans. L. adj. *duplus*, double; L. n. *sulfur*, sulfur; M.L. v. *oxido*, oxidize; M.L. adj. *disulfidooxidans*, disulfide-oxidizing bacteria). The new species appears as a aerobic, endospore-forming rod shaped bacterium (length, 0.9 to 3.6 µm; width, 0.3 to 0.5 µm). The strain is nonmotile; it is a typical gram-positive bacterium, even if Gram staining is variable. *S. disulfidooxidans* produces oval spores, located subterminally in a swollen sporangium. Cells sometime appear pleomorphic and increase in width with aging. Long chains of rods appear only on selected substrates. *S. disulfidooxidans* does not grow alone on solid medium, but it forms colonies only when an accompanying acidifying bacterium is present and growing.

S. disulfidooxidans grows in liquid medium where it literally flocculates. Growth is maximal between pH 1.5 and 2.5, and culture is possible within a wide range of pH, from 0.5 to 6.0. The *Sulfobacillus* strain grows best at 35°C and within an interval of 4 to 40°C. *S. disulfidooxidans* utilizes glucose, glutamate, oxidized glutathione, or dithio(bis)benzothiazole during its heterotrophic growth. When the bacterium uses elemental

sulfur as its sole energy source, it does not oxidize it to sulfuric acid, but yeast extract is needed as a growth factor. No acid formation has been observed during culture on carbohydrates (API 50 CH).

The G+C content of the extracted DNA is 53 ± 1 mol% as

TABLE 7. Features differentiating the genera *Sulfobacillus* and *Alicyclobacillus*

Characteristic	Result for genus:	
	<i>Sulfobacillus</i> ^a	<i>Alicyclobacillus</i> ^b
Growth at 25°C	+	-
Growth at pH 2	+	-
Growth factors required	+	- ^c
Autotrophic growth	+	DU ^d
Growth on galactose	-	+
Acid produced from carbohydrates	-	+

^a This work and that of Golovacheva and Karavaiko (16).^b Darland and Brock (7) and Deinhard et al. (8, 9).^c Except *A. cycloheptanicus* (see Table 6).^d DU, data unavailable.

determined by the thermal denaturation profiles. Its highest 16S rDNA sequence identities were 95.5 and 95.2% with *A. cycloheptanicus* and *S. thermosulfidooxidans*, respectively. As determined by neighbor-joining, parsimony, and maximum-likelihood approaches, the closest phylogenetically to *S. disulfidooxidans* is *S. thermosulfidooxidans*, followed by strains from the genus *Allicyclobacillus*, both genera forming a highly supported clade of low-percentage-G+C gram-positive strains.

S. disulfidooxidans SD-11 has been deposited at the American Type Culture Collection, Rockville, Md., and has been designated ATCC 51911.

ACKNOWLEDGMENTS

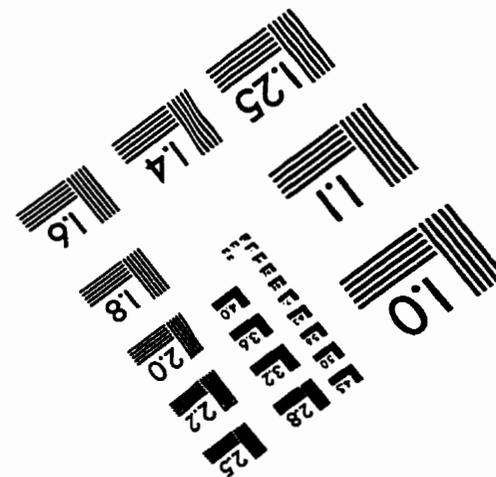
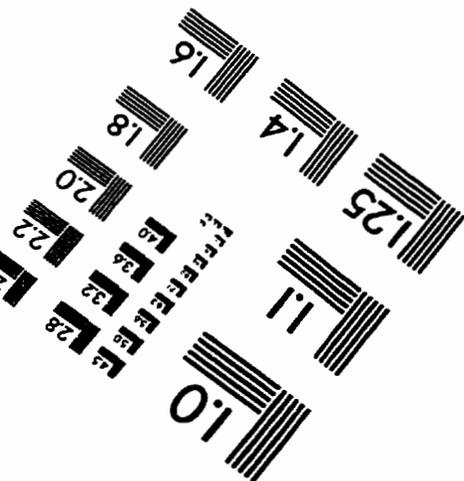
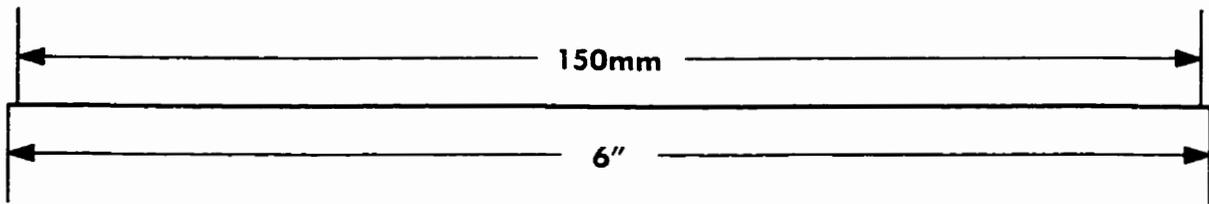
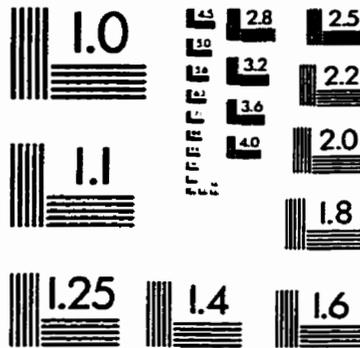
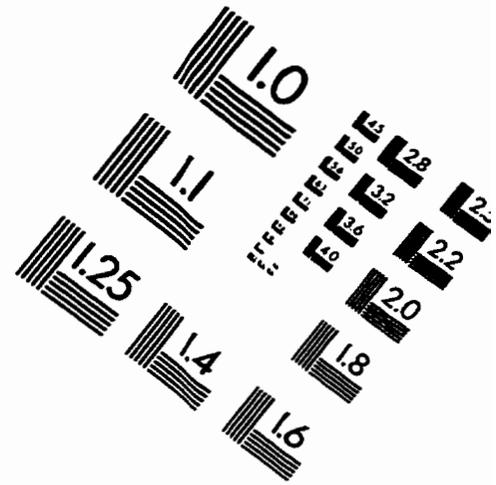
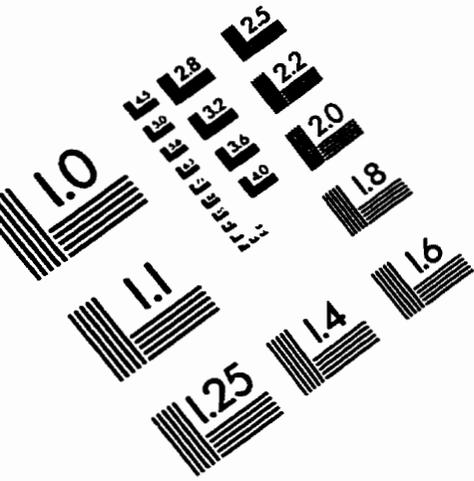
We thank A. Roy from Centre de Recherche en Biologie Forestière, F. Garneau and L. Simon for excellent technical assistance, and M. Goldner for comments on the manuscript.

Financial support of the FCAR-CRIQ to S.D. is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1992. Short protocol in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in Molecular Biology, p. 2.10 and 2.11. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Bhattacharyya, S., B. K. Chakrabarty, A. Das, P. N. Kundu, and P. C. Banerjee. 1991. *Acidiphilium symbioticum* sp. nov. an acidophilic heterotrophic bacterium from *Thiobacillus ferrooxidans* cultures isolated from Indian mines. *Can. J. Microbiol.* 37:78–85.
- Blais, J. F., R. D. Tyagi, and J. C. Auclair. 1992. Bioleaching of metals from sewage sludge by sulfur-oxidizing bacteria. *J. Environ. Eng. Div. (ASCE)* 118:690–707.
- Brierley, J. A. 1978. Thermophilic iron-oxidizing bacteria found in copper leaching dumps. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:523–525.
- Brock, T. D., K. M. Brock, R. T. Belly, and R. L. Weiss. 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.* 84:54–68.
- Brosius, J., J. L. Palmer, J. P. Kennedy, and H. F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4801–4805.
- Darland, G., and T. Brock. 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 67:9–15.
- Deinhard, G., P. Blanz, K. Puralla, and E. Altan. 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Syst. Appl. Microbiol.* 10:47–53.
- Deinhard, G., J. Saar, W. Krischke, and K. Poralla. 1987. *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing ω -cycloheptane fatty acids. *Syst. Appl. Microbiol.* 10:68–73.
- Dorch, M., and E. Stackebrandt. 1992. Some modifications in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA. *J. Microbiol. Methods* 16:271–279.
- Dufresne, S., J. F. Blais, C. Roy, and R. Guay. 1993. Municipal waste water treatment plant sludges: a source of organic carbon-tolerant, sulfur-oxidizing *Thiobacillus* and *Sulfobacillus* strains. p. 267–276. In A. E. Torma, M. L. Apel, and C. L. Brierley (ed.), *Biohydrometallurgical technologies*, vol. II. Fossil energy materials, bioremediation, microbial physiology. Proceedings of an International Biohydrometallurgy Symposium, Jackson Hole, Wyo. The Minerals, Metals, and Materials Society, Warrendale, Pa.
- Feig, S. 1973. Effects of supplementary aeration on the growth of *Thiobacillus thiooxidans* in shaken cultures. *Can. J. Microbiol.* 19:306–307.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees for DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17:368–376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Goebel, B. M., and E. Stackebrandt. 1994. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1614–1621.
- Golovacheva, R. S., and G. I. Karavaiko. 1978. A new genus of thermophilic spore-forming bacteria. *Sulfobacillus*. *Microbiology* 47:658–665.
- Guay, R., and M. Silver. 1975. *Thiobacillus acidophilus* sp. nov.: isolation and some physiological characteristics. *Can. J. Microbiol.* 21:281–288.
- Harrison, A. P., Jr. 1981. *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:327–332.
- Karavaiko, G. I., R. S. Golovacheva, T. A. Pivovarova, I. A. Tsaplina, and N. S. Vartanjan. 1988. Thermophilic bacteria of the genus *Sulfobacillus*. p. 29–41. In: *BioHydroMetallurgy* Proceeding of the International Symposium, Warwick 1987, Technology Letters, Antony Rowe Ltd, Chippenham, Wiltshire, United Kingdom.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111–120.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 1993. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park.
- Lane, D. J., A. P. Harrison, Jr., D. Stahl, B. Pace, S. J. Giovannoni, G. J. Olsen, and N. R. Pace. 1992. Evolutionary relationship among sulfur and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* 174:269–279.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
- Maidak, B. L., N. Larsen, G. J. Olsen, M. J. McCaughey, R. Overbeek, T. J. Macke, K. Fogel, J. Blandy, and C. R. Woese. 1994. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* 22:3485–3487.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3:208–218.
- Marmur, J., and P. Doty. 1961. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J. Mol. Biol.* 3:585–594.
- Marsh, R. M., and P. R. Norris. 1983. The isolation of some thermophilic, autotrophic iron- and sulphur-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 17:311–315.
- Murray, R. G. E., R. S. Doetsch, and C. F. Robinow. 1994. Determinative and cytological light microscopy. p. 21–41. In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (ed.), *Methods for general molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Poralla, K. (Universität Tübingen). 1996. Personal communication.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
- Seegerer, A., A. Neuner, J. K. Kristjansson, and K. O. Stetter. 1986. *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:559–564.
- Silverman, M. P., and D. G. Lundgren. 1959. Studies of the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.* 77:642–647.
- Stackebrandt, E., and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846–849.
- Swofford, D. L. 1993. PAUP-phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1. Illinois Natural History Survey, Champaign, Ill.
- Tourova, D. P., A. B. Poltoraus, I. A. Lebedeva, I. A. Tsaplina, D. I. Bogdova, and G. I. Karavaiko. 1994. 16S ribosomal RNA (rDNA) sequence analysis and phylogenetic position of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:509–512.
- Tsaplina, I. A., G. A. Osipov, T. I. Bogdanova, T. P. Nedorezova, and G. I. Karavaiko. 1994. Fatty-acid composition of lipids in thermoacidophilic bacteria of the genus *Sulfobacillus*. *Microbiology* 63:459–464.

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc
 1653 East Main Street
 Rochester, NY 14609 USA
 Phone: 716/482-0300
 Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved