

Master 2 Recherche –

Eau et Environnement

2014

Assia FEJRIOUI

Isolement et caractérisation des bactéries sulfatoréductrices et des bactéries sulfoxydantes des digesteurs anaérobies et essai de désulfuration

Stage principal effectué dans le laboratoire de l'Equipe de Microbiologie Anaérobie (E02B26)

Sous la direction de M.Abdel-Allah Qatibi et Mme Ghislane Bennisse.

Soutenue le 30 juin 2014 devant le membre jury :

Encadrante : Mme G.BENNISSE
Encadrant : Mr. A .I QATIBI
Examineur : Mr.BENKADDOUR
Examineur : Mr. BOULARBAH

Faculté des sciences et techniques Gueliz
Faculté des sciences et techniques Gueliz
Faculté des sciences et techniques Gueliz
Faculté des sciences et techniques Gueliz

Remerciements

Ce travail est réalisé dans le laboratoire de l'Equipe de Microbiologie Anaérobie (EMA), de la Faculté des Sciences et Techniques-Guéliz de Marrakech.

Je tiens tous d'abord à remercier les membres du jury, d'avoir accepté de juger ce travail de recherche. J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur Benkaddour, Professeur dans le département de Science de la Terre, ainsi qu'à Monsieur Boularbah, Professeur au département de Biologie, pour l'intérêt qui ont porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs.

Je tien à exprimer toute ma gratitude à M.Abdel-Allah Qatibi pour m'avoir accueilli au sein de son unité, d'avoir encadré mon travail, et pour la confiance qu'il m'a accordé. Son soutien et ses conseils m'ont beaucoup apporté.

Je tiens particulièrement à remercier mon encadrante de mémoire Madame Ghislane Bennisse pour son soutien, sa disponibilité, son aide précieuse pour la corrections de mon manuscrit et surtout son implication dans ces travaux de recherche Merci encore pour tes conseils Mme Bennisse.

Je remercie également Monsieur Hafid, Professeur au département de science de la terre (FSTG), pour la prise de photographies des souches pures par un microscope à contraste de phase.

Je voudrais adresser tous mes remerciements à mes collègues, Abdel Aziz EL houari, Sara Lafar avec qui j'ai eu la chance de collaborer, et qui ont très largement contribué à l'obtention des résultats décrits dans le présent mémoire.

Liste des figures

Figure 1 - Schéma du processus microbiologique de la digestion anaérobie (Qatibi, 1986)

Figure 2 - Le cycle biologique du soufre (Caumette, 1985)

Figure 3 - Observation au microscope optique (a) et électronique (b) de *Desulfovibrio marrakechensis* (Chamkh et al., 2009)

Figure 4 - Observation au microscope électronique de (a) *Thiobacillus* ; (b) *Thiomicrospira*

Figure 5 - Digesteurs type cylindriques classiques (A, B) utilisés par la station pour la production de Biogaz à partir des boues

Figure 6 - Ajout de la résazurine comme indicateur de l'anaérobiose ;

Figure 7 - Ebullition du milieu de culture ;

Figure 8 - Refroidissement sous azote

Figure 9 - Tubes de Hungate (a) et flacons type pénicilline (b) pour le milieu de culture

Figure 10 - Courbe d'étalonnage pour le dosage des sulfures

Figure 11 - Courbe d'étalonnage pour le dosage des sulfates

Figure 12 - Préparation des échantillons de boues DA et DB

Figure 13 - Technique de numération sur milieu liquide

Figure 14 - Enrichissements des BSR

Figure 15 - Illustration du volume et des différentes phases du tube Hungate

Figure 16 - Isolation des bactéries anaérobies par la technique des Roll-Tubes

Figure 17 - Techniques d'isolement sur milieu solide à partir des enrichissements de BSR des boues DA et DB (la photo en bas du schéma représente un roll-tube)

Figure 18 - Flacons de pénicillines incubés horizontalement

Figure 19 - Repiquage des colonies morphologiquement différentes sur milieu solide

Figure 20 - Evolution de la biomasse des BSR en présence de lactate (10mM) et sulfate (20mM) dans les enrichissements anaérobies à partir des deux digesteurs A (1b) et B (2b)

Figure 21 - Production du sulfure (**1a** et **2a**) par les enrichissements anaérobies des BSR obtenues à partir de deux digesteurs A et B en présence de différentes concentrations d'oxygène.

Figure 22 - Microscopie à contraste de phase (x1000) de la souche DZ cultivée sur lactate comme source d'énergie et de carbone en présence de sulfate

Figure 23 - Croissance et production des sulfures par la BSR souche DZ cultivée sur le lactate comme source d'énergie et carbone et le sulfate comme accepteur d'électrons en **anaérobie**.

Figure 24 - Cinétique de production des sulfures par la souche DZ cultivée sur milieu **aérobie** en présence du 10mM de lactate et 20mM de sulfates et évolution de la biomasse (D0 580 nm) et du pH

Figure 25 - Productions des sulfures et évolution de la biomasse de la souche DZ en présence de différentes concentrations d'oxygène.

Figure 26 - Aspect macroscopique des colonies isolées du digesteur A (SMA) et du Digesteur B (SMB)

Figure 27 - Isolat DB1 après purification

Figure 28 - Culture des isolats de bactéries sulfo-oxydantes des digesteurs A et B sur milieu riche

Figure 29 - Cinétique de croissance des isolats de *Thiobacillus* (DA3, DB1, DB2) en présence de thiosulfate comme seule source d'énergie.

Figure 30 - Evolution des sulfures dans la coculture DZ+DA3

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effets du sulfure d'hydrogène (H₂S) sur les humains (Sauve, 2011).

Tableau 2 -Oxydation de différents donneurs d'électrons couplée à la réduction du sulfate (Postgate, 1984)

Tableau 3 - Protéines impliquées dans le mécanisme de la réduction de l'oxygène et la détoxification des formes réactives de l'oxygène chez *Desulfovibrio spp.* (Dolla et al., 2006).

Tableau 4 - Genres oxydant le soufre de la section B du groupe 12 du *Bergey's Manual*

Tableau 5 - pH de croissance et type nutritionnel de *Thiobacillus* (Schlegel, 1988)

Tableau 6 - Donneurs et accepteurs d'électrons des *Thiobacillus* (Prescott, 2003)

Tableau 7 - Nombre de bactéries sulfato-réductrices dans les deux digesteurs A et B

Tableau 8 - Production de sulfures dans les deux digesteurs A et B

Tableau 9 - Accepteurs d'électrons testés pour la souche DZ en présence de 10 mM lactate comme substrat, après une période d'incubation d'une semaine à 35°C

Tableau 10 - Nombre d'Unités Formant colonie par ml de bactéries sulfoxydantes dans les digesteurs A et B

Tableau 11 - Aspect des isolats de bactéries sulfoxydantes dans la boue DA

Tableau 12 - Aspect des isolats de bactéries sulfo-oxydantes dans la boue DB

Tableau 13 - Examen microscopique des isolats purs de bactéries sulfo-oxydantes des digesteurs

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
Chapitre 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I- Généralité sur les boues des stations d'épuration.....	3
II- La digestion anaérobie ou méthanisation.....	3
III- Problématiques des sulfures engendrés dans les installations de biogaz et procédés de désulfuration.....	5
1- Effets néfastes du sulfure d'hydrogène.....	5
1.1- Sur l'Homme.....	5
1.2- Sur les microorganismes.....	5
1.3- Sur l'environnement.....	6
2- Procédés de désulfuration du biogaz.....	6
IV- Relation entre les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et les bactéries sulfo- oxydantes (BSO) dans le cycle du soufre.....	6
V- Caractéristiques bactériologiques des bactéries sulfato-réductrices et des <i>Thiobacillus</i>	8
1- Bactéries sulfato-réductrices (BSR).....	8
1.1- Classification sommaire	8
1.2- Métabolisme énergétique.....	9
1.3- Conditions de culture.....	9
1.4- Défense des BSR contre l'oxygène.....	10
2- Bactéries sulfo-oxydantes (BSO) du genre <i>Thiobacillus</i>	11
2.1- Classification et morphologie.....	11
2.2- Métabolisme	12
Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES.....	14
I- Origines des boues.....	14
II- Milieux de culture pour les BSR et les <i>Thiobacillus</i>	14
1- Préparation du milieu de culture anaérobie pour les BSR.....	14
1.1- Technique d'anaérobiose.....	14
1.2- Composition du milieu de culture de base.....	15

1.3-	Préparation du milieu de culture.....	15
2-	Milieu de culture de base pour les <i>Thiobacillus</i>	16
III-	Techniques de dosage.....	17
1-	Dosage des sulfures.....	17
2-	Dosage des sulfates.....	17
IV-	Etude des bactéries sulfato-réductrices.....	18
1-	Dénombrement des BSR.....	18
1.1-	Préparation des échantillons.....	18
1.2-	Technique de dénombrement.....	19
2-	Enrichissement des BSR.....	20
3-	Etude de l'effet de la concentration d'oxygène sur les BSR.....	20
4-	Isolement des BSR.....	21
4.1-	Principe d'isolement en anaérobiose.....	21
4.2-	Purification des souches de BSR.....	23
4.3-	Test de pureté.....	23
5-	Caractérisation partielle d'une BSR souche DZ.....	23
5.1-	Etude morphologique.....	23
5.2-	Caractérisation sommaire du métabolisme énergétique.....	23
6.	Tolérance de la souche DZ à l'oxygène.....	24
V-	Recherche et dénombrement de <i>Thiobacillus</i>	25
1-	Numération des <i>Thiobacillus</i>	25
2-	Isolement et purification.....	25
3-	Caractérisation partielle des souches isolées.....	26
4-	Etude du caractère chimiolithotrophe.....	26
5-	Croissance bactérienne.....	26
VI-	Réalisation d'une co-culture définie entre <i>Thiobacillus</i> et BSR.....	26
 Chapitre 3- RESULTATS ET DISCUSSION.....		27
I-	Etude des bactéries productrices de sulfures (BSR).....	27
1-	Dénombrement des BSR dans les boues des digesteurs anaérobies A et B....	27
2-	Effet de l'oxygène sur la croissance des BSR.....	29
3-	Isolement et purification des BSR.....	31
4-	Caractérisation partielle de la BSR souche DZ.....	31
4.1-	Caractéristiques morphologiques.....	31

4.2-	Accepteurs d'électrons.....	32
4.3-	Etude du caractère anaérobie de la souche DZ.....	32
5-	Détermination des seuils de tolérance de <i>Desulfovibrio sp</i> souche DZ vis-à-vis de l'oxygène	34
II-	Recherche de <i>Thiobacillus</i> dans les boues des digesteurs anaérobies.....	36
1-	Dénombrement des BSO au sein des digesteurs anaérobies A et B.....	36
2-	Etude de la diversité des BSO.....	37
2.1-	Examen macroscopique.....	37
2.2-	Examen microscopique.....	38
3.	Etude du caractère chimiolithotrophe des isolats de BSO.....	39
4.	Cinétique de croissance des isolats de <i>Thiobacillus</i>	39
III-	Coculture de <i>Thiobacillus</i> aérobie souche DA3 et de la BSR anaérobie souche DZ.....	40
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		43
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		

INTRODUCTION GENERALE

Sur le plan économique et sanitaire, la digestion anaérobie des boues de station de traitement des eaux usées est actuellement considérée comme l'une des meilleures voies de dépollution. Elle permet de produire du biogaz avec un potentiel énergétique directement utilisable pour produire de l'énergie sous forme électrique, thermique ou mécanique. En effet, le biogaz est composé majoritairement de méthane (40-80%), de gaz carbonique (20-60%) et d'autres composés tels que les sulfures (H_2S) (>1%, cas générale) (Moletta, 2014). Ce dernier peut être un sous-produit indésirable lorsqu'il atteint des concentrations importantes qui induisent des problèmes liés à la corrosion des installations ainsi qu'à l'émission de fortes émanations malodorantes et toxiques. Ces sulfures proviennent de la réduction microbienne des sulfates, thiosulfate et sulfites présents dans les boues traitées. Ainsi, les stations de traitement équipées de digesteurs anaérobies sont équipées d'unités physico-chimiques et/ou biologiques de désulfuration. Néanmoins cette élimination peut s'avérer coûteuse dans le cas de traitement physico-chimiques. La production élevée d' H_2S lors du procédé de méthanisation indique souvent la présence et l'activité de bactéries anaérobies « strictes » appelés bactéries sulfato-réductrices (BSR). Elles ont la capacité d'oxyder des composés carbonés simples (lactate, acétate, formiate) ou de l'hydrogène en présence de sulfate, de sulfite, de thiosulfate et de soufre élémentaire comme accepteurs terminaux d'électrons. Ces organismes, en plus de produire des sulfures, peuvent entrer en compétition avec les bactéries méthanogènes pour des substrats communs tel que l'acétate et l'hydrogène et limiter la production de méthane dont ces deux substrats sont des précurseurs dans un digesteur anaérobie (Moletta, 2014).

L'élimination des sulfures du biogaz par un procédé physico-chimique est coûteuse et l'élimination par oxydation aérobie n'est pas idéale dans le contexte de la biométhanisation (Prescott, 2003 ; Rattanapan et Ounsaneha, 2011 ; Namgung *et al.* 2012). En revanche, l'idée d'une oxydation anaérobie de ces sulfures serait une solution idéale, à la fois peu coûteuse et ne perturbent pas la biométhanisation. C'est donc dans le prolongement de la thématique développée au sein de l'équipe de Microbiologie des anaérobies où mon stage a été effectué, que le présent travail s'inscrit en parallèle à d'autres travaux de recherche en cours s'intéressant à la thématique générale de la problématique des sulfures. L'objectif principal donc du projet de mémoire est d'étudier les microorganismes producteurs de ces sulfures qu'on retrouve dans le biogaz, ceux montrant une capacité prometteuse pour leur élimination au sein même des digesteurs produisant le biogaz et des tentatives d'établissement de

cocultures stables entre ces microorganismes qui sont en fait largement retrouvés dans des biotopes riches en composés soufrés.

Ce rapport comprend trois chapitres.

- Le **premier chapitre** est une étude bibliographique sur la problématique des sulfures générés par la digestion anaérobie, sur la relation existant entre les BSR et les *Thiobacillus* (BSO) dans le cycle du soufre, et sur les caractéristiques bactériologiques de ces bactéries.
- Le **deuxième chapitre** est une partie explicative des différentes techniques chimiques et microbiologiques utilisées pour l'isolement et la caractérisation des BSR et des BSO ainsi que de la co-culture de ces dernières.
- Le **troisième chapitre** est consacré aux résultats obtenus et à la discussion.

Il se termine par une synthèse des principaux apports de ce travail ainsi que les perspectives qui se dessinent pour de futures recherches.

Chapitre 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

VI- Généralité sur les boues des stations d'épuration

Les eaux usées sont recueillies par les égouts et dirigées vers les stations d'épuration afin d'être purifiées avant leur réintroduction dans le milieu naturel. Leur traitement dans les stations permet de séparer une eau épurée d'un résidu secondaire, les boues, qui présentent les caractéristiques d'un amendement organique bien pourvu en matière organique, azote, phosphore ainsi qu'en oligo-éléments (Jardé, 2002). Selon l'étape de traitement des eaux on distingue différents types de boue :

- **les boues primaires**, qui proviennent du traitement primaire des eaux usées par décantation.
- **les boues biologiques**, biomasse en excès provenant du traitement biologique secondaire. Elles sont aussi appelées boues secondaires ou boues activées.
- **les boues mixtes**, mélange de boues primaires et de boues biologiques. Elles proviennent de la totalité de la station.
- **les boues physico – chimiques** ou **tertiaire**, provenant de la décantation après traitement avec un réactif.

Les boues résiduaires se présentent sous une forme liquide avec une forte charge en matière organique hautement fermentescible.

VII- La digestion anaérobie ou méthanisation

La digestion anaérobie est un processus naturel biologique de dégradation de la matière organique que contiennent les boues, par des bactéries en absence d'oxygène (Moletta, 2014). Ce processus est mis en œuvre au sein d'un digesteur à partir de déchets organiques, et conduit à une production de gaz (biogaz) riche en méthane et d'un coproduit, le digestat. La méthanisation répond à un double objectif de valorisation énergétique : le **biogaz** est utilisé comme combustible, le **digestat**, composé de deux phases (liquide et solide) est utilisable comme amendement sur les terres agricoles.

La méthanisation est un processus de fermentation anaérobie complexe (Figure 1), mettant en jeu plusieurs étapes biochimiques correspondant à l'action de différents groupes bactériens.

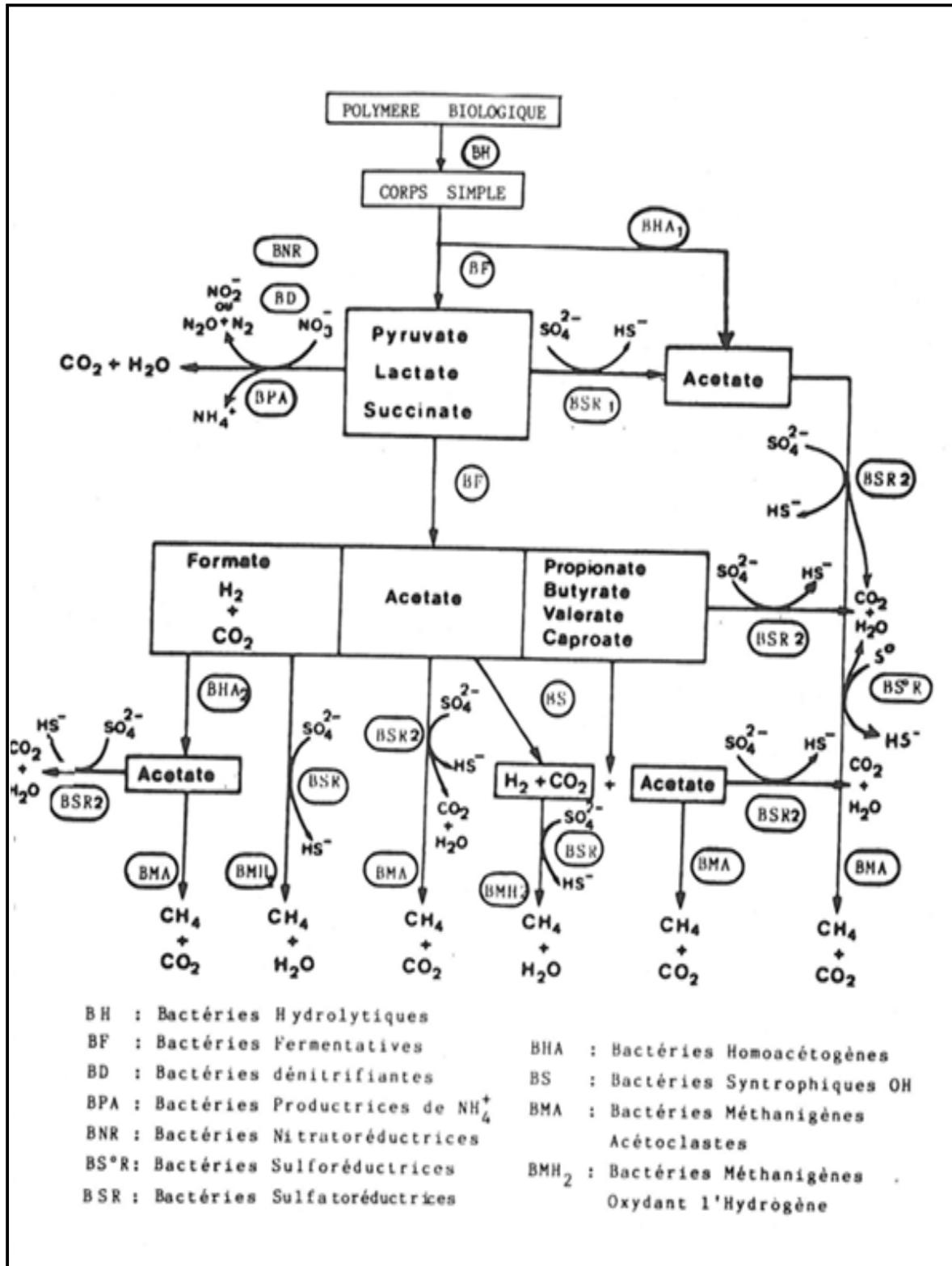


Figure 1 : Schéma du processus microbologique de la digestion anaérobie (Qatibi, 1986)

VIII- Problématiques des sulfures engendrés dans les installations de biogaz et procédés de désulfuration

La dégradation microbienne anaérobie de substances organiques dans les installations de biogaz libère non seulement les composants principaux que sont le méthane (CH₄) et le dioxyde de carbone (CO₂) mais aussi de l'hydrogène sulfuré (H₂S).

1- Effets néfastes du sulfure d'hydrogène

1.4- Sur l'Homme

Chez l'homme, l'inhalation est la voie essentielle d'exposition à l'H₂S. A fortes concentrations, l'absorption d'H₂S est rapide et ses effets létaux peuvent survenir en quelques minutes, voir en quelques secondes. Il peut également être absorbé par le tractus gastro-intestinal et la peau (Bisson *et al.*, 2011). Le sulfure d'hydrogène réagit immédiatement avec l'hémoglobine du sang et bloque le transport de l'oxygène jusqu'aux tissus et aux organes vitaux du corps. Le **tableau 1**, décrit les effets du H₂S sur la santé humaine.

Tableau 1 : Effets du sulfure d'hydrogène (H₂S) sur les humains (Sauve, 2011).

Concentration de H ₂ S (ppm)	Effets sur les humains
4 à 10	Faible odeur détectable (odeur d'œuf pourri), irritation oculaire
10 à 100	Odeur repoussante, irritation oculaire, toux, perte de l'odorat au bout de 2 à 15 minutes d'exposition
100 à 500	Inflammation oculaire, irritation des voies respiratoires
500 à 1000	Perte de connaissance rapide puis mort
1000	Mort immédiate dès la première inspiration

1 ppm=1,4 mg/m³

1.5- Sur les microorganismes

Des concentrations à partir de 50 mg / l d'hydrogène sulfuré dissout dans le substrat de fermentation sont toxiques et inhibent les bactéries méthanogènes. L'hydrogène sulfuré forme en outre, avec des oligo-éléments, des sulfures de métal difficilement solubles. Les oligo-éléments sont ainsi soustraits aux bactéries de méthane. Ceci entraîne une diminution de la vitesse de dégradation et une réduction de la production de méthane (Moletta, 2014).

1.6- Sur l'environnement

Quand l'hydrogène sulfuré est transféré vers l'atmosphère, il est rapidement oxydé en dioxyde de soufre (SO₂). Le dioxyde de soufre se recombine ensuite avec l'humidité contenue dans l'atmosphère pour produire de l'acide sulfurique qui retombe avec la pluie sous forme de pluies acides. Ces acides ont un pouvoir corrosif supérieur à celui d'H₂S (Boulinguez, 2010). L'H₂S peut causer des changements de pH aux systèmes écologiques aqueux.

2- Procédés de désulfuration du biogaz

Il existe de nombreuses méthodes de désulfuration (Zhao *et al.*, 2010). Parmi celles-ci, citons la combustion, l'incinération thermique, l'adsorption (charbon actif), l'oxydation par voie sèche, le masquage, la dispersion et enfin les traitements biologiques. Cependant, certains procédés biologiques utilisant les bactéries aérobies du soufre (BSO) sont visés pour surmonter les coûts élevés reliés aux processus physico-chimiques d'élimination du sulfure d'hydrogène (Prescott, 2003 ; Ramirez *et al.*, 2009; Rattanapan et Ounsaneha, 2011).

IX- Relation entre les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et les bactéries sulfoxydantes (BSO) dans le cycle du soufre

Le cycle du soufre (**Figure 2**) est un cycle biogéochimique majeur au sein duquel interviennent des bactéries anaérobies et aérobies.

Production du H₂S

Dans un environnement anaérobie (boues, couche de boue visqueuse, sédiments...), l'hydrogène sulfuré est produit généralement selon deux voies :

- La réduction dissimilatrice par les bactéries sulfoxydantes, ou par les bactéries sulfato-réductrices
- La décomposition de matières organiques sulfurées par les décomposeurs.

Par ailleurs, le H₂S est également produit par la réduction assimilatrice du sulfate par toutes les bactéries aussi bien en aérobie qu'en anaérobie pour la synthèse des acides aminés sulfurés. Cette réduction du sulfate est dite assimilatrice.

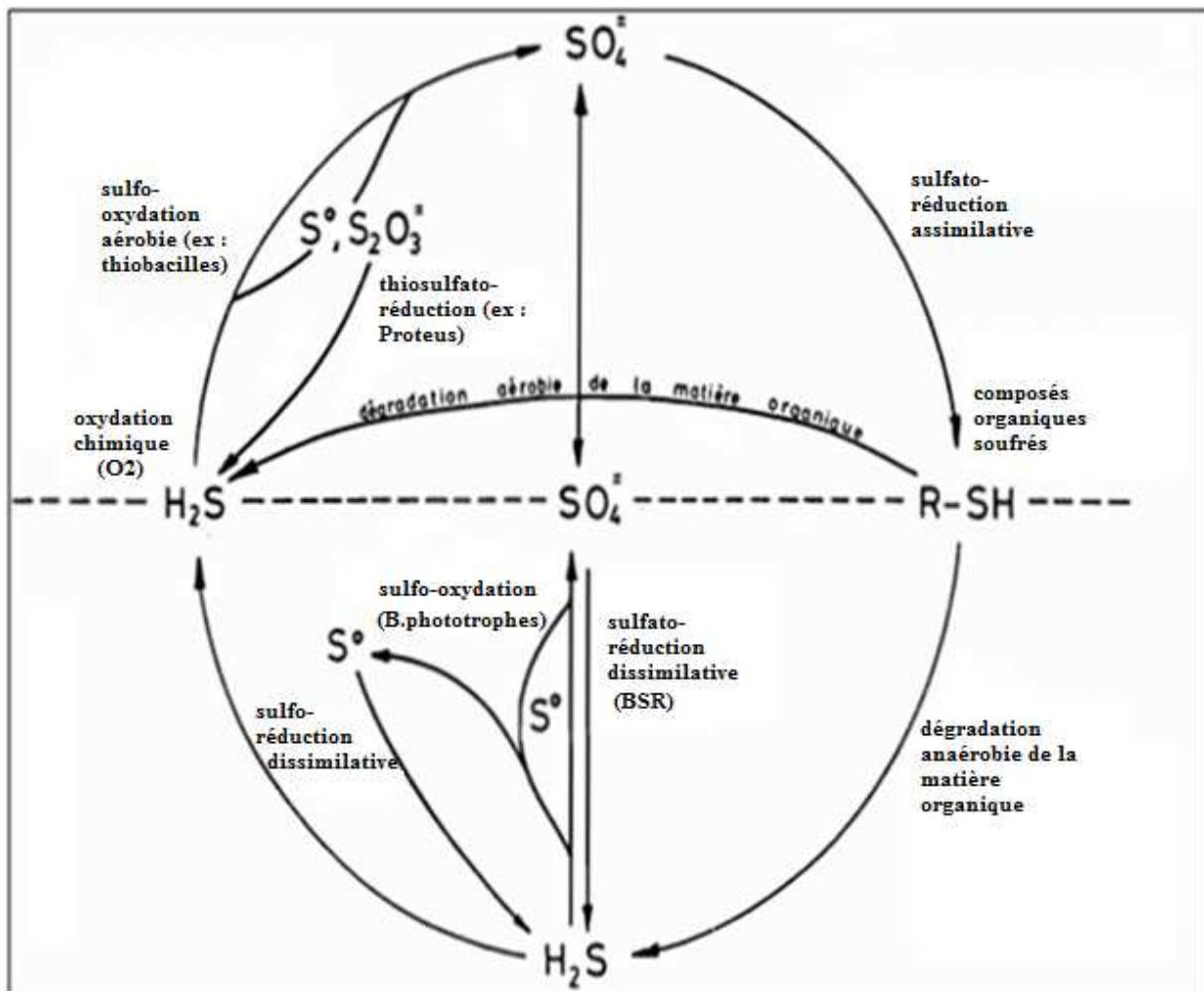


Figure 2: Le cycle biologique du soufre (Caumette, 1985)

Oxydation du H₂S

Dans la **zone aérobie** plusieurs genre de bactéries sulfo-oxydantes (**BSO**) peuvent intervenir dans l'oxydation du H₂S, en S⁰ ou en SO₄²⁻. Le genre de BSO le plus connu étant le genre *Thiobacillus* (Soupramanien, 2012 ; Peu *et al.*, 2012).

Dans la **zone anaérobie**, le H₂S peut être oxydé non seulement par les bactéries phototrophes anaérobies sulfureuses en présence de lumière (Prescott, 2003) mais également par des bactéries chimiolithotrophes qui utilisent le nitrate comme accepteur d'électrons (*Thiobacillus denitrificans*). Ces bactéries constituent un filtre biologique d'odeurs (Freddrich, 1998).

X- Caractéristiques bactériologiques des bactéries sulfato-réductrices et des *Thiobacillus*

1- Bactéries sulfato-réductrices (BSR)

1.1- Classification sommaire

Les BSR forment un groupe phylogénétiquement très diversifié affiliées aux *Bacteria* et aux *Archae*. Le seul point commun de ce groupe physiologique est que les BSR soient anaérobies strictes capables d'utiliser comme accepteur final d'électrons le sulfate (SO_4^{2-}), le sulfite (SO_3^{2-}), le soufre élémentaire (S^0) pour certaines et le thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) qu'elles réduisent en sulfure (S^{2-}). Plusieurs propriétés sont utilisées pour leur classification à savoir leur forme cellulaire, la mobilité, la teneur d'ADN en GC%, la présence de la désulfoviridine et des cytochromes, la température optimale de croissance et l'oxydation complète ou incomplète de l'acétate (Chamkh, 2011). Le genre *Desulfovibrio* (**Figure 3**) appartenant à la Famille des *Desulfovibrionaceae* est le plus communément isolé (Loubinoux *et al.*, 2002, Chamkh, 2009 ; Chamkh, 2011).

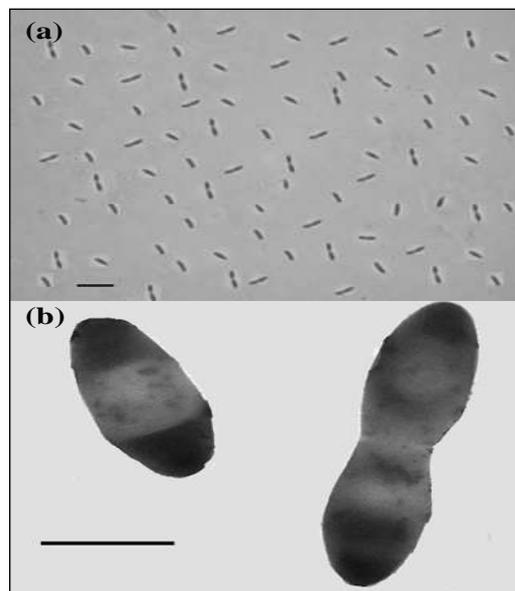


Figure 3 : Observation au microscope optique (a) et électronique (b) de *Desulfovibrio marrakechensis* (Chamkh *et al.*, 2009)

1.2- Métabolisme énergétique

Certaines BSR réalisent en présence de sulfate une oxydation complète d'un nombre limité de substrats organiques en acétate et en CO₂. Les bactéries du genre *Desulfovibrio* appartiennent à cette catégorie. D'autres BSR sont capables en présence de sulfate d'oxyder de manière complète une grande variété de composés tels que les acides gras ou des composés aromatiques. Ces organismes se développent beaucoup plus lentement que ceux de la première catégorie. Ils possèdent une voie biochimique permettant l'oxydation de l'acétyl-CoA en CO₂. Les substrats organiques les plus couramment utilisés par les bactéries du genre *Desulfovibrio* sont le lactate, le pyruvate, l'éthanol, le malate et le fumarate (**Tableau 2**).

Tableau 2: Oxydation de différents donneurs d'électrons couplée à la réduction du sulfate (Postgate, 1984)

Reaction
Hydrogen : $4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{H}_2\text{O} + \text{S}^{2-}$
Acetate : $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{S}^{2-}$
Formate : $4\text{HCOO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{HCO}_3^- + \text{S}^{2-}$
Pyruvate : $4\text{CH}_3\text{COCO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{CO}_2 + \text{S}^{2-}$
Lactate : $2\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{S}^{2-}$
Malate : $2(\text{OOCCH}_2\text{CHOHCOO})^{2-} + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{CO}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{S}^{2-}$
Fumarate : $2(\text{OOCCHCHCOO})^{2-} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{CO}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{S}^{2-}$
Succinate : $4(\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COO})^{2-} + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{CO}_2 + 4\text{HCO}_3^- + 3\text{S}^{2-}$

1.3- Conditions de culture

Les milieux de culture des BSR dites non extrêmes contiennent habituellement un composé organique donneur d'électrons (lactate par exemple) et un accepteur terminal d'électrons (sulfate par exemple). Ces milieux de culture doivent contenir un agent réducteur (tel que *Na₂S*) permettant d'abaisser le potentiel redox à des valeurs avoisinant les -200 mV. Le pH des milieux de culture doit être compris entre 7 et 7,5. Il est à noter que la croissance des BSR est lente (temps de génération de 3 à 6 heures) par rapport aux bactéries aérobies en général. De plus, il est à noter que la concentration en H₂S dans le milieu de culture peut influencer le taux de croissance et pourrait, à forte concentration, arrêter la croissance. Ce phénomène est lié à la toxicité intrinsèque de l'H₂S et au fait que les sulfures

rendent le fer peu soluble, donc non disponible pour la bactérie, en formant un précipité de sulfure de fer (Loubinoux, 2001).

1.4- Défense des BSR contre l'oxygène

Les BSR sont souvent trouvées dans les biotopes où les conditions oxiques peuvent temporairement exister. Elles ont ainsi développé plusieurs stratégies de défense contre l'exposition à l'oxygène. Ces stratégies incluent des comportements particuliers en présence de l'oxygène, comme l'agrégation ou « aérotaxis », des systèmes enzymatiques pour réduire et éliminer l'oxygène et de ses formes réactives. Les BSR et particulièrement des espèces du genre *Desulfovibrio*, possèdent une variété d'enzymes capables d'éliminer le stress oxydatif. Ces enzymes qui diffèrent selon leur localisation cellulaire, sont listées ci-dessous dans le **tableau 3**. Plusieurs BSR peuvent tolérer la présence de l'oxygène quand elles sont cultivées en culture pure. Elles peuvent survivre après une courte exposition à l'oxygène et la tolérance à l'oxygène est espèce-dépendante (Dolla *et al.*, 2006).

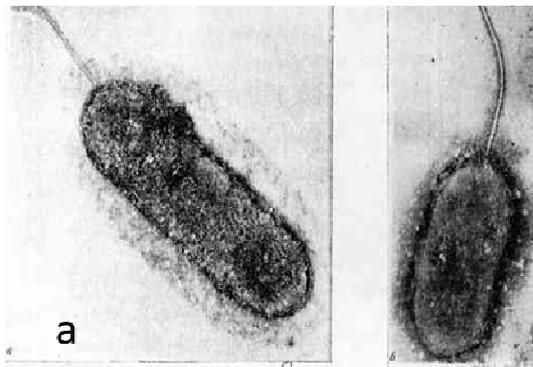
Tableau 3 - Protéines impliquées dans le mécanisme de la réduction de l'oxygène et la détoxification des formes réactives de l'oxygène chez *Desulfovibrio spp.* (Dolla *et al.*, 2006).

	Protéines clé	Localisation
Réduction de l'oxygène		
Cytoplasmique	Rubredoxine oxydoréductase	Cytoplasme, soluble
	Cytochrome c	Lié à la membrane plasmique
	Cytochrome bd	Lié à la membrane
Périplasmique	[Fe] hydrogénase	Périplasma, soluble
Détoxification des formes réactives de l'oxygène		
Balayage des superoxydes	Superoxyde dismutase	Périplasma
	Superoxyde réductase	Cytoplasme
Balayage de H ₂ O ₂	Catalase	Cytoplasme
	Rubrerythrine 1	Cytoplasme
NADH peroxydases	Rubrerythrine 2	Cytoplasme
	Nigerythrine	Cytoplasme
Thiol-spécifique	Thiol peroxydase	Cytoplasme

2- Bactéries sulfo-oxydantes (BSO) du genre *Thiobacillus*

2.1- Classification et morphologie

Les bactéries sulfo-oxydantes (BSO) forment un groupe très divers. Un certain nombre de genres sont capables d'oxyder le H₂S et sont rangés dans la section A et B du groupe 12 du *Bergey's Manual*. Dans cette section on retrouve des bactéries filamenteuses se déplaçant par glissement (*Beggiatoa*, *Thioploca*, *Thiothrix*) et des bactéries unicellulaires en forme de bacille ou spiralée qui sont mobiles ou immobiles par des flagelles (**Tableau 4**). Les plus connues sont les genres *Thiobacillus* un bacille Gram-négatif et *Thiomicrospira* une longue cellule spiralée. Les deux ont un flagelle polaire (**Figure 4**).



Wiki.Web.ru



Thiomicrospira pelophila
Kuenen et Robertson (1989)

Figure 4 : Observation au microscope électronique de (a) *Thiobacillus* ; (b) *Thiomicrospira*

Tableau 4 : Genres oxydant le soufre de la section B du groupe 12 du *Bergey's Manual*

Genre	Forme de la cellule	Flagelles	%G+C	Localisation des dépôts de soufre
<i>Thiobacillus</i>	Bacillus	+ ; Polaires	52-68	Extracellulaire
<i>Thiomicrospira</i>	Spirales	+ ; Polaires	36-44	Extracellulaire
<i>Thiobacterium</i>	Bacilles inclus dans les masses gélatineuses	-		Intracellulaire
<i>Thiospira</i>	Bacilles spiralés avec des terminaisons pointues	+ ; Polaires (seul ou en touffe)		Intracellulaire
<i>Macromonas</i>	Bacilles en forme de haricot	+ ; Polaires	67	Intracellulaire

2.2- Métabolisme

Les BSO les plus utilisées et étudiées dans les processus d'oxydation des sulfures sont les *Thiobacillus* tel que *Thiobacillus novellus* (Cha *et al.*, 1999), *Thiobacillus thioparus* (Chung *et al.*, 1997 ; Oyarzun *et al.*, 2003) et *Thiobacillus denitrificans* (Sublette et Sylvester, 1987).

Les *Thiobacillus* peuvent oxyder non seulement le sulfure d'hydrogène mais divers composés soufrés réduits (**Tableau 5**). L'oxydation de l'H₂S peut s'effectuer sur une large gamme de pH (entre 1 et 8), incluant à la fois des *Thiobacillus* acidophiles tel que *Acidithiobacillus thiooxidans* (Aroca *et al.*, 2007) ou neutrophiles (*T. thioparus*, *T. denitrificans* et *T. novellus*).

Bien que *Thiobacillus* utilise normalement le CO₂ comme source principale de carbone, certaines espèces telles que *T. novellus*, *T. intermedius* et *T. ferrooxidans* peuvent se développer de façon hétérotrophe (**Tableau 5**).

Tableau 5 - pH de croissance et type nutritionnel de *Thiobacillus* (Schlegel, 1988)

Espèce	pH de croissance	Donneur d'électrons	Type
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	2-5	S ²⁻ ; S ₂ O ₃ ²⁻ ; S	O
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	2-6	Fe ²⁺ ; S ₂ O ₃ ²⁻ ; S	F
<i>Thiobacillus thioparus</i>	6-8	S ₂ O ₃ ²⁻ ; S	O
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	6-8	S ₂ O ₃ ²⁻ ; S	O
<i>Thiobacillus intermedius</i>	2-6	S ₂ O ₃ ²⁻ ; S ; glutamate	F
<i>Thiobacillus novellus</i>	6-8	S ₂ O ₃ ²⁻ ; S ; glutamate	F

O : chimiolithotrophe obligatoire ; F : chimioorganotrophe facultatif

Les *Thiobacillus* se développent en aérobiose, mais *Thiobacillus denitrificans* peut se développer facultativement en anaérobiose. Il effectue une respiration anaérobie en utilisant le nitrate (NO₃) comme accepteur terminal d'électrons (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Donneurs et accepteurs d'électrons des *Thiobacillus* (Prescott, 2003)

Espèces	Donneur d'électrons	Accepteur d'électrons	Source de carbone	Produits
<i>Thiobacillus sp (général)</i>	$S^0, H_2S, S_2O_3^{2-}$	O_2	CO_2	SO_4^{2-}
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	$S^0, H_2S, S_2O_3^{2-}$	O_2, NO_3^-	CO_2	SO_4^{2-}, N_2
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Fe^{2+}, S^0, H_2S	O_2	CO_2	Fe^{3+}, SO_4^{2-}

En conclusion de cette synthèse bibliographique, les BSR constituent la principale source de H_2S . C'est la raison pour laquelle nous allons, dans ce présent travail, nous focaliser sur l'étude de ce groupe bactérien issu des digesteurs anaérobies d'une station de traitement des eaux usées de la région. Les *Thiobacillus* constituent le plus commun et le plus important véhicule par lequel les sulfures réduits peuvent être oxydés. On abordera également la faisabilité d'une co-culture définie entre une BSR et une bactérie appartenant au genre *Thiobacillus* ("mini" cycle de soufre), toutes deux isolées des mêmes boues de digesteurs anaérobies afin de démontrer que cette coexistence entre les deux bactéries est possible au sein même du digesteur anaérobie.

Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES

VII- Origines des boues

Des échantillons de boues ont été collectés dans des conditions anaérobies à partir de deux digesteurs A et B d'une station d'épuration et de réutilisation des eaux usées. L'architecture des digesteurs utilisés est schématisé ci-dessous (**Figure 5**).

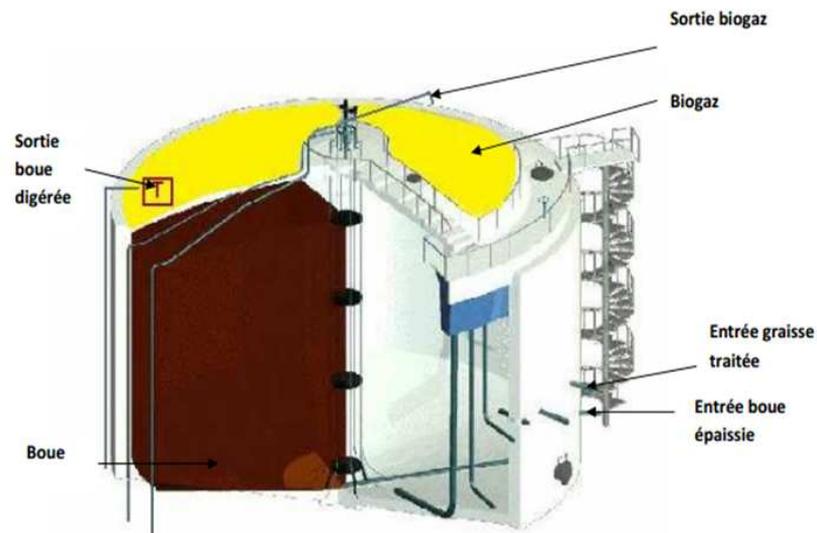


Figure 5- Digesteurs type cylindriques classiques (A, B) utilisés par la station pour la production de Biogaz à partir des boues

VIII- Milieux de culture pour les BSR et les *Thiobacillus*

1- Préparation du milieu de culture anaérobie pour les BSR

1.1- Technique d'anaérobiose

Les techniques utilisées dans cette étude sont celles de Hungate (1969). Elles reposent sur l'utilisation de récipients divers (tubes de Hungate, tubes haute pression, flacons pénicilline...), fermés par des bouchons en butyl maintenus par des viroles à vis (tubes de Hungates). Les bouchons peuvent être transpercés par des aiguilles stériles sans risque de contamination ou d'introduction d'air. Les prélèvements et inoculations sont effectués à l'aide de seringues médicales préalablement purgés à l'aide d'azote exempt d'oxygène (stériles et à usage unique) munies d'aiguilles hypodermiques (également stériles et à usage unique), près de la flamme d'un bec bunsen. Ceci est réalisé grâce à une rampe de distribution de gaz inertes.

1.2- Composition du milieu de culture de base

La composition pour un litre de milieu liquide est la suivante : 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g KH_2PO_4 ; 0,5 g NH_4Cl ; 0,4 g $NaCl$; 0,25 g L. Cystéine-HCl ; 0,05 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,3 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,1 g KCl ; 2 g Na_2SO_4 ; 4 g Lactate ; 0,1 g d'extrait de levure ; 1ml de solution d'oligoéléments (Chamkh, 2011).

1.3- Préparation du milieu de culture

Les produits sont introduits dans un Erlenmeyer contenant de l'eau distillée et mis sous agitation magnétique. Après avoir compléter le volume du milieu avec de l'eau distillée, le pH est mesuré et ajusté à l'aide de la solution KOH 10M et 1M et 1ml d'une solution de résazurine (0,1%) est ajoutée comme indicateur de l'anaérobiose (**Figure 6**). Les milieux de cultures sont ensuite dégazés par ébullition (**Figure 7**) et refroidis sous flux d'azote (**Figure 8**) exempt d'oxygène.

Figure 6 - Ajout de la résazurine comme indicateur de l'anaérobiose

Figure 7 - Ebullition du milieu de culture

Figure 8 - Refroidissement sous azote

Les milieux sont ensuite répartis dans des tubes de Hungate ou des flacons de type pénicilline immédiatement fermés à l'aide de bouchons en caoutchouc en butyl noire (**Figure 9**). La stérilisation des tubes et flacons se fait par autoclavage à 121°C pendant 20 mn. Juste avant inoculation, des solutions anaérobies stériles de tampon $NaHCO_3$, de réducteur $Na_2S \cdot 9H_2O$, et d'une solution de vitamines (Balch et al. 1977) sont rajoutées chacune dans le milieu de culture.

Figure 9 - Tubes de Hungate (a) et flacons type pénicilline (b) pour le milieu de culture

2- Milieu de culture de base pour les *Thiobacillus*

Il s'agit d'un milieu de culture minéral, sélectif pour les *Thiobacillus* composé de (par litre): 2,27g K_2HPO_4 ; 1,8g KH_2PO_4 ; 1,98g $(NH_4)_2SO_4$; 0,4g $NaCl$; 0,02g $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,3g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 5g $Na_2S_2O_3$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (3%); 1g Na_2CO_3 ; 15g d'agar (pour milieu solide). Le pH est ajusté à 7,2 avec KOH 1M ou 10M. Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 mn.

IX- Techniques de dosage

1- Dosage des sulfures

Un volume de 0,1ml de la culture est injecté rapidement dans 4ml de réactif HCL 50mM – $CuSO_4$ 5mM sous agitation. Après cette acidification, l'intensité de la coloration du complexe CuS formé, est mesurée à 480nm au spectrophotomètre. Une courbe étalon (**Figure 10**) donne la concentration en ions sulfures solubles en fonction de la densité optique mesurée. Cette technique présente l'avantage d'offrir des résultats rapides et productibles. L'erreur de cette technique (<5%) (Chamkh, 2011).

Figure 10 - Courbe d'étalonnage pour le dosage des sulfures

2- Dosage des sulfates

Les sulfates en présence de chlorure de baryum sont précipités en milieu chlorhydrique à l'état de sulfate de baryum. Le précipité est stabilisé à l'aide d'une solution de polyvinylpyrrolidone et les suspensions sont mesurées au spectrophotomètre. Un volume donnée de la culture est centrifugé, le surnageant récupéré est diluée dans un volume d'eau distillée. A 39ml de cet échantillon, est rajouté 1ml d'acide chlorhydrique et 5ml de la solution de chlorure de baryum stabilisé. Après un temps de réaction de 15 mn, la lecture est faite au spectrophotomètre à 650 nm. La courbe d'étalonnage (**Figure 11**) donne directement la teneur en SO_4^{2-} exprimée en mg/l.

Figure 11 - Courbe d'étalonnage pour le dosage des sulfates

X- Etude des bactéries sulfato-réductrices

1- Dénombrement des BSR

Le milieu de culture choisie pour cette numération est le milieu de culture de base anaérobie (voir paragraphe II.1.2) contenant en plus du SO_4^{2-} (20mM) et du lactate (20mM). Les BSR sont dénombrées par la méthode NPP (Nombre le plus probable).

1.1- Préparation des échantillons

Les échantillons de boues sont broyés dans un broyeur type Potter, sous flux d'azote stérile, pour faciliter le détachement des bactéries adhérant aux particules (**Figure 12**).

Figure 12 – Préparation des échantillons de boues DA et DB

1.2- Technique de dénombrement

La croissance des bactéries est suivie par mesure de la densité optique à 580nm et par dosage des sulfures à 480nm.

Le tube trouble (croissance bactérienne) contient au moins une bactérie viable. Le nombre de cultures positives dans 3 dilutions successives donne le nombre le plus probable (NPP) (**Figure 13**) de microorganismes viables de la culture mère, c'est la méthode de Mac Grady. Cependant, l'apparition de trouble est un critère qui ne caractérise pas seulement les BSR, mais d'autres bactéries anaérobies car le milieu n'est pas sélectif. Aussi la quantification des sulfures est un critère propre aux BSR. C'est pour cette raison qu'on a considéré les tubes positifs comme étant les tubes contenant BSR à condition de démontrer la production des sulfures :

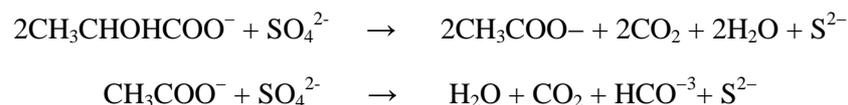


Figure 13 - Technique de numération sur milieu liquide

2- Enrichissement des BSR

Après 4 semaines d'incubation, tous les tubes positifs, ont été sélectionnés et repiqués sur un milieu de culture neuf pour BSR identique à celui utilisé pour leur numération mais contenant deux fois plus de substrat (20 mM lactate), la concentration en sulfate reste inchangée (20 mM) (**Figure 14**).

Figure 14 - Enrichissements des BSR

Les cultures sont incubées jusqu'à l'apparition d'une turbidité stable et visible à l'œil nu, en suivant en même temps la croissance des souches en mesurant la DO à 580, et la production de sulfures mesuré à 480 nm.

3- Etude de l'effet de la concentration d'oxygène sur les BSR

Des volumes différents d'air sont injectés dans des tubes d'Hungate (**Figure 15**) contenant un milieu anaérobie pour BSR contenant 10 mM de lactate, 20 mM de sulfate, et sans extrait de levure.

Figure 15 - Illustration du volume et des différentes phases du tube Hungate

Différentes concentrations d'oxygène stérile ($0 \mu\text{molO}_2$; $0,937\mu\text{molO}_2$; $1,87\mu\text{molO}_2$; $2,81\mu\text{molO}_2$; $3,75\mu\text{molO}_2$; $65\mu\text{molO}_2$) sont injectées à raison de trois exemplaires par concentration. Les tubes incubés en anaérobiose stricte (100% N₂) ou en aérobiose stricte (100% air) sont considérés comme des témoins dans cette expérience. Les tubes sont incubés à 35°C et un suivi de la croissance est effectué par mesure de la DO à 580 nm et par dosage des sulfures en fonction du temps.

4- Isolement des BSR

4.1-Principe d'isolement en anaérobiose

Les isolements sont réalisés par la méthode des « roll-tubes » (Hungates, 1969). Un roll tube est un tube Hungate contenant le milieu gélosé. Le milieu solide est chauffé dans un four à micro-ondes pour faire fondre l'agar, puis refroidi à 50°C dans un bain-marie thermostaté afin de maintenir la gélose en surfusion. Après inoculation, le tube est mis en rotation horizontalement sur un plateau inclinée afin de répartir, de manière homogène par force centrifuge, le milieu gélosé sur toute la surface interne des tubes. Les tubes sont refroidis pendant leur rotation avec de la glace et les cellules bactériennes sont ainsi dispersées dans la gélose solidifiée (**Figure 16**). Les tubes sont ensuite incubés à 35°C. Les différentes étapes d'isolement des BSR à partir des enrichissements sont illustrées par la **Figure 17**.

Figure 16 - Isolation des bactéries anaérobies par la technique des Roll-Tubes

Figure 17 - Techniques d'isolement sur milieu solide à partir des enrichissements de BSR des boues DA et DB (la photo en bas du schéma représente un roll-tube)

4.2- Purification des souches de BSR

Après 1 mois d'incubation, des colonies isolées sont observées (**Figure 16**). Une seule colonie bien isolée a été choisie pour être purifiée, à partir du digesteur A (la boue DA la plus diluée et produisant le maximum de sulfure) a été désignée DZ. Stérilement près du bec benzène et sous flux d'azote stérile, la colonie est prélevée avec l'extrémité légèrement recourbée d'une pipette pasteur stérile en aspirant à l'aide d'une poire. La colonie est expulsée de la pipette pasteur vers un tube de Hungate contenant 10 ml de milieu de culture anaérobie liquide de base contenant 10 mM de lactate et 20 mM de sulfate. Le tube est refermé, dégazé, et vigoureusement agité afin de disloquer la colonie et les particules d'agar. La suspension ainsi réalisée sert de point de départ pour une nouvelle culture sur milieux liquides. Le tube contenant la colonie est incubé à 35°C.

4.3-Test de pureté

Avant toute caractérisation d'une souche, il est important de s'assurer de sa pureté. La pureté de la souche DZ a été contrôlée par repiquage sur un milieu riche liquide sans sulfate ni lactate contenant du biotrypcase (1%), extrait de levure (5%), et par une observation microscopique.

5- Caractérisation partielle d'une BSR souche DZ

5.1- Etude morphologique

Pour étudier les caractéristiques morphologiques (forme de la cellule, mobilité, présence et position des spores), des observations au microscope optique à contraste de phase ont été réalisées à l'état frais et par la prise de photographies, réalisées dans le Département des Sciences de la Terre avec l'aide du Professeur Hafid. Une coloration Gram a été également effectuée.

5.2- Caractérisation sommaire du métabolisme énergétique

La souche DZ a été testée pour sa capacité à dégrader un seul substrat, le lactate, et l'utiliser comme source de carbone et d'énergie. La souche est cultivée sur un milieu liquide en anaérobie pour BSR contenant 10mM lactate, 20mM sulfate. Le suivi de la densité optique à 580nm, et la disparition du substrat corrélée à l'apparition de produits de dégradation (les sulfures), attestent l'utilisation du substrat testé.

Pour tester l'aptitude de la souche DZ à réduire les composés soufrés, différents accepteurs ont été testés : sulfate 20 mM ; sulfite 5 mM et 10 mM ; thiosulfate 20 mM ; soufre élémentaire (10 g/l). Tous les tests ont été effectués en trois exemplaires et ont été confirmés par un deuxième repiquage. Un milieu liquide anaérobie pour BSR (milieu BSR de base contenant 10mM de lactate et sans sulfate) a été utilisé pour cette expérience. Un milieu témoin inoculé est préparé ne contenant ni substrat (lactate), ni accepteur final d'électrons (sulfate), dont l'objectif est d'estimer la croissance due aux apports de l'inoculum cultivé sur un milieu pour BSR contenant 10 mM lactate, 20 mM de sulfate.

6- Tolérance de la souche DZ à l'oxygène

Ce test a été réalisé dans des flacons pénicillines (**Figure 18**) de 120 ml de volume, permettant le contrôle de la phase gazeuse du milieu de culture. Les flacons sont inoculés et incubés horizontalement à 35°C. La croissance de la souche DZ a été contrôlée par la mesure de la DO à 580_{nm}, la production des sulfures à 480_{nm} et la mesure du pH.

Figure 18- Flacons de pénicillines incubés horizontalement

V- Recherche et dénombrement de *Thiobacillus*

1- Numération des *Thiobacillus*

Principe : Après décantation des boues, le surnageant estensemencé sur milieu de culture solide à pH 7,2. Les boites sont incubées à une température de 35°C. Cette méthode est basée sur le principe que chaque celluleensemencée sur un milieu de culture solide forme une colonie visible à l'œil nu.

Technique : Les solutions mères du digesteur A et B de volume connu (1ml) sont diluées en série décroissante dans une solution saline stérile, de manière à obtenir des concentrations successives de plus en plus faible de 10⁻¹ jusqu'à 10⁻⁶. On dépose un volume connu 0,1 ml de chacune des dilutions sur le milieu de culture solide (voir paragraphe II.2) à raison de 2 boites de Pétri/dilution. Les boites sont incubées dans l'étuve à 35°C.

Lecture des résultats : Comme chaque espèce bactérienne forme une colonie, on compte le nombre de cellules viables dans l'échantillon en multipliant les colonies dénombrées par le facteur de dilution.

En parallèle la diversité des espèces bactériennes présentes sur le milieu est étudiée par observation à l'œil nu et caractérisation morphologique de chaque type de colonie en décrivant sa taille, son contour, le relief, ainsi que sa pigmentation.

2- Isolement et purification

Chaque type de colonie morphologiquement différente est repiquée sur le même type de milieu solide (**Figure 19**) pour obtenir des souches pures.

Figure 19 - Repiquage des colonies morphologiquement différentes sur milieu solide

3- Caractérisation partielle des souches isolées

Après cinq jours d'incubation, les colonies ayant poussé sont sélectionnées pour faire une coloration de Gram.

4- Etude du caractère chimiolithotrophe

Cette étude a été réalisée par repiquage des souches sur un milieu riche liquide composé du milieu de base pour *Thiobacillus* (voir paragraphe II.2) mais sans thiosulfate, sans agar, contenant du biotrypcase (10%), extrait de levure (5%), glucose (20%).

5- Croissance bactérienne

Les souches pures, ont été sélectionnées et par la suite cultivées sur un milieu liquide aérobie pour *Thiobacillus* (même composition du milieu de base mais sans agar), la croissance de ces souches a été suivie par mesure de la densité optique à 580_{nm}.

VI- Réalisation d'une co-culture définie entre *Thiobacillus* et BSR

Dans un premier temps, la souche pure DZ a été cultivée sur un milieu anaérobie contenant 10 mM de lactate, 20mM de sulfate, sans extrait de levure, sans rézasurine. L'incubation a été faite à 35°C et la croissance de la souche DZ a été suivie par dosage des sulfures à 480_{nm}. Au moment où la souche DZ atteint le plateau (maximum de sulfures produits) on ajoute au milieu le *Thiobacillus* souche DA3 aérobie isolée dans notre travail. La quantité d'oxygène injecté est 93 μmol . Les cocultures ont été incubées à 35°C. La croissance de la coculture a été suivie par l'évolution des sulfures dans le milieu de culture.

Chapitre 3- RESULTATS ET DISCUSSION

IV- Etude des bactéries productrices de sulfures (BSR)

1- Dénombrement des BSR dans les boues des digesteurs anaérobies A et B

Les pH des deux échantillons de boues ont été mesurés au laboratoire et ont révélé des pH proches de la neutralité (7,3 pour DA et de 7,4 pour DB) compatibles avec les pH appliqués dans la digestion anaérobie des boues par la station. Des observations microscopiques à l'état frais ont révélé la présence d'une flore abondante et variée.

Après 4 semaines d'incubation à 35°C, les tubes de culture pour BSR (série de dilutions) inoculés à partir des échantillons de boues, deviennent troubles indiquant une croissance bactérienne. Cependant, vu que le milieu utilisé n'est pas sélectif, d'autres bactéries anaérobies peuvent s'y développer. Aussi, nous nous sommes basé sur la production des sulfures comme critère propre aux BSR (Tableau 7).

Tableau 7 - Nombre de bactéries sulfato-réductrices dans les deux digesteurs A et B

Il est important de noter que le nombre de BSR est approximativement 10^3 fois plus important dans le digesteur B que celui trouvé dans le digesteur A. Aussi, si le traitement au chlorure de fer, pratiqué par certaines stations, peut momentanément diminuer la concentration des sulfures dans le biogaz, son ajout dans les digesteurs augmente le nombre des bactéries qui en produisent, les BSR. En effet, le chlorure de fer est un des oligoéléments nécessaire à la croissance de ces bactéries (voir composition de milieu de culture pour BSR).

Le **tableau 8**, montre les quantités de sulfures quantifiées pendant deux périodes différentes dans chaque dilution ayant servi au dénombrement des BSR. On remarque une production de sulfures généralement plus élevée dans le digesteur B par rapport au digesteur A ainsi qu'une baisse remarquable de sulfures après seulement deux jours d'incubation supplémentaires. D'où trois questions fondamentales : 1) Y a-t-il eu une erreur de dosage des sulfures malgré la simplicité de la méthode utilisée ? 2) Y a-t-il une dégradation chimique et/ou précipitation des sulfures ? 3) Y a-t-il des microorganismes anaérobies autres que les BSR (aucune souche connue, n'utilise les sulfures comme substrat) utilisatrices des sulfures comme source d'énergie ?

Tableau 8 - Production de sulfures dans les deux digesteurs A et B

Vu que nous avons aussi quantifié et isolé des *Thiobacillus* (voir plus bas) en aérobiose des mêmes fermenteurs, il est probable que la consommation des sulfures enregistrée soit due à ces microorganismes. Pour étayer cette hypothèse, nous avons testés l'effet de l'oxygène (microaérophilie) sur la croissance, la production et la consommation des sulfures par des tubes d'enrichissement de BSR sélectionnés des deux digesteurs (A et B).

2- Effet de l'oxygène sur la croissance des BSR

L'oxygène a été choisi par souci de gain de temps vu que les processus anaérobies sont généralement lents. En effet, nous aurions pu utiliser les nitrates à la place de l'oxygène pour démontrer l'existence des *Thiobacillus* anaérobies facultatifs. La **Figure 20** présente l'évolution de la biomasse, exprimée en DO, à différentes concentrations en oxygène dans deux enrichissements (cultures mixtes indéfinie) provenant des digesteurs A et B. Il est à noter que ce qui est recherché dans ces expériences est une estimation de la densité microbienne au sein de la culture mixte indéfinie sous l'influence de l'oxygène. Le calcul des taux de croissance n'était pas nécessaire pour valider notre hypothèse. Il aurait son sens physiologique si on étudiait des cultures pures (voir paragraphe cocultures).

Figure 20 - Evolution de la biomasse des BSR en présence de lactate (10mM) et sulfate (20mM) dans les enrichissements anaérobies à partir des deux digesteurs A (1b) et B (2b)

Plusieurs constatations : i) Inexistence de phase de latence indiquant une bonne adaptation des microorganismes sélectionnés dans les enrichissements ; ii) Croissance bactérienne aussi bien en absence qu'en présence d'oxygène dans les deux digesteurs (A et B). Cependant, d'après ces résultats, deux groupes de microorganismes se dégagent dans le digesteur B en fonction de la concentration en oxygène. En effet, des observations microscopiques des deux enrichissements ont montré la présence de deux types bactériens dominants très différents sur le plan morphologique. Des petits vibrio (bacilles incurvés) très mobiles ont été observés dans les digesteurs **A et B** et d'autres vibrio plus grands et immobiles ont été observés uniquement

dans le digesteur A.; iii) Il semble que les BSR partenaires des enrichissements B soient plus sensibles à l'oxygène que ceux des enrichissements A (**Figure 21**). En effet, on remarque que la production de sulfures est importante à faibles concentrations d'oxygène, mais plus la concentration en O₂ augmente (>3,75 µmol O₂) plus la quantité de sulfures diminue.

Figure 21 - Production du sulfure (**1a** et **2a**) par les enrichissements anaérobies des BSR obtenues à partir de deux digesteurs A et B en présence de différentes concentrations d'oxygène.

Et par conséquent, soit les BSR sont inhibées par l'oxygène et donc la production des sulfures diminue au fur et à mesure que la concentration d'oxygène augmente, soit les sulfures sont consommés par des BSO anaérobies facultatives en présence d'oxygène. De plus, il a été démontré que les BSR bien qu'elles soient anaérobies strictes elles peuvent survivre à l'O₂ pendant quelques jours (Chamkh, 2011). Elles manifestent une tolérance à l'O₂ qui n'existe pas chez les autres bactéries anaérobies strictes. En effet, les BSR possèdent des enzymes telles que la catalase et la superoxyde-dismutase, qui sont impliquées dans la dégradation des métabolites cytotoxiques de l'oxygène (Dolla et Fournier, 2006).

3- Isolement et purification des BSR

Après une période d'incubation de 1 mois à 35°C, une colonie de couleur brune bien isolée a été obtenue à partir du digesteur A, et repiquée sur milieu liquide pour BSR contenant 10mM de lactate et 20 mM de sulfate. La pureté de la souche a été contrôlée par repiquage sur un milieu riche, sans sulfate, sans lactate, contenant du glucose (1%), du biotrypcase (1%), de l'extrait de levure (5%).

L'**observation au microscope optique** d'une souche nommée DZ, a montré la présence d'un seul type de bactéries identiques sur le plan morphologique qui sont tous des **petits vibrio allongés mobiles**. Le fait de constater que cette souche est capable de se développer sur un milieu contenant du lactate indique qu'il s'agit d'une **chiomioorganotrophe**.

4- Caractérisation partielle de la BSR souche DZ

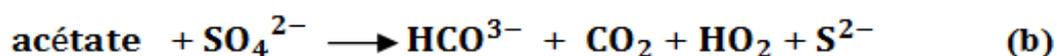
4.1- Caractéristiques morphologiques

D'après l'observation au microscope à contraste de phase, la souche DZ se présente sous la forme d'un vibrio (Figure 22), mobile. La coloration de Gram indique qu'il s'agit d'un Gram négatif.

Figure 22 - Microscopie à contraste de phase (x1000) de la souche DZ cultivée sur lactate comme source d'énergie et de carbone en présence de sulfate

4.2- Accepteurs d'électrons

Nous nous sommes limités dans ce paragraphe à déterminer les différents accepteurs terminaux d'électrons, autres que le sulfate, par la souche DZ. Le but étant de démontrer que les sulfures peuvent provenir d'autres composés soufrés. Il est à rappeler que l'oxydation du lactate par la souche DZ est accompagnée d'une production de sulfures selon la réaction suivante (Peck, 1993):



En présence de lactate comme source d'énergie, le test d'accepteurs d'électrons montre que le sulfate, les sulfites (5mM et 10mM), le thiosulfate (20mM) et le soufre élémentaire, peuvent être utilisés comme accepteurs d'électrons par la souche DZ. En effet une bonne croissance et une production importante de sulfures ont été obtenues avec ces composés soufrés (Tableau 9).

Tableau 9- Accepteurs d'électrons testés pour la souche DZ en présence de 10 mM lactate comme substrat, après une période d'incubation d'une semaine à 35°C

*, a été mis dans le milieu à une concentration de 10 g/l.

4.3- Etude du caractère anaérobie de la souche DZ

La **figure 23** montre la corrélation entre la croissance de la souche DZ en **anaérobiose** et la production de sulfures. Une croissance importante s'accompagne d'une production des sulfures en quantité importante.

Figure 23- Croissance et production des sulfures par la BSR souche DZ cultivée sur le lactate comme source d'énergie et carbone et le sulfate comme accepteur d'électrons en **anaérobiose**.

La souche DZ a été cultivée sur milieu de culture liquide en **aérobiose**, contenant 10mM de lactate, 20mM de sulfate. Sa croissance a été contrôlée par mesure de la DO 580nm et par dosage des sulfures (**Figure 24**).

Figure 24 - Cinétique de production des sulfures par la souche DZ cultivée sur milieu **aérobiose** en présence du 10mM de lactate et 20mM de sulfates et évolution de la biomasse (DO 580 nm) et du pH

D'après la **figure 24**, la DO n'augmente pas, la souche DZ est incapable de croître en présence d'O₂ (Air). Notons que la très légère augmentation de DO enregistrée au bout de 50 heures mais qui se stabilise pendant toute l'expérience, ne peut être attribuée qu'à l'allongement des cellules. Cet allongement est confirmé par l'observation au microscope. De même qu'on ne note pas de production de sulfures et pas de changement du pH. Cela indique une absence de toute activité physiologique de la bactérie. En comparant la production de sulfures en anaérobiose (**Figure 23**) avec celle produite en aérobiose (**Figure 24**) on peut conclure que la *Desulfovibrio sp* souche DZ est une **anaérobiose strict** bien adaptée aux conditions anaérobies du digesteur des boues d'où elle a été isolée.

L'allongement des cellules a été également observé chez *Desulfovibrio aerotolerans* (Mogensen, 2005) et *Desulfovibrio marrakechensis* ; (Chamkh, 2011) qui pourrait être lié au stress exercé par l'O₂. Il a été démontré en outre que les BSR bien qu'elles soient anaérobies strictes elles peuvent survivre à l'O₂ pendant quelques jours (Chamkh, 2011). Elles manifestent une tolérance à l'O₂ qui n'existe pas chez les autres bactéries anaérobies strictes. En effet, les BSR possèdent des enzymes telles que la catalase et la superoxyde-dismutase,

qui sont impliquées dans la dégradation des métabolites cytotoxiques de l'oxygène (Dolla et Fournier, 2006).

Compte tenu donc de la morphologie de la souche DZ **anaérobie stricte** qui se présente sous la forme d'un vibrio allongé, mobile, Gram négatif, et des résultats partiels des caractéristiques physiologiques (oxydation du lactate en acétate et sulfate, sulfite, thiosulfate comme accepteurs terminaux d'électrons), on peut dire qu'il est plus que probable que la souche DZ appartienne au genre *Desulfovibrio*. Des études phylogénétiques sont en cours avec nos partenaires pour confirmer cette hypothèse.

5- Détermination des seuils de tolérance de *Desulfovibrio sp* souche DZ vis-à-vis de l'oxygène

En vue d'établir des cocultures entre *Desulfovibrio sp* souche DZ et une souche de *Thiobacillus*, isolé du même digesteur (voir plus bas), nous étions amenées à déterminer la concentration d'oxygène minimale permettant aussi bien une croissance mesurable et une production de sulfures maximales. Pour cela, la souche a été cultivée en anaérobiose stricte sans rézasurine ni réducteur (HCL-Cystéine) et en y injectant différentes concentrations d'oxygène dans la phase gazeuse. Il est important de préciser que nous avons travaillé à pression constante dans tous les flacons pénicilline (**Figure 25**).

Figure 25 - Productions des sulfures et évolution de la biomasse de la souche DZ en présence de différentes concentrations d'oxygène.

D'après la **Figure 25**, on constate que ce n'est qu'à la concentration de **93 μmolO_2** qu'on observe une croissance bactérienne et une production maximale de sulfures. On peut conclure que *Desulfovibrio sp* souche DZ est une anaérobie stricte mais pouvant tolérer l'oxygène jusqu'à une teneur de **93 μmolO_2** . Ce qui explique la présence de cette souche dans le digesteur anaérobie où existent toujours des microniches aérobies vu sa conception même. Cependant, la teneur maximale de sulfures produits en présence de **93 μmolO_2** qui est de 4,3 mM (**Figure 25**) demeure plus faible que celle produite en anaérobiose stricte qui est de 5,67 mM (voir **Figure 23**).

V- Recherche de *Thiobacillus* dans les boues des digesteurs anaérobies

1- Dénombrement des BSO au sein des digesteurs anaérobies A et B

Les boues des digesteurs A et B ont été cultivées sur milieu solide pour *Thiobacillus*. Notons que les milieux de cultures utilisés dans notre étude ont un pH neutre (7,2) pour être dans le même pH que celui des digesteurs A et B qui sont respectivement de 7,3 et 7,4.

Tableau 10 – Nombre d'Unités Formant colonie par ml de bactéries sulfoxydantes dans les digesteurs A et B

Le même nombre de cellules viables est observée dans les deux échantillons de boues du DA et DB. Etant donné que le milieu de culture est un milieu minérale contenant le thiosulfate comme seule source d'énergie et le bicarbonate comme seule source de carbone, on peut en déduire qu'il s'agit bien de bactéries sulfo-oxydantes provenant des deux digesteurs anaérobies.

Par contre le nombre de ces bactéries sulfo-oxydantes est nettement inférieur à celui des BSR qui rappelons-le est de $6,5 \cdot 10^5$ bactérie/ml pour DA et $4 \cdot 10^8$ bactérie/ml pour DB (**Tableau 7**). Ceci indique clairement que les conditions dans les deux digesteurs sont nettement plus favorables au développement des BSR et donc à la production de sulfures retrouvés dans le biogaz produit.

2- Etude de la diversité des BSO

2.1- Examen macroscopique

La **Figure 26**, illustre les colonies des bactéries sulfo-oxydantes obtenues après une semaine d'incubation.

Figure 26 - Aspect macroscopique des colonies isolées du digesteur A (SMA) et du Digesteur B (SMB)

La description morphologique des colonies isolées de DA et DB est donnée respectivement dans les **Tableaux 11** et **12**.

Tableau 11- Aspect des isolats de bactéries sulfoxydantes dans la boue DA

Tableau 12- Aspect des isolats de bactéries sulfo-oxydantes dans la boue DB

2.2- Examen microscopique

Les colonies morphologiquement différentes (**Tableaux 11 et 12**) ont été repiquées sur un même milieu de culture neuf, pour avoir des souches pures. Après incubation, seule les souches DA3, DB1 et DB2 se sont développées (**Figure 27**).

Figure 27- Isolat DB1 après purification

Tableau 13- Examen microscopique des isolats purs de bactéries sulfo-oxydantes des digesteurs

D'après les examens microscopiques, seul l'isolat DA3 présente la même morphologie microscopique que celle du genre *Thiobacillus* qui est, rappelons-le, un bacille à Gram négatif. Tous les autres isolats sont des bactéries sulfo-oxydantes mais n'appartenant pas au Genre *Thiobacillus*.

3- Etude du caractère chimiolithotrophe des isolats de BSO

Les souches de bactéries sulfo-oxydantes ont été repiquées sur le même milieu pour *Thiobacillus* mais sans gélose (milieu liquide) et sans substrat (Thiosulfate), mais contenant du glucose, de l'extrait de levure, et du biotrypcase. Après 2 jours d'incubation, les tubes présentant un trouble (**Figure 28**) indiquent qu'il y a croissance.

Figure 28 : Culture des isolats de bactéries sulfo-oxydantes des digesteurs A et B sur milieu riche

Les souches DA3, DB2 et DB1 n'ont pas poussées sur le milieu riche contenant le glucose, on peut donc dire qu'il s'agit de *Thiobacillus* chimiolithotrophes obligatoires qui ne peuvent tirer leurs énergie qu'à partir de substances inorganiques réduites (le thiosulfate, sulfures ...).

En se basant sur la description des *Thiobacillus* réalisé par Schlegel (1988), nos isolats de *Thiobacillus* se rapprocheraient plus de *Thiobacillus thioparus* et de *Thiobacillus denitrificans* qui sont tous deux des chimiolithotrophes obligatoires neutrophiles.

4- Cinétique de croissance des isolats de *Thiobacillus*

Les isolats DA3, DB1, DB2 ont été repiqués sur un milieu de culture aérobie pour *Thiobacillus*, contenant le thiosulfate comme source d'énergie et le bicarbonate comme source de carbone, à pH 7,2. La croissance des souches a été suivie par mesure de la densité optique à 580 nm (**Figure 29**).

Figure 29 - Cinétique de croissance des isolats de *Thiobacillus* (DA3, DB1, DB2) en présence de thiosulfate comme seule source d'énergie.

D'après la **Figure 29**, l'isolat DA3 se développe plus rapidement, avec un taux de croissance de $0,1 \text{ h}^{-1}$, que des deux autres isolats DB1 et DB2 montrant un taux de croissance respectif de $0,004 \text{ h}^{-1}$ et $0,002 \text{ h}^{-1}$. Le taux de croissance de $0,1 \text{ h}^{-1}$ de DA3 est proche de celui retrouvé dans la littérature chez certains *Thiobacillus* tel que *Thiobacillus ferrooxidans* (Godard, 1987)

Par ailleurs, on remarque qu'après un certain temps, la croissance baisse pour les trois isolats suite à l'épuisement du substrat (thiosulfate) consommé.

De ces trois isolats de *Thiobacillus* DA3, DB1 et DB2 isolées à partir des deux digesteurs A et B, nous n'avons retenu pour la suite de notre étude que DA3 qui présente la plus forte croissance sur le milieu minérale avec le thiosulfate comme seule source d'énergie.

VI- Coculture de *Thiobacillus* aérobie souche DA3 et de la BSR anaérobie souche DZ

Il nous a paru intéressant de cultiver la bactérie sulfato-réductrice souche DZ anaérobie stricte pouvant tolérée jusqu'à $93\mu\text{mol d'O}_2$, isolée dans notre étude, en présence du *Thiobacillus* DA3 aérobie. Pour cela, nous avons dans un premier temps lancé la culture de DZ sur le milieu pour BSR en anaérobie strict jusqu'à ce qu'il y ait une production maximale de sulfure. A ce moment-là, nous avons inoculé le milieu avec la souche DA3 et ajouté 10 ml d'air pour permettre à cette dernière de se développer (**Figure 30**).

Figure 30 - Evolution des sulfures dans la coculture DZ+DA3

Pour une meilleure interprétation de la courbe nous l'avons subdivisée en plusieurs phases :

Phase a : Au départ on observe une production importante des sulfures par la souche DZ jusqu'à un plateau où il y a le maximum de sulfures produits (5mM)

Phase b : Après ajout de la souche DA3 et des 10ml d'air ($93\mu\text{mol O}_2$) nous constatons instantanément une légère chute du sulfure due à l'effet de dilution apporté par l'inoculum DA3.

Phase c : La quantité des sulfures diminue fortement. Cette diminution ne peut être due qu'à la consommation des sulfures par la souche DA3.

Phase d : La quantité de sulfure se stabilise suite à une stagnation de la croissance de DA3 probablement due à un épuisement d'oxygène. C'est la raison pour laquelle nous avons injecté à nouveau 10 ml d'air.

Phase e : On constate durant cette phase une rediminution des sulfures correspondant à une relance de la croissance de DA3.

Cette expérience montre qu'il est possible que les sulfures produits par la BSR souche DZ soient dégradés par *Thiobacillus* souche DA3. La consommation des sulfures reste tributaire de la concentration d'oxygène. Dans notre expérience nous avons ajouté deux fois $93\mu\text{mol O}_2$ ($=186\mu\text{mol O}_2$). Or à cette concentration en oxygène, nous avons montré que la souche DZ est inactive (Voir **figure 25**). Aussi, des travaux de recherche sur l'effet des paramètres opérationnels sur la coexistence des BSR et des *Thiobacillus* en fermenteur sont en cours au sein de l'équipe EMA, selon la méthode décrite par (Ende et al. 1997).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Une des principales problématiques des digesteurs anaérobies des stations de traitement des eaux usées concerne l'émission du sulfure d'hydrogène que l'on retrouve dans le biogaz produit comme source d'énergie. L'hydrogène sulfuré est dangereux pour la santé, il participe aux mauvaises odeurs et il est également corrosif pouvant ainsi endommager les installations de la STEP. Aussi, l'idée de notre travail a été d'étudier au sein même des digesteurs anaérobies les bactéries productrices de l'H₂S et celles qui ont la capacité de les consommer.

Ainsi, il a été mis en évidence dans les digesteurs anaérobies la présence d'une biomasse importante de bactéries sulfato-réductrices (6,5.10⁵ BSR/ml de boue dans le digesteur A et 4.10⁸ BSR/ml de boue dans le digesteur B). Les essais que nous avons menés dans les tubes ont montré une relation étroite entre la croissance de ces BSR en anaérobiose et la quantité de sulfure produit. Nous avons isolé l'une d'elle, retrouvée en grand nombre, et l'avons caractérisée, il s'agit d'un *Desulfovibrio sp* anaérobie strict que l'on a nommée DZ qui est capable de réduire le sulfate, le sulfite, le thiosulfate et le soufre élémentaire en sulfure d'hydrogène, et de croître en présence de 93 µmole d'O₂. Cette tolérance à l'O₂ est favorable à l'idée d'établir une coculture de cette souche DZ avec une bactérie sulfo-oxydante aérobie.

Cette étude a montré l'existence au sein même des digesteurs anaérobies de bactéries sulfo-oxydantes (BSO) aérobies. Leur nombre (2,2 à 2,3 10² UFC/ml) est relativement plus faible que celle des BSR. Parmi ces BSO, nous avons retenu une souche appartenant au genre *Thiobacillus* capable d'oxyder les sulfures pour la co-cultiver en présence la BSR souche DZ.

La coculture a montré qu'il est possible que les sulfures produits par la BSR souche DZ soient dégradés par *Thiobacillus* souche DA3. Mais cette consommation de sulfures a nécessité une certaine concentration en O₂ (186 µmole d'O₂) qui dépasse la concentration toléré par la BSR.

Aussi, des travaux de recherche sur la mise en place de cocultures stables en fermenteur où l'apport en O₂ est contrôlé, sont en cours au sein de l'équipe EMA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aroca G., Urrutia H., Nunez D., Oyarzun P., Arancibia A., Gierrero K. (2007)** Comparison on the removal of hydrogen sulfide in biotrickling filters inoculate with *Thiobacillusthioparus* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Electronic Journal of Biotechnology* <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue4/full/6/index.html> .
- Bisson A.K., Duchêne M. L., Ghillebaert F., Guillard D., Tack K. (2011)** Sulfure d'hydrogène, INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.
- Boulinguez B. (2010)** Procédé d'adsorption et régénération électrothermique sur textile de carbone activé - Une solution pour la problématique des COV dans des gaz à fort potentiel énergétique. Thèse de Doctorat de l'Université de Rennes I. 271p.
- Cha J.M., Cha W.S., Lee J.H. (1999)** Removal of organo-sulfur odour compounds by *Thiobacillus novellus* SRM, sulfuroxidizing microorganism. *Process Biochemistry*, **34**, (6-7), 659-665.
- Chamkh F., Sproer C., Lemos PC., Besson S., El Asli AG., Bennisse R., Labat M., Reis M., Qatibi AI. (2009)** *Desulfovibrio marrakechensis* sp. nov., a 1,4-tyrosol-oxidizing, sulphate-reducing bacterium isolated from olive mill wastewaters by a natural evaporation process. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59**: 936-942.
- Chamkh F. (2011)** Biodégradation anaérobie et valorisation de deux effluents oléicoles marocaines riche en aromatiques, les margines et les saumures d'olives en condition sulfato-réductrices. Thèse de l'Université CaddiAyyad. 205p.
- Chung Y-C., Huang C., Tseng C-P. (1997)** Removal of hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus* sp. strain CH11 in a biofilter. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **69**, (1), 58-62.
- Caumette P. (1985)** Développement des bactéries phototrophes et des bactéries sulfato-réductrices dans les lagunes peu profondes et des lagunes stratifiées, étude de leur rôle dans le cycle du soufre et dans la production de biomasse. Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix Marseille.
- Dolla A., Fournier M., Dermoun Z. (2006)** Oxygen defense in sulphate-reducing bacteria. *Journal Biotechnology*, **67**, 87-100.
- Ende F.V., D. Meier.J and Gernerden H.V. (1997)** Syntrophic growth of sulfate-reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxygen limitation. *FEMS Microbiology Ecology* p. 65-80.
- Friedrich C.G. (1998)** Physiology and Genetics of sulfur-oxidizing Bacteria, *Advances Microbial Physiology*, **39**, 235-289.
- Godard F. (1987)** *Cinétique d'oxydation du fer ferreux par thiobacillusferrooxidans en culture libre et en biofilm*. Mémoire de l'Université de Montréal, École Polytechnique, 152 p.

- Hungate R.E. (1969)** A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* **163**, 194-198.
- Jardé E. (2002)** Composition organique de boues résiduaires de stations d'épuration Lorraines : Caractérisation moléculaires et effets de la biodégradation. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, 267p.
- Loubinoux J. (2001)** Les bactéries sulfato-réductrices : caractérisation et pouvoir pathogène. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré-Nancy I, 144p.
- Loubinoux J., Bisson-Boutelliez C., Miller N., Le Faou A.E. (2002)** Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets. *Molecular Oral Microbiology*, **17**, 321-323.
- Mogensen G.L., K.U. Kjeldsen and K. Ingvorsen. 2005.** *Desulfovibrio aerotolerans* sp. nov., an oxygen tolerant sulphate-reducing bacterium isolated from activated sludge. *Anaerobe*. **11**: 339-349.
- Moletta R. (2014)** La méthanisation. Lavoisier (27ème Edition) 552p.
- Namgung H. K., Ahn Y. H., Song J. (2012)** Development of two-phase bioreactor for the biological removal of hydrogen sulfide from biogas. *Energy Procedia* **14**, 1143-1148.
- Oyarzun P., Arancibia F., Canales C., Aroca G. (2003)** Biofiltration of high concentration of hydrogen sulfide using *Thiobacillus thiooxidans*. *Process Biochemistry*, **39**(2), 165-170.
- Peck Jr H.D. (1993)** Bioenergetic strategies of the sulfate-reducing bacteria. In: Odom J.M., Rivers Singleton (Eds.), *The sulfate-Reducing bacteria: Contemporary perspectives*. Springer-verlag, pp 41-76.
- Peu P. (2011)** La gestion des effluents d'élevage et la production d'hydrogène sulfuré, cas particulier de la méthanisation. Thèse de Doctorat de l'Université de Rennes 1, 153p.
- Peu P., Picard S., Diara A., Girault R., Béline F., Bridoux G. (2012)** Prediction of hydrogen sulphide production during anaerobic digestion of organic substrates. *Bioresource Technology*, **121**, 419-424.
- Postgate R.J. (1984)** *The Sulphate Reducing Bacteria* (2nd Edn.) Cambridge University Press.
- Prescott M. P. (2003)** *Microbiology* (5th édition) New York, Canada.
- Qatibi A. (1986)** Isolement et caractérisation partielle de deux souches méthanogènes thermophiles. Mémoire ORSTOM de DEA., Université de d'Aix-Marseille I, France. 44 pages.
- Ramirez M., Gomez J. M., Aroca G., Cantero D. (2009)** Removal of hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus thiooxidans* in a biotrickling filter packed with polyurethane foam. *Bioresource Technology* **100**, 4989-4995.
- Rattanapan C., Ounsaneha W. (2011)** Removal of Hydrogen Sulfide Gas using Biofiltration. *Walailak Journal of Science*, 9-18.
- Schlegel H.G. (1988)** *General microbiology* (Sixth Edition Cambridge University Press), 530p.

Soupramanien A. (2012) Traitement d'effluents gazeux malodorants issus du secteur industriel du traitement des déchets par voie biologique. Thèse de l'Université Nantes Angers Le Mans,

Sublette K. L., Sylvester N. D. (1987) Oxidation of hydrogensulfide by *Thiobacillusdenitrificans*: desulfurization of naturalgas. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, (2), 249-257.

Zhao Q., Leonhardt E., MacConnell C., Frear C., Chen S. (2010) Purification Technologies for Biogas Generated by Anaerobic Digestion. CSANR Research Report.