

Caractérisation partielle d'une nouvelle bactérie sulfato-réductrice isolée d'un bassin traitant des eaux oléicoles de la région de la région semi-aride de Marrakech par évaporation naturelle

Partial characterization of a new sulphate-reducing bacterium isolated from a basin treating olive-growing water of the semi-arid area of Marrakech by natural evaporation

F. CHAMKH, **H. HANINE**¹², **J. LORQUIN**³, **M. LABAT**³, **J.L. THOLOZAN**³ & **A.I. QATIBI**^{1*}

¹ Laboratoire de Génie Microbiologique. B.P. 549, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cadi Ayyad, 40000 Marrakech Maroc ;

² Laboratoire de Biochimie appliquée, de microbiologie, hygiène et sécurité alimentaire, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal Maroc.

³ Biotechnologie microbienne des environnements chauds UR180, IRD, IFR-BAIM, Universités de Provence et de la Méditerranée, ESIL, case 925, 163, Avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France

**Auteur pour correspondance : Laboratoire de Génie Microbiologique, Faculté des Sciences & Techniques-Guéliz, Université Caddi Ayyad Courriel : qatibi@fstg-marrakech.ac.ma*

Remerciements

Ce travail a été soutenu par le ministère marocain de la recherche scientifique et de la formation des cadres (projet PROTARS III n° D14/15) et par la convention de coopération CNRST, Maroc/ ICCTI, Portugal (projet n°804-06/CNR).

Résumé

Le présent papier traite de la caractérisation partielle d'une nouvelle bactérie sulfato-réductrice (BSR), souche EMSSDQ4 isolée d'un bassin traitant un mélange de margines et d'eaux de saumures d'olive de bouche de la région de Marrakech par évaporation naturelle. La souche EMSSDQ4 est un bâtonnet Gram-négatif, non mobile

capable d'utiliser comme sources d'énergie et de carbone, en présence de sulfate, comme accepteur terminal d'électrons, le lactate, le malate, le pyruvate, le fumarate le 1,4-tyrosol, l'éthanol, le 2-methoxyéthanol et d'autres alcools. En présence de lactate comme donneur d'électrons, le sulfate, sulfite, thiosulfate et le soufre élémentaire sont réduits en sulfures. Le nitrate et le nitrite ne sont pas utilisés par la souche comme accepteurs terminaux d'électrons. Des études de taxonomie moléculaire (RNA 16S) ont montré que la souche EMSSDQ4 appartient au genre *Desulfovibrio* dans la sous-classe δ des *Proteobacteria*. La séquence du RNA 16 S de la souche EMSSDQ4 a révélé en outre qu'elle proche de *Desulfovibrio alcoholivorans* et *Desulfovibrio fructosivorans* avec 96.09 % de similarité. Sur les plans physiologique et nutritionnelle, la souche EMSSDQ4 présente également des caractéristiques suffisamment différentes pour la proposer ultérieurement pour publication dans une revue internationale en tant qu'une nouvelle espèce du genre *Desulfovibrio*.

Mots clés : anaérobiose, bactéries sulfato-réductrices, *Desulfovibrio sp.*, eaux oléicoles, physiologie, taxonomie moléculaire.

Summary :

This paper treats characterization partial of a new sulphate-reducing bacterium (BSR), strain EMSSDQ4 isolated from a pond treating a mixture of olive oil milland olive brine wastewaters from the semi-arid area of Marrakech by natural evaporation. Strain EMSSDQ₄^T is a Gram-negative rod, non mobile able to use as sources of energy and carbon, in the presence of sulphate as terminal electrons acceptor, lactate, malate, pyruvate, fumarate, 1,4-tyrosol, ethanol, 2-methoxyethanol and various others alcohols as substrate. In the presence of lactate as electrons donor, sulphate, sulphite, thiosulphate and elemental sulphur were used as terminal electrons acceptors. Nitrate or nitrite not. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences revealed that strain EMSSDQ₄^T was a

member of the genus *Desulfovibrio* with *D. alcoholivorans*, *D. fructosivorans* and *D. carbinolicus* being its closest relatives among validly described species. On the basis of genotypic and phenotypic characteristics, strain EMSSDQ4 will be proposed in next publication as the type strain of a new species, *Desulfovibrios* sp. nov.

Key words : anaerobiosis, *Desulfovibrio* sp., olive-growing wastewaters, phylogeny, physiology, Sulphate-reducing bacteria

Introduction

Les eaux oléicoles telles que les margines sont riches en matière organique qui renferme différentes substances phénoliques, des composants azotés (acides aminés), acides organiques, sucres, tanins, pectines, caroténoïdes, restes d'huile et tous les composants hydrosolubles des olives (Balice *et al.* 1982). Ces charges de polluants organiques constituent une demande biologique en oxygène (DBO) de l'ordre de 100 kg / m³ et une demande chimique en oxygène (DCO) de 220 kg / m³ (Balice et Cera, 1984). La composition des margines en phénols diffère selon la variété d'olive triturée et la procédure d'extraction. Parmi ces composés, on trouve en majorité, le 3, 4-dihydroxyphenylethanol, le catéchol, l'acide caféique, l'acide coumarique et l'acide ferulique. D'autres composés aromatiques tels que le 4-methylcatechol, le catéchine, les composés flavonoïques, l'acide trans-cinnamique, et l'acide syringique sont également détectés (El Hadrami *et al.* 2004). A côté des phénols, on trouve également la catécholamine ou pigment brun, qui est un polymère de nature phénolique qui ne se trouve pas dans les olives. Il se forme pendant le broyage des olives à partir des orthodiphénols qui sont très abondants dans la pulpe, sous l'action des phénoloxydases (Ranalli, 1991).

Le traitement des margines constitue un problème complexe. En effet, ces

effluents ne peuvent être traités en une seule étape vu la quantité et la qualité des substances chimiques qu'ils renferment. Les systèmes de traitement existant peuvent être classés en procédés physiques, physico-chimiques et biologiques. Les systèmes biologiques sont subdivisés en processus aérobies et anaérobies. Le choix du système de traitement approprié est lié à plusieurs facteurs locaux, à savoir le système utilisé pour l'extraction d'huile, la possibilité de stockage et le rapport entre la charge produite par les huileries et la population locale (Francesco, 1993).

Néanmoins, parmi les techniques biologiques les plus "réalistes", proposées pour épurer les margines, on peut citer la boue activée et la digestion anaérobie (biométhanisation) (Hamdi, 1996 ; Niaounakis et Halvadakis, 2004). En effet, d'un point de vue économique, la dernière technique peut être considérée actuellement comme la meilleure voie de dépollution biologique puisqu'elle permet le contrôle de la pollution et produit du biogaz avec un potentiel énergétique directement utilisable. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas d'études sur le rôle des bactéries sulfato-réductrices (BSR) (compétiteurs des bactéries méthanogènes pour des substrats tels que l'hydrogène et l'acétate) dans le processus de biométhanisation des margines. Ainsi, nous apportons la preuve de l'existence des BSR dans les margines d'un bassin traitant par évaporation naturelle d'un mélange de margines et de saumures d'olive de bouche en décrivant partiellement une BSR que nous avons isolé de ce nouveau biotope.

Matériel et Méthodes

Les prélèvements ont été effectués au niveau d'un bassin d'évaporation d'une "mâasra" semi-industrielle, située au point N 31°38'52" et W 0.07°54'7.3" au Nord ouest à 10 Km de la ville de Marrakech, sur la route de Fès (Fig.1) (Chamkh, 2004).



Figure.1. Bassin d'évaporation recevant les eaux oléicoles (mélange de margines et de saumures) (Flèche : point de prélèvement)

La souche EMSSDQ4 a été isolée et cultivée en condition sulfato-réductrice comme précédemment décrit (Qatibi *et al.* 1991). La préparation du milieu de culture a été réalisée selon les techniques décrites par Hungate (1969), et développées par Miller et Wolin (1974), puis par Balch et Wolfe (1976). L'enrichissement et l'isolement de la souche EMSSDQ4 a été réalisé sur 10 mM lactate comme donneur d'électrons en présence de 20 mM sulfate comme accepteur terminal d'électrons, à une température d'incubation de 37°C. Les isolements des colonies ont été réalisés par la méthode des "roll tubes" (Hungate, 1969). Afin d'obtenir une souche pure, ce procédé a été répété trois fois. La pureté de la souche a été contrôlée par repiquage sur un milieu riche contenant le glucose (1%), l'extrait de levure (1%) et la biotrypcase (1%) en l'absence de sulfate et par une observation microscopique. La croissance cellulaire a été suivie par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 580 nm et la production de sulfures a été estimée par la méthode décrite par Cord-Ruwisch (1985). La détermination des conditions optimales de croissance (pH, température et salinité) et les études phylogéniques ont été réalisées selon les techniques décrites par Mechichi (1999).

Résultats et Discussion

La souche EMSSDQ4 se présente sous la forme d'un bacille droit, Gram négatif non sporulant d'une longueur de 3 à 4 μm et d'un diamètre de 1,3 à 1,6 μm . Elle se présente seule ou en paire ; les spores n'ont jamais été observées (Fig.2).

A l'exception de *Desulfovibrio carbinolicus*, deux espèces du genre *Desulfovibrio* non mobiles décrites jusqu'à présent, et contrairement aux autres BSR du genre *Desulfovibrio*, la souche EMSSDQ4 est non mobile.



Figure 2 : Microscopie à contraste de phase (X 1000) de la souche EMSSDQ4, cultivée sur lactate comme substrat en présence de sulfate.

Les conditions optimales de croissance déterminées pour la souche EMSSDQ4 sont représentées dans le Tableau I. Elle se développe entre 20 et 50°C avec un taux de croissance maximale à 37°C de 0,3 h⁻¹. La souche est viable entre 0g/l et 30 g/l de sel ; l'optimum de croissance a été obtenu dans un milieu ne contenant pas de sel. La gamme de pH est de 6,5 à 8,5 avec un optimum de 7.

Les analyses phylogénétiques montrent que la souche EMSSDQ4 appartient au genre *Desulfovibrio* et elle est proche, mais différente, de *Desulfovibrio fructosovorans* et *Desulfovibrio alcoholovorans* avec une similarité de 96,09 % (Fig. 3). Il est donc fort

probable qu'elle constitue une nouvelle espèce. Cependant, des analyses complémentaires sont en cours pour le confirmer.

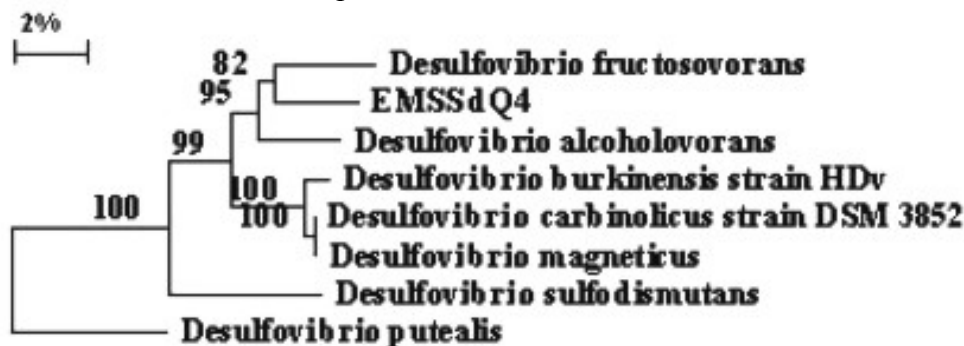


Figure 3. Arbre phylogénétique, réalisé sur 1450 paires de bases sans ambiguïté, de la souche EMSSDQ4.

Tableau I. Comparaison des caractéristiques de la souche EMSSDQ4 ; DA, *D. alcoholovorans* (Qatibi et al. 1991) ; DF, *D. fructosovorans* (Ollivier et al. 1988) et DC, *D. carbinolicus* (Nanninga et Gottschal, 1987)

Caractéristiques	EMSSDQ4	DA	DF	DC
Morphologie	bâtonnet droit	bâtonnet incurvé	bâtonnet incurvé	bâtonnet
Gram	négatif	négatif	négatif	négatif
Mobilité	-	+	+	-
Longueur (µm)	3-4	2,8-3,2	2,0-4,0	1,5-5,0
Diamètre (µm)	1,3-1,6	0,7-0,9	0,5-0,7	0,6-1,1
Gamme de température (°C)	20-50	20-42	20-45	5-44
Température optimale (°C)	37	35-37	35	37-38
Gamme de pH	6,5-8,5	5,5-8,5	nd	5,3-8,7
Optimum pH	7	7	6,5-7	7-7,3
Gamme de salinité (g/l)	0-35	0-20	0-40	nd
Optimum salinité (g/l)	0	5-10	0	0
G+C (%)	nd	64,5 +/- 0,3	64,13	65 +/- 1,0
Cyt c	nd	+	+	+
Désulfovirdine	nd	+	+	+

nd, non déterminé

Afin de caractériser physiologiquement la souche EMSSDQ4, différents substrats ont été testés (Tableau II).

En présence de sulfate comme accepteur terminal d'électrons, le lactate et le malate semblent être préférentiellement utilisés par la souche EMSSDQ4 en tant que source de carbone et d'énergie. En effet, une turbidité et production de sulfures appréciables sont observées. Elle n'utilise pas l'acétate comme toutes les BSR du genre *Desulfovibrio*. Une croissance moins importante a été observée en présence de pyruvate, fumarate et succinate.

Tableau II : Utilisation de substrats en présence et en absence de sulfate et des accepteurs d'électrons par la souche EMSSDQ4; DA, *D. alcoholovorans* (Qatibi et al. 1991) ; DF, *D. fructosovorans* (Ollivier et al. 1988) et DC. *D. carbinolicus* (Nanninga et Gottschal, 1987).

'Substrats'	EMSSDQ4	DA	DF	DC
<u>Donneurs d'électrons</u>				
Lactate	+	+	+	+
Pyruvate	(+)	+	+	+
Malate	+	+	+	+
Succinate	(+)	+		(+)
Fumarate	(+)	+	+	+
Acétate	-	-	-	-
Glycérol	-	+	+	+
1,3-propanediol	(+)	+	+	+
1,2-propanediol	(+)	+	-	-
Méthanol	-	(+)	-	+
Ethanol	+	+	(+)	+
2-méthoxyéthanol	+	nd	nd	nd
Propanol-1	+	+		+
Butanol-1	+	+	+	+
Glucose	-	-	-	-
Fructose	-	-	+	-
1,4-tyrosol	(+)	(+)* ^a	-*	-*
<u>Accepteurs d'électrons</u>				
Sulfate	+	+	+	+
Sulfite	+	+	+	+
Thiosulfate	+	+	+	+
Soufre élémentaire	+	+	+	(+)
Nitrate	-	-	-	-
Nitrite	-	nd	nd	-

nd, non déterminé ; *, ce travail (testé en présence de 0.05% d'extrait de levure) ; +, bonne croissance ; (+), faible croissance ; -, pas de croissance ; * a, moins bonne

croissance que la souche EMSSDQ4 . Les tests d'utilisation des différents donneurs et accepteurs d'électrons ont été déterminés à une concentration de 10 mM. Le méthanol a été testé en présence d'acétate (5mM) et le soufre à 1g l^{-1} . Parmi les substrats testés mais non utilisés en présence de sulfate (20mM) par la souche EMSSDQ4 on peut citer : choline (10mM), crotonate (10mM), extrait de levure(0,05%), biotrypcase (0,05%), casaminoacide (0,05%), L-serine (10mM), L-alanine (10mM), Benzoate (5mM), phénol (5mM), cinnamate (5 mM) et syringate (5 mM).

Contrairement au glycérol, une croissance faible a été observée avec les deux diols testés (1,2- et 1,3-propanediol). Par ailleurs, à l'exception du méthanol, la souche EMSSDQ4 utilise les alcools primaires testés (éthanol, butanol-1, propanol-1) avec une bonne croissance. Parmi les composés aromatiques testés, seul le 1,4- tyrosol (*p*-hydroxyphényléthanol) est utilisé par la souche EMSSDQ4. En présence du lactate comme source de carbone et d'énergie, le test d'accepteurs d'électrons montre, outre le sulfate, le sulfite, le thiosulfate et le soufre élémentaire peuvent être utilisés comme accepteurs d'électrons par la souche EMSSDQ4. En effet, une bonne croissance et une production importante de sulfures ont été obtenues avec ces composés soufrés. Ce travail de caractérisation est actuellement poursuivi pour notamment identifier les produits de dégradation des substrats testés.

Le présent travail a mis en évidence, pour la première fois, et sans équivoque la présence de BSR dans un bassin d'évaporation des eaux oléicoles dont les margines en isolant la première souche sulfato-réductrice de ce nouveau biotope, la souche type est la souche EMSSDQ4. Sa caractérisation physiologique partielle et les analyses phylogénétiques montrent que cette bactérie, semble être originale jamais décrite à ce jour. Elle est manifestement différente de *Desulfovibrio fructosovorans* et de *Desulfovibrio alcoholovorans*. Des études biochimiques (GC%, cytochromes et Desulfovirdine) sont en cours pour confirmer sa description en tant que nouvelle

espèce du genre *Desulfovibrio*.

Sur le plan écologique, la démonstration de l'existence de BSR dans un biotope recevant les margines où il y a des concentrations élevées en composés aromatiques, incite à en tenir compte dans les procédés de biométhanisation de ces effluents. En effet, ces bactéries peuvent entrer en compétition avec les bactéries méthanogènes productrices de méthane. Aussi, en plus de l'effet négatif des composés aromatiques sur la biométhanisation des margines, il faut ajouter celui des BSR en ce sens qu'ils peuvent constituer un second facteur d'inhibition de la méthanisation des margines. De plus, il serait également important d'étudier le rôle de BSR dans les processus de dégradation et ou transformation des composés aromatiques lors de la biométhanisation des effluents oléicoles. Il est enfin important de noter que l'absence de sulfate, par exemple, dans un biotope donné ne signifie pas l'absence de BSR (Qatibi *et al.* 2001).

Références bibliographiques

- Balch WE., et Wolfe RS. (1976):** New approach to the cultivation of methanogenic bacteria : 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressureized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 781-791.
- Balice V., Boari G., Cera O., et Abbaticchi P. (1982) :** Indagine analitica sulle acque di vegetazione. *Nota I. Inquinamento.*, 7-8, 49-53.
- Balice V., et Cera O. (1984) :** Acidic phenolic fraction of the olive vegetation water determined by chromatographic method. *Grasas y Aceites.* 35 (5): 178-180.
- Chamkh F. (2004):** Etude de la dégradation aérobie des margines par un réacteur aérobie type "Jet Loop". Mémoire de 3ème cycle (D.E.S.A). Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech. 37 pages.
- Cord-Ruwisch R. (1985):** A quick method for determination of dissolved and

precipitated sulfides in cultures of sulfate reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods* . 4 : 33-36.

El Hadrami A., Belaqqiz M., El Hassni M., Hanifi S., Abbad A., Capasso R., Gianfreda L., El Hadrami I. (2004): Physico-chemical characterization and effects of olive oil mill wastewaters fertirrigation on the growth of some mediterranean crops. *J. Agro.* 3 (4): 247-254.

Fransesco GL. (1993) : Evaluation économique sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae.* 47: 15-20.

Hamdi M. (1996) : Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochem* 31: 105-110.

Hungate RE. (1969): A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* 163: 194-198.

Mechichi T. (1999) : Etude de la dégradation des composés aromatique par des bactéries anaérobies isolées d'un digesteur méthanogène alimenté des margines. Thèse de Doctorat. Université de Provence, Marseille France 138 pages.

Miller TL., et Wollin MJ. (1974) : A serum bottele modification of hungate technique for cultiving obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* 27: 985-987.

Nanninga HJ., et Gottschal JC. (1987): Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp.nov.and other sulfate-reducing bacteria isolated from an Anaerobic-Purification Plant. *Appl Environ Microbiol* 51: 572-579.

Niaounakis M., et Halvadakis CP. (2004) : Olive-Mill Waste Management-Literature Review And Patent Survey, Tytothito-George Dardanos, Athens, Greece

Ollivier B., Cord-Ruwisch R., Hatchikian EC., et Garcia JL. (1988): Caracterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 149 : 447-450.

Qatibi AI, Nivière V., et Garcia JL. (1991): *Desulfovibrio alcoholovorans* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium able to grow on 1,2- and 1,3-propanediol. *Arch Microbiol.* 155: 143-148.

Qatibi AI., Bennisse R., et Jana M. (2001): Role of Sulfate-Reducing bacteria on

anaerobic degradation of industrial waste water from bioethanol production plants.
L'Eau, l'Industrie, les Nuisances 243: 56-60.

Ranalli A., (1991) :L'effluent des huiles d'olives : proposition en vue de son utilisation et de son épuration. Références aux normes italiennes en la matière. 1 ère partie.
Olivae. 37: 30-39.