

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

**Université des Frères Mentouri Constantine 1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**



*N° d'ordre* : 151/DS/2018

*N° de série* : 02/MicrB/2018

**THESE**

*En vue de l'obtention du*

**DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES**

*Spécialité : Microbiologie Appliquée et Biotechnologies Microbiennes*

Présentée par :

**HARZALLAH Besma**

Sujet de recherche

**Étude de la biodégradation de composés phénoliques par le microbiote des effluents de la raffinerie de pétrole de Skikda. Caractérisation moléculaire des bactéries et du processus enzymatique mis en œuvre.**

Soutenue publiquement le **11/07/2018**, devant le jury composé de

- Présidente : Mme Z. MERAIHI**      Professeur, Université des Frères Mentouri (UFMC1), Constantine 1.
- Encadreur : Mr H. BOUSSEBOUA**      Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie (ENSB), Constantine.
- Co-Encadreur : Mr Y. JOUANNEAU**      Directeur de Recherche, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG), France.
- Examineurs : Mr D. KHELIFI**      Professeur, Université des Frères Mentouri (UFMC1), Constantine 1.
- Mr R. BAKOUR**      Professeur, Université des Sciences et de la Technologie Houari-Boumediène (USTHB), Alger.
- Mr N. NANCIB**      Professeur, Agence Thématique de Recherche en Biotechnologie et Sciences Alimentaires (ATRBSA), Constantine.

**Année universitaire : 2017 – 2018**

*A celui qui m'a non seulement accompagné durant toutes les étapes de ma vie, mais aussi guidé,  
encouragé et n'a lésiné sur aucun moyen.  
Celui avec qui j'aurai souhaité partager cet événement.  
Celui à qui je dois tout.  
Mon père Ahcène*

## **Remerciements**

*Avant tout je voudrais exprimer ma gratitude aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je témoigne mes plus vifs remerciements au Pr Meraihi Zahia qui a bien voulu présider le jury de ce doctorat, au Pr Khelifi Douadi, au Pr Bakour Rabah et au Pr Nancib Nabil qui nous ont honorés de leur présence et pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Un projet de thèse ne se réalise jamais seul, c'est pourquoi je souhaiterai ici remercier toutes les personnes qui ont participé à ces années d'aventure scientifique et humaine.*

*Je souhaiterai tout d'abord exprimer mes remerciements au Pr Bousseboua Hacène, mon directeur de thèse, pour m'avoir permis de la réaliser dans les meilleures conditions. Il m'a permis d'initier ce travail dans son laboratoire tout en manifestant une grande disponibilité. Ses conseils précieux et ses encouragements permanents, ainsi que la liberté d'action qu'il m'a accordée à chaque étape ont permis l'aboutissement de ce travail.*

*Je voudrai dire un grand merci à Mr Yves Jouanneau, mon co-directeur de thèse, pour son accueil, sa collaboration et pour les connaissances qu'il m'a fait partager durant 16 mois de travail. Nos discussions scientifiques enrichissantes et sa disponibilité sans faille m'ont permis d'apprendre et de découvrir énormément tant d'un point de vue technique que scientifique. Son aide précieuse, particulièrement en biologie moléculaire, m'a permis d'explorer les données selon de nouvelles perspectives et de développer mon esprit critique sur les méthodes moléculaires que nous utilisons. Je le remercie pour m'avoir transmis son goût pour la recherche et pour m'avoir fait profiter de son expérience dans le domaine.*

*Je souhaite aussi remercier mes collègues du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications (Université des Frères Mentouri Constantine 1) pour leurs encouragements tout au long de la réalisation de la thèse.*

*Merci à tous les membres de l'équipe BioCE du LCBM, le laboratoire était toujours un lieu chaleureux où règne la bonne humeur. Je remercie en particulier Mr Stéphane Ménage (Directeur du Laboratoire LCBM) et Mr John C. Willison (de l'équipe BioCat).*

*Je souhaite aussi remercier Gislaine Jouanneau pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa sympathie, son accueil chaleureux et son aide dans les corrections de ce travail. Sa maison a été ma maison pendant ce long séjour.*

*Enfin, je tiens à remercier ma famille (Harzallah), ma belle-famille (Grama) et mes amis proches pour leur soutien non seulement tout au long de la thèse mais aussi depuis de nombreuses années. Je vous témoigne une éternelle reconnaissance.*

*Pour terminer, je souhaiterai remercier mon mari et mon fils, pour leur soutien et leur amour indéfectible. Je leur dédie cette thèse.*

# Valorisation des travaux de thèse

## Publication Scientifique

**B. HARZALLAH, H. BOUSSEBOUA & Y. JOUANNEAU.** Diversity shift in bacterial phenol hydroxylases driven by alkyl-phenols in oil refinery wastewaters. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (16) : 14376-14386, 2017. DOI: 10.1007/s11356-017-8950-4.

## Communications nationales et internationales

**B. HARZALLAH, N. LEULMI, K. KHENAKA, R. ARHAB & H. BOUSSEBOUA.** « Microorganismes dominants impliqués dans la biodégradation du 2,5-diméthylphénol ». **Les 11èmes journées nationales des sciences de la nature et de la vie, Bejaia-Algérie. 07 et 08 Novembre 2012.**

**B. HARZALLAH, A. DAFRI & H. BOUSSEBOUA.** « Comparative study of the biodegradation of *ortho*- and *meta*-cresol by wastewaters microflora ». **3rd Biotechnology World Congress, Dubai-U.A.E. 10 au 12 Février 2014.**

**B. HARZALLAH, H. BOUSSEBOUA & Y. JOUANNEAU.** « Dominant bacteria involved in alkylphenols degradation of oil-contaminated wastewaters ». **BioMicroWorld 2015, VI International conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Barcelone-Espagne. 28 au 30 Octobre 2015.**

**B. HARZALLAH, H. BOUSSEBOUA & Y. JOUANNEAU.** « Dominant bacteria involved in alkylphenols degradation in oil-contaminated wastewaters ». **Journée Scientifique de L'IRTSV, Grenoble-France. 10 Novembre 2015.**

**B. HARZALLAH, H. BOUSSEBOUA & Y. JOUANNEAU.** « Biodegradation of phenol and alkylphenols by the wastewaters microbiota from an oil refinery ». **10th International Society for Environmental Biotechnology Conference, Barcelone-Espagne. 1 au 3 Juin 2016.**

## Table des matières

<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>ملخص</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction</b>	01
<b>Revue bibliographique</b>	
1. Les phénols	04
1.1. Généralités	04
1.2. Propriétés physico-chimiques	05
1.3. Origine	06
1.4. Utilisation	08
1.5. Toxicité	09
1.6. Bioaccumulation des phénols	11
1.7. Pollution environnementale causée par les déchets phénoliques	11
1.8. Traitement biologique d'eaux usées phénoliques	12
2. Biodégradation des phénols	14
2.1. Microorganismes dégradant les phénols	16
2.2. Mécanisme de biodégradation des phénols	20
2.2.1. Biodégradation aérobie	20
2.2.2. Biodégradation anaérobie	24
2.3. Optimisation des conditions pour une biodégradation améliorée des phénols	24
2.4. Principales enzymes impliquées dans le catabolisme des phénols	26
2.4.1. Phénol-hydroxylases	26
• Structures et propriétés catalytiques des phénol-hydroxylases (PHs)	27
• Régulation de la synthèse des PHs	32
2.4.2. Catéchol dioxygénases	33
• Les extradiols dioxygénases	33
• Les intradiols dioxygénases	34
2.5. Approche moléculaire pour l'identification de gènes cataboliques responsables de la biodégradation des phénols	36
<b>Matériels et méthodes</b>	
1. Prospection du site de prélèvement et méthode d'échantillonnage	40
2. Techniques de microbiologie	41
2.1. Souches bactériennes utilisées	41
2.2. Milieux de culture	42
2.2.1. Milieu Salin Minimum (MSM)	42
2.2.2. Milieu Gélose Nutritive (GN)	43
2.2.3. Milieu Luria-Bertani (LB)	43
2.2.4. Milieu Cétrimide	43
2.2.5. Milieu Chapman	43

2.2.6. Milieu Mac Conkey	43
2.3. Isolement et purification de bactéries dégradant les phénols	44
2.4. Isolement de bactéries dégradant les méthylphénols	44
2.5. Isolement de bactéries résistantes aux concentrations élevées de phénols	45
2.6. Conservation des souches bactériennes	45
2.7. Utilisation d'autres composés aromatiques et température maximale de croissance des isolats	45
2.8. Mesures de la croissance bactérienne et cinétique de la dégradation des phénols	46
3. Mise en place des microcosmes pour les expériences de biodégradation des phénols	47
3.1. Dispositif expérimental d'étude	47
3.2. Inoculation et conditions d'incubation	47
4. Technique d'analyses physico-chimiques	48
4.1. Mesure de la concentration de CO <sub>2</sub> par CPG	48
4.2. Analyse des phénols par HPLC	49
5. Techniques de biologie moléculaire	50
5.1. Préparation de l'ADN génomique	50
5.1.1. Extraction d'ADN à partir des isolats	50
5.1.2. Extraction de l'ADN à partir des eaux usées	50
5.2. Amplification par PCR, analyse et purification des gènes	51
5.2.1. Les oligonucléotides	51
5.2.2. Amplification du gène ARNr 16S à partir de l'ADN génomique des isolats	51
5.2.3. Profils RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction)	52
5.2.4. Séparation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	53
5.2.5. Purification et dosage de l'ADN	53
5.2.6. Clonage	53
• Ligation	54
• Préparation des cellules compétentes	55
• Transformation des cellules compétentes	55
• Criblage des transformants par PCR	56
5.2.7. Purification de plasmides	56
• Vérification des clonages par coupure enzymatique des plasmides	56
5.2.8. Amplification par PCR et clonage des séquences partielles du gène <i>pheA1</i>	57
5.2.9. Amplification par PCR et clonage de séquences partielles codant pour LmPH	58
5.2.10. Amplification par PCR des catéchol dioxygénases	58
5.2.11. Extraction d'ARN et analyse transcriptionnelle du gène LmPH, <i>pheA1</i> et C23O par RT-PCR	59
5.2.12. Comparaison de séquences, analyse phylogénétique et numéros d'accèsion	60

## Résultats et discussion

### Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole

<b>Résultats</b>	61
1. Qualité des effluents d'eaux usées	61

2. Biodégradation du phénol et des alkylphénols en microcosmes	63
2.1. Diversité des gènes LmPH dans les boues biologiques	65
2.2. Isolement et analyse de séquences partielles de <i>pheA1</i> à partir d'ADN métagénomique	68
2.3. Détection <i>in situ</i> de l'ARNm de la phénol-hydroxylase dans les eaux usées	70
2.4. Isolement des bactéries dégradant le <i>p</i> -crésol et le 3,4-DMP	71
<b>Discussion</b>	74
<b>Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de souches bactériennes</b>	
<b>Résultats et discussion</b>	79
1. Isolement et criblage des souches bactériennes dégradant le phénol	79
2. Identification des souches bactériennes isolées	80
2.1. Caractéristiques morphologiques et biochimiques	80
2.2. Identification des souches basée sur la séquence de leur ARNr 16S	80
3. Utilisation des substrats phénoliques et autres substrats aromatiques	86
4. Température maximale de croissance des isolats	87
5. Détection de gènes de dégradation : phénol hydroxylase	87
6. Recherche des gènes d'intérêt de la souche CP1 par PCR	91
6.1. Gène <i>pheA1</i>	91
6.2. Gène C12O/C23O	92
6.3. Isolement de l'ARN et analyse transcriptionnelle des gènes <i>pheA1</i> et C23O par RT-PCR	93
7. Croissance et cinétique de la dégradation des phénols	95
7.1. Croissance des bactéries tolérant des concentrations de phénol <100mg/l	95
7.2. Croissance des bactéries tolérant des concentrations de phénol >800mg/l	98
7.3. Effet de la température sur la croissance de la souche CP1 sur phénol	103
<b>Conclusion et perspectives</b>	105
<b>Références bibliographiques</b>	109

## Résumé

Cette étude a été réalisée pour évaluer la capacité des microorganismes présents dans les eaux usées d'une raffinerie de pétrole (Sonatrach, Skikda / Algérie) à dégrader les (alkyl)phénols ; Une collection de souches bactériennes a été obtenue dont certaines peuvent également dégrader d'autres composés aromatiques (BTEX, HAP et autres phénols substitués). Sur la base des séquences de gènes d'ARNr 16S, les isolats étaient principalement affiliés aux genres suivants : *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Kocuria*, *Macrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Serratia*. Les expériences cinétiques ont montré que deux souches appartenant au genre *Kocuria* et *Macrococcus* présentaient le taux de dégradation du phénol le plus élevé. Pour la plupart des souches, la croissance et la biodégradation ont été inhibées à des concentrations de phénol supérieures à  $0,2\text{g.l}^{-1}$  sauf pour quatre isolats capables de tolérer et de croître sur phénol ou *p*-crésol jusqu'à  $1\text{g.l}^{-1}$ . Sur ces quatre souches, deux appartenaient au genre *Bacillus*, une au genre *Comamonas* et la dernière au genre *Lysinibacillus*. Les souches de *Bacillus* et *Lysinibacillus* ont montré un potentiel prometteur pour les applications biotechnologiques en raison de leur grande tolérance et de leur dégradation rapide des alkylphénols. D'autre part, les approches moléculaires ont été utilisées pour explorer le potentiel de dégradation des bactéries des eaux usées lors de l'incubation dans des microcosmes avec du phénol, du *p*-crésol ou du 3,4-diméthylphénol. Le suivi du  $\text{CO}_2$  libéré dans la phase gazeuse par GC/MS a indiqué que les trois substrats étaient rapidement minéralisés. Pour analyser les changements de diversité microbiologique induits par le phénol, le *p*-crésol ou le 3,4-diméthylphénol, l'ADN métagénomique a été extrait des échantillons d'eaux usées incubées avec chacun de ces composants. Pour chaque famille de phénol hydroxylase (LmPH et *pheA1*), des ensembles d'amorces ont été utilisés pour amplifier par PCR des gènes codant pour la grande sous-unité de cette enzyme. Après clonage et séquençage des fragments de gènes obtenus, l'analyse de séquence a révélé que la diversité des hydroxylases observées dépendait de l'alkylphénol fourni sous forme de source de carbone. Les résultats suggèrent que les bactéries appartenant au groupe des *Actinobacteria*, des *Betaproteobacteria* et des *Gammaproteobacteria* contribuent majoritairement à la biodégradation. Beaucoup de séquences de PH ne sont pas apparentées à celles de bactéries connues, ce qui laisse suggérer que la dégradation des (alkyl)phénols *in situ* a été principalement réalisée par des bactéries encore non cultivables.

Les résultats obtenus et les outils mis au point dans cette étude pourront servir à développer des méthodes de diagnostic et de suivi de la biodégradation de polluants, par exemple dans le cadre d'opérations de bioremédiation de sites pollués par les phénols.

**Mots-clés :** biodégradation ; pollution des eaux ; alkylphénols ; phénol hydroxylase ; LmPH et *pheA1*.



## ***Abstract***

This study was conducted to evaluate the capacity of microorganisms present in wastewater from an oil refinery (Sonatrach, Skikda / Algeria) to degrade (alkyl)phenols; a collection of bacterial strains has been obtained, some of which may also degrade other aromatic compounds (BTEX, PAHs and other substituted phenols). Based on the 16S rRNA gene sequences, the isolates were mainly affiliated with the following genera: *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Kocuria*, *Macrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and *Serratia*. Kinetic experiments showed that two strains belonging to the genus *Kocuria* and *Macrococcus* had the highest rate of phenol degradation. For most strains, growth and biodegradation were inhibited at phenol concentrations above  $0.2\text{g.l}^{-1}$  except for four isolates able to tolerate and grow on phenol or *p*-cresol up to  $1\text{g.l}^{-1}$ . On these four strains, two belonged to the genus *Bacillus*, one to the genus *Comamonas* and the last to the genus *Lysinibacillus*. Strains of *Bacillus* and *Lysinibacillus* have shown promising potential for biotechnological applications because of their high tolerance and rapid degradation of alkylphenols. On the other hand, molecular approaches have been used to explore the potential for degradation of wastewater bacteria when incubated in microcosms with phenol, *p*-cresol or 3,4-dimethylphenol. Monitoring of  $\text{CO}_2$  released in the gas phase by GC/MS indicated that all three substrates were rapidly mineralized. To analyze changes in microbiological diversity induced by phenol, *p*-cresol or 3,4-dimethylphenol, metagenomic DNA was extracted from wastewater samples incubated with each of these components. For each phenol hydroxylase family (LmPH and *pheA1*), sets of primers were used to amplify by PCR genes encoding the large subunit of this enzyme. After cloning and sequencing the obtained gene fragments, sequence analysis revealed that the diversity of hydroxylases observed depended on the alkylphenol provided as a carbon source. The results suggest that bacteria belonging to the group *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* contribute predominantly to biodegradation. Many PH sequences are not related to those of known bacteria, suggesting that the degradation of (alkyl)phenols *in situ* has been mainly carried out by non-cultivable bacteria.

The results obtained and the tools developed in this study can be used to develop methods for diagnosing and monitoring the biodegradation of pollutants, for example in the context of bioremediation operations for sites polluted by phenols.

**Keywords:** biodegradation; water pollution; alkylphenols; phenol hydroxylase; LmPH and *pheA1*.

## ملخص

أجريت هذه الدراسة لتقييم قدرة الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في مياه الصرف لمصفاة نפט (سوناطراك، سكيكدة / الجزائر) لتفكيك (الكيل) الفينولات ؛ تم الحصول على مجموعة من السلالات البكتيرية، البعض منها يستطيع أيضاً تفكيك مركبات عطرية أخرى (BTEX، PAHs وغيرها من الفينولات المستبدلة). استناداً إلى تسلسل الجينات 16S rRNA، العزلات البكتيرية تنتمي أساساً إلى الأجناس التالية: *Bacillus*، *Aeromonas*، *Achromobacter*، *Kocuria*، *Escherichia*، *Enterobacter*، *Brevundimonas*، *Brevibacterium*، *Brevibacillus*، *Macrococcus*، *Pseudomonas*، *Rhizobium* و *Serratia*. أظهرت تجارب النمو أن سلالتين تنتميان إلى جنس *Macrococcus* و *Kocuria* كان عندهما أعلى معدل لتفكيك الفينولات. بالنسبة لمعظم السلالات، النمو والتحلل البيولوجي تم تثبيطهما في تركيز الفينول أكبر من 0,2 غرام/لتر، باستثناء أربعة عزل التي أظهرت قدرة علي النمو في وسط يحتوي على تركيز 1 غرام/لتر من الفينول أو *p-cresol* من بين هذه السلالات الأربعة، اثنتان تنتميان إلى جنس *Bacillus*، واحدة إلى جنس *Comamonas* والأخيرة إلى جنس *Lysinibacillus*. وقد أظهرت سلالات *Bacillus* و *Lysinibacillus* إمكانات واعدة للتطبيقات البيوتكنولوجية بفضل قدرتها العالية على التحمل والتفكيك السريع لالكيلفينولات. من ناحية أخرى، استخدمت النهج الجزيئية لاستكشاف إمكانات بكتيريا مياه الصرف للتفكيك عندما حضنت في عوالم مصغرة من الفينول أو *p-cresol* أو 3,4-dimethylphenol. أشارت متابعة ثاني أكسيد الكربون الصادر في مرحلة الغاز بواسطة GC/MS إلى أن المركبات الثلاثة تم تعديلها بسرعة. لدراسة التغيرات في التنوع الميكروبيولوجي الناجمة عن الفينول أو *p-cresol* أو 3,4-dimethylphenol، تم استخراج DNA ميتاجينومية من عينات مياه الصرف الصحي التي حضنت مع كل من هذه المكونات. لكل عائلة هيدروكسيلاز الفينول (*pheA1* و *LmPH*)، تم استخدام مجموعات من البرايمرات للتضخيم بواسطة PCR الجينات التي تشفر لكل عائلة هيدروكسيلاز. بعد استنساخ وتسلسل شظايا الجينات التي تم الحصول عليها، كشف تحليل التسلسل أن تنوع هيدروكسيلاز يعتمد على الألكيلفينول المقدم كمصدر للكربون. تشير النتائج إلى أن البكتيريا التي تنتمي إلى المجموعة *Actinobacteria*، *Betaproteobacteria* و *Gammaproteobacteria* تساهم بشكل أساسي في التحلل البيولوجي. العديد من متواليات PH لا ترتبط بتلك البكتيريا المعروفة، مما يشير إلى أن تفكيك (الكيل) الفينولات في الموقع كان بشكل رئيسي من قبل البكتيريا غير القابلة للزرع.

النتائج التي تم الوصول إليها والأدوات التي تم تطويرها في هذه الدراسة يمكن استخدامها لتطوير وسائل لتشخيص ومراقبة التحلل الحيوي للملوثات، على سبيل المثال من خلال عمليات المعالجة البيولوجية للمواقع الملوثة بالفينول.

**الكلمات المفتاحية:** التحلل الحيوي ؛ تلوث المياه ؛ (الكيل) الفينولات ؛ فينول هيدروكسيلاز ؛ *LmPH* و

*pheA1*

## Liste des abréviations

- 3,4-DMP** : 3,4-diméthylphénol.
- BCF** : Facteur de Bioconcentration.
- C12O** : Catéchol 1,2-dioxygénase.
- C23O** : Catéchol 2,3-dioxygénase.
- CEA** : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives.
- CFA** : Continuous Flow Analyzer.
- CO** : Catéchol dioxygénase.
- DBO<sub>5</sub>** : Demande Biochimique en Oxygène au bout de 5 jours.
- DCO** : Demande Chimique en Oxygène.
- DTT** : Dithiothréitol.
- EMBL** : European Molecular Biology Laboratory.
- Forw.** : Forward.
- HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.
- HRP** : Peroxydase de Raifort Purifiée.
- K<sub>s</sub>** : Constante de demi-saturation dans l'équation de Haldane pour le TCE.
- LSEHL** : Laboratoire Santé Environnement Hygiène de Lyon.
- MMOH** : Méthane monooxygénase.
- mPH(s)** : Multicomponent phenol(s) hydroxylase(s).
- MSBR** : Réacteur Biologique Séquentiel Mobile.
- PAS** : Peroxydase de Soja.
- p*-crésol** : *para*-crésol.
- PH(s)** : Phénol(s) hydroxylase(s).
- Rev.** : Reverse.
- SBR** : Réacteur Biologique Séquentiel.
- SOC** : Super Optimal broth with Catabolite repression.
- sPH(s)** : Single phenol(s) hydroxylase(s).
- STEP** : Station d'épuration.
- TBE** : Tris-Borate-EDTA.
- TCE** : Trichloréthylène.
- T<sub>m</sub>** : Température de fusion.
- ToMOH** : Toluène-2-monooxygénase.
- USEPA** : Agence de Protection Environnementale des Etats-Unis.

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure chimique des phénols (a)- phénol – b)- <i>p</i> -crésol – c)- 3,4-DMP).	04
<b>Figure 2</b> : Voie <i>ortho</i> de la dégradation du phénol.	23
<b>Figure 3</b> : Voie <i>meta</i> de la dégradation du phénol.	23
<b>Figure 4</b> : Schéma d'une sous-unité dans la conformation fermée. Le cofacteur FAD, le substrat de phénol et le résidu de site actif Tyr285 sont dessinés sous forme de modèles à bille et bâton, avec des atomes dans des couleurs standard (a). Stéréoscopie du site actif de la phénol hydroxylase dans la conformation fermée. Tyr289 est situé à l'intérieur de la liaison d'hydrogène à la fois de l'intermédiaire C4a peroxy-FAD modélisé et de l'atome d'oxygène de phénol. Les résidus Asp54 et Arg287 sont tous deux en contact avec le solvant par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes (b).	28
<b>Figure 5</b> : Site actif de la phénol-hydroxylase de <i>Pseudomonas</i> sp. OX1.	30
<b>Figure 6</b> : Structure de ToMOH et comparaison avec MMOH. Les diagrammes de ruban des groupes ToMOH (a) et MMOH (b). Liaison hydrogène au ou près des centres ToMOH et MMOH. Les interactions des liaisons hydrogènes avec les coordinats de glutamate coordonnés de ToMOH (c) et de MMOH (d).	30
<b>Figure 7</b> : Schéma représentatif du site de prélèvement (STEP de la raffinerie de pétrole Sonatrach – Skikda/Algérie).	41
<b>Figure 8</b> : Carte du vecteur pJET1.2/blunt.	54
<b>Figure 9</b> : Spectres HPLC de substrats résiduels dans des échantillons de microcosmes à t=0h et à t=22h ; A) – Phénol ; B) – <i>p</i> -crésol ; C) – 3,4-DMP.	64
<b>Figure 10</b> : Arbres phylogénétiques de séquences partielles de gènes LmPH provenant des boues d'épuration.	67
<b>Figure 11</b> : Arbre phylogénétique de séquences partielles de gènes de type <i>pheA1</i> provenant d'eaux usées.	70
<b>Figure 12</b> : Gel d'agarose montrant le produit de RT-PCR ciblant l'ARNm du gène LmPH : M - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; pistes 1 et 3 - ADNc des eaux usées (avec RT*) ; pistes 2 et 4 - contrôle négatif : ADNc des eaux usées (sans RT*) ; piste 5 - contrôle positif : ADN métagénomique des eaux usées. * : Transcriptase inverse.	71
<b>Figure 13</b> : Profils RFLP des gènes d'ARNr 16S des 14 isolats retenus : M - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; puits 1 à 7 (CS) - gènes d'ARNr 16S des isolats issus des microcosmes incubés avec le <i>p</i> -crésol ; puits 1 à 7 (DS) - gènes d'ARNr 16S des isolats issus des microcosmes incubés avec le 3,4-DMP.	72
<b>Figure 14</b> : Amplification par PCR des fragments LmPH à partir de souches bactériennes. : M - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; 1 - CS4 ; 2 – CS5 ; 3 – CS6 ; 4 – CS7 ; 5 – DS2 ; 6 – DS4 ; 7 – DS6 ; 8 – DS7. Les amorces de PCR utilisées : Phe Uf / Phe H1r et Phe Uf / PheH2r (puits 1 à 8).	73
<b>Figure 15</b> : Photographie des isolats bactériens obtenus sur phénol et/ou <i>p</i> -crésol.	79
<b>Figure 16</b> : Photographie des quatre isolats bactériens les plus résistants aux phénols : CC1 - en forme de bâtonnet à Gram-positif, des colonies beiges de forme ronde irrégulière et avec des bords légèrement ondulés ; CC2 - bacilles à Gram-positif, des colonies irrégulières et beiges ; CC3 - en forme de bâtonnet à Gram-négatif, des colonies rondes et jaunâtres ; CP1 - bacilles à Gram-positif, des colonies beiges gluantes et en forme étoilée.	80

<b>Figure 17 :</b> Gel d'électrophorèse des produits de la PCR de <i>pheA1</i> de K22 : M - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific). Les amorces de PCR utilisées : KPheA1F5 / KPheA1R2 et KPheA1F5 / KPheA1R3 (puits 1 et 2).	88
<b>Figure 18 :</b> Gel d'électrophorèse des produits de la PCR de <i>pheA1</i> de CP1 : M - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; a) - PCR1 avec les amorces pheA1Gr+f4 / pheA1Gr+R ; b) – PCR2 avec les amorces pheA1Gr+f2 / pheA1Gr+R.	89
<b>Figure 19 :</b> Amplification par PCR des gènes de la CO à partir de l'isolat CP1 : M - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; 1 - Avec des amorces spécifiques du gène C12O ; 2 – Avec des amorces spécifiques du gène C23O.	92
<b>Figure 20 :</b> Gel d'agarose montrant les produit de RT-PCR ciblant l'ARNm du gène <i>pheA1</i> (a), C23O (b) et ARNr 16S (c) de l'isolat CP1 : M - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; piste 1 - contrôle positif : ADN génomique de l'isolat CP1 ; pistes 2, 3 et 4 - ADNc de CP1 en présence de phénol, glucose et succinate, respectivement (avec RT) ; pistes 5, 6 et 7 - contrôle négatif : ADNc de CP1 dans les mêmes conditions précédentes (sans RT).	94
<b>Figure 21 :</b> Courbes de croissance des bactéries sélectionnées en présence de 100mg.l <sup>-1</sup> de phénol.	95
<b>Figure 22 :</b> Cinétiques de dégradation de phénol (100mg.l <sup>-1</sup> ) par les souches bactériennes sélectionnées.	97
<b>Figure 23 :</b> Effet de différentes concentrations de phénol ou de <i>p</i> -crésol sur la croissance des isolats (a) - CC1 – b) - CC2 – c) - CC3 – d) - CP1).	98
<b>Figure 24 :</b> Croissance des isolats sur phénol ou crésols ((a) - CC1 – b) - CC2 – c) - CC3 – d) - CP1).	100
<b>Figure 25 :</b> Histogramme du % de phénol ou de <i>p</i> -crésol résiduel dans les cultures des quatre isolats (CC1 – CC2 – CC3 – CP1).	100
<b>Figure 26 :</b> Histogramme du % de phénol ou de crésol résiduel dans les cultures des quatre isolats (CC1 – CC2 – CC3 – CP1).	101
<b>Figure 27 :</b> Cinétique de croissance de l'isolat CP1 sur phénol (1g.l <sup>-1</sup> ) à des températures différentes.	104
<b>Figure 28 :</b> Histogramme montrant la biodégradation (%) de phénol utilisé par l'isolat CP1 à différentes températures.	104

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Propriétés physico-chimiques des phénols.	06
<b>Tableau 2</b> : Concentrations de phénols produites par différentes industries.	12
<b>Tableau 3</b> : Divers microorganismes eucaryotes capables de dégrader les phénols.	18
<b>Tableau 4</b> : Divers microorganismes procaryotes capables de dégrader les phénols.	19
<b>Tableau 5</b> : Souches bactériennes utilisées.	42
<b>Tableau 6</b> : Oligonucléotides utilisés pour les différentes réactions de PCR.	51
<b>Tableau 7</b> : Propriétés physico-chimiques de base des eaux usées collectées.	61
<b>Tableau 8</b> : Minéralisation des méthylphénols par le microbiote des eaux usées.	64
<b>Tableau 9</b> : Description des bibliothèques de séquences de gènes de PHs obtenues à partir de microcosmes incubés avec différentes sources de carbone.	65
<b>Tableau 10</b> : Identification et propriétés des souches représentatives isolées sur <i>p</i> -crésol ou 3,4-DMP.	73
<b>Tableau 11</b> : Influence de l'addition des méthylphénols sur la distribution des séquences de LmPH dans les groupes fonctionnels.	76
<b>Tableau 12</b> : Caractéristiques de l'étude microscopique et macroscopique des isolats bactériens.	82
<b>Tableau 13</b> : Résultats des tests biochimiques des isolats bactériens.	83
<b>Tableau 14</b> : Identification basée sur la séquence d'ARNr 16S de bactéries dégradant le phénol ou le <i>p</i> -crésol.	85
<b>Tableau 15</b> : Croissance des isolats bactériens sur substrats aromatiques.	90

# *Introduction*

Les phénols sont produits annuellement à raison de 7 millions de tonnes dans le monde. Ils sont rejetés par diverses industries telles que les raffineries de pétrole, les cokeries, l'industrie pharmaceutique, l'industrie chimique, etc. (Senthilvelan *et al.*, 2014). En raison de sa grande solubilité dans l'eau (83 g.l<sup>-1</sup>), le phénol présent dans les eaux usées atteint les sources d'eau en aval et peut nuire à la vie dans les milieux aquatiques (Das *et al.*, 2016). Les alkylphénols, tels que les crésols, les diméthyl- et les triméthylphénols, se retrouvent également à des niveaux significatifs dans les eaux usées industrielles, surtout lorsque le traitement génère du goudron de houille (Xenofontos *et al.*, 2016). Les phénols sont toxiques et potentiellement cancérigènes (Belaid *et al.*, 2002). Ils sont toxiques pour les organismes vivants à faible concentration et de ce fait, leur rejet dans les eaux de mers et les rivières sans aucun traitement préalable pose de sérieux problèmes pour la faune et la flore aquatique.

Pour réduire le risque pour les écosystèmes et l'homme, la dépollution s'impose. Il existe des méthodes physico-chimiques permettant la décontamination des eaux polluées mais elles souffrent de quelques inconvénients : le coût élevé, la faible efficacité, l'applicabilité limitée et la consommation d'énergie élevée. Habituellement ces traitements peuvent avoir comme conséquence la production de sous-produits toxiques. Ces contraintes ont conduit au développement de technologies alternatives de dépollution, dont l'objectif est d'éliminer ces composés toxiques sans porter atteinte aux écosystèmes.

Pour neutraliser ces polluants, il existe des techniques prometteuses, efficaces et moins coûteuses basées sur le traitement biologique de ces effluents. Cette méthode d'élimination qui est la biodégradation consiste à utiliser le pouvoir épurateur des microorganismes de l'environnement (Amrouche *et al.*, 2011). En effet, l'utilisation de microorganismes dans le traitement des eaux contaminées par les phénols est bénéfique en raison de leur potentiel d'élimination complète de ces polluants. Certains microorganismes ont acquis la faculté d'utiliser les phénols en tant que source de carbone et d'énergie et sont de plus capables de résister à des concentrations toxiques pour les autres organismes (Goudar *et al.*, 2000).



Les eaux usées des raffineries de pétrole contiennent du phénol, des monométhylphénols (*o*-, *m*- et *p*-crésol) et des diméthylphénols (2,4-, 2,5-, 3,4- et 3,5-DMP) comme composés phénoliques majoritaires (Ramakrishnan et Gupta, 2006). Elles constituent ainsi un modèle de choix pour comprendre les mécanismes microbiens impliqués dans la réponse à la présence des phénols. En effet, ces populations bactériennes sont supposées posséder les systèmes enzymatiques permettant de répondre à la contamination. Parmi ces enzymes, il y a les phénols hydroxylases (PH). Ces dernières sont impliquées dans l'attaque initiale des phénols. Elles catalysent la première réaction du processus de dégradation de ces molécules, ajoutant un groupe hydroxyle au noyau aromatique pour donner du catéchol (Shingler, 2003). Les PH bactériennes appartiennent à deux familles d'enzymes distinctes : les hydroxylases multicomposantes (mPH) et les hydroxylases à un seul composant (sPH) (Harayama *et al.*, 1992).

Ce travail a pour objectif de caractériser le potentiel bactérien de biodégradation des phénols au sein des eaux usées de la raffinerie de pétrole de Skikda (Sonatrach/Algérie). Il s'articule autour de deux axes principaux. Nous avons exploré la diversité des PH présents dans ces eaux usées par des approches moléculaires indépendantes de la culture, ciblant les gènes codant pour la grande sous-unité des classes d'enzymes mPH ou sPH. Nous présentons une nouvelle méthode de PCR permettant la récupération spécifique de séquences partielles de gènes de sous-unités sPH à partir d'ADN métagénomique. Nous avons également examiné la réponse du microbiote des eaux usées aux modifications par les méthylphénols dans les microcosmes et nous avons testé si le degré de méthylation du phénol a changé le profil de diversité des séquences PH. De plus, nous avons étudié la diversité des bactéries dégradant le phénol et/ou le *p*-crésol dans les eaux usées de cette raffinerie de pétrole. Plusieurs souches bactériennes ont été isolées sur un milieu de croissance minimal, avec du phénol ou du *p*-crésol comme seule source de carbone. Les souches obtenues ont été identifiées sur la base de l'analyse des séquences de leur gène ARNr 16S. Les isolats tolérant de fortes concentrations de phénol ou de *p*-crésol ont été comparés pour leur capacité de croissance sur une gamme de concentrations de phénol ou de crésol. Nous avons porté notre attention sur l'isolat le plus performant, qui a montré des taux élevés de dégradation de phénol et des trois isomères de crésol. Le gène codant pour la phénol hydroxylase de cet isolat a été partiellement séquencé et sa régulation a été étudiée par RT-PCR.

Cette thèse est scindée en trois parties :

La première partie est consacrée à une revue bibliographique composée de deux chapitres. Le premier chapitre décrit les phénols et le deuxième chapitre expose les principales voies de biodégradation des phénols.

La deuxième partie de ce travail est dédiée à la partie expérimentale, qui regroupe les différentes techniques utilisées dans cette étude : analyses physico-chimiques (CPG et HPLC), biologie moléculaire (extractions d'ADN, PCR, séquençages, analyses par bioinformatique, élaboration d'arbres phylogénétiques) et microbiologie (isolement de nouvelles souches bactériennes).

La troisième partie est consacrée à une synthèse des principaux résultats obtenus, qui sont discutés et suivis par une conclusion générale et des perspectives pour ce travail de recherche.

# *Revue bibliographique*

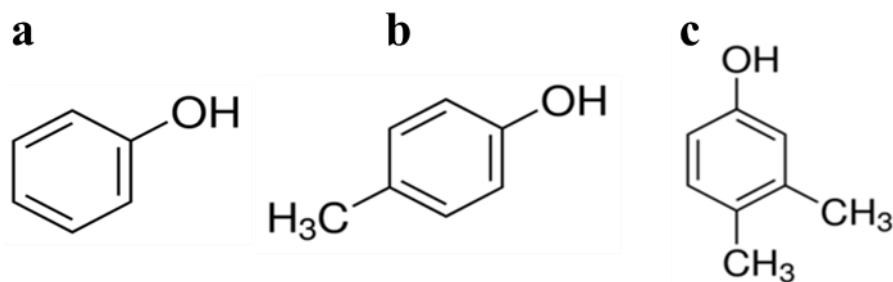
## 1. Les phénols

### 1.1. Généralités

Le phénol est le nom commun de l'hydroxybenzène, un composé aromatique ayant un groupement hydroxyle lié à un atome de carbone du cycle benzénique (Fig. 1). Le phénol est aussi nommé acide carbolique, acide phénique, acide phénylique, hydrate de phényle, hydroxyde de phényle et oxybenzène (Nair *et al.*, 2008).

Les crésols sont des phénols isomériques comportant un substituant de méthyle en position *ortho* (*o*-crésol), *mé*ta (*m*-crésol), ou *para* (*p*-crésol), par rapport au groupement hydroxyle (Fig. 1). Le terme « crésols » fait références aux trois isomères respectifs de crésols et au mélange d'isomères de crésols. Les quatre substances sont évaluées comme un groupe car elles possèdent des caractéristiques physico-chimiques similaires et présentent des propriétés environnementales et toxicologiques comparables (Environnement Canada, 2016).

Les diméthylphénols (DMP) sont des composés phénoliques, également connus comme hydroxylènes ou xylénols. Les six isomères des diméthylphénols sont les : 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- et 3,5-DMP (Fig. 1).



**Figure 1** : Structure chimique des phénols (a)- phénol – b)- *p*-crésol – c)- 3,4-DMP).

Le phénol est un des premiers termes de la grande famille des composés aromatiques qui sont des molécules organiques, cycliques et très toxiques (ATSDR, 2008). Ce composé aromatique a été, pour la première fois, isolé du goudron de houille en 1834 par le chimiste allemand Friedrich Ferdinand Runge (EPA, 1979). Il est l'un des polluants les plus répandus dans les milieux aquatiques et particulièrement dans les eaux usées industrielles.

Les crésols et les diméthylphénols sont des composés organiques aromatiques classés comme des phénols polluants. Comme le phénol, ils sont largement présents dans divers effluents industriels. Ces polluants sont connus pour leur toxicité élevée et leur faible biodégradabilité. Leur présence dans les eaux usées est devenue un sérieux problème environnemental (Bakas *et al.*, 2014).

## **1.2. Propriétés physico-chimiques**

Le phénol est l'unité structurelle de base pour une variété de composés organiques de synthèse. Dans les conditions normales de température et de pression, le phénol est un solide qui se présente sous la forme d'une masse cristalline ou d'aiguilles incolores (INRS, 2011). Il est modérément volatile à la température ambiante, hygroscopique et très inflammable (Clabrase et Kenyon, 1991). Il a une odeur caractéristique, à la fois âcre et douceâtre avec un seuil olfactif de 0,04ppm et un goût de brûlé vif (Amoore et Hautala, 1983). En présence d'impuretés, d'eau ou de lumière, le phénol se teint en rose ou rouge (INRS, 2011). Il est très soluble dans de nombreux solvants organiques usuels tels que l'acétone, l'éthanol, les hydrocarbures aromatiques et l'oxyde de diéthyle (INRS, 2011).

Le phénol est un acide faible et sous sa forme ionisée, il est très sensible à l'oxydation et aux réactions de substitution électrophile. Il peut réagir vivement avec les oxydants puissants. La réaction entre le phénol et de nombreuses substances (1,3-butadiène, chlorure d'aluminium, formaldéhyde, nitrate de sodium, nitrobenzène, etc.) peut être violente. À chaud, le phénol liquide attaque certains métaux (aluminium, plomb, zinc, etc.), ainsi que certains plastiques, notamment le polyéthylène (INRS, 2011). Ses propriétés physico-chimiques sont représentées dans le tableau 1.

Les crésols se présentent sous la forme de cristaux (*o*-crésol et *p*-crésol) ou de liquide (*m*-crésol et mélange d'isomères) incolores qui brunissent à l'air. D'après le système de classification de la volatilité, l'*o*-crésol est un composé organique volatile, tandis que le *m*-crésol et le *p*-crésol sont des composés organiques semi-volatiles, bien que certains auteurs les considèrent en général comme des composés organiques volatiles (Environnement Canada, 2016).

Les crésols s'oxydent facilement sous l'action de l'air et de la lumière, ils peuvent réagir vivement avec des oxydants puissants. À température élevée, ils se décomposent avec émission de vapeurs toxiques et inflammables. Leur réactivité chimique est très semblable à

celle du phénol : de nombreuses réactions de condensation sont notamment possibles avec des acides, des aldéhydes, des cétones, etc. (INRS, 2004). Les caractéristiques physico-chimiques du *p*-crésol sont représentées dans le tableau 1.

À température ambiante, les diméthylphénols se présentent sous la forme de cristaux aciculaires blancs, ils possèdent une odeur phénique caractéristique et persistante, avec un seuil olfactif de 1,2mg.l<sup>-1</sup> et un seuil du goût de 0,05mg.l<sup>-1</sup>. Les propriétés physico-chimiques du 3,4-DMP sont mentionnées dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Propriétés physico-chimiques des phénols.

Propriété	Phénol	<i>p</i> -crésol	3,4-DMP
<b>Formule chimique</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> OH	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> OH
<b>Masse molaire</b>	94,14g.mol <sup>-1</sup>	108,14g.mol <sup>-1</sup>	122,167g.mol <sup>-1</sup>
<b>Solubilité dans l'eau (25°C)</b>	87g.l <sup>-1</sup>	19g.l <sup>-1</sup>	4,76g.l <sup>-1</sup>
<b>Point de fusion</b>	43°C	34,8°C	62,5°C
<b>Point d'ébullition</b>	181,8°C	201,8°C	225°C
<b>Température d'auto-inflammation</b>	715°C	599°C	599°C
<b>Point d'éclair en coupelle fermée</b>	87°C	86°C	61 à 95°C
<b>pKa</b>	9,95	10,26	10,36

### 1.3. Origine

Le phénol est produit à la fois naturellement et synthétiquement par des procédés chimiques. Naturellement, le phénol est extrait par distillation de goudron de houille. Par synthèse, l'oxydation de cumène représente 95% de la production de phénol dans le monde (Busca *et al.*, 2008).

Le *p*-crésol est traditionnellement extrait du goudron de houille. Il est actuellement préparé industriellement, principalement par une voie en deux étapes commençant par la sulfonation du toluène suivie d'une hydrolyse basique du sel sulfonate, donnant ainsi le sel de sodium du crésol. D'autres procédés pour la production de *p*-crésol comprennent la chloration du toluène suivie d'une hydrolyse. Dans le procédé cymène-crésol, le phénol est alkylé avec du propylène pour donner le *p*-cymène, qui peut être désalkylé par oxydation.

Les diméthylphénols sont théoriquement préparés soit par l'action de l'acide nitreux sur les xylidines, soit par celle de la potasse fondante sur les dérivés sulfonés des diméthylbenzènes (Berthelot et Jungfleisch, 1898). Industriellement, le mélange des diméthylphénols est obtenu par extraction à partir du goudron, suivie d'une distillation fractionnée (Finar, 1961). L'insertion des groupes méthyles dans le phénol pour produire des xylénols est un procédé commercial d'une utilité considérable. Le procédé utilisé de façon usuelle est la méthylation avec de l'alcool méthylique sur un catalyseur solide, généralement un oxyde métallique modifié, à une température de 300 à 450°C. Ils peuvent aussi être produits à partir de l'hydrolyse du 4-chloro-*o*-xylène.

Le phénol est un constituant du goudron de houille, où il est formé durant la décomposition des matières organiques. L'augmentation des concentrations de phénol dans l'environnement peut entraîner des feux de forêt. Le phénol est détecté parmi les composants volatiles provenant du fumier liquide à des concentrations de 7 à 55mg.kg<sup>-1</sup> de poids sec et à une concentration moyenne de 30µg.kg<sup>-1</sup> de poids sec dans le fumier. Il provient également des activités anthropogéniques telles que : l'extraction de combustibles fossiles, la fabrication des matières plastiques, du papier, des pesticides, des produits chimiques organiques, des produits pharmaceutiques, la transformation du bois, le raffinage du charbon et du pétrole, le tannage, ainsi que des eaux de ruissellement agricoles. Les eaux usées domestiques et les déversements de produits chimiques à partir de plusieurs autres processus industriels libèrent aussi des composés phénoliques dans l'environnement (Kumaran et Paruchuri, 1997).

L'origine des crésols dans l'environnement peut être de sources naturelles ou artificielles. Ils sont naturellement présents dans certains aliments, tels que le bacon, le beurre, le fromage, le ketchup et les tomates. Dans certaines boissons aussi, telles que : le café, le thé noir, le brandy, le rhum et le whisky. Les gaz d'échappement des voitures, du charbon ou la combustion du bois, la fumée de cigarette, ou les raffineries de pétrole libèrent également des crésols dans l'environnement (ATSDR, 2008).

Les diméthylphénols sont naturellement présents dans la fumée de la marijuana, la fumée du tabac et le thé noir (Risne et Cash, 1990 ; Hashibe *et al.*, 2005). L'utilisation anthropique des diméthylphénols dans la préparation de divers produits chimiques, comme matière première pour les essences et comme composant dans les gaz d'échappement automobiles, aboutit à leur libération dans l'environnement.

#### **1.4. Utilisation**

Environ huit millions de tonnes de phénol sont utilisés dans le monde annuellement (Senthivelan *et al.*, 2014). Le phénol est principalement utilisé en synthèse organique. Il constitue la matière première pour la production de bisphénol A, utilisé dans la fabrication des résines phénoliques, de caprolactame qui entre dans la fabrication du nylon, d'acide salicylique, d'alkylphénols, de diphényle-éthers, des dichlorophénols et autres substances chimiques telles que l'acide adipique, l'acide picrique et la phénolphtaléine (INERIS, 2005). En tant que substance pure, le phénol est utilisé dans la fabrication de produits anti-moisissures, de désinfectants, d'antiseptiques et de préparations médicinales diverses, telles que des bains de bouche, des gouttes nasales et auriculaires et des pastilles pour maux de la gorge. Il est également utilisé pour la préparation de certaines crèmes et mousses de rasage, pour son effet germicide et ses propriétés anesthésiques locales. En médecine vétérinaire, on le trouve comme antiseptique interne et anesthésique gastrique. Le phénol est un produit majeur dans la synthèse de produits pharmaceutiques, dont l'aspirine (Busca *et al.*, 2008). C'est aussi un agent de peptisation dans la colle, un solvant d'extraction en raffinerie et production de lubrifiants, un agent de blocage pour les monomères d'isocyanates bloqués, un réactif dans l'analyse chimique et un intermédiaire pétrochimique primaire (ATSDR, 2008). Le phénol entre dans la composition de dissolvants pour peintures et vernis, de laques, de peintures, d'adhésifs, de caoutchouc, de durcisseurs et de matériaux isolants (INERIS, 2005). Il est utilisé en combinaison avec du chloroforme (un mélange couramment utilisé en biologie moléculaire pour la purification de l'ADN et de l'ARN à partir de protéines), il est également utilisé pour la lyse cellulaire (Green et Sambrook, 2012).

Ces dernières années, la consommation mondiale de crésols a atteint 223,4 de tonnes. À l'échelle internationale, les crésols sont largement utilisés comme intermédiaires dans la production de plusieurs produits, eux-mêmes impliqués dans une grande variété d'applications quotidiennes, telles que la vitamine E synthétique, les antioxydants (dans les plastiques), les colorants, les désodorisants, les parfums, les pesticides, les plastifiants (phosphates d'aryle), les produits pharmaceutiques, les résines, les teintures et d'autres produits chimiques (les explosifs, les révélateurs photographiques, etc.) (Environnement Canada, 2016).



Les diméthylphénols sont utilisés dans la préparation des désinfectants, la synthèse des résines artificielles, en tant que constituant de la créosote du goudron (0,7% en poids), comme matière première pour les antioxydants, les essences ainsi que le caoutchouc, comme adhésifs et produits chimiques d'étanchéité, comme solvants tels que les produits de nettoyage et d'entretien, ainsi que les peintures et revêtements et comme résidu des gaz d'échappement automobiles.

### **1.5. Toxicité**

Depuis 1979, les phénols sont classés dans la liste de l'Agence de Protection Environnementale des Etats-Unis (USEPA) (Mishra et Kumar, 2017). Ces polluants sont des substances organiques présentant un danger environnemental majeur. Ils sont très répandus dans notre environnement, avec une toxicité élevée pour de nombreux organismes vivants. Ces composés sont considérés comme toxiques même à de faibles concentrations, pour divers organismes, y compris l'homme (Singleton et Khan, 2003). La toxicité et l'impact sur l'environnement de ces composés phénoliques varient selon le nombre, les types et les positions des groupes substituants sur le noyau aromatique.

En plus de la toxicité aigüe, certains polluants phénoliques possèdent des activités endocriniennes potentielles de perturbation, même à très faibles concentrations (Singleton et Khan, 2003). Certains composés phénoliques ont des effets antithyroïdiens et goitrigènes, démontrés chez l'animal et chez l'homme (Leclère *et al.*, 2001). Des phénols substitués sont également très bio-réfractaires, de sorte que les processus biologiques conventionnels ne peuvent pas les éliminer efficacement (Bennie, 1999). Ils sont difficilement biodégradables et sont des inhibiteurs d'activité biologique (Belaid *et al.*, 2002). Ces produits toxiques s'accumulent dans les graisses animales et se concentrent dans les huiles, telles que les hydrocarbures et dans les sédiments (Nath *et al.*, 1997). Les empoisonnements aigus aux composés phénoliques chez les humains peuvent entraîner la mort, quelle que soit la voie d'exposition.

L'exposition (aigüe) à forte concentration aux phénols par voie orale, entraîne des dommages dans le foie, le pancréas, la rate, les reins, le sang, une toxicité cardiaque incluant de faibles pulsations, une dépression cardiaque, une réduction dans la pression artérielle, des collapsus, de l'œdème et des arrêts respiratoires (Wang *et al.*, 2011). L'ingestion de 1g de phénol est létale pour les humains (Kumaran et Paruchuri, 1997). L'hypothermie, l'irritation

des yeux, la dépression myocardique, les brûlure de peau, ainsi que les troubles gastro-intestinaux sont parmi les effets pathologiques des phénols rapportés par de nombreux chercheurs (Tziotzios *et al.*, 2005 ; Chakraborty *et al.*, 2010). L'exposition aux phénols provoque aussi des lésions hépatiques et rénales, des troubles du système nerveux central, de la diarrhée et l'excrétion d'urine foncée chez les animaux et l'homme (Olujimi *et al.*, 2010). En outre, la consommation d'eau contenant des concentrations élevées en composés phénoliques peut conduire à des cancers.

Les études sur les phénols révèlent qu'ils sont toxiques et très dangereux pour la vie aquatique (Pan et Kurumada, 2008). Ils peuvent notamment modifier les écosystèmes aquatiques et causer des dommages (Huang *et al.*, 2007). La faune et la flore sont les principales victimes des effluents industriels contenant des phénols (Lika et Papadakis 2009). La présence de ces composés dans les eaux usées entraîne une diminution de la concentration en oxygène dissous. Ces composés s'oxydent facilement grâce à la présence d'oxygène du milieu en subissant une quinonisation, ce qui rend l'environnement irrespirable avec une asphyxie de toute vie aquatique. Ce phénomène entraîne une dégradation de la qualité des eaux de surface en inhibant le développement des microorganismes (Capasso, 1997). Ce qui entraîne le déséquilibre du biotope aquatique. Ils agissent sur les microorganismes en : dénaturant leurs protéines cellulaires, abimant leurs membranes et en affaiblissant leur tension superficielle. Ils inhibent les microorganismes ainsi que les enzymes impliquées dans la décomposition des polluants organiques (Scalbert, 1991). La toxicité du phénol vis-à-vis des plantes est prouvée. Les saules exposés à  $1\text{g.l}^{-1}$  de phénol flétrissent, puis meurent (Wang *et al.*, 2011). Le phénol peut également inhiber la synthèse et la réplication de l'ADN cellulaire. Une étude a révélé que le phénol arrêta la synthèse de l'ADN chez les fibroblastes humains diploïdes (Michalowicz et Duda 2007).

En raison des effets indésirables des phénols sur l'environnement et sur la santé, il est nécessaire de traiter les eaux contaminées, avant de les rejeter dans le milieu naturel. Des législations régulent, normalement, la teneur en phénol des eaux résiduaires. Ainsi, pour l'USEPA, la limite maximale acceptable de concentration du phénol dans les eaux usées ne doit pas dépasser  $1\text{mg.l}^{-1}$  (Huang *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2008), afin de protéger la santé humaine contre leurs effets toxiques potentiels. La limite générale des normes de rejet des effluents du phénol est de  $0,05\text{mg.l}^{-1}$ , avant retour dans les cours d'eau (Mohanty *et al.*, 2005). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a donc limité la concentration du phénol

dans l'eau potable à 0,001mg.l<sup>-1</sup> (Barrios-Martinez *et al.*, 2006).

### **1.6. Bioaccumulation des phénols**

La bioaccumulation, également nommée bioconcentration, est, en plus de la toxicité et de la persistance, l'une des caractéristiques qui définit la dangerosité d'une substance. La bioaccumulation est donc la concentration progressive d'une substance spécifique dans le corps d'un organisme vivant et ce, à partir de sa nourriture ou de son milieu ambiant (eaux, sols). Après ingestion, plutôt que d'être éliminées, certaines substances ont tendance à être stockées dans les tissus adipeux des animaux, de manière plus ou moins irréversible. En remontant le long de la chaîne alimentaire, la concentration de ces substances augmente au sein de diverses espèces (Huang *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2008).

De nombreuses molécules produites par les activités humaines (organochlorés, métaux lourds, radionucléides, pesticides, phénol, etc.) ont la propriété de circuler dans les réseaux trophiques où leur bioaccumulation peut causer des effets toxiques à terme, pour les organismes ou pour ceux qui les consomment. La bioaccumulation est définie par le facteur de bioconcentration (BCF) qui est le rapport de la concentration dans l'organisme vivant sur la concentration dans le milieu (Ramade, 1992).

La bioaccumulation du phénol, à une concentration de 2mg.l<sup>-1</sup> ou plus dans l'environnement aquatique, peut déjà provoquer des effets secondaires sur le développement de certains poissons. Alors que des concentrations entre 10 et 100mg.l<sup>-1</sup> entraînent la disparition de la vie aquatique dans les 96 heures (Huang *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2008). Cependant, le phénol est rapidement métabolisé par les poissons. Des études indiquent également une rétention de certains métabolites du phénol (INERIS, 2005).

Le facteur de bioconcentration expérimental de 19,9 pour le *p*-crésol indique qu'il se bioconcentre faiblement chez les poissons et autres organismes aquatiques. Chez les humains, on considère que les crésols ne se concentrent pas de manière significative (ATSDR, 2008).

### **1.7. Pollution environnementale causée par les déchets phénoliques**

Les composés phénoliques sont les polluants caractéristiques des eaux usées générées par les raffineries de pétrole, les usines de céramique, les aciéries, les processus de conversion du charbon, les unités de fabrication de résines phénoliques, de pesticides et d'explosifs, etc. La concentration des phénols dans les effluents générés par certaines industries est rapportée

dans le tableau 2 (Busca *et al.*, 2008).

**Tableau 2** : Concentrations de phénols produites par différentes industries.

Industrie	Concentration de phénols (mg.l <sup>-1</sup> )
Opérations de cokéfaction	28 – 3900
Transformation du charbon	9 – 6800
Pétrochimie	2,8 – 1220
Pâtes et papiers	0,1 - 1600
Production de gaz	4000
Raffineries	6 – 500
Pharmaceutiques	1000
Fabrication du benzène	50

### 1.8. Traitement biologique d'eaux usées phénoliques

Le phénol provenant des eaux usées peut être éliminé par diverses méthodes classiques, telles que : l'échange d'ions, l'extraction par solvant, l'oxydation chimique, l'adsorption, la coagulation et d'autres méthodes de traitement non biologiques. Cependant, en raison du coût élevé et de la faible efficacité et/ou de la possibilité de production de sous-produits toxiques pour ces technologies, il est nécessaire de trouver une alternative pour la dégradation du phénol. Alternativement, le phénol peut être dégradé biologiquement en produits finis stables (comme le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub>O) et la biodégradation du phénol est plus avantageuse que les méthodes de traitement non biologiques (Senthilvelan *et al.*, 2014).

Le succès de la bioremédiation microbienne est réalisé par l'interaction des microbes dans leur niche, dans les conditions les plus favorables, de diverses manières (Riccardi *et al.*, 2005) : Biostimulation (renforcement de l'activité des microbes indigènes), bioaugmentation (augmentation des comptes microbiens viables), bioaccumulation (stockage d'éléments toxiques ou non toxiques par les microbes), biosorption (élimination des éléments de l'environnement par adsorption) (Gupta *et al.*, 2000) et développements de biofilms (Singh *et al.*, 2006).

Le traitement biologique consiste à transformer les déchets en produits terminaux simples (Pradeep *et al.*, 2011). Le traitement biologique est préféré aux méthodes de conventionnelles de traitement du phénol, en raison de son potentiel à dégrader complètement

les phénols. Il ne produit pas de métabolites intermédiaires toxiques et abaisse la concentration des phénols en-dessous de la limite de toxicité admissible. Pour cette raison, l'intérêt de l'utilisation des méthodes biologiques est en augmentation (Lika et Papadakis 2009).

Le traitement biologique des eaux usées utilise des microorganismes qui existent naturellement dans le milieu, avec deux types majeurs de traitement (Eiroa *et al.*, 2008 ; Luo *et al.*, 2009). Le premier consiste à dégrader les résidus organiques en milieu aérobie, en libérant du gaz carbonique. Le deuxième, en milieu anaérobie conduit à une fermentation, libérant ainsi du gaz carbonique et du méthane.

Lors de la dégradation aérobie des phénols, l'oxygène moléculaire est utilisé pour l'attaque initiale du noyau aromatique (Tay *et al.*, 2006). La dégradation aérobie des phénols par des microorganismes est principalement basée sur l'*ortho*-et la *meta*-oxydation. Au cours de la première étape de dégradation des phénols, l'oxygène moléculaire est utilisé par l'enzyme phénol-hydroxylase pour ajouter un deuxième groupe hydroxyle dans la position *ortho*-, additivement à celle déjà présente, pour produire du catéchol qui peut ensuite être dégradé soit par l'*ortho*- ou la *meta*-oxydation (Barrios-Martinez *et al.*, 2006 ; Tziotzios *et al.*, 2007). La plupart de ces études implique des espèces microbiennes déjà présentes dans le milieu (Melo *et al.*, 2005).

L'utilisation de boues activées apparaît comme une solution plus attrayante, en raison de ses divers avantages (Barrios-Martinez *et al.*, 2006 ; Tziotzios *et al.*, 2007). Ce procédé consiste essentiellement en un traitement aérobie qui oxyde les matières organiques et autres contaminants des eaux usées en dioxyde de carbone, eau et biomasse. L'air est fourni par l'aération (par diffusion d'air ou brassage mécanique) et les cellules microbiennes forment des boues activées qui sont traitées dans un clarificateur secondaire. Plusieurs types de réacteur existent : les réacteurs de type films suspendus (Chen *et al.*, 2007), lit fixe (Bajaj *et al.*, 2008), lit panier (Tziotzios *et al.*, 2007), etc. Des problèmes apparaissent lors du traitement de solutions phénoliques ayant un taux élevé de charge organique (Moussavi *et al.*, 2009).

Des études montrent que l'utilisation du SBR (réacteur biologique séquentiel) pour l'élimination des phénols convient pour des taux de charge modérée (Chan et Lim, 2007 ; Moussavi *et al.*, 2009). Une étude avec des solutions phénoliques, ayant une concentration initiale égale à  $120\text{mg.l}^{-1}$ , montre qu'un réacteur discontinu séquentiel SBRensemencé avec une culture halophile permet d'éliminer 99,5% des phénols (Woolard et Irvine, 1995). En effet, pour des charges élevées en phénols, les systèmes SBR classiques ont une faible efficacité et conduisent à des problèmes opérationnels, tels que la production de boues en excès (Sirianuntapiboon et Yommee, 2006). D'autres études sur la dégradation des phénols, réalisées dans des conditions différentes, utilisent un mélange de cultures exogènes. Elles montrent une accélération de la dégradation des phénols (Bajaj *et al.*, 2009). Afin d'améliorer l'efficacité de ces processus, il est envisagé d'intégrer le lit mobile à un système SBR, (MSBR) développant ainsi une technologie efficace et fiable pour purifier les flux d'eaux usées contenant des concentrations élevées de phénols (Moussavi *et al.*, 2009). Ainsi, le réacteur MSBR peut traiter des solutions de concentrations phénolique jusqu'à  $3.10^3\text{mg.l}^{-1}$ . Il conduit à une efficacité d'élimination de 99%.

Dans le milieu anaérobie, les phénols sont dégradés par des organismes méthanogènes, par des bactéries sulfato-réductrices (Fang *et al.*, 2006 ; Luo *et al.*, 2009). La voie anaérobie la plus étudiée est une dégradation des phénols par le biais du benzoyl-CoA (Tay *et al.*, 2006). L'efficacité des biodégradations anaérobies n'est pas élevée, c'est pourquoi la biodégradation des phénols en milieu aérobie est privilégiée.

## **2. Biodégradation des phénols**

La biodégradation est la décomposition des contaminants organiques complexes, éventuellement toxiques, en éléments non toxiques et plus simples par l'activité microbienne. Ces contaminants peuvent être considérés comme source nutritive ou substrat de croissance. Ils sont l'objet d'une série de réactions biochimiques conduisant généralement à la formation d'eau et de gaz carbonique (Parales *et al.*, 2002).

Les microorganismes ont la capacité de dégrader les composés d'origine naturelle, situation connue comme le principe de l'infailibilité microbienne (Alexander, 1965). Cependant, le taux et l'étendue de la biodégradation d'un composé chimique dépendent en grande partie de sa structure et de son environnement (Annachhatre et Gheewala, 1996). En effet, plusieurs facteurs peuvent limiter le taux de biodégradation des phénols. Ces facteurs

peuvent inclure la température, le pH, la teneur et la disponibilité de l'oxygène, la concentration du substrat et les propriétés physiques des contaminants.

Certains autres facteurs qui peuvent affecter la biodégradation des phénols sont la structure chimique et la toxicité du composé. L'effet structurel chimique est reflété par le nombre de substituants, le type de substituants, la position des substituants et le degré de ramification. Plus le nombre de substituants dans la structure est grand, plus elle devient toxique et moins dégradable. Par exemple, les phénols substitués tels que le mono, le di- et le triméthylphénol sont moins dégradables que le phénol non substitué. De plus, les phénols *o*- et *p*-substitués sont plus dégradables que les phénols *m*-substitués (Al-Khalid et El-Naas, 2012).

La biodégradation des polluants est cruciale afin de prédire leur longévité et leurs effets à long terme et elle est également importante dans le processus de remédiation effective. La dégradation microbienne est donc une stratégie utile pour éliminer des composés organiques et détoxifier les eaux usées et autres sites pollués (Gallego *et al.*, 2003). Les composés phénoliques sont des constituants courants de nombreux effluents industriels. Pour obtenir une biodégradation maximale par des microorganismes, un certain nombre de paramètres physico-chimiques doit être optimisé. En particulier, la concentration des phénols doit être ajustée car elle inhibe la croissance de microorganismes à des valeurs élevées.

L'élimination biologique peut être classée en méthodes microbiennes et enzymatiques. La dégradation microbienne est une stratégie utile pour éliminer les composés organiques et détoxifier les eaux usées et les environnements pollués (Gallego *et al.*, 2003). Les phénols sont dégradés par divers microorganismes, y compris les levures, les champignons et les bactéries. En raison de leur présence généralisée dans l'environnement, de nombreux microorganismes peuvent utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie (Basha *et al.*, 2010).

Les techniques enzymatiques pour éliminer les composés organiques en solution aqueuse. Ce procédé a d'abord été proposé par Klivanov et ses collègues et a été continuellement améliorée depuis. Les peroxydases sont les enzymes les plus largement rapportées pour la polymérisation du phénol, par rapport à d'autres enzymes. Les auteurs ont signalé l'utilisation de peroxydase de raifort purifiée (HRP) pour éliminer 30 composés phénoliques et aromatiques aminés différents (Cooper et Nicell, 1996 ; Wilberg *et al.*, 2000).

La conversion du phénol est activée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'enzyme catalyse l'oxydation de composés aromatiques, formant des radicaux libres qui subissent une polymérisation spontanée (Wilberg *et al.*, 2002). Les coques de graines de soja ont été identifiées comme une source riche de peroxydase, la peroxydase de soja (PAS) étant un sous-produit de l'industrie alimentaire de soja, elles fournissent une source bon marché et abondante de peroxydase (Wilberg *et al.*, 2002 ; Hejri et Saboora, 2009). Les racines de radis contiennent aussi de l'enzyme peroxydase et peuvent être utilisées pour éliminer les phénols des eaux usées (Naghbi *et al.*, 2003).

### **2.1. Microorganismes dégradant les phénols**

Les microorganismes qui peuvent dégrader le phénol ont été isolés dès 1908 (Chandana Lakshmi et Sridevi, 2009). Les éléments clés de communautés microbiennes responsables de la dégradation des déchets phénoliques sont des espèces du genre *Pseudomonas*. Leurs bases physiologiques et génétiques reliées à la dégradation des phénols ont été décrites par de nombreux chercheurs (Chandana Lakshmi et Sridevi, 2009). L'espèce *Pseudomonas putida* a été étudiée de façon approfondie et est apparue comme ayant un potentiel élevé de dégradation des phénols (Chandana Lakshmi et Sridevi, 2009). Selon Whiteley *et al.* (2001), les isolats en mesure d'utiliser le phénol comme seule source de carbone appartiennent principalement à *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Les genres bactériens : *Achromobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp. et *Streptomyces* sp. sont également cités pour leur efficacité dans la biodégradation des phénols. Cependant, ces microorganismes subissent une inhibition de leur croissance par le substrat, à des concentrations élevées de phénols (Prieto *et al.*, 2002). Les études sur la biodégradation bactérienne des phénols ont permis d'établir les mécanismes possibles ainsi que les enzymes impliquées dans ce processus. L'efficacité de la dégradation des phénols peut être améliorée par le procédé d'immobilisation de cellules (Annadurai *et al.*, 2000).

Des rapports antérieurs ont montré que des levures ont aussi un rôle dans la dégradation de composés phénoliques, notamment des souches appartenant aux genres : *Candida*, *Debaryomyces*, *Oospora*, *Saccharomyces* et *Trichosporon cutaneum* (Chandana Lakshmi et Sridevi, 2009). Parmi les levures, *Candida tropicalis* est capable de dégrader les phénols et les composés aliphatiques à des concentrations relativement élevées (Chandana Lakshmi et Sridevi, 2009).



En raison de la dissémination des phénols dans l'environnement, de nombreux microorganismes les utilisent comme seule source de carbone et d'énergie (Basha et *al.*, 2010). Ces microorganismes peuvent se ranger en deux catégories, les procaryotes (les bactéries dont les actinomycètes) et les eucaryotes (les champignons et les algues) (comme le montre les tableaux 3 et 4, ci-dessous) (Chandana Lakshmi et Sridevi, 2009).

**Tableau 3** : Divers microorganismes eucaryotes capables de dégrader les phénols.

Moisissures	Références
<i>Aspergillus niger</i>	Garcia <i>et al.</i> 2000
<i>Aspergillus terreus</i>	Garcia Garcia <i>et al.</i> 1997
<i>Coprinus</i> sp.	Guiraud <i>et al.</i> 1999
<i>Coprinus cinereus</i>	Masuda <i>et al.</i> 2001
<i>C. cinereus</i>	Guiraud <i>et al.</i> 1999
<i>C. micaceus</i>	Guiraud <i>et al.</i> 1999
<i>Coriolus versicolor</i>	
<i>Fusarium</i>	
<i>Graphium</i> LE6, LE11, LA1, LE9, LA5, FIB4, AE2	Francis Fitz Gibbon <i>et al.</i> 1998
<i>Geotrichum candidum</i>	Santos et Linardi, 2004 ; Weijian Cai <i>et al.</i> 2007
<i>Mycelia sterilia</i>	Francis Fitz Gibbon <i>et al.</i> 1998
<i>Penicillium</i> AF2, AF4, F1B9	Santos et Linardi, 2004
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Fountoulakis <i>et al.</i> 2002
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Francis Fitz Gibbon <i>et al.</i> 1998 ; Garcia <i>et al.</i> 2000
<i>Rhizobium</i> sp., CCNWTB 701	Gehomg Wei <i>et al.</i> 2007
Levures	Références
<i>Candida maltosa</i>	Ariana Fialova <i>et al.</i> 2004
<i>Candida tropicalis</i>	Salmeron-Alcocer <i>et al.</i> 2007
<i>Candida tropicalis</i> CHP4	Kumaran, 1980
<i>Candida tropicalis</i> Ct2	Komarkova <i>et al.</i> 2003
<i>Candida tropicalis</i> H15	Krug <i>et al.</i> 1985 ; Krug et Straube, 1986
<i>Candida tropicalis</i> NCYC 1503	Chen <i>et al.</i> 2002
<i>Candida tropicalis</i> 708	Shimizu <i>et al.</i> 1973
<i>Candida tropicalis</i> YMEC 14	Ettayebi <i>et al.</i> 2003
<i>Dabaromyces subglobosus</i>	Chai <i>et al.</i> 2004
<i>Rhodotorula glutinis</i> ATCC 28052	Katayama-Hirayama <i>et al.</i> 1994
<i>Rhizobium</i> sp., CCNWTB 701	Gehomg Wei <i>et al.</i> 2007
<i>Trichosporon cutaneum</i> R57	Alexieva <i>et al.</i> 2004 ; Chai <i>et al.</i> 2004
Algues	Références
<i>Ankistrodesmus braunii</i>	Gabriele pinto <i>et al.</i> 2002
<i>Ochromonas danica</i>	Semple et Cain, 1995
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Gabriele pinto <i>et al.</i> 2002

**Tableau 4 :** Divers microorganismes procaryotes capables de dégrader les phénols.

Bactéries	Références
<i>Acinetobacter</i> sp.	Tibbles et Baecker, 1989a, Oliver <i>et al.</i> 2002
<i>Acinetobacter</i> sp. W-17	Usama Beshay <i>et al.</i> 2002
<i>A. calcoaceticus</i> AH	Nakamura et Sawada, 2000
<i>A. johnsonii</i>	Heilbuth <i>et al.</i> 2003
<i>Achromobacter</i> sp. E1	Watanabe <i>et al.</i> 1996a
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Kowanlska <i>et al.</i> 1998
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Bastos <i>et al.</i> 2000a
<i>Alcaligenes</i> sp. E2	Watanabe <i>et al.</i> 1996a
<i>Alcaligenes</i> sp. R5	Watanabe <i>et al.</i> 1996a
<i>Alcaligenes</i> strain P5	Baek <i>et al.</i> 2001
<i>Arthrobacter</i> sp.	Kar <i>et al.</i> 1996
<i>Azoarcus</i> sp.	Shinoda <i>et al.</i> 2000
<i>Azospirillum brasilense</i>	Barkovskii <i>et al.</i> 1985 ; Arutchelvan <i>et al.</i> 2005
<i>Bacillus brevis</i>	Arutchelvan <i>et al.</i> 2006
<i>B. thermoleovorans</i> A2	Mutzel <i>et al.</i> 1996
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Moustafa El-Sayed, 2003
<i>Burkholderia</i> species	Salmeron-Alcocer <i>et al.</i> 2007
<i>Comamonas testosterone</i> P15	Yap <i>et al.</i> 1999
<i>Comamonas testosterone</i> E23	Yap <i>et al.</i> 1999
<i>Halomonas</i> sp.	Hinteregger et Streichsbier, 1997
<i>Halophilic bacteria</i> CA00, CA08, SL03, SL08, SP04	Peyton <i>et al.</i> 2002
<i>Iron reducing organism</i> GS-15	Lovley et Lonergan, 1990
<i>Magnetospirillum</i> sp.	Shinoda <i>et al.</i> 2000
<i>Micorbacterium phyllosphaerae</i>	Salmeron-Alcocer <i>et al.</i> 2007
<i>Micrococcus</i> sp.	Tibbles et Baecker, 1989b
<i>Nocardia</i> sp.	Tibbles et Baecker, 1989b
<i>Pseudomonas</i> sp.	Kang et Park, 1997
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Arutchelvan <i>et al.</i> 2005
<i>Pseudomonas putida</i> BH	Soda <i>et al.</i> 1998
<i>Pseudomonas putida</i> DSM 548	Monterio <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas putida</i> EKII	Hinteregger <i>et al.</i> 1992
<i>Pseudomonas putida</i> MTCC 1194	Bandhyopadhyaya <i>et al.</i> 1998
<i>Pseudomonas putida</i> Q5	Kotturi <i>et al.</i> 1991 ; Onsyko <i>et al.</i> 2002
<i>Pseudomonas putida</i> NRRL-β -14875	Seker <i>et al.</i> 1997
<i>Pseudomonas putida</i> CCRC 14365	Tsuey-Ping Chung, 2005
<i>Pseudomonas pictorum</i> NCIM 2077	Sheeja et Murugesan, 2002

<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 11172	Loh et Liu, 2001
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	Hughes et Cooper, 1996
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17484	Gonzalez <i>et al.</i> 2001a
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 21812	Daraktchiev <i>et al.</i> 1996
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49451	Wang et Loh, 1999
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Reardon <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas putida</i> F1 ATCC 700007	Abuhamed <i>et al.</i> 2003 ; Tarik Abu Hamed <i>et al.</i> 2003
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 31800	GurusamyAnnadurai <i>et al.</i> 2007
<i>Pseudomonas putida</i> NICM 2174	Annadurai <i>et al.</i> 1999, Annadurai <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas putida</i> JS6	Spain et Gibson, 1988
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Spain et Gibson, 1988
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SPC2	Ahamad et Kunhi, 1996
<i>Pseudomonas testosteroni</i> CPW301	Kim <i>et al.</i> 2002
<i>Pseudomonas</i> sp. STI	Safia Ahmed, 2001
<i>Ralstonia eutropha</i>	OzlemTepe et Arju, 2007
<i>Rhodococcus</i> sp. DCB-p0610	Pai <i>et al.</i> 1995
<i>R. erthropolis</i> UPV-I	Prieto <i>et al.</i> 2002
<i>Sphingomonas bisphenolicum</i> AO1	Ko-ichiOshiman <i>et al.</i> 2007
Sulfate-reducing bacteria	Boopathy, 1995
<b>Cultures bactériennes mixtes</b>	<b>Références</b>
Mixed bacteria	Ha <i>et al.</i> 2000
Mixed methanogenic cultures	Karlsson <i>et al.</i> 1999
<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>C. freundii</i> , <i>M. Agilisand</i> , <i>P. putida</i>	Kanekar <i>et al.</i> 1999
<i>Bacteria</i> + <i>E.coli</i> ATCC 33456	Chirwa et Wang, 2000
<i>Clostridium ghonii</i> , <i>C. Hastiforme</i> , <i>C. glycolicum</i>	Letouneau <i>et al.</i> 1995
<i>P. putida</i> F1 et <i>B. Strain</i> JS150	Rogers et Reardon, 2000
SRB et AUMB	Boopathy, 1997

## 2.2. Mécanisme de biodégradation des phénols

### 2.2.1. Biodégradation aérobie

En condition aérobie, les microorganismes utilisent l'énergie d'oxydation des phénols pour se multiplier grâce au processus de respiration. La dégradation implique une série d'actions enzymatiques spécifiques qui font partie de la voie catabolique (Chandana Lakshmi et Sridevi, 2009).

La première étape du métabolisme aérobie est l'hydroxylation des phénols en catéchol par la phénol-hydroxylase (EC 1.14.13.7), une enzyme dépendante du NAD(P)H (Chandana Lakshmi et Sridevi, 2009). Cette enzyme incorpore un atome d'oxygène dans le cycle aromatique pour former le catéchol qui subit alors un clivage du noyau par une dioxygénase (Beadle et Smith, 1982).

Le catéchol est dégradé par *ortho*- ou *meta*-fission en intermédiaires du métabolisme central (Fig. 2 et 3). La fission initiale du noyau aromatique est catalysée par une enzyme de clivage *ortho*, la catéchol 1,2-dioxygénase (EC 1.13.11.1) ou par une enzyme de clivage *meta*, la catéchol 2,3-dioxygénase (EC 1.13.11.2). Les catéchols sont donc clivés soit par *ortho*-fission (intradiol, c'est-à-dire par liaison carbone entre deux groupes hydroxyle, soit par *meta*-fission (diol supplémentaire, c'est-à-dire entre un des groupes hydroxyle et un carbone non hydroxylé comme le montrent les figures 2 et 3 (Seo *et al.*, 2009).

Après plusieurs étapes ultérieures, les produits des deux voies *ortho* et *meta* sont incorporés en tant qu'intermédiaires du cycle de Krebs. L'*ortho*-clivage est la voie la plus productive pour l'organisme car il implique moins de dépenses d'énergie (Chandana Lakshmi et Sridevi, 2009). Les composés aromatiques sont généralement convertis en métabolites : le catéchol, le protocatéchuate et, plus rarement le gentisate. Les intermédiaires dans la biodégradation des phénols sont le catéchol, le *cis*, *cis*-muconate, le  $\beta$ -cétoadipate, le succinate et l'acétate (Chandana Lakshmi et Sridevi, 2009).

*Streptomyces setonii* (ATCC 39116) dégrade des composés aromatiques tels que le phénol ou le benzoate via une voie de clivage *ortho*, en utilisant la catéchol 1,2-dioxygénase (An *et al.*, 2001). Une souche bactérienne, *Serratia plymuthica*, est capable de tolérer le phénol jusqu'à une concentration de 1050mg.l<sup>-1</sup>. Le phénol est alors dégradé par voie *ortho* et l'extrait brut a montré la présence de l'enzyme de clivage du noyau catéchol 1, 2-dioxygénase (Pradhan et Ingle, 2007).

La croissance de *Pseudomonas putida* sur phénol induit la synthèse de la phénol-hydroxylase et des enzymes de la *meta*-fission (Feist et Hegeman, 1969). Le *meta*-clivage du catéchol entraîne la formation du 2-hydroxymuconate semialdéhyde, qui peut être métabolisé par la déshydrogénase NAD<sup>+</sup> dépendante ou par une hydrolase. Pour *P. putida* souche U, la dégradation du phénol par la déshydrogénase semble être la voie privilégiée (Wigmore *et al.*, 1974). Une souche mutante déficiente en activité déshydrogénase NAD<sup>+</sup> dépendante, était

capable d'utiliser le phénol via la voie hydrolytique, bien que le taux de croissance soit réduit. L'accumulation observée de 2-hydroxymuconate semialdéhyde est nécessaire pour «orienter» le substrat dans la voie hydrolytique.

La souche *Pseudomonas* CF600 est capable de croître sur phénol, crésols et 3,4-DMP via une phénol-hydroxylase multicomposante et des enzymes de *meta*-clivage codées par des gènes portés par le plasmide pVI150 appartenant à la classe IncP-2 (Shingler *et al.*, 1989 ; Shingler *et al.*, 1992). Les 15 gènes codés dans l'ordre *dmpKLMNOPQBCDEFGHI* se trouvent dans un seul opéron. Les 6 premiers gènes sont impliqués dans la conversion des phénols en catéchol (Shingler *et al.*, 1992). L'enzyme de clivage du cycle, la catéchol 2,3-dioxygénase, est codée par *dmpB*. Les gènes *dmpC* et *dmpD* codent pour les premières enzymes de la voie *meta* : 2-hydroxy-muconate semi-aldéhyde déshydrogénase et 2-hydroxy-muconate semi-aldéhyde hydrolase, respectivement. *dmpE* code pour l'activité 2-oxopent-4-énoate hydratase ; *dmpF* encode l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase ; *dmpG* code pour l'activité 4-hydroxy-2-oxovalérate aldolase. *dmpH* et *I* codent respectivement pour l'activité 4-oxalocrotonate décarboxylase et l'isomérase. L'association étroite précitée de la décarboxylase et de l'hydratase a également été notée avec ces enzymes de *Pseudomonas* sp. CF600 (Shingler *et al.*, 1992).

L'organisation génétique est différente chez *P. putida* souche U, où le manque de coordination entre l'induction de la phénol-hydroxylase et les autres enzymes de la voie *meta* résulteraient d'une dissociation de la régulation de leurs gènes structurels (Seo *et al.*, 2009).

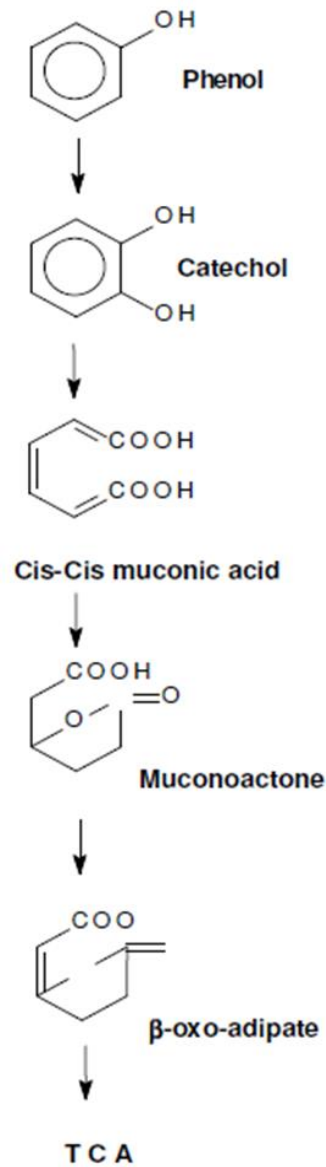


Figure 2 : Voie *ortho* de la dégradation du phénol.

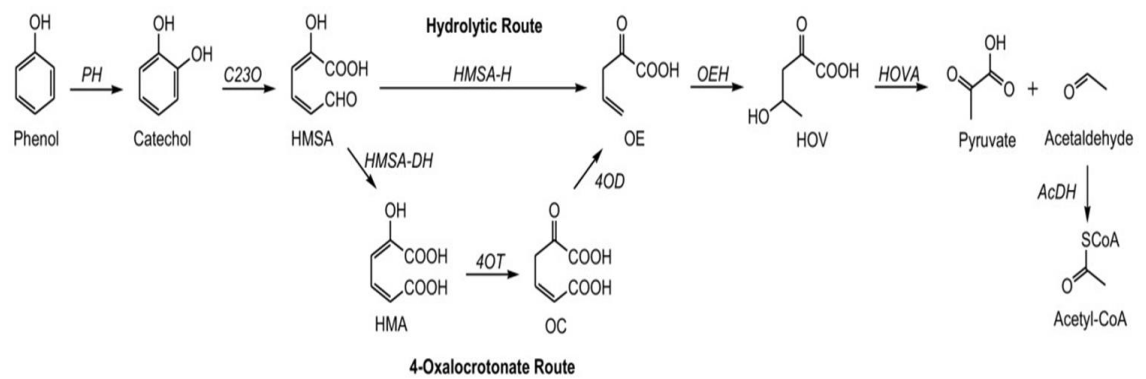


Figure 3 : Voie *meta* de la dégradation du phénol.

### **2.2.2. Biodégradation anaérobie**

La dégradation microbienne des phénols dans des conditions anaérobies a été étudiée principalement chez la bactérie dénitrifiante *Thauera aromatica* (Lack et Fuchs, 1992, 1994). La dégradation anaérobie est initiée par carboxylation des phénols qui s'effectue en deux étapes. La première étape implique la phosphorylation des phénols par l'addition d'un groupe phosphate, à partir d'un donneur de phosphoryle, catalysée par une enzyme appelée phénylphosphate-synthase (kinase) pour former le phosphate de phényle comme premier intermédiaire (Lack et Fuchs, 1992, 1994). La seconde étape implique la carboxylation du phosphate de phényle, catalysée par une enzyme nécessitant du  $Mn^{+2}$ , la phényl-phosphate-carboxylase pour former le 4-hydroxybenzoate. La synthèse des enzymes phosphorylantes et carboxylantes est strictement régulée. L'enzyme carboxylant le phénol de *Thauera aromatica* n'appartient à aucun groupe des carboxylases étudiées car la réaction semble se dérouler via un intermédiaire phosphorylé libre. Elle est extrêmement sensible à l'oxygène et sensible aux piègeurs radicaux, l'enzyme est indépendante de la biotine ou encore de la thiamine diphosphate et diffère de la plupart des carboxylases connues car utilisant du  $CO_2$  comme substrat et un métal comme co-catalyseur (Breining *et al.*, 2000).

L'étape suivante est analogue à celle décrite pour la dégradation du benzoate par *Paracoccus denitrificans* en 1970. Dans cette voie, le phénol est carboxylé en position *para* par rapport au 4-hydroxybenzoate qui est la première étape dans la voie anaérobie. Dans ce cas, l'enzyme impliquée est la 4-hydroxybenzoate carboxylase. Il a été démontré que la dégradation anaérobie de plusieurs autres composés aromatiques comprenait une réaction de carboxylation (Basha *et al.*, 2010).

Les organismes capables de dégrader le phénol dans des conditions anaérobies sont principalement *Thauera aromatica* et *Desulphobacterium phenolicum* (Basha *et al.*, 2010). Cependant, la biodégradation anaérobie est plus lente et moins efficace.

### **2.3. Optimisation des conditions pour une biodégradation améliorée des phénols**

La biodégradation des phénols par un microorganisme dépend d'un certain nombre de facteurs et il est tout à fait essentiel de comprendre comment ces facteurs affectent la dégradation du microorganisme. La sélection des conditions physico-chimiques optimales est toujours une préoccupation majeure.



Chacun de ces facteurs devrait donc être optimisé pour que l'organisme choisi atteigne la dégradation maximale du composé phénolique sélectionné. L'optimisation de la concentration du substrat dans la biodégradation des phénols est particulièrement importante, car il est connu que la biodégradation des phénols par les cellules microbiennes est inhibée par les phénols eux-mêmes, en particulier à des concentrations élevées ( $\geq 200\text{mg.l}^{-1}$ ). Bien que les phénols soient biodégradables à la fois en aérobiose et en anaérobiose, ils peuvent inhiber la croissance de microorganismes à des concentrations élevées, même pour les espèces qui peuvent les utiliser comme substrat de croissance (Al-Khalid et El-Naas, 2012).

Jones et Johnson (1973) ont rapporté qu'une concentration minimale de phénol, comprise entre  $0,24$  à  $0,28\text{g.l}^{-1}$ , est nécessaire pour la croissance de la bactérie dégradant le phénol *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250.

La biodégradation du phénol est parfois améliorée en ajoutant dans le milieu d'autres sources de carbone. Loh et Wang (1997) ont étudié l'amélioration du potentiel de biodégradation de *Pseudomonas putida* ATCC 49451, en utilisant le glutamate de sodium et le glucose comme sources de carbone. Ils concluent dans leur étude que l'addition de 1000 ppm de glutamate augmente la tolérance à la toxicité envers le phénol. Par contre, l'apport en glucose provoque une chute significative du pH du milieu de 7,2 à 4,3, ce qui entraîne une réduction du taux de dégradation.

Feitkenhauer *et al.* (2001) ont étudié l'effet du pH sur la biodégradation du phénol par la souche thermophile *Bacillus thermoleovorans* sp A2. Ils ont trouvé que le taux de croissance le plus élevé se situe à pH 6,0.

L'effet de facteurs physiologiques comme le pH, la température, les concentrations de glucose et de sulfate d'ammonium sur le potentiel de biodégradation de *Pseudomonas putida* ATCC 3180 a été étudié par Annadurai *et al.* (2002). Les auteurs rapportent que les valeurs optimales de dégradation du phénol sont de pH 7,0, température  $30^{\circ}\text{C}$ , glucose  $0,6\text{g.l}^{-1}$  et sulfate d'ammonium  $0,6\text{g.l}^{-1}$ .

Chakraborty *et al.* (2010) ont entrepris une étude pour évaluer la biodégradation du phénol par une souche bactérienne isolée des effluents d'une usine de transformation de coke. La vitesse d'élimination du phénol par la souche ESDSPB<sub>2</sub> est étudiée en fonction de divers paramètres physico-chimiques, tels que le pH, la température et la concentration en glucose du milieu. Les conditions optimales pour l'élimination du phénol sont : un pH de 7,0, une

température d'incubation de 30°C et 0,25% de glucose.

## **2.4. Principales enzymes impliquées dans le catabolisme des phénols**

Les enzymes isolées à partir de souches de *Trichosporon cutaneum* impliquées dans la dégradation spécifique du phénol et de ses dérivés servent de référence pour la comparaison des caractéristiques structurelles et fonctionnelles d'enzymes semblables provenant d'autres microorganismes (Eppink *et al.*, 2000). Il est bien établi dans la littérature que, chez les levures et les moisissures, le phénol est métabolisé par un mécanisme *ortho* et entre dans le métabolisme central comme succinate et acétyl-S-CoA (Schie et Young, 2000). Ce mécanisme catabolique implique six enzymes cytoplasmiques. Les quatre premières enzymes de dégradation du phénol par un *ortho*-mécanisme sont : la phénol-hydroxylase (EC 1.14.13.7), la catéchol 1,2-dioxygénase (EC 1.13.11.1), l'enzyme de lactonisation *cis,cis*-muconate (EC 5.5.1.1) et la 3-oxoadipate énoyl-lactone-hydrolase (Schie et Young, 2000). La phénol-hydroxylase et la catéchol dioxygénase sont décrites ci-dessous.

### **2.4.1. Phénol-hydroxylases**

La première étape dans les deux voies est la monohydroxylation à la position *ortho* du cycle aromatique. L'enzyme qui catalyse ces réactions et qui joue un rôle clé dans la dégradation aérobie des composés monoaromatiques est une monooxygénase : la phénol-hydroxylase (EC 1.14.13.7). Les monooxygénases aromatiques sont divisées en deux groupes : les formes enzymatiques monocomposantes et multicomposantes (Divari *et al.*, 2003).

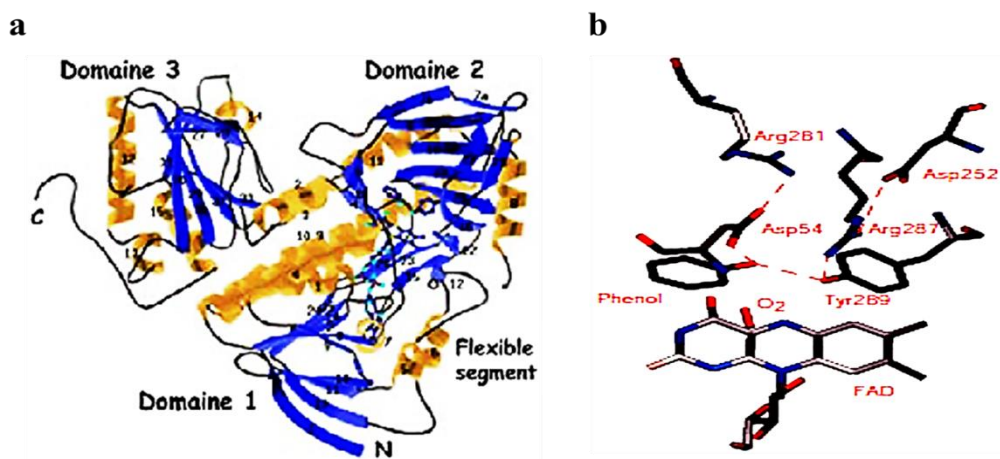
La phénol-hydroxylase catalyse la fixation d'un groupe hydroxyle en position *ortho* du noyau aromatique, hydroxylant ainsi le phénol en catéchol. Cette réaction est réalisée par une enzyme caractérisée comme une monooxygénase et constitue la première étape de la dégradation des composés aromatiques chez les microorganismes. Les monooxygénases introduisent un atome d'oxygène dans le substrat correspondant. Outre le phénol, qui est le substrat privilégié de la phénol-hydroxylase, cette enzyme peut catalyser l'hydroxylation de phénols substitués par des groupes hydroxyles, amines, halogènes ou méthyles (Basha *et al.*, 2010).

- **Structures et propriétés catalytiques des phénol-hydroxylases (PHs)**

- PHs des levures : La phénol-hydroxylase isolée et décrite chez la levure a été caractérisée comme une fonction mixte oxydase contenant le FAD et strictement dépendante du cofacteur NADPH. L'enzyme est un homodimère constitué de deux monomères identiques avec  $M_m = 76$  kD, contenant chacun deux dinucléotides d'adénine et de flavine non liés par covalence. Dans le processus d'investigation de la phénol-hydroxylase de la levure, il s'est avéré qu'elle contient 16 groupes thiol (-SH) sur 1M et n'a pas de ponts disulfure. Pour une activité enzymatique maximale, tous les groupes thiol sont réduits et liés au groupe prothétique FAD. Le phénol agit comme effecteur de substrat, en augmentant l'affinité à son cofacteur NADPH (Nair *et al.*, 2008 ; Röling, 2010).

Une analyse structurale de la phénol-hydroxylase de *T. cutaneum* ATCC 46490 a été effectuée. Le modèle protéique est constitué de deux homodimères. Chaque sous-unité contient trois domaines (Fig. 4), le premier d'entre eux contient la couche  $\beta$  reliant le cofacteur FAD. Le centre actif de l'enzyme est entre le premier et le second domaine. Ce dernier relie également le substrat. Le troisième domaine contient un motif de type thiorédoxine et est impliqué dans l'interaction des deux sous-unités. La flexibilité conformationnelle permet au substrat d'atteindre le centre actif et d'exclure le solvant pendant la réaction d'hydroxylation. Cette souplesse est importante en présence de substitués dans le cycle aromatique (Enroth *et al.*, 1998).

L'enzyme a été isolée et purifiée à partir des levures de sol *T. cutaneum* par Neujahr et Gaal en 1973, et plus tard retrouvée dans les souches de *Candida tropicalis*. Le clonage, le séquençage et l'expression du gène phénol-hydroxylase de *T. cutaneum* dans *Escherichia coli* sont rapportés pour la première fois en 1992 (Kälin *et al.*, 1992). Les auteurs ont également observé quelques différences dans l'activité catalytique de la phénol-hydroxylase isolée de différentes espèces de levures. Par exemple, l'enzyme partiellement purifiée de *C. tropicalis* ATCC 46491 présente une spécificité de substrat plus large que l'enzyme isolée d'une souche de *T. cutaneum*. Grâce au séquençage complet et à l'analyse comparative du génome, la présence de phénol-hydroxylase a été déterminée, ainsi que le reste des enzymes clés du catabolisme phénolique dans une souche d'*Aspergillus fumigatus* Af293 (Tuckwell *et al.*, 2011).



**Figure 4 :** Schéma d'une sous-unité dans la conformation fermée. Le cofacteur FAD, le substrat de phénol et le résidu de site actif Tyr285 sont dessinés sous forme de modèles à bille et bâton, avec des atomes dans des couleurs standard (a). Stéréoscopie du site actif de la phénol-hydroxylase dans la conformation fermée. Tyr289 est situé à l'intérieur de la liaison d'hydrogène à la fois de l'intermédiaire C4a peroxy-FAD modélisé et de l'atome d'oxygène de phénol. Les résidus Asp54 et Arg287 sont tous deux en contact avec le solvant par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes (b) (Enroth *et al.*, 1998).

Les résultats des analyses par hybridation ADN-ADN (Southern blot) de gènes codant une enzyme avec l'activité phénol-hydroxylase (*phyA*) ont montré que des séquences nucléotidiques d'ADN similaires étaient présentes dans un certain nombre de souches de *T. cutaneum* et *Candida elinovii*. Par conséquent, ces souches possèdent probablement des gènes *phyA* avec un degré élevé de similarité. En outre, chez certaines souches, plusieurs séquences homologues de ce gène ont été détectées, suggérant que de nombreux gènes *phyA*, ou des fragments similaires à des gènes *phyA* (par exemple : la résorcinol hydroxylase) sont présents dans ces génomes. D'autre part, l'ADN isolé de *Trichosporon pullulans*, de *Trichosporon penicillatum* et de *C. tropicalis* n'a montré aucune similitude de séquence avec le gène *phyA* isolé des souches *Trichosporon* étudiées (Enroth *et al.*, 1998).

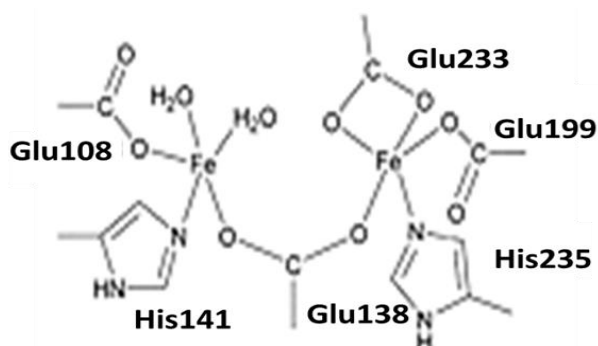
- PHs des bactéries : Les phénol-hydroxylases des bactéries appartiennent principalement à la classe des oxygénases aromatiques multicomposantes (à trois composants) et sont responsables de l'oxydation du phénol et de certains dérivés phénoliques substitués par un méthyle aux catéchols correspondants (Hanson et Berliner, 2009). Ces enzymes sont utilisées par un grand nombre de bactéries pour dégrader les composés toxiques au dioxyde de carbone et à l'eau, en tant que partie de leurs voies cataboliques. Deux phénol-hydroxylases :

la DMP phénol-hydroxylase de *Pseudomonas* sp. CF600 et la toluène *o*-monooxygénase de *Burkholderia cepacia* G4 (ToMOH), également connue sous le nom de toluène-2-monooxygénase, ont été isolées et caractérisées à ce jour. Ces enzymes présentent des caractéristiques et des propriétés similaires à celles de la méthane monooxygénase (MMOH), tant par rapport à leur réactivité que par leur structure (Hanson et Berliner, 2009). Plus précisément, chacun de ces systèmes contient trois composants fonctionnels nécessaires à la catalyse : un composant hydroxylase contenant un centre de fer binucléaire ponté par un carboxylate, un composant réductase et une petite protéine effectrice. Ils ont également besoin d'O<sub>2</sub> et le donneur d'électrons NADH pour que les hydroxylations se produisent (Hanson et Berliner, 2009).

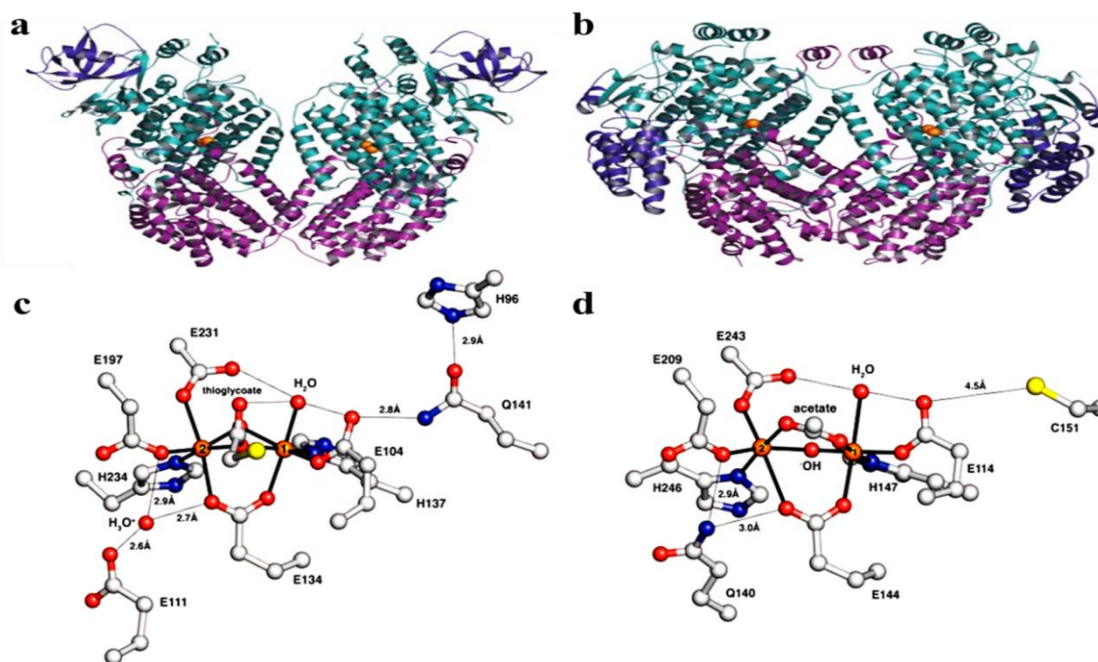
La phénol-hydroxylase de *Pseudomonas* sp. CF600 catalyse la première étape de la voie de dégradation du phénol, en le transformant en catéchol qui, par la suite, subit une dégradation supplémentaire. Ses trois composantes sont un composant hétéromultimérique ( $\alpha\beta\gamma$ ) hydroxylase (DmpLNO) accommodant le centre de fer binucléaire non-héminique, un composant de réductase (DmpP) contenant du FAD et un groupe [2Fe-2S] comme cofacteur et une petite protéine de couplage (activateur) (DmpM) sans ions métalliques ou cofacteurs associés (Hanson et Berliner, 2009). Les études biochimiques et la comparaison de séquences de ces composants indiquent une homologie significative pour les sujets correspondants de MMOH, par rapport aux ligands dans le domaine de liaison au fer des composants de l'hydroxylase. En outre, un alignement de séquence d'acides aminés des protéines de couplage MMOB (16 kDa) et DmpM (10,4 kDa) et la comparaison de leurs structures de solution RMN indiquent des structures secondaires similaires. Il est donc probable que les rôles de DmpM et MMOB dans leurs complexes protéiques respectifs soient équivalents, c'est-à-dire en modifiant le potentiel redox du composant oxygénase, en augmentant la réactivité avec O<sub>2</sub> et en affectant le rendement du produit. Le DmpM est nécessaire pour le renouvellement maximal de la DMP phénol-hydroxylase, qui atteint un maximum à un rapport DmpM/DmpLNO d'environ 1,5:1 (Hanson et Berliner, 2009).

Un composant supplémentaire est associé à la DMP phénol-hydroxylase, la protéine dite protéine auxiliaire DmpK, qui semble être responsable de l'assemblage dépendant du fer de DmpLNO. Plus précisément, DmpK a été proposé de jouer un rôle important lors de l'incorporation post-traductionnelle du fer dans apoDmpLNO. DmpK semble être unique parmi les oxygénases de fer binucléaire non-héminique. Une structure cristalline de la

protéine du complexe régulateur de la phénol-hydroxylase de *Pseudomonas* sp. OX1 a récemment été signalé. Le centre à deux atomes de fer de la phénol-hydroxylase est essentiellement le même en l'absence ou en la présence de ses protéines régulières (Fig. 5) et ressemble à celui du centre de fer binucléaire de MMOH dans sa forme mélangée (Fig. 6) (Sazinsky *et al.*, 2004). Il peut être dû à la photoréduction des échantillons par rayonnement synchrotron. Alors que ces structures donnent un aperçu du rôle potentiel de la protéine régulatrice (prévention de la réduction des intermédiaires fer-oxygène à haute valence pendant la catalyse), une invocation spectroscopique détaillée est nécessaire pour évaluer le changement de structure géométrique et électronique du site actif en l'absence / présence de la protéine régulatrice (Hanson et Berliner, 2009).



**Figure 5** : Site actif de la phénol-hydroxylase de *Pseudomonas* sp. OX1 (Hanson et Berliner, 2009).



**Figure 6 :** Structure de ToMOH et comparaison avec MMOH. Les diagrammes de ruban des groupes ToMOH (a) et MMOH (b). Liaison hydrogène au ou près des centres ToMOH et MMOH. Les interactions des liaisons hydrogènes avec les coordinats de glutamate coordonnés de ToMOH (c) et de MMOH (d) (Sazinsky *et al.*, 2004).

Les études de Mössbauer ont contribué à caractériser le groupe de fer binucléaire de DmpLNO. Deux types de groupes différentiels de fer binucléaire sont observés, chacun contenant deux sites de fer équivalents. Les clusters I et II représentent respectivement et environ 85% et 15% de la quantité totale de DmpLNO, alors que l'activité catalytique de grandeur de la constante de couplage d'échange  $J$  ( $H_{ex} = -2JS1.S2$ ) dans le groupe I est estimée supérieure à  $60 \text{ cm}^{-1}$ , valeur indicative d'un pont oxo entre les deux centres ferriques à haut spin et éventuellement des ligands de carboxylate de pontage supplémentaires (Hanson et Berliner, 2009). En revanche, l'ampleur de  $J$  dans le groupe II est beaucoup plus petite, ce qui implique un pont  $\mu$ -hydroxo ou  $\mu$ -aqua entre les deux centres de fer, comme cela a été observé dans MMOH. La bande X du mode parallèle à basse température EPR des expositions DmpLNO réduites par dithionite et le signal de spin entier à  $g_{\text{eff}} = 166,6$ , indicatif de deux ions  $\text{Fe}^{2+}$  couplés faiblement ferromagnétiquement. Une analyse de la concentration de spin a montré que le signal EPR observé ne correspond qu'à 19% de la concentration totale de centres binucléaires, il a été proposé que seul le groupe II soit EPR est actif. L'existence de deux variétés différentes de clusters différentiels dans DmpLNO rappelle la  $\Delta^9$  désaturase et la toluène-4-monooxygénase, suggérant un mécanisme de réaction similaire (Hanson et Berliner, 2009).

Dans le genre *Pseudomonas*, le gène structural de la phénol-hydroxylase a été identifié dans un plasmide et le gène a été cloné et séquencé (Nurk *et al.*, 1991). Ce gène a une homologie de 46% avec la 2,4-dichlorophénol-hydroxylase d'*Alcaligenes eutrophus* (Perkins *et al.*, 1990).

La phénol-hydroxylase provenant d'*Acinetobacter radioresisents* S13 est une autre monooxygénase multicomposante qui catalyse l'hydroxylation du phénol, des phénols chlorés, méthylés et le naphthol. Elle nécessite également trois composants protéiques pour une activité catalytique complète, une oxygénase (PHO) qui contient le centre de fer binucléaire non-héminique requis pour la catalyse, une réductase (PHR) et une petite protéine régulatrice (PHI). Un complexe protéique distinct est formé entre les trois composants ; le renouvellement catalytique maximal est réalisé lorsque le rapport PHR:PHI:PHO est de 2:1:1.

Comme la DMP phénol-hydroxylase et MMOH, le petit composant régulateur PHI semble favoriser les interactions entre le substrat et le site actif en fer du composant PHO. Dans ce cas, la protéine effectrice interagit avec la composante réductase, facilitant ainsi le transfert des électrons entre les composants réductase et oxygénase (Hanson et Berliner, 2009).

D'autres phénol-hydroxylases homologues à la DMP phénol-hydroxylase, MMOH et l'alcène monooxygénase provenant de *N. coralline* ont été isolés de *Commamonas testosteroni* R5 et de *Ralstonia eutropha* E2, mais elles restent à caractériser par spectroscopie structurale et mécaniquement (Hanson et Berliner, 2009).

- **Régulation de la synthèse des PHs**

L'inductibilité enzymatique est l'objet d'intérêt pour déterminer la relation entre le type de substrat aromatique et l'activité phénol-hydroxylase. La spécificité du substrat et l'effet des conditions réactionnelles (pH, température, etc.) sur l'activité enzymatique ont été étudiés pour une enzyme isolée de *Candida maltosa*. Les auteurs ont testé le phénol, le catéchol, le résorcinol, le *p*-crésol et l'acide benzoïque comme substrats. Le phénol (1g.l<sup>-1</sup>) était le meilleur inducteur. L'activité enzymatique la plus faible est déterminée lorsque le *p*-crésol est utilisé comme source de carbone unique. Cependant, l'addition de phénol conduit à la dégradation complète du *p*-crésol. Des études ont également démontré que la présence d'acide humique affecte positivement la phénol-hydroxylase. L'addition de ces composés au cours de la culture de *C. maltosa* dans un bioréacteur augmente son activité de biodégradation totale des substances de type phénol (Cejkova *et al.*, 2002).

La phénol-hydroxylase de *T. cutaneum* a montré une activité différente vis à vis des phénols substitués. La caractéristique enzymatique de *Pseudomonas picketti* PK01 a été induite par seulement deux substrats phénoliques (phénol et *p*-crésol), tandis que l'enzyme de *T. cutaneum* a été induite par les trois isomères de crésol et les trois isomères de fluorophénol. Toutes ces différences spécifiques pourraient s'expliquer par les différentes positions de liaison des substrats, ainsi que par la structure différente des enzymes isolées à partir de différents microorganismes. L'étude détaillée de la structure protéique de l'enzyme a établi qu'il y avait une homologie dans la section à l'extrémité N-terminale de la phénol-hydroxylase chez des levures et de la *p*-hydroxybenzoate hydroxylase chez *Pseudomonas* sp. (Nurk *et al.*, 1991).



### 2.4.2. Catéchol dioxygénases

Le premier produit intermédiaire de la dégradation du phénol est le catéchol. L'enzyme dioxygénase catalyse le clivage du noyau aromatique du catéchol et de ses dérivés. Elle réalise l'étape critique dans la dégradation aérobie des composés aromatiques chez les microorganismes. Deux classes de ces enzymes sont identifiées sur la base des mécanismes de clivage des cycles aromatiques: les dioxygénases intradiols, qui utilisent le Fe (III) pour cliver le cycle aromatique en position *ortho* par rapport aux substituants hydroxyles et les dioxygénases extradiols qui utilisent du Fe (II) ou d'autres ions métalliques à valence 2 (Mn (II)) pour cliver le noyau aromatique en *meta* position par rapport aux groupes hydroxyles. Les études génomiques, structurales, spectroscopiques et cinétiques élargissent la connaissance de la distribution, de l'évolution et des mécanismes d'action de ces enzymes. Généralement, les dioxygénases extradiols ont plus d'activité que les dioxygénases intradiols, ce qui est démontré par une plus grande spécificité vis-à-vis du substrat, la présence de variations structurales et la participation à d'autres voies métaboliques, y compris des chaînes biosynthétiques et des voies de dégradation des composés non aromatiques (Vaillancourt *et al.*, 2006).

- **Les extradiols dioxygénases**

Dans les mécanismes de *meta clivage*, l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase (EC 1.13.1.2.) attaque la liaison à la *meta*-position dans le cycle aromatique. Le produit de cette réaction est l'acide 2-hydroxymuconique semi-aldéhyde, qui est ensuite décomposé en acétaldéhyde et en pyruvate sur plusieurs étapes.

La structure tridimensionnelle de l'enzyme a été obtenue et s'est révélée être un homotétramère, constitué de sous-unités identiques dont chacune contient deux domaines similaires (Kita *et al.*, 1999). L'étude du gène codant la catéchol 2,3-dioxygénase dans la bactérie dégradant l'aniline *Acinetobacter* sp. YAA, montre qu'elle présente une activité différente vis-à-vis des composés suivants: catéchol (100%), 3-méthylcatéchol (19%), 4-méthylcatéchol (57%), 4-chlorocatéchol (46%) et 2,3-dihydroxybiphényle (5%). Cette enzyme possède une structure tétramère de sous-unités identiques de 35 kD (Takeo *et al.*, 2007).

Chez les bactéries dont le *meta*-clivage des composés phénoliques est caractéristique, les gènes codant la voie *meta* sont souvent de grands plasmides comme les plasmides TOL ou NAH (van der Meer *et al.*, 1992). Les catécholdioxygénases (extradiols) se retrouvent donc dans de nombreuses voies cataboliques dégradant d'autres composés aromatiques que le phénol comme le toluène et le naphthalène.

- **Les intradiols dioxygénases**

La seconde enzyme provenant des mécanismes *ortho* de la voie 3-oxoadipate pour la dégradation du phénol est la catéchol 1,2-dioxygénase (EC 1.13.11.1.). Cette enzyme est souvent utilisée pour évaluer le potentiel de différentes associations microbiennes pour la dégradation aérobie des composés aromatiques (Grekova-Vasileva et Topalova, 2009).

Presque tous les membres de cette famille sont des homodimères. L'enzyme catéchol 1,2-dioxygénase produite par *Pseudomonas arvilla* est l'exception à cette règle, elle contient deux sous-unités hautement homologues qui peuvent former un homo ou un hétérodimère (Nakai *et al.*, 1979). L'enzyme est en forme de boomerang et peut donc être clairement divisée en trois domaines: deux domaines catalytiques résidant à chaque extrémité du «boomerang» et un domaine de liaison au centre. Chaque domaine catalytique est composé de deux feuilles  $\beta$  de topologie empilées et mixtes et de plusieurs bobines aléatoires. Ces feuilles et ces bobines englobent ensuite le site actif : un complexe de fer non-hème (III).

Initialement, l'enzyme a donc été isolée et purifiée à partir de bactéries du genre *Pseudomonas*. Il a été établi que l'enzyme dioxygénase incorporait directement de l'oxygène moléculaire dans le cycle aromatique du catéchol, ce qui a entraîné la formation d'acide cis, cis-muconique.

De nombreuses enzymes ayant une action similaire ont été décrites. La voie métabolique pour la dégradation du 4-aminophénol comme seule source de carbone par *Burkholderia* sp. AK-5 a été étudiée. La souche transforme le 4-aminophénol en 1,2,4-trihydroxybenzène dont le noyau est ensuite clivé en *orthopar* une dioxygénase (Takenaka *et al.*, 2003). Dans l'assimilation de l'aniline par *Rhodococcus* sp. AN22, l'activité constitutive de la catéchol-1,2-dioxygénase a été détectée dans le milieu contenant de l'aniline, ainsi que dans le milieu avec du glucose comme source de carbone. Les enzymes isolées dans les deux expériences ont montré des caractéristiques similaires en ce qui concerne le catéchol (Matsumura *et al.*, 2004).

La question principale dans la dégradation des différents composés phénoliques, en raison de la diversité de leur structure chimique due aux différents groupes de substitution, est de savoir s'ils sont métabolisés par le même mécanisme. Dans une souche d'*Arthrobacter* dégradant le phénol et le crésol, deux catéchol dioxygénases ont été détectées, l'activité de la catéchol 2,3-dioxygénase est beaucoup plus élevée que celle de la 1,2-dioxygénase. Sur la base de ces résultats, les auteurs ont conclu que le phénol et le crésol sont métabolisés par le même mécanisme *meta*. Les deux catégories de catéchol dioxygénase impliquées dans la dégradation de divers composés phénoliques ont également été trouvées chez des souches de *Pseudomonas* et d'autres espèces étroitement apparentées (Lillis *et al.*, 2010).

Une nouvelle catéchol 1,2-dioxygénase a été isolée à partir d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* TKU002, capable d'assimiler l'acide benzoïque comme seule source de carbone. L'enzyme a des caractéristiques uniques, comme la très faible masse moléculaire (22 kD), l'activité la plus élevée contre le pyrogallol, l'acidité moyenne élevée pour la production d'enzymes, ce qui la distingue des autres catéchol dioxygénases microbiennes (Wang *et al.*, 2006).

Chez les levures, la catéchol 1,2-dioxygénase la mieux caractérisée a été isolée de la souche assimilable au phénol de *C. albicans* TL3. Un mécanisme *ortho* pour la dégradation du phénol a été déterminé par l'application d'une analyse enzymatique, chromatographique et par spectrométrie de masse. La souche était également capable de dégrader le formaldéhyde, qui est l'un des principaux polluants dans les eaux usées provenant de la fabrication de produits phénoliques (Tsai et Li, 2007).

Les recherches sur les enzymes avec l'activité de la catéchol dioxygénase augmentent encore le spectre des microorganismes capables de dégrader le phénol par différents mécanismes. Un exemple intéressant est *Fusarium* sp. HJ0, qui peut dégrader et assimiler les concentrations élevées de phénol. Il a été déterminé que la catéchol 1,2-dioxygénase et la catéchol 2,3-dioxygénase sont présentes chez la souche, ce qui signifie que le catéchol est oxydé à la fois par voies *ortho* et *meta*. Ces deux enzymes peuvent effectuer et préserver leur activité catalytique dans une large gamme de valeurs de température et de pH (Cai *et al.*, 2007).

En 1970, l'enzyme catéchol 1,2-dioxygénase de masse moléculaire de 100 kD a été isolée du genre *Trichosporon* (Varga et Neujahr, 1970). L'enzyme est relativement stable à pH 8 et inactivée à pH = 6,2. Il a été établi qu'elle avait des caractéristiques plus proches de celles de l'enzyme isolée de *Brevibacterium*, bien que cette dernière ait une plus large spécificité de substrat.

Par des expériences sur des cellules induites par le phénol et le résorcinol, il s'est avéré que la catéchol 1,2-dioxygénase de *T. cutaneum* avait une spécificité de substrat plus large, avec notamment la capacité d'oxyder les dérivés méthyl- et hydroxyl-catéchols.

## **2.5. Approche moléculaire pour l'identification de gènes cataboliques responsables de la biodégradation des phénols**

Au cours de la dernière décennie, les techniques récentes d'analyse métagénomique ont relancé les études d'écologie microbienne en permettant de mieux connaître la composition et les équilibres de consortiums bactériens présents dans l'environnement. En ce qui concerne les espèces microbiennes, seulement 5% de la diversité microbienne serait connue à ce jour et donc 95% reste encore à explorer (Srivastava *et al.*, 2014).

Grâce aux techniques de biologie moléculaire appliquées aux analyses environnementales, des stratégies ont permis la découverte et l'identification de nouvelles bactéries et de leurs gènes cataboliques impliqués dans la dégradation des xénobiotiques. L'application de ces techniques à la bioremédiation a également amélioré notre compréhension de la composition, de la phylogénie et de la physiologie des membres actifs de la communauté microbienne dans l'environnement.

Depuis longtemps, on sait que les gènes responsables de la dégradation bactérienne des composés aromatiques sont souvent portés par des plasmides (Chakrabarty, 1976). Chez *Pseudomonas*, par exemple, les gènes responsables de la biodégradation du toluène et du naphthalène sont portés par des gènes appelés respectivement TOL et NAH (Fujii *et al.*, 1997). Les techniques de PCR de RT-PCR (transcription inverse couplée à la PCR) ont été employées pour la détection de gènes spécifiques dans des échantillons environnementaux (Selvaratnam *et al.*, 1995).

La voie de *meta*-clivage pour le catéchol est l'une des principales voies de dégradation microbienne des composés aromatiques. Shingler *et al.* (1992) ont étudié la dégradation du phénol par *Pseudomonas* sp. CF600 via une phénol-hydroxylase multicomposante codée par un plasmide trouvé que les 15 gènes *dmp* de la voie catabolique sont regroupés sur un plasmide.

Shingler *et al.* (1993) ont cloné le gène codant pour le régulateur (DmpR) de la voie catabolique phénolique et l'ont identifié comme un membre de la famille des activateurs transcriptionnels NtrC. Ce régulateur fonctionne comme un activateur transcriptionnel de tous les autres gènes *dmp* en interagissant avec l'ARN polymérase associé au facteur  $\sigma 54$ .

Dans *Bacillus thermoglucosidasius* A7, Kirchner *et al.* (2003) ont décrit une nouvelle phénol-hydroxylase (PheA) qui catalyse la première étape de la dégradation du phénol. Cette enzyme est composée de deux protéines, codées par les gènes *pheA1* et *pheA2*. Le système actif à 55°C est constitué d'une oxygénase (*PheA1*) et d'une flavine réductase (*PheA2*). *PheA1* catalyse l'ortho-hydroxylation du phénol en catéchol, grâce à une source d'électrons provenant du NADH par l'intermédiaire de *PheA2* et FAD. L'activité hydroxylase est strictement dépendante de FAD, et ni le FMN ni la riboflavine ne peuvent remplacer le FAD dans cette réaction. La *PheA2* catalyse la réduction NADH dépendante du cofacteur FAD sous sa forme libre, qui sert de transporteur d'électrons à la composante hydroxylase.

Chez *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2, Zhan *et al.* (2009) ont étudié l'utilisation retardée du phénol en présence de Benzoate. Les gènes *mphR* codant pour l'activateur transcriptionnel et *mphN* codant pour la grande sous-unité de phénol-hydroxylase ont été régulés à la baisse par l'addition de benzoate. Les auteurs ont suggéré que la répression catabolique de la dégradation du phénol par le benzoate chez cette souche résulte de l'inhibition de la protéine activatrice *MphR*.

Chez différentes espèces indigènes de *Pseudomonas*, Peters *et al.* (1997) ont mis en évidence l'acquisition d'un opéron de dégradation du phénol, *PheBA* par transfert de gènes. L'expression du gène *pheA*, qui code pour la phénol monooxygénase, permet aux pseudomonades d'utiliser le phénol comme substrat de croissance. Les gènes *phe* ont été regroupés de la même manière dans les opérons *phe* des neuf espèces étudiées.

Watanabe *et al.* (1999) ont isolé un total de 41 souches bactériennes, à partir d'un réacteur contenant des boues activées et soumis à différentes charges phénoliques. Les souches ont été identifiées sur la base des séquences du gène *gyrB* codant l'ARNr 16S. L'analyse phylogénétique des gènes *gyrB* a divisé ces souches en deux groupes physiologiquement divergents. L'analyse a montré que le changement de population a eu lieu suite à l'augmentation de la concentration du phénol. Cette étude a également démontré l'utilité des analyses de populations fines, ciblées par *gyrB* dans l'écologie microbienne.

Selvaratnam *et al.* (1995) ont employé la technique de transcription inverse couplée à la PCR pour suivre l'expression *in situ* du gène *DmpN* dans un réacteur discontinu contenant des boues activées. Cette technique a ensuite été utilisée pour analyser l'expression *in situ* du gène catabolique *dmpN* dans un réacteur discontinu de séquençage (SBR) inoculé avec *P. putida* ATCC 11172. Une plus grande expression de *dmpN* est observée après que la concentration maximale en phénol ait été atteinte (15 min après le début de l'aération). La diminution des concentrations de phénol dans le réacteur correspondait à des niveaux réduits d'expression de *dmpN*.

Futamata *et al.* (2001) ont étudié la diversité des gènes codant la phénol-hydroxylase dans des aquifères pollués au trichloréthylène (TCE) et au phénol. Les séquences de la grande sous-unité de la phénol-hydroxylase multicomposante LmPH ont été comparées. Elles forment trois groupes phylogénétiques, correspondant à trois types d'enzymes caractérisés par des constantes cinétiques différentes (Ks faible, modéré ou élevé). Ks a été défini comme étant la constante de demi-saturation dans l'équation de Haldane pour le TCE, analogue du substrat de la phénol-hydroxylase. Des analyses par PCR compétitives ont été utilisées pour quantifier les proportions relatives des trois types de LmPHs pendant l'enrichissement des bactéries dégradant le phénol / TCE du sol aquifère.

Chez *Pseudomonas Stutzeri*, Cafaro *et al.* (2004) ont rapporté la présence de deux monoxygénases différentes. Ils ont trouvé une phénol-hydroxylase (PH) et une toluène / *o*-xylène monoxygénase (ToMO). Ils ont mentionné dans leur étude que la phénol-hydroxylase est une enzyme à deux composantes : la composante PH P transfère des électrons de NADH à un sous-complexe doté d'une activité hydroxylase et la composante PH M semble avoir une fonction régulatrice.

Chez *Rhodococcus erythropolis* UPV-1, Saa *et al.* (2010) ont mis en évidence une phénol-hydroxylase à deux composantes dépendant des flavines. Les deux protéines sont codées par les gènes *pheA1* et *pheA2*, voisins dans le génome. Le gène *pheA1* séquencé est composé de 1 629 pb codant une protéine de 542 acides aminés, tandis que le gène *pheA2* est constitué de 570 pb codant pour une protéine de 189 acides aminés. Les auteurs ont cloné et caractérisé les deux gènes et rapporté que, pour l'hydroxylation du phénol, les deux protéines sont nécessaires en plus du FAD et du NADH.

## *Matériels et méthodes*



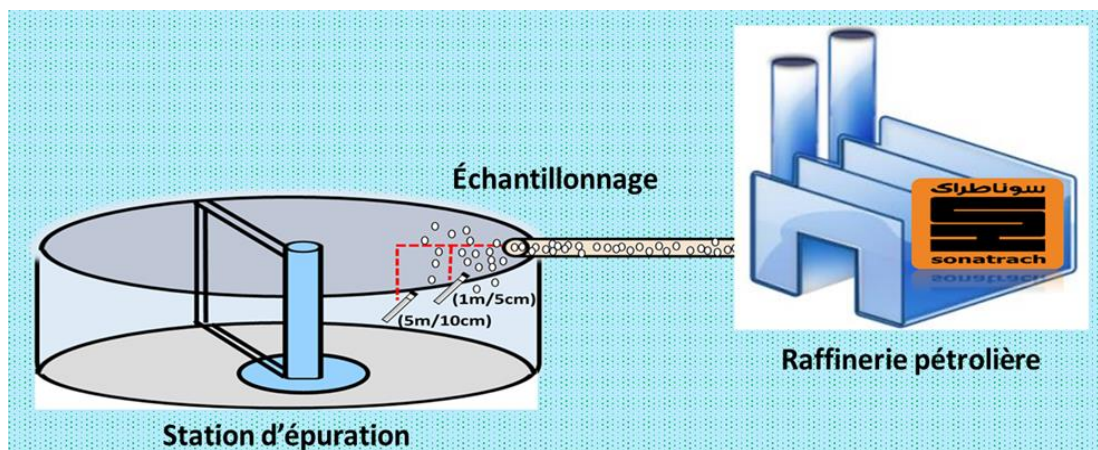
## **Matériels et méthodes**

Les expériences d'isolement, de purification de cultures de microorganismes, ainsi que les travaux de biochimie et de biologie moléculaire ont été effectués au laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université des Frères Mentouri – Constantine, Algérie), d'une part, et au laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR 5249 CEA/CNRS/Université Grenoble Alpes (CEA de Grenoble, France) d'autre part.

### **1. Prospection du site de prélèvement et méthode d'échantillonnage**

Les échantillons d'eaux usées étudiés au cours de ce travail ont été prélevés au mois de septembre 2014 et 2015, au niveau de la station d'épuration (STEP) de la raffinerie de pétrole (Sonatrach) de Skikda (Algérie). La STEP se situe entre la latitude 36° 52' 23" Nord et la longitude 6° 58' 27" Est. Ce site a été choisi pour le degré élevé de pollution de ses eaux par les hydrocarbures et notamment les phénols. En effet, les eaux usées des raffineries pétrolières contiennent du phénol, des monométhylphénols (*o*-, *m*- et *p*-crésol) et des diméthylphénols (2,4-, 2,5-, 3,4- et 3,5-DMP) comme composés phénoliques majoritaires (Ramakrishnan et Gupta, 2006). Notre principal objectif était d'exploiter la diversité bactérienne et fonctionnelle associée à la biodégradation des phénols sur ce site peu étudié. En effet, le contact permanent avec les polluants de ce type permet une adaptation et un développement plus au moins stable d'un microbiote autochtone apte à dégrader des substrats récalcitrants. Des prélèvements manuels instantanés ont été effectués à différents endroits du bassin de stockage des eaux usées, au niveau d'une zone agitée par le courant de l'effluent où le risque de sédimentation était très faible. Ces sites se situent à deux distances du canal et à différentes profondeurs (distance de 1m et profondeur de 5cm et distance de 5m et profondeur de 10cm) (Fig. 7).

Les échantillons ont été prélevés dans des flacons en verre et des tubes Falcon, dans des conditions aseptiques pour préserver le microbiote autochtone. Les échantillons ont été conservés à 4°C, jusqu'aux analyses physico-chimiques et microbiologiques (Rodier *et al.*, 2005).



**Figure 7** : Schéma représentatif du site de prélèvement (STEP de la raffinerie de pétrole Sonatrach – Skikda/Algérie).

Certains paramètres physico-chimiques des effluents ont été mesurés au Laboratoire Santé Environnement Hygiène de Lyon (LSEHL - CARSO), selon les méthodes du prestataire : indice phénol et l'ammonium (Flux continu - CFA),  $DBO_5$  (Avec dilutions), DCO (Spectrophotométrie), nitrates (Chromatographie ionique) et le pH. Chaque mesure a été effectuée en double exemplaires.

## 2. Techniques de microbiologie

### 2.1. Souches bactériennes utilisées

*Sphingomonas* sp. CHY-1 (Tab. 5) a été isolée au laboratoire à partir de sol pollués provenant d'un site où était installée une ancienne usine à gaz. La souche CHY-1 est capable d'utiliser le chrysène comme seule source de carbone, et peut croître sur naphthalène, phénanthrène ou anthracène (Willison, 2004). Plusieurs enzymes de dégradation des HAP, notamment la naphthalène-dioxygénase, ont été étudiées chez cette souche (Demaneche *et al.*, 2004 ; Jouanneau *et al.*, 2006 ; Jouanneau *et al.*, 2007) qui a été retenue comme témoin dans cette étude. Deux souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (Tab. 5) ont été utilisées pour les méthodes de clonage mises en œuvre. Les souches CC1, CC2, CC3 et CP1 sont isolées sur *p*-crésol et/ou phénol à une concentration d' $1\text{g.l}^{-1}$ , elles peuvent aussi métaboliser d'autres composés phénoliques et certains HAP (Harzallah, 2016).

Tableau 5 : Souches bactériennes utilisées.

Souche	Génotype/Phénotype	Utilisation	Fournisseur
<i>E. coli</i> DH5a	<i>F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi- 1 gyrA96 relA1</i>	Clonage	Invitrogen
<i>E. coli</i> NEB5a	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Clonage	New England BioLabs
<i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1		Souche modèle dégradant les HAP	(Demaneche <i>et al.</i> , 2004 ; Willison, 2004)
<i>Bacillus</i> sp. CC1		Souche dégradant le phénol et les crésols	(Harzallah, 2016)
<i>Bacillus</i> sp. CC2		Souche dégradant le phénol et les crésols	(Harzallah, 2016)
<i>Comamonas</i> sp. CC3		Souche dégradant le phénol et les crésols	(Harzallah, 2016)
<i>Lysinibacillus</i> sp. CP1		Souche dégradant le phénol et les crésols	(Harzallah, 2016)

## 2.2. Milieux de culture

### 2.2.1. Milieu Salin Minimum (MSM)

Le milieu MSM est composé de : 1,2g.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 1,6g.l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4g.l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1g.l<sup>-1</sup> NaCl. Le pH est ajusté à 7,1 avec du HCl (1N). Après stérilisation, 10ml.l<sup>-1</sup> de chacune des solutions stériles suivantes sont ajoutés : 20g.l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10g.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1g.l<sup>-1</sup> Fe-EDTA (stérilisé par filtration), 2g.l<sup>-1</sup> extrait de levure (Difco). Pour la préparation des milieux solides, 15g d'agar sont ajoutés à un litre de milieu avant la stérilisation. Les substrats phénoliques étudiés ont été préparés en solutions concentrées, filtrés puis ajoutés au milieu à température ambiante. Ce milieu a été préparé au sein du laboratoire.

### **2.2.2. Milieu Gélose Nutritive (GN)**

La Gélose nutritive est préparée comme suit : 1g.l<sup>-1</sup> extrait de viande (Difco), 2g.l<sup>-1</sup> extrait de levure (Difco), 5g.l<sup>-1</sup> peptone (Difco), 5g.l<sup>-1</sup> NaCl, 15g.l<sup>-1</sup> agar bactériologique (Difco), avec un pH final de 7,4, ajusté avec une solution NaOH (10M). Ce milieu a été préparé au sein du laboratoire.

### **2.2.3. Milieu Luria-Bertani (LB)**

Le milieu LB est composé comme suit : 10g.l<sup>-1</sup> tryptone, 5g.l<sup>-1</sup> extrait de levure, 10g.l<sup>-1</sup> NaCl, le pH est ajusté à 7,5 avec une solution NaOH (10M). Ce milieu, fourni par les laboratoires Invitrogen, a été préparé par dissolution de 25g du milieu déshydraté dans 1l d'eau distillée au sein du laboratoire. Pour la préparation des milieux solides, 15g d'agar sont ajoutés à un litre de milieu avant la stérilisation.

### **2.2.4. Milieu Cétrimide**

Le milieu Cétrimide permet l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonadaceae*) : la composition du milieu est donnée comme suit : 20g.l<sup>-1</sup> peptone, 0,3g.l<sup>-1</sup> cétrimide, 1,4g.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 10g.l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 13,6g.l<sup>-1</sup> agar bactériologique, avec un pH final de 7,2 ± 0,2. Ce milieu, fourni par les laboratoires Difco, a été préparé au sein du laboratoire à partir du milieu déshydraté : dissolution de 45,3g dans 990ml d'eau distillée, puis ajout de 10ml de glycérol, le tout est porté à ébullition.

### **2.2.5. Milieu Chapman**

Ce milieu est utilisé pour l'isolement des *Micrococcaceae*. Il permet également de différencier les espèces fermentant le mannitol de celles qui ne le fermentent pas. Sa composition est donnée comme suit : 10g.l<sup>-1</sup> peptone, 1g.l<sup>-1</sup> extrait de viande de bœuf, 75g.l<sup>-1</sup> NaCl, 10g.l<sup>-1</sup> mannitol, 0,025g.l<sup>-1</sup> rouge de phénol, 15g.l<sup>-1</sup> agar bactériologique, avec un pH final de 7,4 ± 0,2. Ce milieu est commercialisé par l'Institut Pasteur d'Alger.

### **2.2.6. Milieu Mac Conkey**

La gélose Mac Conkey est employée pour la culture des entérobactéries et du *P. aeruginosa*. Ce milieu permet également de tester la capacité des bactéries à Gram-négatif à fermenter le lactose. La composition du milieu Mac Conkey est donnée comme suit : 17g.l<sup>-1</sup>

de peptone pancréatique de gélatine, 1,5g.l<sup>-1</sup> de tryptone, 1,5g.l<sup>-1</sup> de peptone pepsique de viande, 10g.l<sup>-1</sup> de lactose, 1,5g.l<sup>-1</sup> de sels biliaires, 5g.l<sup>-1</sup> de NaCl, 0,03g.l<sup>-1</sup> de rouge neutre, 0,001g.l<sup>-1</sup> de cristal violet, 13,5g.l<sup>-1</sup> d'agar bactériologique, avec un pH final de 7,1 ± 0,2. Ce milieu est commercialisé par l'Institut Pasteur d'Alger.

Un cycle de 20min à 121°C à l'autoclave, est utilisé pour la stérilisation des milieux de culture liquides ou solides, préparés au laboratoire.

### **2.3. Isolement et purification de bactéries dégradant les phénols**

L'isolement des bactéries impliquées dans la biodégradation du phénol et du *p*-crésol, a été effectué par la méthode de dilution-sélection sur milieu de culture minimum. L'ensemencement a été fait à partir des échantillons collectés (eaux usées brutes) et de leurs dilutions (de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>) sur milieu MSM, supplémenté de phénol ou de *p*-crésol (100mg.l<sup>-1</sup>). Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30°C pendant 72h. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque dilution et pour chaque substrat.

Sur la base de l'aspect macroscopique (forme, contour, relief, surface, taille, couleur, et pigmentation) diverses colonies ont été prélevées et repiquées sur le même milieu puis sur GN. Parallèlement, des repiquages sur des milieux sélectifs (Cétrimide, Chapman et Mac Conkey) ont été effectués pour l'obtention de cultures pures. Des repiquages successifs sur milieux solides (ordinaires ou sélectifs) ont été effectués mensuellement pour l'ensemble des isolats.

Après la phase d'isolement, 24 et 10 isolats ont été obtenus sur phénol et *p*-crésol, respectivement. Les souches bactériennes isolées et purifiées ont été soumises à une coloration de Gram et à une série de tests biochimiques préliminaires.

### **2.4. Isolement de bactéries dégradant les méthylphénols**

Des dilutions appropriées de cultures à partir de microcosmes incubés pendant 48h avec du *p*-crésol ou du 3,4-DMP ont été étalées sur une gélose MSM supplémentée avec 100mg.l<sup>-1</sup> du substrat phénolique respectif et incubées à 30°C pendant 72h. Les colonies montrant différents aspects apparents ont été sélectionnées et transférées de façon répétée sur le même milieu minimum et le milieu LB.

## **2.5. Isolement de bactéries résistantes aux concentrations élevées de phénols**

L'isolement de souches tolérantes à des concentrations élevées en phénol/crésol a été effectué de la manière suivante : des échantillons d'eau usée (2,5ml) ont été dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  dans des cultures d'enrichissement constituées de milieu MSM, dans lesquelles le *p*-crésol ( $0,8\text{g.l}^{-1}$ ) ou le phénol ( $1\text{g.l}^{-1}$ ) a été ajouté comme seule source de carbone et d'énergie. Les cultures ont été incubées dans des Erlenmeyers de 100ml pendant 72h à  $30^{\circ}\text{C}$  avec agitation ( $150\text{rpm}$ ). En culture, la dégradation du phénol et/ou du *p*-crésol a été contrôlée par HPLC. Après épuisement du substrat phénolique,  $100\mu\text{l}$  de dilutions de culture ( $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) ont été étalés sur milieu MSM (solide) additionné de  $0,4\text{g.l}^{-1}$  de phénol ou de *p*-crésol. Les colonies isolées ont été repiquées et purifiées sur boîtes MSM et LB.

## **2.6. Conservation des souches bactériennes**

Pour la conservation des souches bactériennes à long terme, des stocks de glycérol ont été préparés. Une colonie de chaque souche bactérienne cultivée sur milieu LB solide a été prélevée et ensemencée dans 3ml de milieu LB. La culture a été arrêtée lorsque les bactéries atteignent la phase de croissance exponentielle. Le glycérol utilisé a été d'abord placé en autoclave, puis refroidi. Un volume de  $200\mu\text{l}$  de glycérol (80%) a été ajouté à  $600\mu\text{l}$  de suspension bactérienne en phase exponentielle et agité au vortex afin de séparer les cellules et d'assurer un mélange homogène des bactéries et du glycérol. Le mélange a été fait dans des tubes cryogéniques. Ces derniers ont été placés immédiatement dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2.7. Utilisation d'autres composés aromatiques et température maximale de croissance des isolats**

Pour tester la capacité des isolats à utiliser d'autres composés aromatiques comme seule source de carbone et d'énergie, les souches ont été étalées sur des boîtes de MSM et quelques cristaux (environ 5mg) de substrat carboné (biphényle, bisphénol A, carbazole, naphthalène et phénanthrène) ou  $50\mu\text{l}$  de BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes) ont été déposés au centre du couvercle de la boîte Pétri. Les substrats phénoliques testés (phénol, *o*-, *m*-, *p*-crésol, *p*-chlorophénol, 3,4-DMP et *p*-nitrophénol) ont été ajoutés par filtration au milieu. Après 2 à 5 jours d'incubation à  $30^{\circ}\text{C}$ , les boîtes ont été vérifiées pour la croissance bactérienne. Des boîtes sans substrat ont été utilisées comme témoins (Djokic *et al.*, 2011b).

La température maximale de croissance des souches bactériennes a été déterminée en les cultivant sur GN à des températures comprises entre 25 et 60°C, par incrément de 5°C pendant 24 à 48h.

## **2.8. Mesures de la croissance bactérienne et cinétique de la dégradation des phénols**

Pour mesurer la croissance bactérienne, les isolats à Gram-positif et thermophiles ont été sélectionnés. Le milieu MSM a étéensemencé à raison de 5% (V/V: 15ml de milieu de culture inoculé avec 0,75ml de pré-culture). Les tubes Falcon (50ml) ont été incubés à 30°C et 15rpm. L'évolution de la turbidité au cours du temps (3h, 6h, 9h, 24h, 30h et 48h) a été mesurée à une longueur d'onde de 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Biophotometer, Eppendorf). La pré-culture a été ajustée à une  $DO_{600}$  de 1 et différentes concentrations de phénol ont été introduites (allant de 100 à 500mg.l<sup>-1</sup>, avec un incrément de 100). Deux répétitions ont été réalisées pour chaque concentration. La dégradation du phénol (100mg.l<sup>-1</sup>) par ces isolats bactériens a été également suivie par HPLC. Les échantillons prélevés ont été centrifugés, puis les surnageants ont été filtrés avant l'analyse HPLC (pour la détermination de la concentration du phénol dans le milieu).

Pour les isolats résistants aux concentrations élevées de phénols, on a utilisé des microplaques à 96 puits. Chaque culture bactérienne a été ajustée à une  $DO_{600}$  de 1, avant d'être utilisée pour inoculer à 8% (v/v) des portions de 250μL de MSM. Le milieu MSM a été complété par des concentrations initiales de phénol ou de *p*-crésol, variant de 400 à 1200mg.l<sup>-1</sup> en incrément de 200. L'incubateur (TECAN, Infinite® 200 PRO) a été réglé à 150rpm et à 30°C et des mesures de  $DO_{600}$  ont été effectuées toutes les 15min sur une période de 72h. Les courbes de croissance ont été tracées comme moyenne des trois répétitions. A la fin de la période d'incubation, des échantillons de culture (≈ 200μl) ont été clarifiés pour une analyse HPLC (pour vérifier la disparition ou une éventuelle persistance du substrat phénolique dans le milieu).

L'isolat le plus performant a été retenu pour un suivi de la croissance et de la dégradation du phénol à 1g.l<sup>-1</sup>, et à différentes températures d'incubation : allant de 25 à 50°C, avec un incrément de 5°C. Les expériences ont été conduites dans des Erlenmeyers de 100ml en duplicata pour chaque température où 20ml du milieu MSM ont été inoculés avec 1ml d'inoculum préalablement ajusté à une  $DO_{600}$  de 1. Chaque incubateur a été réglé à une

température et 150rpm, sur une période de 24h. À chaque intervalle de temps, des aliquotes sont prélevés pour la mesure de la DO<sub>600</sub> (Biophotometer, Eppendorf) et le dosage de la concentration résiduelle du phénol par HPLC. La majorité des ajustements et des mesures de DO des différentes cultures ont été effectués par le spectrophotomètre du laboratoire (Biophotometer, Eppendorf).

### **3. Mise en place des microcosmes pour les expériences de biodégradation des phénols**

Les effluents de STEP ont servi d'inoculum pour l'étude de la biodégradation des phénols. Trois séries ont été réalisées dans les mêmes conditions, contenant chacune soit du phénol soit du *p*-crésol, soit du 3,4-DMP comme seule source de carbone et d'énergie. Ces molécules ont un degré de pureté de 99,9% (Sigma-Aldrich).

#### **3.1. Dispositif expérimental d'étude**

Les cultures ont été réalisées dans des Erlenmeyers stériles d'un volume total de 250ml, scellés par des bouchons en caoutchouc étanches afin d'éviter tout échange gazeux avec l'extérieur. Cependant, ils permettent les prélèvements par seringues de phase gazeuse pour mesurer l'accumulation du CO<sub>2</sub>, par minéralisation des phénols, et de phase aqueuse pour le suivi de la concentration résiduelle du substrat dans le milieu.

#### **3.2. Inoculation et conditions d'incubation**

Les échantillons d'eaux usées ont d'abord été traités pour éliminer l'excès de sources de carbone comme suit : l'échantillon (250ml) a été centrifugé stérilement à 7 000rpm pendant 15min à 4°C. Le culot cellulaire obtenu a été lavé deux fois avec du milieu MSM sans substrat carboné (Krivobok *et al.*, 2003) et remis en suspension dans le même volume de milieu MSM. La suspension a été incubée pendant une nuit à 25°C sous agitation. Ensuite, la culture a été ajustée à une DO de 1 à 600nm, avant d'être utilisée comme inoculum. L'inoculum, ainsi obtenu, doit être utilisé dans les 2 heures qui suivent sa préparation.

Les microcosmes ont été standardisés à 4 volumes d'air et 1 volume de milieu de culture [4/1(v/v) : soit 50ml/flacon]. Le milieu MSM a étéensemencé à raison de 8% (v/v : 50ml de milieu de culture inoculé avec 4ml d'inoculum).



Le phénol, le *p*-crésol et le 3,4-DMP ont été additionnés aseptiquement dans le milieu MSM, par filtration à travers des membranes filtrantes de 0,22µm (Merck Millipore), à une concentration de 200mg.l<sup>-1</sup>, 100mg.l<sup>-1</sup> et 100mg.l<sup>-1</sup>, respectivement. Chaque série de test a été réalisée en triplicata.

Un microcosme de contrôle et un microcosme abiotique ont été préparés comme suit :

- Témoin endogène : contenant 50ml du milieu MSM inoculés par le microbiote et incubés dans les mêmes conditions expérimentales mais sans substrat ajouté.
- Témoin abiotique : 50ml du milieu MSM contenant le substrat phénolique et incubés dans les mêmes conditions mais sans l'inoculum microbien pour tester une éventuelle dégradation abiotique.

Les microcosmes ont été incubés à l'obscurité, à une température de 30°C, sous une agitation de 150rpm. Des prélèvements de la phase aqueuse (500µl) et gazeuse (25µl) ont été effectués au cours des trois premiers jours, stérilement sous hotte microbiologique.

#### **4. Technique d'analyses physico-chimiques**

Deux paramètres permettant l'évaluation de la biodégradabilité des composés phénoliques ont été mesurés : la concentration du CO<sub>2</sub>, mesurée par chromatographie en phase gazeuse (CPG), et/ou la concentration résiduelle du substrat carboné déterminée par chromatographie liquide haute pression (HPLC).

##### **4.1. Mesure de la concentration de CO<sub>2</sub> par CPG**

Le CO<sub>2</sub> a été dosé par un chromatographe en phase gazeuse HP6890 (Agilent Technologies) équipé d'une colonne HP-PLOT/Q (15m x 0,32mm, 20µm d'épaisseur de phase ; Agilent Technologies). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur, avec un débit de 36ml.min<sup>-1</sup>. Pour être injectés sur la colonne, les échantillons gazeux ont été prélevés du ciel gazeux des Erlenmeyers en culture, à l'aide d'une seringue à gaz de 25µl de capacité, munie d'un système de vanne ouverture/fermeture étanche (Hamilton). Après injection manuelle de l'échantillon (25µl), une fraction (1/12<sup>ème</sup>) est entrée dans la colonne. La température du four a été maintenue à 40°C. Le détecteur de masse HP 5973 MS a été réglé en mode Single-Ion Monitoring (SIM) à une énergie d'ionisation de 70eV et une tension de 1 400 volts. Le CO<sub>2</sub> a été élué après 1min. L'utilisation du mode SIM a donc permis de détecter la masse du CO<sub>2</sub>.

Un mélange Argon : CO<sub>2</sub> (90% : 10%) a été dilué dans des flacons remplis d'argon afin de construire une gamme de calibration. L'aire sous chaque pic correspondant au CO<sub>2</sub> a été reportée en fonction de la concentration connue du mélange.

A chaque point de la cinétique de minéralisation, les aires de pics du CO<sub>2</sub> mesurées dans l'air ambiant ont été soustraites à ceux du CO<sub>2</sub> mesurés dans les microcosmes. Les aires des pics obtenus ont été convertis, à partir de la courbe de calibration, en concentration de CO<sub>2</sub>.

#### **4.2. Analyse des phénols par HPLC**

Les échantillons prélevés ont été clarifiés par centrifugation à 12 000rpm pendant 5min, et les surnageants ainsi obtenus filtrés à travers des filtres de 0,45µm (Macherey-Nagel). A partir des fractions de surnageant exemptes de cellules, les phénols (phénol, *o*-, *m*-, *p*-crésol, *p*-chlorophénol, 3,4-DMP et bisphénol A) ont été dosés par la chaîne HPLC Infinity 1260 (Agilent Technologies) sur une colonne NUCLEODUR® C18 Pyramid (Macherey-Nagel) d'une longueur de 250mm, d'un diamètre de 4mm et d'une granulométrie de 5µm. La température de la colonne a été maintenue à 30°C. Le débit de la phase mobile est de 0,5ml.min<sup>-1</sup> et elle est composée de méthanol/eau (70/30). Les injections ont été réalisées à l'aide d'un injecteur automatique et le volume de chaque injection est de 50µl. L'appareil est équipé d'un détecteur UV-Visible à barrette de diodes et la longueur d'onde du détecteur UV a été fixée à 270nm.

A partir des solutions mères de phénol (2g.l<sup>-1</sup>), *o*-, *m*-, *p*-crésol (1g.l<sup>-1</sup>) *p*-chlorophénol (1g.l<sup>-1</sup>), 3,4-DMP (1g.l<sup>-1</sup>) et bisphénol A (1g.l<sup>-1</sup>), une série de quatre dilutions a été préparée pour chaque substrat phénolique. L'aire du pic correspondant à chaque dilution (concentration) a été reportée afin de tracer la courbe d'étalonnage. La concentration résiduelle des substrats phénoliques dans le milieu a été mesurée, par la conversion des aires de pic obtenues à partir de la courbe de calibration.

## **5. Techniques de biologie moléculaire**

### **5.1. Préparation de l'ADN génomique**

#### **5.1.1. Extraction d'ADN à partir des isolats**

Afin d'apparenter les souches bactériennes isolées aux genres ou aux espèces correspondants, une analyse de la séquence ARNr 16S des isolats a été réalisée. Les souches étudiées ont été maintenues en culture axénique sur milieu liquide (LB). L'ADN génomique des souches bactériennes dégradant le phénol, le *p*-crésol et le 3,4-DMP a été extrait et purifié à partir de 1- 3ml de culture, à l'aide du kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant.

#### **5.1.2. Extraction de l'ADN à partir des eaux usées**

L'ADN des microorganismes provenant de microcosmes (cf. § 3.2. de Matériels et Méthodes) incubés avec le phénol, le *p*-crésol ou le 3,4-DMP, ainsi que le témoin endogène (utilisé comme contrôle de diversité), a été isolé comme suit : après 3 jours d'incubation, les cultures ont été récoltées par centrifugation pendant 15min à 7 000rpm et à 4°C. La masse moyenne des échantillons est de 0,6g. L'ADN métagénomique est directement extrait des culots à l'aide du kit NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel).

Le protocole du fabricant a été adapté : les culots ont été remis en suspension dans 700µl de solution de lyse (SL1) puis les suspensions ont été transférées dans des tubes de 2ml NucleoSpin® Bead Tube Type A contenant des billes en céramique. Pour améliorer le rendement et la qualité de l'ADN métagénomique extrait, 100µl de Enhancer SX ont été ajoutés, puis les tubes ont été placés horizontalement sur une plaque de vortex à une vitesse maximale afin de lyser les bactéries. Après centrifugation, les surnageants ont été filtrés à travers une membrane. Les extraits solubles ainsi débarrassés des principaux contaminants et inhibiteurs, ont été déposés sur colonne de silice. La membrane subit alors plusieurs lavages successifs puis un essorage et, enfin, l'ADN métagénomique est élué dans 100µl de tampon SE (solution d'éluion).

## 5.2. Amplification par PCR, analyse et purification des gènes

### 5.2.1. Les oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés au cours de ce travail sont présentés dans le tableau 6. Ils ont été synthétisés par la société Eurofins Genomics (Allemagne).

**Tableau 6 :** Oligonucléotides utilisés pour les différentes réactions de PCR.

Amorces	Séquence nucléotidique (5'→3')	Gène cible amplifié	T <sub>m</sub> (°C)
27f/1492r	AGAGTTTCCTGGCTCAG (17)/TACGGGTACCTTGTTACGACTT (22)	ARNr 16S	50-52/47
pJET1.2 Forw./pJET1.2 Rev.	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC (23)/AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG (24)	Insert	74/68
PheUf	CCAGGSBGARAARGAGARGAARCT (24)	LmPH	63,8
PheUR	CGGWARCCCGGCCAGAACCA (20)	LmPH	64,5
PheLr	GGVABRTTGYCCGGGTC (17)	LmPH	58,4
PheMhr	GATBGGCACRTTGTCTTC (18)	LmPH	54,1
Pheh-3F/Pheh-3R	CGKATGACSTACGGCTGGATGGGCG (25)/ACGTCCTGTTTCGATGATCTCCTTGATCCGC (30)	<i>pheA1</i>	70,4/69,5
pheA1Gr+f2	ACAACCTTCMTYGCSCACTACGG (22)	<i>pheA1</i>	62,1
pheA1Gr+f4	ACCGCYCCSACCGACACSGGCA (22)	<i>pheA1</i>	70,5
pheA1Gr+R	TGCCGGMGTAGTTSCGCTCGT (21)	<i>pheA1</i>	64,7
pheA1Gr+R2	CCAGAASASRTTKCGCCAG (19)	<i>pheA1</i>	58,8
KPheA1F5	CACGCSTGGGGCGTSATGGACGT (23)	<i>pheA1</i>	69,6
KPheA1R2	AGCCSBYGGCSAGRTSCTGGTG (22)	<i>pheA1</i>	68,9
KPheA1R3	CCGTCCTGCATGGASACGTTTCATGCC (26)	<i>pheA1</i>	69,5
C120-F/C120-R	GCCAACGTCGACGTCTGGCA (20)/CGCCTTCAAAGTTGATCTGCGTGGT (25)	C120	63,5/64,6
C230-F/C230-R	AAGAGGCATGGGGGCGCACCGGTTTCGATCA (30)/CCAGCAAACACCTCGTTGCGGTTGCC (26)	C230	73,6/69,5

### 5.2.2. Amplification du gène ARNr 16S à partir de l'ADN génomique des isolats

Les réactions d'amplification d'ADN (PCR) ont été réalisées avec l'enzyme GoTaq® Flexi DNA polymérase (Promega). Le mélange réactionnel se compose de 5µl de tampon Green GoTaq® Flexi Buffer (x5), 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5µl de dNTP (10mM chacun), 0,5µl de chacune des amorces (27f et 1492r / 10µM chacune) (Tab. 6), de la matrice d'ADN (100ng d'ADN génomique) et de 1,25 unités de polymérase dans un volume total de 25µl. Le programme PCR réalisé à l'aide d'un thermocycleur (T personal, Biometra) est le suivant : une dénaturation initiale de l'ADN 2min à 95°C, suivie de 25 à 30 cycles de dénaturation (30s à 95°C) / hybridation (30s à 54°C : la température d'hybridation du couple

d'oligonucléotides) / élongation (1min 30s à 72°C) ; et enfin une élongation terminale de 5min à 72°C.

Dans certains cas, l'ADN polymérase KOD Hot Start (Novagen) a été utilisée pour l'amplification du gène ARNr 16S de certaines souches bactériennes. Cette enzyme n'a ni activité polymérase, ni activité 3' - 5'exonucléase à température ambiante, ce qui diminue donc les risques d'amplification non spécifique et de dégradation des amorces en début de phase opératoire. Le mélange réactionnel est composé de 2,5µl de tampon KOD Buffer (x10), 1,5µl de MgSO<sub>4</sub> (25mM), 2,5µl de NTP (2mM chacun), 0,5µl de chacune des amorces (27f et 1492r / 10µM chacune) (Tab. 6), de la matrice d'ADN (100ng d'ADN génomique) et de 0,5 unité de polymérase dans un volume total de 25µl. Après une étape d'activation de l'enzyme, 2min à 95°C, 25 à 30 cycles d'amplification sont réalisés, avec une étape de dénaturation, 20s à 95°C, une étape d'hybridation, 15s à 54°C et une étape d'élongation, 30s à 72°C.

Pour certaines souches bactériennes, 2µl de DMSO (50% dans l'eau) ont été ajoutés au mélange réactionnel (25µl) pour favoriser la PCR. Le double des proportions mentionnées ci-dessus, a été utilisé pour un volume final de 50µl de mélange réactionnel. Le fragment amplifié à une taille d'environ 1,4kb.

### **5.2.3. Profils RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction)**

L'analyse RFLP a été utilisée ici dans le but de comparer les isolats sur la base des profils de digestion de leur gène codant l'ARNr 16S. Les profils RFLP varient selon les séquences variables des gènes ARNr 16S des isolats. Les gènes ont été amplifiés et les amplicons ont été digérés par l'enzyme de restriction AluI (Thermo Fisher Scientific) 1h à 37°C. Pour cela, 8µl des produits de PCR sont mélangés avec 2µl d'une mixture, dont 10µl contiennent : 5µl de tampon (Tango (Yellow) Buffer (x10)), 2,5µl d'eau et 2,5µl d'enzyme AluI.

Les produits de digestion ont été analysés sur un gel de polyacrylamide à 10%, préparé selon le protocole suivant : 4ml acrylamide/bis acrylamide 30% (29 : 1) (Sigma-Aldrich), 5,6ml H<sub>2</sub>O, 1,2ml tampon TBE (x10), 200µl ammonium persulfate (10% w/v), 10µl TEMED (Sigma-Aldrich). L'électrophorèse a été réalisée dans un appareil SE260 pour gels verticaux de 10cm x 10cm x 1,5mm (Hoeffer Scientific Instrument) à température ambiante, dans un tampon TBE (x1) à 200V, 20min. Le profil de restriction a été révélé par coloration au

GelRed™. Les fragments ont été révélés par fluorescence sous l'UV avec l'appareil Fusion Fx7.

#### **5.2.4. Séparation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose**

Les fragments d'ADN obtenus par PCR ou par coupure enzymatique de plasmides ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, en présence de marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus ou GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). Le colorant fluorescent GelRed™ NucleicAcid Gel Stain (FluoProbes®) a été incorporé directement dans le gel d'agarose (1/10 000<sup>ème</sup>) pour marquer l'ADN. Dans un champ électrique, les fragments d'ADN se déplacent vers l'anode à une vitesse inversement proportionnelle à leur masse moléculaire. Ces électrophorèses ont été réalisées dans un appareil i-Mupid (Eurogentec) pour gels horizontaux en tampon TBE (x0,5) (Tris 44,5mM ; acide borique 44,5mM ; EDTA 1mM ; pH = 8) pendant 30min à voltage constant de 100 V. Les fragments ont été révélés par fluorescence sous lampe UV ( $\lambda = 302\text{nm}$ ) et l'image des gels a été enregistrée avec l'appareil Fusion Fx7 (Vilber Lourmat).

#### **5.2.5. Purification et dosage de l'ADN**

Les fragments d'ADN obtenus par PCR ont été purifiés à partir des mélanges réactionnels, ou à partir du gel d'agarose, en utilisant le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Les acides nucléiques ont été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific). Un volume de 1 à 2 $\mu\text{l}$  de préparation d'ADN ou d'ARN est déposé sur la lampe. Il n'est pas nécessaire de faire de dilution de l'échantillon car l'absorbance lue à 260nm peut être comprise entre 0,04 et 74. La concentration en acides nucléiques est calculée selon les formules suivantes : concentration d'ADN =  $\text{DO}_{260} \times 50$  ou d'ARN =  $\text{DO}_{260} \times 40$ .

#### **5.2.6. Clonage**

Les étapes citées ci-dessous consistent à insérer par ligation un fragment d'ADN dans un plasmide. Le nouveau plasmide, ainsi créé, est ensuite introduit dans *E. coli*. Celle-ci est alors sélectionnée et multipliée afin d'obtenir le plasmide en quantité suffisante pour d'autres opérations comme le séquençage.

- **Ligation**

La ligation entre le vecteur pJET1.2/blunt (Fig. 8) et le fragment d'ADN à cloner a été réalisée par l'enzyme T4 DNA ligase du kit Rapid DNA ligation (Thermo Fisher Scientific). Le fragment et le vecteur, dans un ratio molaire 3/1, ont été placés dans un mélange de ligation contenant 2µl de tampon de ligation, 1µl de T4 DNA ligase et un volume d'eau stérile q.s.p. 10µl. Le kit CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) a été employé pour cloner des fragments d'ADN à bouts francs. Un prétraitement de « End conversion » qui phosphoryle les bouts francs de l'insert a été réalisé de manière à obtenir, à l'étape suivante, un ratio molaire minimum de 1/2 (vecteur : insert), dans un volume total de 10µl contenant 5µl de « End conversion mix ». La réaction a été incubée 15min à 22°C, puis inactivée 5min à 75°C et refroidie dans la glace. La ligation dans le plasmide pSTBlue-1 (1µl soit 50ng) a été effectuée avec 1µl d'enzyme T4 DNA ligase (4 unités). Les mélanges de ligation ont été incubés à température ambiante pendant 15 à 30min.

Le plasmide pJET1.2/blunt (Fig. 8) est le vecteur utilisé dans cette étude, il possède un gène létal codant pour une protéine toxique qui n'est plus exprimée lors de la ligation du fragment dans le site de clonage. Seules les cellules qui ont intégré le vecteur avec fragment sont capables de croître sur le milieu de culture.

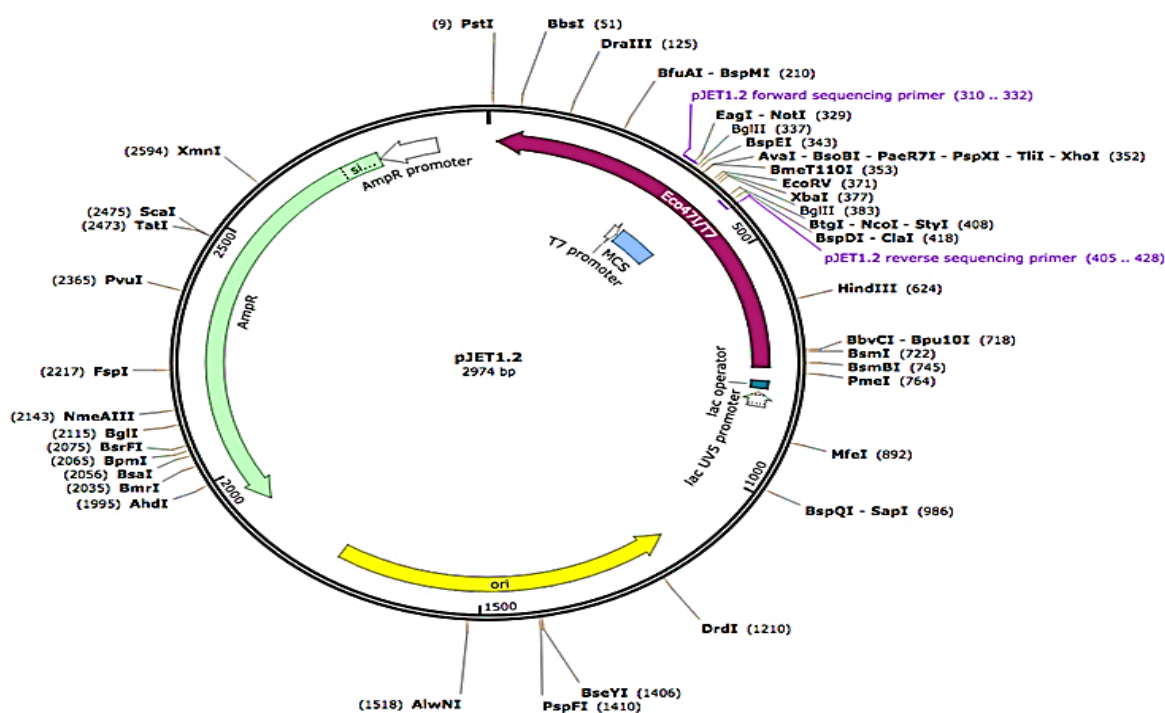


Figure 8 : Carte du vecteur pJET1.2/blunt.

- **Préparation des cellules compétentes**

Deux tampons (RF1 et RF2) ont été employés pour les méthodes de clonage. Le tampon RF1 : 30mM acétate de potassium – 100mM KCl – 10mM CaCl<sub>2</sub> – 50mM MnCl<sub>2</sub> – 15% (v/v) glycérol bidistillé – ajuster le pH à 5,8 avec une solution d'acide acétique 0,2 M, stérilisée par filtration. Le tampon RF2 : 0,5M MOPS pH 6,8 – 10mM KCl – 75mM CaCl<sub>2</sub> – 15% (v/v) glycérol bidistillé, le pH est ajusté à 6,8 avec une solution de KOH 0,2M et stérilisé par filtration.

Les cellules d'*E. coli* (DH5α) ont été mises en culture dans les milieux Phi A et Phi B, puis elles subissent un traitement avec des tampons riches en sels afin de rendre les membranes plus perméables. Les milieux de culture utilisés Phi A et Phi B sont composés de 20g.l<sup>-1</sup> de Bacto-tryptone, 5g.l<sup>-1</sup> de Bacto yeast extract (l'agar est ajouté à raison de 15g.l<sup>-1</sup> pour le milieu Phi A) avec un pH ajusté au KOH à 7,6. 25ml.l<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (20%) stérile sont ajoutés juste avant l'utilisation du milieu.

A partir d'une boîte de Phi A, inoculée la veille avec la souche DH5α et incubée une nuit à 37°C, 5ml de Phi B ont été inoculés avec une colonie et incubés à 37°C et 200rpm. Parallèlement, un Erlenmeyer de 500ml contenant 50ml de Phi B a été préchauffé à 37°C. Après 2h, la pré-culture de 5ml a été introduite dans l'Erlenmeyer et incubée dans les mêmes conditions de culture jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600</sub> comprise entre 0,4 et 0,8. La culture a été ensuite refroidie 20min dans la glace puis centrifugée pendant 5min à 7 000rpm à 4°C. Le culot a été repris dans 20ml de tampon RF1 glacé. Ce mélange a été incubé 5min sur glace puis centrifugé pendant 5min à 7 000rpm à 4°C. Le culot a été repris dans 2ml de tampon RF2 glacé, incubé 5min sur la glace puis aliquoté en fractions de 50μl dans des tubes Eppendorf de 1,5ml préalablement refroidis. Les aliquotes ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à - 80°C (Pühler and Timmis, 1984).

- **Transformation des cellules compétentes**

Après l'incubation, 5μl de produit de ligation ont été ajoutés à 50μl de cellules compétentes et le mélange a été laissé 30min sur la glace. Un choc thermique a été réalisé à 42°C pendant 30s. Les cellules ont été ensuite refroidies sur la glace pendant 2min l'ajout de 450μl de milieu de culture (SOC ou LB). Les cellules ont été placées à 37°C sous agitation constante pendant 1h, puis 100μl ont été étalés sur milieu gélosé LB contenant l'ampicilline. Les boîtes de Pétri ont été incubées une nuit à 37°C.



- **Criblage des transformants par PCR**

A l'aide d'un cône stérile, des colonies ont été dispersées dans 15µl d'eau. Puis 2µl des suspensions ont été ajoutés à 10µl de mix PCR comme décrit ci-dessus (cf. § 5.2.2. de Matériels et Méthodes). Cependant, les oligonucléotides utilisés ont été fournis avec le kit CloneJET™ PCR Cloning Kit (pJET1.2 Forw. et pJET1.2 Rev.) (Tab. 6).

Afin de faire éclater les cellules d'*E. coli* puis de dénaturer l'ADN, le programme PCR commence par une étape de 3min d'incubation à 95°C. Elle est suivie de 25 cycles de dénaturation (30s à 95°C) / hybridation (30s à 59°C : la température d'hybridation du couple d'oligonucléotides) / élongation (1min/kb à 72°C) et enfin une élongation terminale de 5min à 72°C. Les produits PCR issus de chaque colonie ont été séparés sur gel d'agarose. Seuls les transformants ayant intégré un plasmide porteur de l'insert montreront une bande de taille attendue, ce qui permet de les discriminer. Les clones positifs ont été mis en culture sur milieu LB, en présence d'ampicilline la nuit à 37°C et 180rpm.

### **5.2.7. Purification de plasmides**

Après une nuit de culture à 37°C, 3ml de cellules contenant le plasmide et l'insert ont été centrifugés puis les plasmides ont été extraits et purifiés à l'aide des kits NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel), pour les MiniPreps, et Nucleobond® (Macherey-Nagel) pour les MidiPreps. Les plasmides sont élués dans un volume final de 50µl et 200µl pour les MiniPreps et les MidiPreps, respectivement. Une concentration minimale de 50ng.µl<sup>-1</sup> est obtenue pour toutes les préparations.

- **Vérification des clonages par coupure enzymatique des plasmides**

Après purification, les plasmides ont été digérés par l'enzyme de restriction BglII (New England Biolabs). Un volume de 20µl du mélange réactionnel est constitué d'un minimum de 200ng de plasmide, 2µl de tampon (NEBuffer 3 (x10)), 1µl d'enzyme BglII (10 unités) et complété avec de l'eau stérile. La coupure a lieu durant 1h à 37°C. Par la suite, les digestions ont été analysées sur gel d'agarose 1%. La digestion donne 2 fragments (1 correspondant au plasmide ~ 3kb et l'autre à l'insert), ensuite les bandes sont comparées à des marqueurs d'ADN GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus ou GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). Les clonages ont réussi lorsqu'un fragment d'une longueur attendue est détecté.

### 5.2.8. Amplification par PCR et clonage des séquences partielles du gène *pheA1*

L'amplification d'une partie des gènes *pheA1* à partir de l'ADN métagénomique a été réalisée en utilisant une *nested* PCR. Les deux étapes ont été réalisées avec la Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymérase (New England BioLabs). Cette enzyme n'a ni activité polymérase, ni activité 3' - 5'exonucléase à température ambiante, ce qui diminue donc les risques d'amplification non spécifique et de dégradation des amorces en début de phase opératoire. Dans la première étape, des mélanges réactionnels (25 à 50µL) contiennent 20ng d'ADN métagénomique, 10µM de chacune des amorces (*pheA1Gr+f4* et *pheA1Gr+R*), 5 ou 10µL du tampon Q5® Reaction Buffer (5 X), des dNTP (2mM chacun) et 0,02U.µl<sup>-1</sup> d'ADN polymérase. Après une dénaturation initiale de l'ADN pendant 3min à 95°C, une PCR « Touch down » a été utilisée pour éviter l'amplification de séquences non spécifiques. Elle comprenait 5 cycles où la température d'hybridation était graduellement abaissée de 64°C à 60°C (1°C/cycle), 25 cycles de 20s à 95°C, 20s à 59°C, et 1min à 72°C, et une dernière étape d'élongation de 5min à 72°C. Dans la deuxième PCR, les produits de la première PCR ont servi de matrice et l'amorce *pheA1Gr+f4* a été remplacée par *pheA1Gr+f2*. La réaction a été effectuée dans les mêmes conditions, sauf que les 5 premiers cycles ont été omis. Le produit de PCR final, de taille ~ 790pb, a ensuite été purifié et cloné (cf. du § 5.2.4. au § 5.2.6. de Matériels et Méthodes). Des microplaques à 96 puits ont été remplies par le milieu LB (supplémenté d'ampicilline) à raison de 200µl / puits. Les puits ont été par la suite inoculés par les clones (48 clones / substrat phénolique) puis les plaques ont été recouvertes avec une feuille adhésive stérile et incubées à 37°C pendant 24h. Le lendemain, chaque plaque a été repiquée puits à puits dans une autre plaque de 96 puits contenant 200µl / puits de milieu gélosé LB (supplémenté d'ampicilline). Après 24h d'incubation, les plaques ont été envoyées à la société Eurofins Genomics pour extraction plasmidique et séquençage de l'insert.

Les réactions d'amplification ont été réalisées sur l'ADN génomique de l'isolât le plus performant. Deux paires d'amorces *Pheh-3F* / *Pheh-3R* (Tab. 6) (Sandhu *et al.*, 2009) et *pheA1Gr+f2* (conçus dans cette étude) / *Pheh-3R* (Tab. 6) ont été utilisées pour amplifier un fragment interne du gène *pheA1*. Une *nested* PCR à deux étapes a également été utilisée comme décrit ci-dessus. La seule différence notée était le remplacement de l'amorce *Pheh-3F* par l'amorce *pheA1Gr+f2* dans la seconde PCR. Le produit de PCR final, de taille ~ 650pb, a ensuite été purifié, cloné et séquençé (cf. du § 5.2.4. au § 5.2.7. de Matériels et Méthodes).

### **5.2.9. Amplification par PCR et clonage de séquences partielles codant pour LmPH**

Un fragment interne du gène codant pour la grande sous-unité de PH multicomposante (LmPH) a été amplifié en utilisant la paire d'amorces PheUf / PheUR (Tab. 6) décrite précédemment (Futamata *et al.*, 2001). Les réactions de PCR ont été réalisées dans 25µL de mélanges réactionnels, contenant 50ng d'ADN métagénomique, 8µM de chacune des amorces (PheUf et PheUR), 5µL du tampon Q5® Reaction Buffer (5 X), dNTP (0,2mM chacun) et 0,5 U de la Q5 DNA polymérase. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : dénaturation initiale de l'ADN 2min à 95°C, puis 5 cycles où la température d'hybridation était abaissée de 61°C à 57°C (1°C/cycle), 25 cycles de 95°C pendant 30s / 56°C pendant 3s / 72°C pendant 1min, puis une dernière étape d'élongation de 7min à 72°C. Le produit de PCR (~ 600pb) a ensuite été purifié et cloné dans pJET1.2/blunt (cf. du § 5.2.4. au § 5.2.6. de Matériels et Méthodes). Une sélection de 48 clones positifs pour chaque substrat phénolique a été cultivée dans des microplaques de 96 puits, puis soumises à un séquençage de l'insert de plasmide (cf. § 5.2.8. de Matériels et Méthodes).

Pour l'amplification du gène de LmPH à partir d'isolats bactériens, les conditions de PCR étaient telles que décrites ci-dessus, sauf que la paire d'amorces était PheUf / PheLr ou PheUf / PheMhr (Tab. 6). Ces amorces ont été préalablement conçues pour cibler spécifiquement les gènes de LmPH du groupe I et du groupe II, respectivement (Futamata *et al.*, 2001).

### **5.2.10. Amplification par PCR des catéchol dioxygénases**

Pour l'amplification de la catéchol 1,2-dioxygénase et de la catéchol 2,3-dioxygénase, les ensembles d'amorces C12O-F / C12O-R et C23O-F / C23O-R (Tab. 6) (Sei *et al.*, 1999). Les réactions de PCR ont été réalisées dans des mélanges réactionnels de 25µl contenant 10ng de l'ADN génomique de l'isolat le plus performant, 0,8mM de chacune des amorces, 5µl du tampon Green GoTaq® Flexi Buffer (x5), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTP et 1,25 U de GoTaq® DNA polymérase. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 3min à 95°C suivie de 25 cycles de 20s à 95°C / 20s à 62°C / 6s à 72°C ; et finalement 5min à 72°C. Les produits obtenus ont été révélés par fluorescence sous lumière UV et l'image de gel a été enregistrée avec la caméra Fusion Fx7 (Vilber Lourmat).

**5.2.11. Extraction d'ARN et analyse transcriptionnelle du gène LmPH, *pheA1* et C23O par RT-PCR**

Immédiatement après la collecte (au mois de Septembre 2015), des échantillons d'eaux usées (25ml) ont été mélangés (v/v) avec une solution RNA later-like buffer (sulfate d'ammonium 3,5M, citrate de sodium 0,02M, EDTA 0,01M, pH 5,2) ; puis centrifugé à 4°C, 10 000g pendant 10min. La solution RNA later-like buffer sert à stabiliser les ARNm, qui ont une courte durée de vie, en empêchant leur dégradation avant l'analyse. Des souches bactériennes ont été également cultivées sur un milieu MSM (50ml) additionné d'une de ces sources de carbone suivantes : phénol (4,2mM) ou glucose (10mM) ou succinate de sodium (10mM). Les cultures ont été récoltées à la fin de la phase exponentielle de croissance par centrifugation à 4°C, 10 000g pendant 10min. Les culots obtenus ont été congelés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ARN. Les échantillons ont été remis en suspension dans du NucleoZol (250µl) dans des tubes de 2ml contenant des billes de verre (type B, Macherey-Nagel) et les cellules bactériennes ont été lysées par agitation horizontale pendant 5min. Les extraits ont été ajustés à 0,7ml avec un autre volume de NucleoZol et 0,2ml d'eau exempte de nucléases, puis centrifugés. La phase aqueuse a été récupérée, traitée avec 2,5µl de 4-bromoanisole (Sigma-Aldrich) et finalement mélangée avec un volume égal d'isopropanol pour précipiter l'ARN. Les préparations ont été lavées dans de l'éthanol à 75%, avant dissolution dans 40µl d'eau exempte de nucléases. Les échantillons d'ARN ont été conservés à -80°C.

Les échantillons d'ARN ont été soumis à une transcription inverse (RT) en utilisant un kit commercial (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega). L'ARN a été ajusté à 100ng par réaction dans un total de 20µl. Les réactions ont été effectuées à 25°C pendant 5min, puis à 42°C pendant 1h, tel que recommandé par les instructions du kit. Finalement, les réactions sont arrêtées par un chauffage de 15min à 70°C. Une réaction de contrôle dépourvue de transcriptase inverse a été incluse. Ensuite, les préparations d'ADNc de deux extractions d'ARN indépendantes obtenues à partir des eaux usées ont été combinées, avec utilisation de 5µl comme matrice dans la PCR ciblant les gènes de LmPH (cf. § 5.2.9. de Matériels et Méthodes). Le produit de PCR résultant a été cloné et les inserts d'ADN de 42 clones positifs, prélevés au hasard, ont été soumis à un séquençage (cf. § 5.2.9. de Matériels et Méthodes). Pour les cultures bactériennes, 5µl de chaque ADNc ont été utilisés comme matrice dans la PCR ciblant les gènes *pheA1* et C23O (cf. § 5.2.8. et § 5.2.10. de Matériels et Méthodes). Le

gène ARNr 16S a également été amplifié à partir des produits d'ADNc en tant que témoin positif.

#### **5.2.12. Comparaison de séquences, analyse phylogénétique et numéros d'accèsion**

Le séquençage des gènes ARNr 16S, LmPH et *pheA1*, a été effectué soit à partir des produits de PCR purifiés, soit à partir des gènes clonés dans pJET1.2. Le séquençage des gènes a été réalisé sur les deux brins d'ADN selon la méthode de Sanger par la société Eurofins Genomics (Allemagne) (Sanger *et al.*, 1977). Les séquences de chacun des brins d'ADN ont été comparées à l'aide du logiciel ApE (v2.0.49, 2016) et la recherche de séquences homologues à celles présentes dans les bases de données a été faite par l'application BLASTn sur le site NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). L'alignement multiple des séquences expérimentales, avec des séquences issues des bases de données, ou encore la conception des amorces, ont été réalisés *via* le logiciel ClustalW2 disponible sur le site de l'EBI ([ClustalW2 | EBI](#)). Les arbres phylogénétiques basés sur les séquences des gènes PH, ont été construits en utilisant l'option « One Click » disponibles sur le site Web de [www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr) (Dereeper *et al.*, 2008). L'analyse implique l'alignement à l'aide de MUSCLE, la conservation à l'aide de Gblocks, la phylogénie à l'aide de PhyML et la construction des arbres par TreeDyn. PhyML est une application de phylogénie basée sur le principe de la vraisemblance maximale. Il est à signaler que d'autres détails sont disponibles sur le site.

Les séquences nucléotidiques des gènes partiels de PH et de l'ARNr 16S déterminées dans cette étude ont été déposées dans la base de données EBI / ENA sous les numéros d'accèsion : ARNr 16S de LT604129 à LT604134, LmPH de LT604135 à LT604179 et *pheA1* de LT604180 à LT604201.

## *Résultats et discussion*

*Chapitre 1 : Diversité des phénol-  
hydroxylases bactériennes dans les eaux  
usées de la raffinerie de pétrole.*

## Résultats

### 1. Qualité des effluents d'eaux usées

Les rejets d'eaux usées d'origine industrielle dans l'environnement doivent être encadrés afin d'assurer le respect de la capacité d'épuration des écosystèmes aquatiques et de préserver les différents usages de l'eau. En effet, ces eaux usées complexes contiennent à la fois des substances contaminantes organiques et inorganiques. La concentration maximale autorisée de ces substances est règlementée par la législation algérienne actuelle (J.O.R.A., 2009).

Les résultats d'analyses physico-chimiques des échantillons d'eaux usées prélevés au mois de septembre de l'année 2014 et 2015, de la STEP (Sonatrach/Skikda) sont illustrés dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Propriétés physico-chimiques de base des eaux usées collectées.**

Paramètres analytiques	Echantillons <sup>(1)</sup>	Echantillons <sup>(2)</sup>	Unités	Normes
<b>Indice phénol</b>	<0,02	<0,02	mg.l <sup>-1</sup>	NF EN ISO 14402
<b>pH</b>	6,8	6,9		NF EN ISO 10523
<b>Température</b>	28	26	°C	
<b>DBO<sub>5</sub></b>	40,5±17,5	61±15,8	mg.l <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	NF EN 1899-1
<b>DCO</b>	300,25±38,3	325±32,5	mg.l <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	ISO 15705
<b>Ammonium</b>	2,67±0,49	2,32±0,54	mg.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub>	NF EN ISO 11732
<b>Nitrates</b>	<1	<1	mg.l <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub>	NF EN ISO 10304-1

<sup>(1)</sup> Moyenne de résultats des paramètres physico-chimiques d'échantillons d'eaux usées collectées à partir de la STEP de la raffinerie de pétrole (Sonatrach/Skikda) au mois de Septembre 2014.

<sup>(2)</sup> Moyenne de résultats des paramètres physico-chimiques d'échantillons d'eaux usées collectées à partir de la STEP de la raffinerie de pétrole (Sonatrach/Skikda) au mois de Septembre 2015.

La couleur et l'odeur des échantillons étudiés constituent le premier indicateur de pollution : les échantillons analysés présentent une couleur noirâtre et une odeur fétide.

La température joue un rôle important dans l'augmentation de l'activité chimique et microbienne et dans l'évaporation des eaux (Mekaikia-Mokhtaria *et al.*, 2007). La température de l'eau est un paramètre essentiel dans le fonctionnement des systèmes aquatiques. Elle varie en fonction de la température externe, des saisons et de la profondeur de l'eau. Elle favorise la solubilité des sels et influence la dissolution des gaz et notamment la



## *Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.*

dissolution de l'oxygène, indispensable à la vie aquatique. Plus la température de l'eau s'élève, plus la quantité d'oxygène dissous diminue. Une température trop élevée des eaux peut donc aboutir à des situations de manque drastique d'oxygène, pouvant entraîner : la disparition de certaines espèces vivantes, la réduction du processus naturel d'autoépuration, la croissance accélérée de végétaux dont des algues toxiques, etc.

La moyenne de la température des échantillons d'eaux usées prélevés est de 27°C. Cette température favorise le développement de différents microorganismes, comme elle semble activer les réactions d'oxydation, d'hydrolyse et de minéralisation de la matière organique biodégradable.

Le pH est un indicateur de pollution par excellence (El Maroufy, 1992). Entre 6 et 8, il est favorable à la vie aquatique. Le pH des échantillons prélevés est de 6,8 et 6,9 pour les échantillons <sup>(1)</sup> et <sup>(2)</sup>, respectivement. Des pH relativement neutres favorisent ainsi le développement d'une large gamme de microorganismes aérobies.

Pour estimer la quantité de matières organiques présentes dans l'eau, nous avons utilisé les paramètres suivants : la DBO<sub>5</sub> (Demande Biologique en Oxygène sur 5 jours) et la DCO (demande chimique en oxygène). La DBO<sub>5</sub> représente la quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes pour dégrader l'ensemble de la matière organique présente dans un échantillon d'eau maintenu à 20°C et à l'obscurité pendant 5 jours. La mesure de la DBO<sub>5</sub> est un paramètre prescrit pour la surveillance des rejets et le fonctionnement des stations d'épuration. Contrairement à la DBO<sub>5</sub>, qui ne prend en compte que les matières organiques biodégradables, la DCO est une mesure globale des matières organiques et de certains sels minéraux oxydables. La DCO est la quantité d'oxygène consommée par les matières oxydantes quelle que soit leur origine, organique ou minérale. La mesure de la DCO est surtout utilisée pour la surveillance des eaux usées urbaines et industrielles (Bliefert et Perraud, 2008).

Le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> donne une première estimation à la fois de la biodégradabilité de la matière organique des effluents et de leur teneur en substances non biodégradables. Il donne aussi une indication sur l'origine de la pollution organique. Pour les échantillons <sup>(1)</sup> et <sup>(2)</sup>, ce ratio est supérieur à 3. Cela signifie que ces effluents sont très partiellement biodégradables (eaux usées issues d'une industrie pétrolière) (Anonyme, 2006).

## ***Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.***

L'analyse quantitative des phénols contenus dans les effluents montre que la concentration totale de phénols est inférieure à  $0,02\text{mg.l}^{-1}$ , ce qui suggère que les composés phénoliques rejetés par la raffinerie sont rapidement dégradés par les microorganismes dans les eaux usées. Ces valeurs sont donc inférieures aux normes admises ( $1\text{mg.l}^{-1}$ ) (J.O.R.A., 2009). Cependant, comme les analyses n'ont pas été faites immédiatement après le prélèvement, les phénols initialement présents dans les eaux usées ont pu disparaître par biodégradation pendant la période de stockage et ce, malgré une conservation à basse température ( $4^{\circ}\text{C}$  pendant 30 jours).

### **2. Biodégradation du phénol et des alkylphénols en microcosmes**

Le but de cette étude est d'explorer la diversité des phénol-hydroxylases (PHs) bactériennes présentes dans les eaux usées et d'observer l'effet de l'addition des méthylphénols sur cette diversité. Les échantillons d'eaux usées proviennent d'une raffinerie de pétrole située dans l'Est de l'Algérie (Skikda). Ils présentent un pH presque neutre, des valeurs élevées de DCO et de  $\text{DBO}_5$  et une teneur relativement faible en azote inorganique et en phénols totaux (Tab. 7).

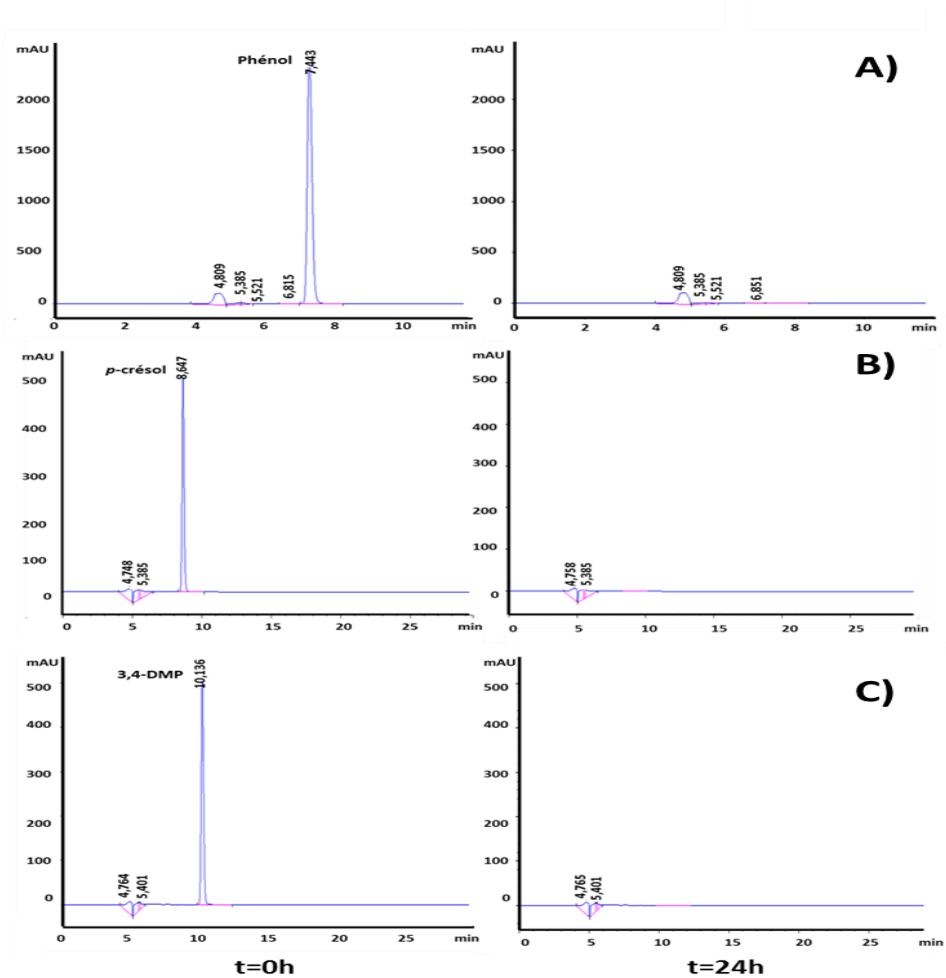
Afin de tester la capacité de dégradation des phénols, des microcosmes contenant des échantillons d'eaux usées ont été mis en place, comme précédemment décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes (cf. § 3.2.). Ils sont complétés par du phénol, du *p*-crésol ou du 3,4-DMP. La décomposition de ces substrats phénoliques est suivie par mesure de l'accumulation de  $\text{CO}_2$  dans la phase gazeuse des microcosmes, mesurée par GC-MS. Les trois composés phénoliques sont rapidement minéralisés sans temps de latence. Une proportion variable de ces composés est convertie en  $\text{CO}_2$  en 22h (38,2-54,6%), le reste de la source de carbone étant probablement utilisé pour former de la biomasse (Tab. 8). Les mesures en HPLC de substrats résiduels dans des échantillons de culture centrifugés montrent que les concentrations diminuent à une valeur inférieure à la limite de détection après 22h (Fig. 9). Ce qui confirme la dégradation totale des composés phénoliques et indique la présence de microorganismes aptes à dégrader les phénols dans ces eaux usées industrielles.

**Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.**

**Tableau 8 :** Minéralisation des méthylphénols par le microbiote des eaux usées.

Source de carbone ajouté	Concentration initiale (mM)	CO <sub>2</sub> produit dans l'espace libre (mmole)	Taux de minéralisation <sup>(a)</sup> %
Aucune	-	0,020±0,003	-
Phénol	2,04	0,335±0,004	54,6
<i>p</i> -crésol	0,90	0,122±0,004	38,7
3,4-DMP	0,76	0,117±0,008	38,2

<sup>(a)</sup> Les taux indiquent le pourcentage de conversion de chaque composé phénolique à la fin du temps d'incubation de 22 heures.



**Figure 9 :** Spectres HPLC de substrats résiduels dans des échantillons de microcosmes à t=0h et à t=22h ; A) – Phénol ; B) – *p*-crésol ; C) – 3,4-DMP.

## 2.1. Diversité des gènes LmPH dans les boues biologiques

Afin d'isoler des gènes codant pour la grande sous-unité de la phénol-hydroxylase multicomposante (LmPH), une approche PCR est mise en œuvre par l'utilisation de l'ADN métagénomique comme matrice (l'extraction d'ADN des microcosmes est décrite dans la partie Matériels et Méthodes (cf. § 5.1.2.)). Afin de prendre en compte la variabilité entre les échantillons microbiens, l'ADN utilisé comme matrice est préparé sous la forme d'un mélange d'ADN génomique, extrait des trois répliques de microcosmes. Une paire d'amorces PheUf / PheUr est utilisée, elle a été précédemment décrite pour amplifier un fragment interne de 620pb du gène LmPH (environ 1500pb de longueur) d'une gamme de bactéries dégradant les phénols (Futamata *et al.*, 2001). Les produits de PCR obtenus avec l'ADN métagénomique à partir des quatre conditions de microcosmes considérées ici sont clonés, ce qui donne 4 librairies d'ADN présentées dans le tableau 9. Après analyse des séquences et élimination des séquences trop courtes ou non apparentées, un total de 104 séquences est identifié comme gènes LmPH partiels. Dans chaque librairie de clones, l'alignement de séquences multiples montre que les séquences pour la majorité d'entre elles sont uniques. Le terme unique désigne ici des séquences partageant moins de 99% d'identité entre elles (Tab. 9).

**Tableau 9 :** Description des librairies de séquences de gènes de PHs obtenues à partir de microcosmes incubés avec différentes sources de carbone.

Paramètre	Source de carbone ajouté			
	aucune	phénol	<i>p</i> -crésol	3,4-DMP
Gènes de type-LmPH				
Nb. Clones séquencés	48	48	54	42
Nb. PH séquences considérées <sup>(a)</sup>	26	26	25	27
Nb. Séquences uniques	8	12	13	12
Gènes de type- <i>pheA1</i>				
Nb. Clones séquencés	48	48	48	48
Nb. PH séquences considérées <sup>(a)</sup>	37	34	33	41
Nb. Clones séquencés	5	6	6	5

<sup>(a)</sup> Séquences conservées après élimination de séquences trop courtes ou non apparentées.

## ***Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.***

Une analyse phylogénétique est alors effectuée sur cet ensemble de séquences uniques, elles sont comparées à plusieurs séquences apparentées trouvées dans les bases de données GenBank / EMBL. Les résultats sont présentés sous la forme de deux arbres non enracinés sur la figure 10 : le premier montre les relations entre les gènes partiels de LmPH dérivés de deux échantillons, (non traité et traité au phénol ; partie a), le second comparant les séquences de *p*-crésol et 3,4-DMP (partie b). Sur la base de leurs similitudes avec les séquences de référence trouvées chez des bactéries connues, les 104 séquences de LmPH sont liées phylogénétiquement à des homologues de *Beta*- et *Gamma*-*proteobacteria* et pour quelques séquences à *Alpha*-*proteobacteria* (Fig. 10a). Les séquences les plus proches montrent des similitudes dans une gamme variant de 75 à 98% : *Acidovorax* sp. JS42 (Numéro d'accèsion : CP000539) 88%, *Acinetobacter* sp. SJ-15 (Numéro d'accèsion : JQ346083) 97%, *Alcaligenes faecalis* (Numéro d'accèsion : EF540866) 89%, *Arhodomonas* sp. (Numéro d'accèsion : JX311708) 82%, *Comamonas testosteroni* (Numéro d'accèsion : AB024741) 82%, *Marinobacter* sp. (Numéro d'accèsion : AB985591) 75%, *Methylibium petroleiphilum* PM1 (Numéro d'accèsion : CP000555) 80%, *Oleomonas* sp. SJ-1 (Numéro d'accèsion : JQ346085) 98%, *Pseudomonas putida* POXN01 (Numéro d'accèsion : KC152907) 80%, *Pseudomonas* sp. 2B32 (Numéro d'accèsion : JX177819) 82%, *Ralstonia* sp. Clone MFI\_WH1\_phe1 (Numéro d'accèsion : KJ174604) 98%.

Cependant, beaucoup de gènes de LmPH ressemblent à ceux de bactéries non-cultivables. Une comparaison des profils de diversité LmPH des 4 bibliothèques indique un changement significatif, se produisant lors de la modification des boues avec des méthylphénols. Alors que les gènes LmPH, apparentés à ceux d'*Alpha*-*proteobacteria* sont prédominants dans les boues non traitées (14 sur 26), les ensembles de séquences trouvées dans les boues traitées avec le *p*-crésol et le 3,4-DMP sont fortement enrichis en gènes LmPH ressemblant à ceux trouvés chez les *Gamma*-*proteobacteria* (05 sur 25 et 14 sur 27, respectivement). L'ensemble des séquences extraites des boues traitées au phénol présente la plus grande diversité, avec des séquences dispersées le long de l'arbre phylogénétique (Fig. 10a).

Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.

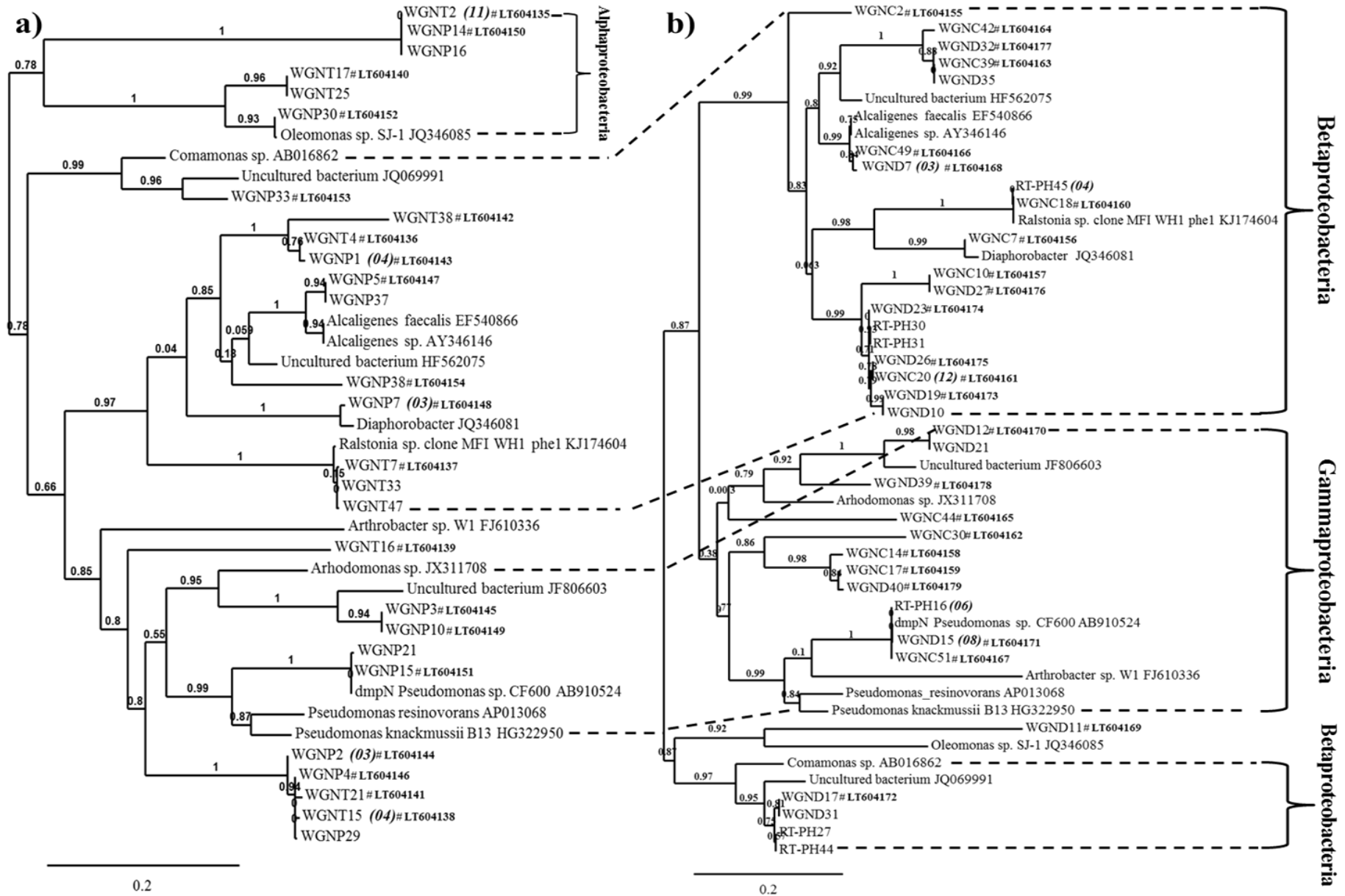


Figure 10 : Arbres phylogénétiques de séquences partielles de gènes LmPH provenant des boues d'épuration.

Les séquences proviennent d'échantillons non traités et traités au phénol (Partie a), ou d'échantillons exposés au *p*-crésol ou au 3,4-DMP (Partie b). Les séquences proviennent de quatre librairies de clones obtenues par amplification par PCR d'un fragment de 620 pb du gène LmPH (Tab. 9). Les séquences alignées correspondent aux résidus d'acides aminés 65-272 de la grande sous-unité de mPHs (la numérotation se réfère à la séquence DmpN de *Pseudomonas* CF600). Pour les séquences multiples partageant >99% d'identité, un nombre est indiqué entre parenthèses après la désignation de la séquence. Par exemple, WGNC20 (12) signifie qu'il y avait 12 copies presque identiques à WGNC20 (séquences 12 + 1) dans les ensembles des gènes LmPH obtenus à partir des microcosmes traités au *p*-crésol. L'arbre inclut également les séquences les mieux adaptées en tant que références, ainsi que les numéros d'accession pertinents. Dans la partie b, les séquences notées RT-PHxx se réfèrent à l'ADNc obtenu par RT-PCR sur l'ARN total des eaux usées.

WGNT, WGNP, WGNC, WGND se rapportent à des séquences de LmPH obtenues à partir d'échantillons d'eaux usées non traitées, traitées au phénol, *p*-crésol, 3,4-DMP respectivement.

La longueur de la branche est proportionnelle au nombre de substitutions par site.

Le nombre au-dessous de la barre d'échelle est le nombre de substitutions par site.

## **2.2. Isolement et analyse de séquences partielles de *pheA1* à partir d'ADN métagénomique**

La diversité des PHs à une seule composante a rarement été étudiée et aucune méthode de PCR n'avait encore été proposée pour amplifier le gène *pheA1* à partir de l'ADN métagénomique. A cet égard, une paire d'amorces a été décrite précédemment, elle ciblait le gène *pheA1* dans le génome de *Rhodococci* isolé (Sandhu et al., 2009). Mais ces amorces n'ont pas permis d'obtenir un produit spécifique à partir de l'ADN de boue biologique. Nous avons donc conçu de nouvelles amorces basées sur des alignements de gènes représentatifs de *pheA1* présents dans des bases de données d'ADN.

Des ensembles d'amorces utilisés pour amplifier un fragment interne du gène *pheA1* sont conçus après alignement de séquences de gènes de type *pheA1* trouvés dans les génomes de bactéries dégradant les phénols, la plupart étant des bactéries Gram-positives. Les séquences considérées dans l'alignement sont les suivantes (numéro d'accèsion donné entre parenthèses) : *Rhodococcus jostii* RHA1 (CP000431 / ABG94319) ; *R. opacus* 1CP (X99622) ; *R. erythropolis* CCM2595 (FM995530) ; *Gordoniapolyiso prenivorans* (NC016906) ; *Pseudonocardia dioxanivorans* (CP002593) ; *Salinispora poraarenicola* (CP000850) et *Roseiflexus castenholzii* (CP000804). Il est montré que *pheA1* code effectivement une phénol-hydroxylase seulement pour les trois *Rhodococci* (Saa et al., 2010 ; Szokoel et al., 2014), il est supposé que les autres séquences codent des hydroxylases sur la base de la ressemblance avec des PHs connues (annotations de génomes entiers). Des régions courtes, partiellement conservées parmi les séquences sélectionnées sont choisies pour la conception des amorces : pheA1Gr+f2, pheA1Gr+f4 et pheA1Gr+R (cf. § 5.2.1. dans Matériels et Méthodes). La séquence de ces amorces correspond aux régions délimitées par les nucléotides 674-695, 271-292 et 1430-1450 de la séquence du gène *pheA1* de la souche RHA1.

Plusieurs approches d'amplification par PCR sur ADN métagénomique sont employées mais aucune des combinaisons d'amorces testées ne donne de produits de la taille attendue. Une méthode de PCR en deux étapes successives nommée *nested* PCR a été alors mise en place, sa première étape est réalisée soit avec la paires d'amorces pheA1Gr+f4 / pheA1Gr+R ou Pheh-3F / Pheh-3R (qu'on propose de nommer PCR1) et sa deuxième étape



## **Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.**

est réalisée soit avec la paires d'amorces pheA1Gr+f2 / pheA1Gr+R ou pheA1Gr+f2 / Pheh-3R (qu'on propose de nommer PCR2) (cf. § 5.2.1. et § 5.2.8. dans Matériels et Méthodes).

L'utilisation de l'ADN métagénomique à partir de boues traitées au phénol comme matrice permet d'obtenir un produit de PCR de la bonne taille, avec les deux paires d'amorces (PCR1 et PCR2). Les deux produits de PCR sont clonés et 48 amplicons de chaque clonage sont soumis à un séquençage d'ADN. Les résultats montrent que tous les amplicons analysés sont partiellement apparentés avec des gènes *pheA1* trouvés dans des bases de données. De plus, les deux ensembles de données présentent un contenu en séquences similaires (données non représentées). Cette observation suggère que les deux approches PCR ciblent la même sélection de séquences, chacune reflétant probablement la diversité du gène *pheA1*. Dans les travaux ultérieurs, la paire d'amorces pheA1Gr+f2 / pheA1Gr+R est choisie parce qu'elle a donné un produit de PCR plus long, avec les séquences d'amorces de cette paire correspondant à une plus grande gamme de gènes *pheA1* disponibles dans GenBank. En utilisant la *nested* PCR ainsi définie, quatre librairies de fragments de gène *pheA1* ont été générées à partir d'ADN métagénomique dérivé de boue traitée au phénol ou aux méthylphénols (*p*-crésol ou 3,4-DMP). Après élimination des séquences inappropriées, un total de 145 fragments de gène *pheA1* a été retenu pour une analyse ultérieure. Dans les quatre librairies, seul un nombre limité apparaît comme unique (Tab. 9).

La comparaison aux séquences présentes dans les bases de données (BLAST) révèle que la majorité de ces séquences uniques correspondent aux gènes *pheA1* trouvés chez les Actinobactéries, en particulier les Rhodococci. Néanmoins, le degré d'identité ne dépasse pas 90% et bon nombre de ces séquences sont similaires à des gènes hypothétiques de type *pheA1* de bactéries non-cultivables.

Une analyse phylogénétique de toutes les séquences uniques est illustrée à la figure 11. Les séquences du gène *pheA1* se répartissent en 4 groupes, un groupe étant très éloigné des trois autres. Le sous-ensemble de séquences distant des 3 autres s'apparente à une nitrophénol-hydroxylase (Numéro d'accension : AB081773), ce qui suggère qu'il pourrait représenter un groupe d'enzymes ayant des spécificités de substrat distinctes. Aucun groupe de séquences ne semble être spécifiquement enrichi après incubation de boues avec du phénol ou des méthylphénols. Il semble donc qu'aucune de ces sources de carbone n'a favorisé l'apparition d'un groupe particulier de bactéries dotée du gène *pheA1*.

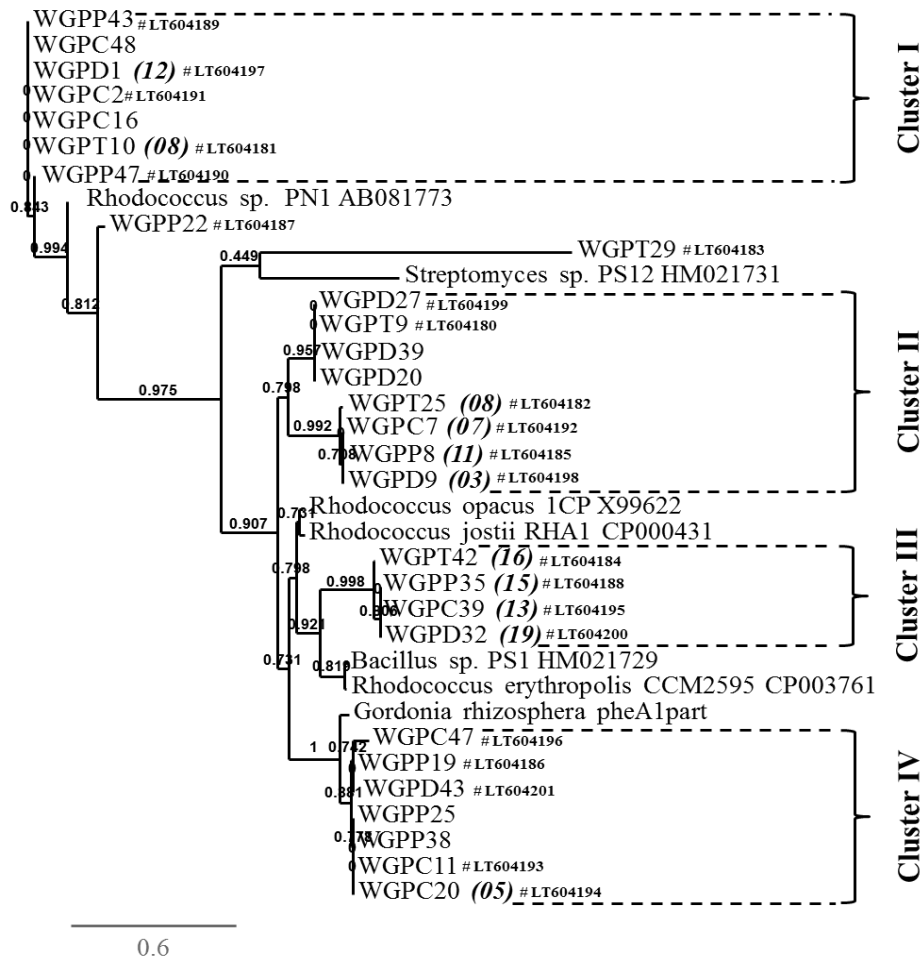


Figure 11 : Arbre phylogénétique de séquences partielles de gènes de type *pheA1* provenant d'eaux usées.

### 2.3. Détection *in situ* de l'ARNm de la phénol-hydroxylase dans les eaux usées

Afin d'identifier les gènes fonctionnels de LmPH exprimés dans le microbiote des eaux usées, on a procédé à la recherche des transcrits d'ARNm spécifiques dans l'ARN total extrait des eaux usées. A cette fin, la RT-PCR ciblant les transcrits de LmPH est conduite comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes (cf. § 5.2.11.). Un produit de la bonne taille est obtenu et ce même produit est absent dans les expériences de contrôle où la transcriptase inverse est omise (Fig. 12). L'analyse de séquences des amplicons de 42 clones révèle que seulement 19 d'entre eux correspondent à des gènes de LmPH, tandis que 23 amplicons apparaissent comme des copies d'une séquence non liée à LmPH (vecteur de clonage BASIC : KP223706), qui provient probablement d'une hybridation d'amorce non spécifique. Une élimination supplémentaire de 3 autres séquences courtes conduit à un sous-ensemble de 16 séquences, dont 7 ressemblent au gène *dmpN* de *Pseudomonas* CF600 (Fig.

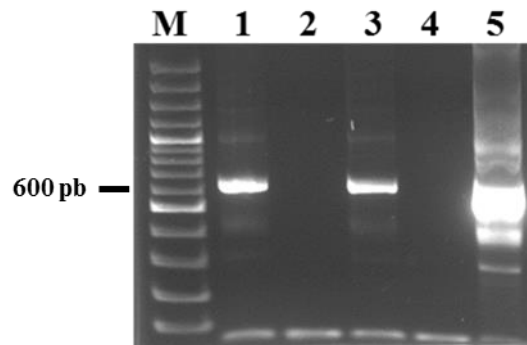
Les séquences proviennent de quatre librairies de clones obtenues par amplification par PCR d'un fragment de 780 pb du gène *pheA1* (Tab. 9). Pour les séquences multiples partageant >99% d'identité, un nombre est indiqué entre parenthèses après la désignation de la séquence. Par exemple, WGPD1 (12) signifie qu'il y avait 12 copies presque identiques à WGPD1 (séquences 12 + 1) dans les ensembles de gènes *pheA1* obtenus à partir des microcosmes traités par 3,4-DMP. L'analyse a montré que les séquences se divisaient en quatre groupes notées groupe I à IV. L'arbre comprend des séquences de référence supplémentaires choisies comme les meilleures correspondances trouvées dans les bases de données d'ADN, ainsi que des numéros d'accès pertinents.

WGPT, WGPP, WGPC, WGPD se rapportent à des séquences *pheA1* obtenues à partir d'échantillons d'eaux usées non traitées, traitées au phénol, *p*-crésol, 3,4-DMP respectivement.

La longueur de la branche est proportionnelle au nombre de substitutions par site.

Le nombre au-dessous de la barre d'échelle est le nombre de substitutions par site.

10b). 5 amplicons correspondent parfaitement au gène LmPH de *Ralstonia* sp. et deux autres sont similaires (RT-PH30, RT-PH31 ; Fig. 10b). Ces séquences sont également très proches du gène LmPH des membres non-cultivables des *Burkholderiales*, récemment reconnus comme étant un groupe de dégradation phénolique prédominant dans les eaux usées (Zhang *et al.*, 2015). Les deux derniers transcrits détectés proviennent de gènes proches de LmPHs, trouvés chez des bactéries non-cultivables liées aux *Beta-proteobacteria* (Fig. 10b).



**Figure 12** : Gel d'agarose montrant le produit de RT-PCR ciblant l'ARNm du gène LmPH : **M** - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; **pistes 1 et 3** - ADNc des eaux usées (avec RT\*) ; **pistes 2 et 4** - contrôle négatif : ADNc des eaux usées (sans RT\*) ; **piste 5** - contrôle positif : ADN métagénomique des eaux usées.

\* : Transcriptase inverse.

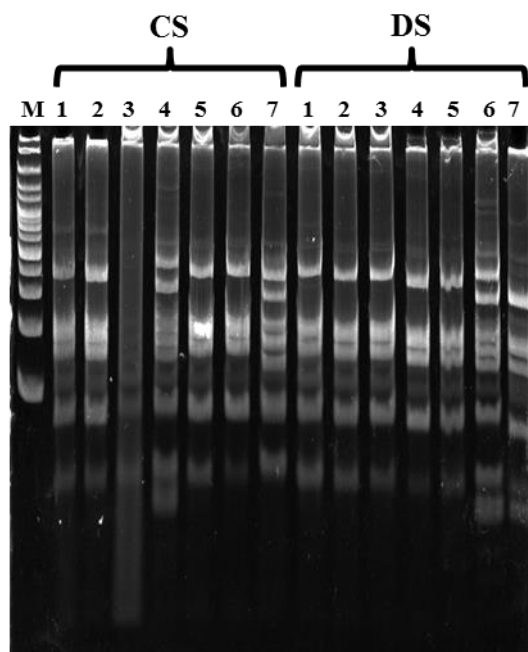
#### **2.4. Isolement des bactéries dégradant le *p*-crésol et le 3,4-DMP**

Des échantillons microbiens sont prélevés à partir des microcosmes amendés soit avec du *p*-crésol, soit avec du 3,4-DMP. Ils sont étalés sur un milieu minimal contenant le même composé phénolique comme seule source de carbone et d'énergie. Ainsi, plusieurs isolats bactériens ont été obtenus. Sur la base d'aspects morphologiques différents, 7 isolats sont choisis pour chaque source de carbone et font l'objet de caractérisations détaillées. Les isolats bactériens sont identifiés sur la base de la détermination de leur séquence du gène ARNr 16S, après amplification par PCR du gène presque complet (1465pb) de l'ADN génomique. La comparaison de ces séquences, par analyse RFLP, révèle que les 2 groupes de 7 souches obtenues sur *p*-crésol et 3,4-DMP donnent chacun 3 profils uniques (Fig. 13). Les recherches de séquences similaires dans GenBank (en utilisant BLAST) ou dans la base de données RDP (en utilisant SeqMatch) montrent que toutes les souches appartiennent aux protéobactéries,

## *Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.*

avec 2 souches dégradant le *p*-crésol. Elles sont affiliées à *Achromobacter* sp. et *Stenotrophomonas* sp. (CS4 et CS7 ; Tab. 10). Deux autres dégradent le 3,4-DMP, elles sont liées à *Brevundimonas* sp. et *Acinetobacter* sp. (DS6 et DS7 ; Tab. 10). Alors que les 2 dernières souches, CS5 et DS2, représentent chacune 5 isolats avec un gène d'ARNr 16S presque identique. Elles sont étroitement liées à *Pseudomonas aeruginosa*.

Les 5 souches de *P. aeruginosa* isolées sur *p*-crésol croissent sur le 3,4-DMP mais pas les 2 autres souches dégradant le *p*-crésol (souches CS4 et CS7). Sur la base d'une PCR avec des amorces spécifiques de groupe, Il semble que *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* contiendraient une LmPH de groupe II, alors qu'*Achromobacter* aurait une LmPHs de groupe I (Fig. 14) (voir la discussion ci-dessous pour la définition de groupe).



**Figure 13 :** Profils RFLP des gènes d'ARNr16S des 14 isolats retenus : **M** - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; **puits 1 à7 (CS)** - gènes d'ARNr 16S des isolats issus des microcosmes incubés avec le *p*-crésol ; **puits 1 à7 (DS)** - gènes d'ARNr 16S des isolats issus des microcosmes incubés avec le 3,4-DMP.

**Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.**

**Tableau 10 :** Identification et propriétés des souches représentatives isolées sur *p*-crésol ou 3,4-DMP.

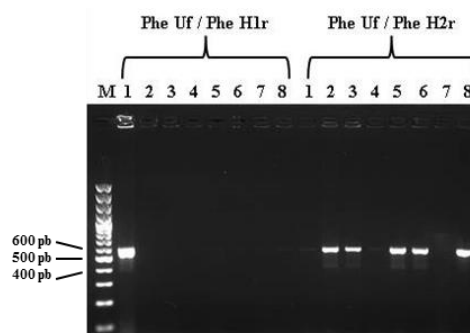
Souche isolée	Identification de la souche				Propriétés de la souche				Gène LmPH <sup>c</sup>
	Genre/espèce	Numéro d'accèsion du meilleur match	Identité (%)	T <sup>a</sup> (°C)	Sources de carbone utilisées <sup>b</sup>				
					Phénol	<i>p</i> -crésol	3,4-DMP	BTEX	
CS4	<i>Achromobacter</i> sp.	KP996670	99	40	+	+	-	+	I
CS5 (4) <sup>d</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KU682199	100	45	+	+	+	+	II
CS7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	KT748642	99	40	+	+	-	+	ND
DS2 (4) <sup>d</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KU682199	100	45	+	+	+	+	II
DS6	<i>Brevundimonas diminuta</i>	KF453789	99	40	+	+	+	+	ND
DS7	<i>Acinetobacter</i> sp.	GU201827	99	35	+	+	+	+	II

T<sup>a</sup>: température maximale de croissance.

<sup>b</sup> BTEX: benzène, toluène, éthylbenzène et xylène.

<sup>c</sup> Les nombres romains indiquent le groupe auquel appartient la LmPH comme déduit de la PCR spécifique (voir le texte) ; ND: non détecté.

<sup>d</sup> Les nombres entre parenthèses représentent des isolats supplémentaires montrant la même séquence d'ARNr 16S que la souche pertinente.



**Figure14 :** Amplification par PCR des fragments LmPH à partir de souches bactériennes : **M** - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; **1** - CS4 ; **2** – CS5 ; **3** – CS6 ; **4** – CS7 ; **5** – DS2 ; **6** – DS4 ; **7** – DS6 ; **8** – DS7. Les amorces de PCR utilisées : PheUf / Phe H1r et PheUf / PheH2r (**puits 1 à 8**).

## **Discussion**

Dans ce chapitre, l'objectif principal était d'étudier si oui ou non le potentiel catalytique des bactéries dégradant les phénols dans les eaux usées dépendait de la méthylation des phénols disponibles, en tant que sources de carbone. À cette fin, le travail a porté sur des phénol-hydroxylases qui catalysent la première étape de la voie de dégradation des phénols. L'analyse d'ensembles de gènes de LmPH, récupérés à partir d'ADN métagénomique, a fourni des preuves d'un changement significatif de la diversité lorsque les bactéries sont exposées aux méthylphénols. D'autre part, aucun changement évident n'a été observé par la comparaison des sous-ensembles de séquences de gène *pheA1*, obtenues à partir de microcosmes traités au phénol ou aux méthylphénols. Ces observations suggèrent que les bactéries dégradant les méthylphénols contiendraient une LmPH avec une spécificité de substrat différente de celle présente dans les bactéries dégradant le phénol. Ceci est corroboré par le fait que les isolats bactériens sélectionnés sur le *p*-crésol et le 3,4-DMP contiennent majoritairement une LmPH du groupe II, comme discuté ci-dessous.

Les approches par PCR ciblant les gènes cataboliques essentiels sont des outils précieux pour évaluer le potentiel biologique des échantillons environnementaux, comme le montrent les études sur les dioxygénases oxydant les HAP (Martin *et al.*, 2013) ou celles concernant les phénol-hydroxylases (Futamata *et al.*, 2001). Dans le cas des PHs, deux types d'enzymes peuvent être trouvés chez les bactéries. Mais jusqu'à présent, seule la diversité des mPHs a été étudiée en ciblant le gène LmPH (Futamata *et al.*, 2001). Dans ce chapitre, nous présentons pour la première fois des informations conjointes sur les mPHs et les sPHs trouvées dans la communauté bactérienne d'un site pollué par des hydrocarbures. Bien que notre analyse ait pris en compte un nombre relativement restreint de séquences, l'abondance des séquences de LmPH semble être plus élevée que celle de *pheA1* car la proportion de séquences uniques est plus élevée (45/104 contre 22/145, Tab. 9). Cette observation est conforme à l'hypothèse selon laquelle les bactéries, dans les boues activées, dégradant les phénols et portant LmPH sont prédominantes par rapport à celles qui portent *pheA1* (Watanabe *et al.*, 1998).

Les mPHs sont classés en 3 groupes, selon leur affinité relative pour le substrat, mesurée par la constante de demi-saturation pour le substrat alternatif trichloréthylène ( $K_s$ ) (Futamata *et al.*, 2001). Les enzymes ayant une faible valeur de  $K_s$  sont classées dans le groupe I, tandis que celles de  $K_s$  moyen et élevé sont placées respectivement dans les groupes

## ***Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.***

II et III. Les LmPHs correspondantes peuvent être distinguées sur la base d'une séquence peptidique interne, située entre les résidus 250 et 255 (numérotation concernant la séquence de référence DmpN de *Pseudomonas* CF600). Ce peptide est : EQDPDN ou EQDPGN dans le groupe I, EQHEDN dans les groupes II et III. L'analyse des séquences peptidiques déduites des gènes LmPH décrits dans cette étude révèle qu'une majorité d'entre elles (60/104) ne correspond à aucun groupe parce que le peptide concerné présente une ou deux substitutions d'acides aminés. Les séquences avec une seule substitution portent un peptide similaire à celui du groupe I (EQDPAN) et des changements structurels mineurs sont attendus, en raison du remplacement d'acide aminé. Ces séquences de LmPH, fortement représentées dans notre ensemble de données ( $\approx 45\%$ ), seront désignées sous le nom de groupe I-like ci-dessous. D'autre part, les LmPHs montrant deux substitutions dans le peptide (EQDEAN) présentent vraisemblablement des différences significatives qui pourraient affecter l'activité enzymatique. Ces enzymes seront désignées ci-dessous comme non classifiées. Alors que les séquences de LmPH du groupe III, abondantes dans les bactéries provenant d'un aquifère pollué au TCE (Futamata *et al.*, 2001), sont pratiquement absentes dans nos échantillons d'eaux usées amendés de phénols.

Cette situation est plutôt inattendue, puisque la forte concentration de phénols, ajoutés dans les microcosmes, aurait dû favoriser les bactéries contenant des mPHs avec une activité élevée et une faible affinité (groupe III). Cela pourrait s'expliquer par une probable position significativement dominante des bactéries contenant des LmPHs de groupe I dans les eaux usées. Quant à la proportion minoritaire de bactéries contenant des LmPH de groupe III, elle pourrait être due à la faible concentration à l'équilibre des phénols dans les eaux usées, ce qui empêcherait ces bactéries d'atteindre un niveau détectable dans les microcosmes. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'analyse des microcosmes non traités donne des LmPHs de groupe I ou non classifiés mais pas de LmPHs de groupe III.

La distribution des séquences de LmPH dans les groupes définis ci-dessus varie largement en fonction de l'exposition de la communauté bactérienne des eaux usées aux méthylphénols (Tab. 11). Les échantillons non traités et exposés au phénol présentent une teneur relativement élevée en séquences non classifiées (6/26 et 7/26, respectivement), mais presque aucune du groupe II. En revanche, les échantillons exposés au *p*-crésol et au 3,4-DMP présentent une faible teneur en séquences non classifiées, mais un enrichissement dans les séquences du groupe II, du groupe I-like et du groupe I (Tab. 11). Ces observations sont



**Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.**

cohérentes avec les résultats de notre analyse phylogénétique qui montrent un changement de diversité des séquences LmPH du aux méthylphénols. Les LmPHs du groupe II, qui sont devenues abondantes en réponse à l'addition du 3,4-DMP, se retrouvent principalement dans les *Pseudomonades* tels que la souche archétypique CF600 (Powlowski et Shingler, 1994). En conséquence, la majorité des souches isolées sur le 3,4-DMP sont identifiées comme *Pseudomonas* sp. (Tab. 10) et chacune d'elles porte une LmPH de groupe II. Dans une étude antérieure, diverses espèces de *Pseudomonas* ont été identifiées comme les principales bactéries dégradant le phénol et le *p*-crésol dans une rivière contaminée (Heinaru *et al.*, 2000). Parmi ces isolats bactériens, environ les deux tiers semblaient contenir une mPH, tandis que le dernier tiers contenait une sPH.

**Tableau 11 :** Influence de l'addition des méthylphénols sur la distribution des séquences de LmPH dans les groupes fonctionnels.

Groupe fonctionnel	Source de carbone ajoutée			
	Aucune	Phénol	<i>p</i> -crésol	3,4-DMP
<b>Groupe I</b>	5	4	2	12
<b>Groupe I-like</b>	14	11	16	4
<b>Groupe II</b>	1 <sup>a</sup>	2	3 + 1 <sup>a</sup>	9
<b>Groupe IV</b>	6	7	2	0

<sup>a</sup> Les séquences incluses dans le groupe II, bien que le peptide pertinent ait montré une comparaison de substitution par rapport à la séquence canonique (EQHPDN).

Les expériences de RT-PCR ont permis une identification réussie des transcrits de gènes de LmPH dans le microbiote complexe des boues activées, bien que les séquences récupérées soient quelque peu contaminées par des transcrits provenant d'un gène non apparenté. Les séquences trouvées sont étroitement apparentées aux gènes de LmPH dont le nombre s'est accru lors de l'ajout du *p*-crésol ou du 3,4-DMP dans le microcosme. En supposant que le nombre de séquences clonées reflète le nombre de copies des transcrits de gènes LmPH, nos résultats suggèrent que les gènes LmPH, associés aux bactéries dégradant le *p*-crésol ou le 3,4-DMP, sont mieux exprimés dans les eaux usées au moment de l'échantillonnage. On peut en déduire que les méthylphénols sont présents à une concentration plus élevée que le phénol dans les eaux usées, probablement parce qu'ils sont dégradés à un rythme plus lent, comme le montrent les études avec des bactéries isolées (Djokic *et al.*, 2011b).

## *Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.*

Cette partie d'étude est la première dans l'exploration de la diversité des sPH, par l'utilisation d'une approche indépendante de la culture. Cette démarche est une des premières contributions à l'exploration de la diversité des sPH. Nous avons développé une méthode de PCR qui offre une spécificité élevée, puisque les amplicons non apparentés aux gènes de PH sont apparus à un très faible taux (11%). La plupart des gènes *pheA1* obtenus ont des similitudes limitées avec des homologues de bactéries cultivées, ce qui suggère que les hôtes bactériens sont principalement non-cultivables. Bien que nos séquences correspondent le mieux aux gènes *pheA1* de *Rhodococcus* sp., cette affiliation doit être considérée comme provisoire puisque plusieurs souches de *Bacillus* contiennent aussi des gènes presque identiques à ceux trouvés dans les Rhodococci (Djokic *et al.*, 2011b). Contrairement à ce qui a été observé pour les LmPHs, l'addition des méthylphénols ne provoque pas de changement significatif dans la diversité des séquences *pheA1*. Cela pourrait s'expliquer par une capacité inférieure des bactéries porteuses de *pheA1* à métaboliser les alkylphénols. Bien que de telles bactéries se soient révélées capables de dégrader les crésols (Veeranagouda *et al.*, 2009), aucune bactérie de ce type n'a encore été décrite comme apte à dégrader le 3,4-DMP. L'absence apparente d'effet sélectif des méthylphénols sur la gamme des gènes *pheA1* pourrait également être liée à la concentration de composés phénoliques utilisés comme source de carbone. Peut-être que les valeurs initiales relativement basses utilisées dans cette étude présentent un signal trop faible pour favoriser un groupe bactérien spécifique de *pheA1*. Ces bactéries sont généralement Gram-positives et beaucoup d'entre elles tolèrent une forte concentration de phénol ou de *p*-crésol (Djokic *et al.*, 2011b).

Les approches PCR développées dans cette partie ont ciblé efficacement les gènes PHs bactériens dans des systèmes microbiens hautement complexes. Ils pourraient devenir de nouveaux outils pour surveiller le potentiel catalytique des communautés dégradant les phénols sur des sites pollués ou dans des installations utilisées pour éliminer la pollution organique. De plus, nos données de RT-PCR prouvent qu'il est possible de détecter des transcrits de gènes LmPH dans des échantillons d'eaux usées, donnant ainsi un premier aperçu des bactéries dégradant les phénols *in situ*. Les futurs développements technologiques devront mettre en œuvre des méthodes quantitatives telles que la qPCR comme moyen d'évaluer avec précision l'activité des bactéries dégradant les phénols. Une méthode a déjà été décrite pour l'estimation quantitative des gènes de LmPH dans les boues activées (Basile et Erijman, 2008) mais aucune méthode n'a encore été proposée pour tester les gènes de type *pheA1 in situ*. La mise en œuvre de ces outils génétiques devrait objectivement faciliter la

*Chapitre 1 : Diversité des phénol-hydroxylases bactériennes dans les eaux usées de la raffinerie de pétrole.*

gestion des installations de bioremédiation conçues pour traiter les eaux usées contenant des composés phénoliques.

***Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de  
souches bactériennes.***

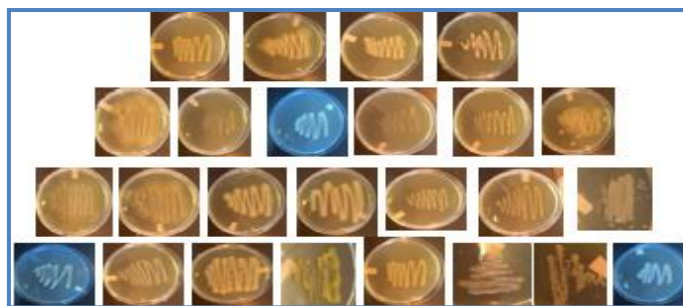
## Résultats et discussion

### 1. Isolement et criblage des souches bactériennes dégradant le phénol

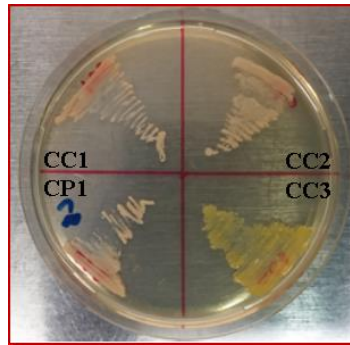
La recherche de bactéries impliquées dans la biodégradation du phénol et/ou du *p*-crésol (cf. § 2.3. dans Matériels et Méthodes), donne respectivement 24 et 10 colonies bactériennes d'aspects macroscopiques différents (Fig. 15). Tous ces isolats sont capables de se développer directement sur un milieu minimum contenant  $100\text{mg.l}^{-1}$  de phénol ou de *p*-crésol comme seule source de carbone et d'énergie. Ces souches ont donc la capacité de dégrader ces phénols. Les souches bactériennes isolées sur phénols ont été répertoriées et sont décrites dans le tableau 12.

Après une étape d'enrichissement et de purification en utilisant le phénol ( $1\text{g.l}^{-1}$ ) et/ou le *p*-crésol ( $0,8\text{g.l}^{-1}$ ) comme source de carbone et d'énergie, 4 colonies bactériennes ont été obtenues après étalement des dilutions sur milieu MSM solide supplémenté de  $0,4\text{g.l}^{-1}$  de phénol ou de *p*-crésol (cf. § 2.5. dans Matériels et Méthodes). Cette procédure d'enrichissement a été faite pour l'acquisition de dégradants et d'espèces tolérant les fortes concentrations de phénols. La figure 16 montre l'aspect de ces quatre isolats bactériens après croissance sur milieu minimum supplémenté de phénol.

$\frac{3}{4}$  des souches bactériennes obtenues se sont révélées à Gram-positif. La prédominance des bactéries à Gram-positif est attendue parce qu'elles ont une paroi plus résistante. Ce qui leur permet de tolérer de plus fortes concentrations de polluants toxiques (Dalal *et al.*, 2012).



**Figure 15** : Photographie des isolats bactériens obtenus sur phénol et/ou *p*-crésol.



**Figure 16** : Photographie des quatre isolats bactériens les plus résistants aux phénols : **CC1** - en forme de bâtonnet à Gram-positif, des colonies beiges de forme ronde irrégulière et avec des bords légèrement ondulés ; **CC2** - bacilles à Gram-positif, des colonies irrégulières et beiges ; **CC3** - en forme de bâtonnet à Gram-négatif, des colonies rondes et jaunâtres ; **CP1** - bacilles à Gram-positif, des colonies beiges gluantes et en forme étoilée (En culture, la souche CP1 a démontré une turbidité importante en signe de croissance et elle a toléré jusqu'à  $1,2\text{g.l}^{-1}$  de phénol. Étant donné que cette souche a montré une efficacité de dégradation prometteuse, elle a été retenue pour des tests ultérieurs plus approfondis).

## **2. Identification des souches bactériennes isolées**

L'identification des 38 isolats a été réalisée en se basant sur leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et moléculaires.

### **2.1. Caractéristiques morphologiques et biochimiques**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies en boîte de Pétri sur milieu LB et sur d'autres milieux sélectifs et la coloration de Gram des différents isolats purifiés permettent d'effectuer une première caractérisation. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 12. En ce qui concerne les résultats des tests biochimiques effectués sur les isolats, ils sont regroupés dans le tableau 13.

### **2.2. Identification des souches basée sur la séquence de leur ARNr 16S**

L'ADN génomique a directement été extrait des souches bactériennes. Le gène ARNr 16S a ensuite été amplifié par PCR grâce aux amorces universelles 27f / 1492r. Après amplification, une analyse RFLP basée sur la comparaison des séquences des produits PCR purifiés et digérés a été effectuée. Elle a révélé 21 profils différents, 17 pour le phénol et 4 pour le *p*-crésol. Les produits PCR purifiés ont ensuite été clonés dans pJET1.2 et séquencés

## Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de souches bactériennes.

par la méthode de Sanger (cf. § 5.2.2. au § 5.2.7. et § 5.2.12. dans Matériels et Méthodes). Les séquences ainsi obtenues ont été soumises à une analyse de type BLAST via la base de données NCBI. Le tableau 14 récapitule les séquences analysées en fonction de leur appartenance aux différents groupes au sein du domaine *Bacteria*. Ces 21 séquences montrent que 53% des bactéries sont à Gram (-) contre 47% des bactéries qui sont à Gram (+). Elles se répartissent majoritairement sur deux divisions, à savoir : les *Gammaproteobacteria* et les *Firmicutes*. Parmi ces isolats, 14 sont regroupés dans le cluster *Gammaproteobacteria*, et appartiennent au genre *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas* et *Serratia*. 14 isolats sont regroupés dans le deuxième cluster des *Firmicutes*, ils sont représentés principalement par le groupe des *Bacillales*, les souches appartiennent au genre *Bacillus*, *Brevibacillus* et *Macrococcus*. Le groupe des *Actinobacteria* inclut les genres : *Brevibacterium* et *Kocuria*. Toutes les souches bactériennes présentent une homologie  $\geq 99\%$  par comparaison avec les séquences de la banque de données dans Genbank-BLASTn (Tab. 14).

Le séquençage du gène ARNr 16S des souches bactériennes tolérant les fortes concentrations de phénol a permis d'identifier deux *Bacillales* : CC1 présentant 100% de similarité de séquence avec *Bacillus* sp. AMIC3 (Accession # : LT838346) et CC2 à 99% de similarité avec la souche *Bacillus cereus* L10 (Accession # : KF358254). Ceci permet la classification des souches CC1 et CC2 au genre *Bacillus*. La souche CC3 est identifiée comme *Comamonas* sp, elle présente 100% de similarité avec la souche *Comamonas* sp. clone DCP22-1 (Accession # : LC093418). L'analyse d'affiliation génétique a indiqué que CP1 présente 100% de similarité avec la souche *Lysinibacillus* sp. BAB-5843 (Accession # : KX350217).

Les séquences des gènes partiels de l'ARNr 16S déterminées dans cette partie (25 séquences) seront déposées à EMBL (European Molecular Biology Laboratory) / GenBank database du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tableau 12 : Caractéristiques de l'étude microscopique et macroscopique des isolats bactériens.

Isolats	Aspect microscopique			Aspect macroscopique							
	Forme	Arrangement	Gram	Taille	Couleur	Forme	Elévation	Contour	Opacité	Surface	Consistance
<b>K<sub>1</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(+)	Grosse	Blanche	Irrégulière	Plate	Irrégulier	Opaque	Rugueuse	Muqueuse
<b>K<sub>2</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(+)	Grosse	Blanche	Etoile	Plate	Irrégulier	Opaque	Rugueuse	Muqueuse
<b>P<sub>1</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(-)	Moyenne	Verte	Ronde	Plate	Régulier	Translucide	Lisse - Brillante	Muqueuse
<b>P<sub>2</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(+)	Moyenne	Blanche	Etoile	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>P<sub>3</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(+)	Moyenne	Blanche	Irrégulière	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>P<sub>4</sub></b>	Bacille	Isolé	(-)	Petite	Beige	Ronde	Convexe	Régulier	Translucide	Lisse - Brillante	Muqueuse
<b>P<sub>5</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(-)	Moyenne	Jaune	Ronde	Plate	Régulier	Translucide	Lisse - Brillante	Muqueuse
<b>P<sub>6</sub></b>	Bacille	Amas	(-)	Moyenne	Verte	Ronde	Plate	Régulier	Translucide	Lisse - Brillante	Muqueuse
<b>P<sub>7</sub></b>	Bacille	Isolé	(-)	Moyenne	Jaune	Ronde	Plate	Régulier	Translucide	Lisse	Muqueuse
<b>S<sub>1</sub></b>	Bacille	Amas	(-)	Petite	Rose	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse - Brillante	Crémeuse
<b>S<sub>2</sub></b>	Bacille	Paire - Amas	(+)	Moyenne	Blanche	Etoile	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>S<sub>3</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(+)	Moyenne	Beige	Irrégulière	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>S<sub>4</sub></b>	Bacille	Amas	(+)	Moyenne	Beige	Etoile	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>S<sub>5</sub></b>	Bacille	Amas	(+)	Moyenne	Blanche	Ronde	Plate	Irrégulier	Opaque	Rugueuses	Dure
<b>Z<sub>1</sub></b>	Bacille	Amas	(-)	Moyenne	Blanche	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse - Brillante	Visqueuse
<b>Z<sub>4</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(+)	Moyenne	Beige	Irrégulière	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>Z<sub>5</sub></b>	Bacille	Paire - Amas	(+)	Grosse	Beige	Etoile	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>Z<sub>11</sub></b>	Cocci	Grappe	(+)		Jaune - Orange	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse - Brillante	Visqueuse
<b>Z<sub>14</sub></b>	Bacille	Amas	(-)	Petite	Beige	Ronde	Plate	Régulier	Translucide	Lisse	Crémeuse
<b>Z<sub>22</sub></b>	Cocci	Isolé - Chainette	(+)	Petite	Rose	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse	Crémeuse
<b>Z<sub>24</sub></b>	Bacille	Isolé	(-)	Moyenne	Beige	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse	Crémeuse
<b>Z<sub>25</sub></b>	Bacille	Amas	(-)	Moyenne	Beige	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse	Crémeuse
<b>Z<sub>26</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(-)	Petite	Beige	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse	Crémeuse
<b>Z<sub>28</sub></b>	Bacille	Amas	(-)	Petite	Blanche	Ronde	Convexe	Régulier	Translucide	Lisse	Crémeuse



Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de souches bactériennes.

Isolats	Aspect microscopique			Aspect macroscopique							
	Forme	Arrangement	Gram	Taille	Couleur	Forme	Élévation	Contour	Opacité	Surface	Consistance
<b>HB<sub>1</sub></b>	Bacille	Isolé – Amas	(-)	Petite	Blanche	Ronde	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Muqueuse
<b>HB<sub>2</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(-)	Petite	Blanche	Irrégulière	Convexe	Irrégulier	Translucide	Lisse - Brillante	Muqueuse
<b>HB<sub>3</sub></b>	Bacille	Isolé – Paire - Amas	(-)	Petite	Blanche	Ronde	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Muqueuse
<b>HB<sub>4</sub></b>	Bacille	Paire - Amas	(+)	Grosse	Blanche	Etoile	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>HB<sub>7</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(+)	Grosse	Blanche	Irrégulière	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>HB<sub>8</sub></b>	Bacille	Paire - Amas	(+)	Grosse	Blanche	Etoile	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>HB<sub>9</sub></b>	Bacille	Paire - Amas	(-)	Petite	Blanche	Ronde	Convexe	Régulier	Translucide	Lisse	Visqueuse
<b>HB<sub>10</sub></b>	Bacille	Isolé - Paire	(+)	Grosse	Blanche	Etoile	Plate	Irrégulier	Opaque	Lisse	Dure
<b>HB<sub>11</sub></b>	Bacille	Amas	(-)	Petite	Blanche	Ronde	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Muqueuse
<b>HB<sub>12</sub></b>	Bacille	Isolé - Amas	(-)	Moyenne	Beige	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse - Brillante	Crémeuse

Tableau 13 : Résultats des tests biochimiques des isolats bactériens.

Souches Caractères biochimiques	Métabolisme énergétique				Métabolisme Glucidique								Métabolisme protéique								
	Milieu VF	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase	Milieu MEVAG	Milieu TSI				Test ONPG	Citrate perméase	Milieu Mannitol-Mobilité		Milieu Clark et Lubs		Milieu Moeller			Milieu Urée-Indole		
						Glu	Lac/Sac	H <sub>2</sub> S	Gaz			Mannitol	Mobilité	VP	RM	ADH	LDC	ODC	Urée	Indole	TDA
<b>Z<sub>26</sub></b>	AF	+	-	+	OF	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
<b>Z<sub>28</sub></b>	AS	+	+	-	O	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HB<sub>1</sub></b>	AF	+	-	+	OF	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>HB<sub>2</sub></b>	AF	+	+	-	OF	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
<b>HB<sub>3</sub></b>	AF	+	-	+	OF	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>HB<sub>4</sub></b>	AF	+	-	+	O	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>HB<sub>7</sub></b>	AF	+	-	-	O	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>HB<sub>8</sub></b>	AF	+	-	-	O	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>HB<sub>9</sub></b>	AF	+	+	-	OF	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
<b>HB<sub>10</sub></b>	AF	+	-	+	OF	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>HB<sub>11</sub></b>	AF	+	-	+	OF	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>HB<sub>12</sub></b>	AS	+	+	-	O	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-

Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de souches bactériennes.

Souches Caractères biochimiques	Métabolisme énergétique				Métabolisme Glucidique								Métabolisme protéique									
	Milieu VF	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase	Milieu MEVAG	Milieu TSI				Test ONPG	Citrate perméase	Milieu Mannitol- Mobilité		Milieu Clark et Lubs		Milieu Moeller			Milieu Urée- Indole			
						Glu	Lac/Sac	H <sub>2</sub> S	Gaz			Mannitol	Mobilité	VP	RM	ADH	LDC	ODC	Urée	Indole	TDA	
<b>K<sub>1</sub></b>	AS	+	-	+	O	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>K<sub>2</sub></b>	AS	+	-	+	O	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>P<sub>1</sub></b>	AS	+	+	-	O	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>P<sub>2</sub></b>	AS	+	-	-	O	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>P<sub>3</sub></b>	AS	+	-	+	O	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>P<sub>4</sub></b>	AS	+	+	+	O	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>P<sub>5</sub></b>	AS	+	+	-	O	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>P<sub>6</sub></b>	AS	+	+	-	O	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>P<sub>7</sub></b>	AS	+	+	-	O	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>S<sub>1</sub></b>	AF	+	-	+	OF	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>S<sub>2</sub></b>	AS	+	-	-	O	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>S<sub>3</sub></b>	AS	+	-	+	O	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>S<sub>4</sub></b>	AS	+	-	-	OF	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>S<sub>5</sub></b>	AS	+	-	-	O	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Z<sub>1</sub></b>	AS	+	+	+	O	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Z<sub>4</sub></b>	AS	+	-	+	O	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Z<sub>5</sub></b>	AS	+	-	+	O	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Z<sub>11</sub></b>	AF	+	+	+	OF	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<b>Z<sub>14</sub></b>	AS	+	+	-	O	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Z<sub>22</sub></b>	AS	+	-	+	O	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Z<sub>24</sub></b>	AS	+	+	+	O	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Z<sub>25</sub></b>	AS	+	+	+	O	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

AS : aérobie strict ; AAF : aéro-anaérobie facultatif ; OF : oxydatif et fermentatif ; O : oxydatif.

**Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de souches bactériennes.**

**Tableau 14 :** Identification basée sur la séquence d'ARNr 16S de bactéries dégradant le phénol ou le *p*-crésol.

Souche	Genre/Espèce	Identité (%)	Accession #	PH
<b>K<sub>1</sub> - K<sub>2</sub></b>	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	99	KJ872854	ND
<b>P<sub>2</sub> - P<sub>3</sub></b>	<i>Bacillus</i> sp.	100	KF814108	ND
<b>P<sub>4</sub></b>	<i>Achromobacter insolitus</i>	99	CP019325	ND
<b>P<sub>1</sub> - P<sub>5</sub> - P<sub>6</sub></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99	KT869138	+
<b>P<sub>7</sub></b>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	99	LK391695.1	+
<b>S<sub>1</sub></b>	<i>Serratia odorifera</i>	99	NR_037110	ND
<b>S<sub>2</sub></b>	<i>Bacillus</i> sp.	99	EU784649.1	ND
<b>S<sub>3</sub></b>	<i>Bacillus subtilis</i>	99	HQ266666	ND
<b>S<sub>4</sub></b>	<i>Bacillus mojavensis</i>	99	MF040257	ND
<b>S<sub>5</sub></b>	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	99	JX644589	ND
<b>Z<sub>1</sub></b>	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KY475780	ND
<b>Z<sub>4</sub> - Z<sub>5</sub></b>	<i>Bacillus safensis</i>	99	KP318459	ND
<b>Z<sub>11</sub></b>	<i>Macrococcus brunensis</i>	99	EU373366	ND
<b>Z<sub>14</sub> - Z<sub>28</sub></b>	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	99	KX223755	ND
<b>Z<sub>22</sub></b>	<i>Kocuria rosea</i>	99	LN867187	+
<b>Z<sub>24</sub> - Z<sub>25</sub></b>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	JX122545	+
<b>Z<sub>26</sub></b>	<i>Escherichia coli</i>	99	CP011495	ND
<b>HB<sub>1</sub> - HB<sub>3</sub> - HB<sub>11</sub></b>	<i>Enterobacter</i> sp.	99	JQ229706	ND
<b>HB<sub>2</sub> - HB<sub>9</sub></b>	<i>Aeromonas caviae</i>	100	MF629672	ND
<b>HB<sub>4</sub> - HB<sub>7</sub> - HB<sub>8</sub> - HB<sub>10</sub></b>	<i>Bacillus</i> sp.	99	KX839268	ND
<b>HB<sub>12</sub></b>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP007441	+

PH : phénol hydroxylase – ND : non-déecté.

La capacité de certains microorganismes à métaboliser les phénols a été rapportée depuis longtemps (cf. § 2.1. dans Revue Bibliographique). La biodégradation du phénol et de ses dérivés méthylés par les bactéries a été largement étudiée et un grand nombre de bactéries dégradant les phénols ont été isolées et caractérisées aux niveaux physiologique et génétique. Les protéobactéries composent le principal groupe bactérien cultivable dégradant les phénols. La plupart des travaux de dégradation, de métabolisme et de génétique des microorganismes dégradeurs de phénols concernent des espèces du genre *Pseudomonas* ou d'espèces connexes telles que : *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Ralstonia*, etc. (cf. § 2.1. dans Revue Bibliographique). Cette théorie est soutenue par le fait que les Pseudomonades peuvent utiliser une large gamme de sources de carbone et d'énergie (DeRito *et al.*, 2005). Le genre *Pseudomonas*, et plus précisément l'espèce *Pseudomonas putida* a été couramment utilisée pour la biodégradation des phénols en raison de son efficacité d'élimination élevée. Elle a été étudiée par de nombreux chercheurs sous des formes libres et immobilisées, des modes discontinus et continus, et des cultures pures et mixtes, en utilisant différents types de

bio-réacteurs. Les réponses de *P. putida* aux stress chimiques ont indiqué que ses cellules utilisent divers mécanismes protecteurs pour survivre dans divers environnements extrêmes (Loh et Cao, 2008). Des études sur la tolérance au phénol ont révélé qu'en réponse à un choc phénolique, *P. putida* réagit en activant un ensemble de réponses qui peut être régulé par le système à deux composants ColR / ColS (Kivistik *et al.*, 2006). Bien que le genre *Pseudomonas* ait été largement utilisé pour traiter les phénols, une attention considérable a été portée récemment à de nouveaux microorganismes plus efficaces. Il a été rapporté que *Ralstonia eutropha* et *Ralstonia pickettii* sont des microorganismes ayant la capacité d'utiliser une variété de composés aromatiques comme sources de carbone et d'énergie. Ils présentent plusieurs avantages par rapport aux autres souches étudiées telles que *P. putida* en ce sens qu'il est faiblement pathogène et qu'aucun incident pathogène chez les animaux ou phytopathogène n'a été signalé. La souche *R. pickettii* LD1 peut métaboliser les monochlorophénols, ce qui représente un défi important car ils sont particulièrement formés lors de la chloration des eaux usées (Al-Khalid et El-Naas, 2012).

### **3. Utilisation des substrats phénoliques et autres substrats aromatiques**

La capacité des 25 isolats bactériens identifiés à utiliser une gamme de substrats phénoliques et d'autres substrats aromatiques comme seule source de carbone et d'énergie a été testée comme décrit dans Matériels et Méthodes (cf. § 2.7.). Le tableau 15 regroupe les résultats de croissance obtenus. Toutes les souches bactériennes étudiées peuvent croître sur benzène, phénol et *p*-crésol. Elles peuvent utiliser le phénol et le *p*-crésol aussi bien sur milieu MSM solide que dans des cultures liquides, à une température de 30°C et un pH de 7. Seize isolats sont capables de dégrader le toluène, l'éthylbenzène et le *m*-crésol ; cependant, aucune souche ne peut utiliser le *p*-nitrophénol comme seule source de carbone et d'énergie dans ces conditions testées.

L'isolat CP1 a montré une croissance relativement appréciable sur 15 substrats aromatiques y compris sur des composés bicycliques comme le biphényle, le carbazole, le naphthalène et sur un triaromatique le phénanthrène. En revanche, les isolats CC1, CC2 et CC3 utilisent une gamme de substrats plus restreinte (Tab. 15).

#### **4. Température maximale de croissance des isolats**

Afin de déterminer la température maximale de croissance des souches bactériennes isolées, différentes valeurs de température allant de 25°C à 60°C avec un intervalle de 5°C ont été testées. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 15. Ils indiquent que la plupart des isolats (17/25) sont mésophiles. Alors que huit d'entre eux (appartenant au groupe des *Bacillales*) se sont révélés thermophiles (c.-à-d. des bactéries qui se développent à une température > 45°C).

#### **5. Détection de gènes de dégradation : phénol hydroxylase**

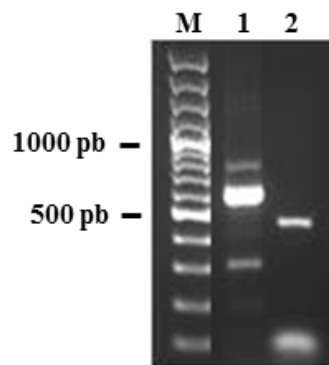
Pour détecter la phénol hydroxylase dans les souches étudiées, on a utilisé une approche PCR visant à amplifier un segment interne du gène codant pour cette enzyme. Les amorces utilisées étaient des amorces universelles (cf. § 5.2.1. dans Matériels et Méthodes), conçues pour amplifier une portion de la grande sous-unité de la phénol hydroxylase chez les bactéries Gram-négatif (LmPH) ou une portion de la grande sous-unité de la phénol hydroxylase chez les bactéries Gram-positif (*pheA1*) (Futamata *et al.*, 2001 ; Sandhu *et al.*, 2009).

L'ADN génomique extrait à partir des souches bactériennes a été utilisé pour l'amplification des LmPH et *pheA1*. En utilisant la paire d'amorces PheUf / PheUR (cf. § 5.2.1. et § 5.2.9. dans Matériels et Méthodes), le fragment de gène LmPH de ~ 600pb a été amplifié chez *Pseudomonas* sp. (Tab. 14) et *Comamonas* sp. (CC3). Cependant, aucune amplification n'a été observée chez les autres isolats Gram (-): *Achromobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Brevundimonas* sp., *E. coli*, *Enterobacter* sp., *Rhizobium* sp. et *Serratia* sp. (Tab. 14).

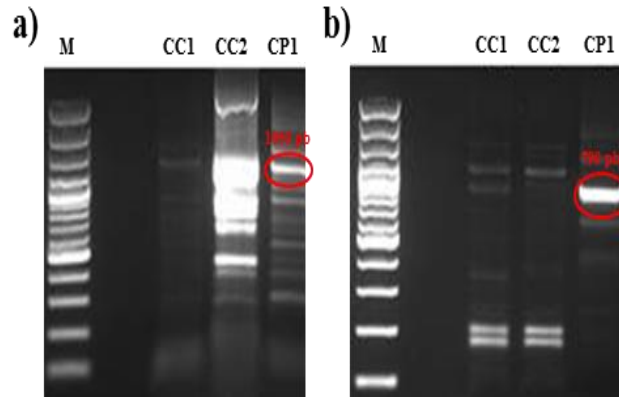
Seulement un quart des isolats (10 sur 38) capables de dégrader les phénols ont donné une réaction positive par PCR mettant ainsi en évidence l'existence d'un gène PH (LmPH ou *pheA1*). Le reste des souches (28 sur 38) n'a donné aucun produit PCR, ce qui suggère que ces souches contiennent des gènes de PH avec des séquences différentes non reconnues par les amorces universelles utilisées dans cette étude.

## Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de souches bactériennes.

Plusieurs combinaisons d'amorces spécifiques (*pheA1Gr+f4* / *pheA1Gr+R* suivie par *pheA1Gr+f2* / *pheA1Gr+R* ; *pheA1Gr+f4* / *pheA1Gr+R2* suivie par *pheA1Gr+f2* / *pheA1Gr+R2* ; *Pheh-3F* / *Pheh-3R* suivie par *pheA1Gr+f2* / *Pheh-3R* ; *KPheA1F5* / *KPheA1R2* et *KPheA1F5* / *KPheA1R3*) ont été utilisées pour détecter la présence du gène *pheA1* dans les souches bactériennes Gram (+) isolées (cf. § 5.2.1. et § 5.2.8. dans Matériels et Méthodes). Seuls les isolats identifiés comme étant *Kocuria rosea* (*K<sub>22</sub>*) et *Lysinibacillus* sp. (CP1) ont donné un résultat positif à l'amplification du gène *pheA1*. Pour ces deux souches, des fragments uniques de la taille attendue ont été obtenus avec le couple d'amorces *KPheA1F5* / *KPheA1R2* (400pb) et pour le couple *KPheA1F5* / *KPheA1R3* (700pb). Ces amorces ont été conçues spécialement pour amplifier le gène *pheA1* de *Kocuria* sp. (Fig. 17). Pour CP1, une PCR nichée a été utilisée pour amplifier le gène *pheA1*. Elle permet par l'implication de deux paires d'amorces utilisées successivement de limiter la quantité de produits non spécifiques consécutifs à la liaison des amorces à des sites inattendus (la seconde paire d'amorces étant censée amplifier une séquence se trouvant au sein du produit de la première PCR). La première PCR (PCR1) a donné plusieurs bandes dont une majoritaire d'environ 1050pb et la seconde PCR (PCR2) a permis l'obtention d'une bande unique d'environ 790pb (Fig. 18).



**Figure 17** : Gel d'électrophorèse des produits de la PCR de *pheA1* de *K<sub>22</sub>* : **M** - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific). Les amorces de PCR utilisées : *KPheA1F5* / *KPheA1R2* et *KPheA1F5* / *KPheA1R3* (**puits 1 et 2**).



**Figure 18 :** Gel d'électrophorèse des produits de la PCR de *pheA1* de CP1 : **M** - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; **a)** - PCR1 avec les amorces *pheA1Gr+f4* / *pheA1Gr+R* ; **b)** – PCR2 avec les amorces *pheA1Gr+f2* / *pheA1Gr+R*.

L'analyse des séquences des produits amplifiés a confirmé la présence du gène *pheA1*. En effet, la recherche des similitudes de séquences par BLAST a montré que le gène *pheA1* de K<sub>22</sub> présente 91% d'identité avec le gène de la pentachlorophénol 4-monooxygénase provenant de *Sphingomonas* sp. UG30 (Accession # : AF059680). Le gène *pheA1* de la souche CP1 a montré 96% de similitude avec le gène de la phénol hydroxylase provenant de *Rhodococcus* sp. Chr-9 (Accession # : HM807584).

Tableau 15 : Croissance des isolats bactériens sur substrats aromatiques.

		K <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>7</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	Z <sub>1</sub>	Z <sub>4</sub>	Z <sub>11</sub>	Z <sub>14</sub>	Z <sub>22</sub>	Z <sub>24</sub>	Z <sub>26</sub>	HB <sub>3</sub>	HB <sub>9</sub>	HB <sub>10</sub>	HB <sub>12</sub>	CC1	CC2	CC3	CP1		
<b>HAP</b>	<b>Biphényle</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	
	<b>Carbazole</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	
	<b>Naphtalène</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+	
	<b>Phénanthrène</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	
	<b>Benzène</b>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	++	
<b>BTEX</b>	<b>Toluène</b>	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	++		
	<b>Éthylbenzène</b>	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	++		
	<b><i>o</i>-xylène</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+	
	<b><i>m</i>-xylène</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+	
	<b><i>p</i>-xylène</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+	
<b>Phénols</b>	<b>Phénol</b>	++	++	+	++	++	+	+	+	+	+	+	++	++	+	++	++	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+	++
	<b><i>o</i>-crésol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+/-	++	
	<b><i>m</i>-crésol</b>	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+/-	++	
	<b><i>p</i>-crésol</b>	+	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	++	++	++	++	++	++	+	++
	<b><i>p</i>-nitrophénol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>3,4-DMP</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	
<b>T °C Maximale de Croissance</b>		<u>50</u>	<u>50</u>	35	45	45	35	<u>50</u>	<u>50</u>	45	45	35	<u>50</u>	35	35	35	45	45	35	35	45	45	<u>50</u>	<u>50</u>	40	<u>50</u>		

++ : très bonne croissance au bout de 2 jours d'incubation ; + : une bonne croissance ; +/- : une faible croissance ; - : aucune croissance.



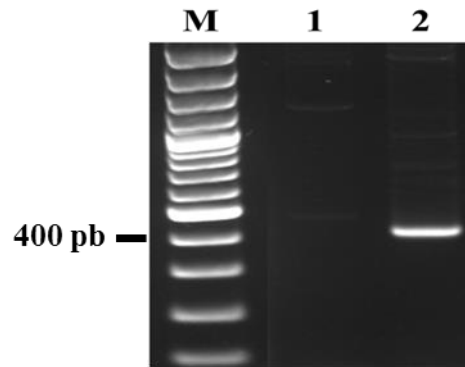
## **6. Recherche des gènes d'intérêt de la souche CP1 par PCR**

### **6.1. Gène *pheA1***

Des amorces spécifiques du gène *pheA1* ont été utilisées pour détecter sa présence dans la souche bactérienne CP1. Les résultats d'amplification sont présentés dans la figure 18 (comme décrit ci-dessus dans le § 5.). Le séquençage de ce gène a montré 96% de similitude avec le gène de la phénol hydroxylase provenant de *Rhodococcus* sp. Chr-9 (Accession # : HM807584). La teneur en GC de la phénol hydroxylase de CP1 (*Lysinibacillus* sp.- Bacilli) s'est avérée être de 61,9%, ce qui est assez proche de celle de *Rhodococcus* sp. Chr-9 (Accession # : HM807584) (Actinobacteria) - 62,6% (Sun *et al.*, 2011) et tout à fait distincte des autres phénols hydroxylases génétiquement similaires, des autres Bacilli telles que *Geobacillus stearothermophilus* BR219 (Accession # : U17960) - 47,3%. Le séquençage du gène *pheA* de *Geobacillus stearothermophilus* BR219 a révélé une forte similitude avec les flavine hydroxylases provenant des espèces de *Rhodococcus* et de *Streptomyces* (Kim et Oriol, 1995). Djokic *et al.* (2011a) ont montré une forte similarité entre les gènes phénols hydroxylases des souches *Bacillus* sp. PS1, PS11 et TN42 et ceux de *Rhodococcus erythropolis*, avec une identité de 98%, 99% et 97%. Une forte similarité de séquence entre PS1, PS11 et TN42 avec *Rhodococcus*, couplée à la forte promiscuité des souches de *Bacillus*, pourrait indiquer que ces gènes ont été acquis par transfert horizontal. Peters *et al.* (1997) ont étudié neuf souches de *Pseudomonas* appartenant à quatre espèces différentes (*P. corrugata*, *P. fragi*, *P. stutzeri* et *P. fluorescens*) et hébergeant des opérons *pheBA* transférés horizontalement. Ces résultats pourraient s'expliquer par un transfert horizontal de gènes (conjugaison, transposition ou recombinaison). Ce transfert de gènes horizontal confère donc une flexibilité de survie et d'adaptation aux microorganismes, permettant ainsi une croissance sur une large gamme de composés aromatiques en développant les enzymes périphériques nécessaires (Nordlund *et al.*, 1993). Ces données indiquent que le matériel génétique introduit pourrait, s'il code une capacité bénéfique, enrichir la variété génétique naturelle pour la biodégradation.

## 6.2. Gène C120/C230

Pour mettre en évidence la présence du gène codant pour la catéchol dioxygénase (C120 et/ou C230) chez l'isolat le plus performant CP1, une amplification de ce gène a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques C120-F / C120-R et C230-F / C230-R (cf. § 5.2.1. et § 5.2.10. dans Matériels et Méthodes). L'image du gel des produits PCR a donné le résultat qui apparaît sur la figure 19. Une bande unique d'environ 400pb est détectée pour les amorces spécifiques du gène C230. Il en ressort que la souche CP1 possède une C230, qui catalyse le clivage du noyau aromatique du catéchol et de ses dérivés en *meta* position par rapport aux groupes hydroxyles.



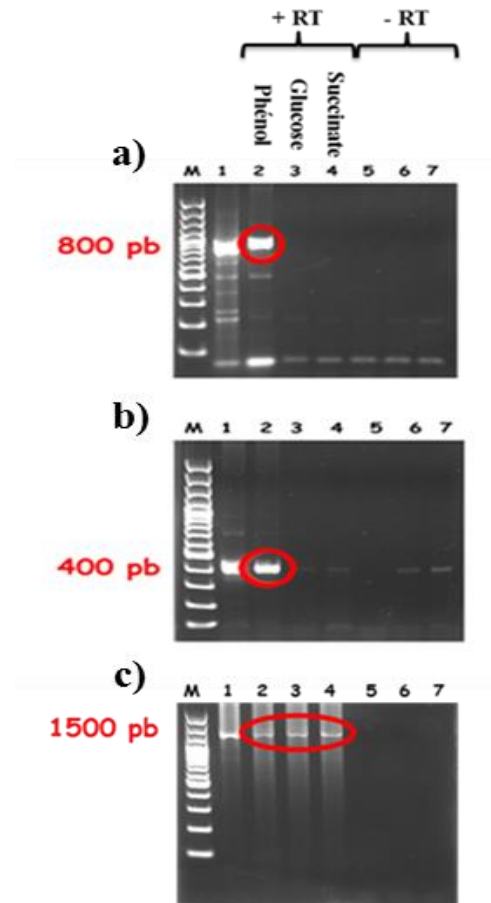
**Figure 19** : Amplification par PCR des gènes de la CO à partir de l'isolat CP1 : **M** - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; **1** - Avec des amorces spécifiques du gène C120 ; **2** – Avec des amorces spécifiques du gène C230.

Plusieurs bactéries Gram (+) de la classe Bacilli (*Bacillus* sp. PS11, *Bacillus* sp. Cro3.2, *B. cereus* MTCC9817 AKG1, *B. cereus* MTCC9818 AKG2, *Geobacillus stearothermophilus* BR219, *G. stearothermophilus* DSM6285, *G. stearothermophilus* FDTP-3 et *G. thermoglucosidasius* A7) possèdent le gène catabolique *pheB*, codant pour la catéchol 2,3-dioxygénase, une enzyme indicative de la voie de dégradation *meta*, qui convertit le catéchol en semialdéhyde 2-hydroxymuconique. Les enzymes de *Bacillus* sp. Cro3.2, *G. stearothermophilus* FDTP-3 et *G. thermoglucosidasius* A7 sont thermostables (Dong *et al.*, 1992 ; Kim et Oriol, 1995 ; Ali *et al.*, 1998 ; Duffner *et al.*, 2000 ; Omokoko *et al.*, 2008 ; Banerjee et Ghoshal, 2010 ; Djokic *et al.*, 2011a). Une culture mixte composée principalement des genres *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium* et *Nocardioides* dégrade le phénol et les crésols par la voie *meta* (Lee *et al.*, 2011).

### **6.3. Isolement de l'ARN et analyse transcriptionnelle des gènes *pheA1* et C23O par RT-PCR**

La détection des transcrits *pheA1* et C23O par RT-PCR est un moyen de connaître l'expression de ces gènes en fonction des conditions physiologiques donc cela renseigne sur la régulation de ces gènes. Dans cette étude, une extraction d'ARN suivie d'une RT-PCR (synthèse d'ADNc à partir d'ARN par une rétro-transcriptase (RT)) des gènes *pheA1* et C23O ont été effectuées sur des cultures de CP1. Ces cultures sont réalisées en présence de phénol, de glucose ou de succinate. L'ADNc de chaque culture bactérienne a été utilisé comme matrice dans la PCR ciblant les gènes *pheA1* et C23O. Le gène ARNr 16S a également été amplifié à partir des produits d'ADNc en tant que témoin positif (cf. § 5.2.8., § 5.2.10. et § 5.2.11. dans Matériels et Méthodes).

Des transcrits de *pheA1* et de C23O ont été détectés pour la culture sur phénol et ces mêmes transcrits n'ont pas été obtenus dans le cas du glucose et du succinate, alors que le gène ARNr 16S a été transcrit pour toutes les cultures bactériennes (Fig. 20). Cela veut dire qu'en fonction des conditions de croissance, plus exactement de la source de carbone utilisé pour la culture, le transcrit est détecté ou non. Ces enzymes sont donc inductibles puisque elles ne sont synthétisées qu'en présence de phénol. D'autre part, l'expression d'un gène de type C23O en présence de phénol suggère que l'isolat CP1 emprunte la voie *meta* lors du processus de dégradation du phénol.



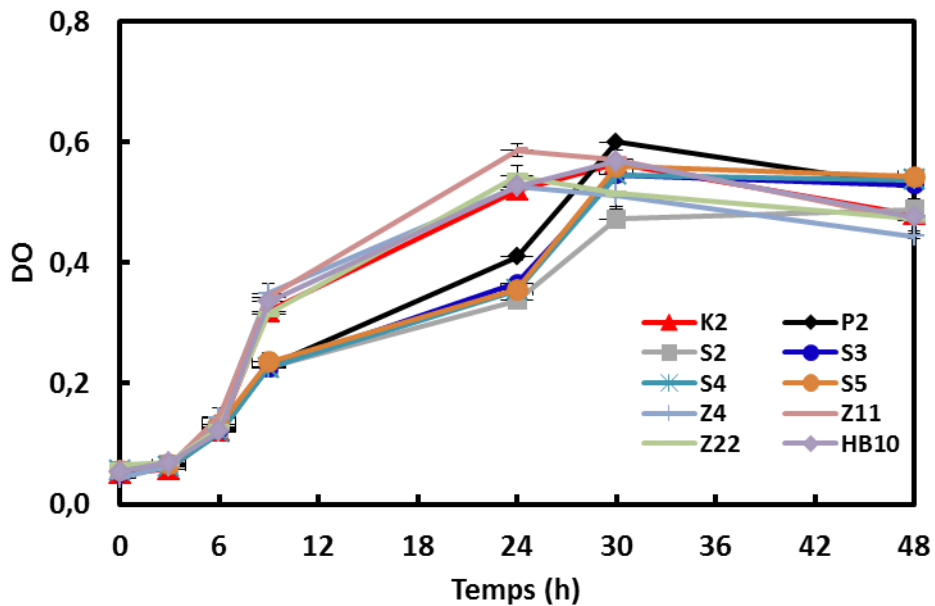
**Figure 20** : Gel d'agarose montrant les produit de RT-PCR ciblant l'ARNm du gène *pheA1* (a), C23O (b) et ARNr 16S (c) de l'isolat CP1 : M - marqueur GeneRuler™ 100pb DNA ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) ; piste 1 - contrôle positif : ADN génomique de l'isolat CP1 ; pistes 2, 3 et 4 - ADNc de CP1 en présence de phénol, glucose et succinate, respectivement (avec RT) ; pistes 5, 6 et 7 - contrôle négatif : ADNc de CP1 dans les mêmes conditions précédentes (sans RT).

## 7. Croissance et cinétique de la dégradation des phénols

### 7.1. Croissance des bactéries tolérant des concentrations de phénol <100mg/l

Les dix souches bactériennes sélectionnées (Gram-positif et thermophiles) ont été cultivées sur MSM additionné de phénol (allant de 100 à 500mg.l<sup>-1</sup>, avec un incrément de 100) comme seule source de carbone et d'énergie. La DO<sub>600</sub> a été suivie dès les premières heures pour évaluer la croissance bactérienne (cf. § 2.8. dans Matériels et Méthodes). La figure 21 représente les courbes de croissance de bactéries en présence de 100mg.l<sup>-1</sup> de phénol.

Pour les dix isolats étudiés, les phases de latences sont très courtes (une augmentation de la concentration bactérienne dès 6h d'incubation). Ce résultat démontre donc une adaptation plus ou moins rapide de ces souches au phénol.



**Figure 21** : Courbes de croissance des bactéries sélectionnées en présence de 100mg.l<sup>-1</sup> de phénol.

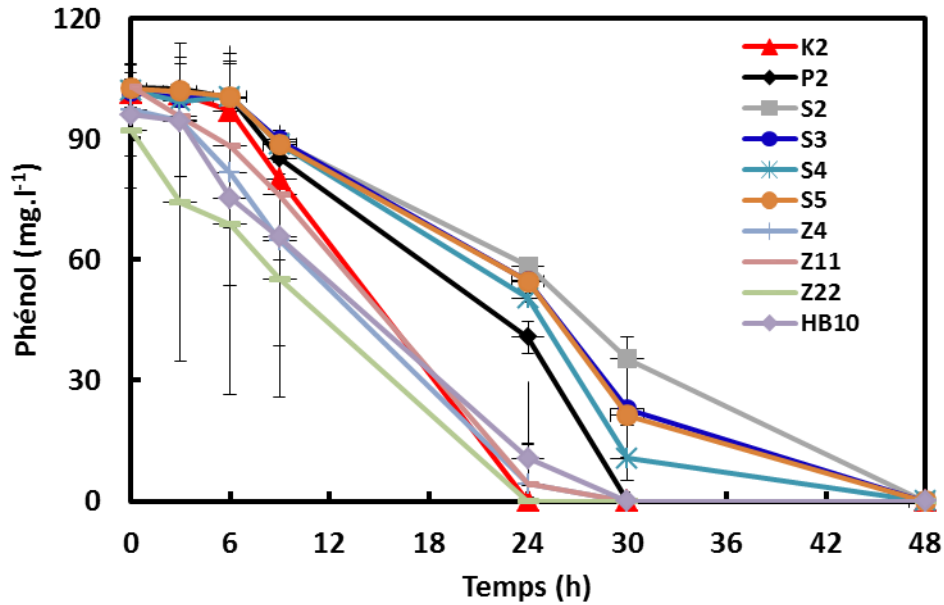
L'isolat P<sub>2</sub> a présenté le niveau de croissance le plus élevé (moyenne des DO = 0,599) suggérant un usage intensif du phénol, celui-ci est suivi par les isolats Z<sub>11</sub>, HB<sub>10</sub>, K<sub>2</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, Z<sub>22</sub>, Z<sub>4</sub> puis S<sub>2</sub> (moyennes des DO = 0,586 ; 0,568 ; 0,565 ; 0,559 ; 0,545 ; 0,545 ; 0,543 ; 0,525 ; 0,488, respectivement). Ces valeurs maximales ont été atteintes après 24h pour les souches Z<sub>4</sub>, Z<sub>11</sub> et Z<sub>22</sub>, après 30h pour les souches K<sub>2</sub>, P<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> et HB<sub>10</sub> et après 48h pour

la souche S<sub>2</sub>. Cette augmentation correspondrait à la phase exponentielle durant laquelle la dissolution du phénol satisfait les besoins métaboliques des cellules. Cette dissolution est en fonction de l'équipement enzymatique qui est spécifique pour chaque bactérie ; ce qui explique les différents pics de charges bactériennes marquées dans des temps différents. Au-delà de 30h, une chute de la charge bactérienne a été constatée. Elle est probablement due à l'épuisement du milieu ou à la sécrétion des métabolites secondaires.

Quant aux milieux contenant des concentrations de phénol  $\geq$  à 200mg.l<sup>-1</sup>, aucun des dix isolats n'a montré une croissance appréciable. Ces résultats peuvent être attribués à la toxicité du phénol sur les souches bactériennes, il est reconnu comme un substrat inhibiteur à des concentrations relativement faibles (100mg.l<sup>-1</sup>) (Pradeep *et al.*, 2015). Cela peut aussi s'expliquer par le fait qu'à des concentrations élevées de phénol, les enzymes cataboliques appropriées peuvent être réprimées. En effet, les phénols en forte concentrations inhibent souvent la croissance cellulaire, en agissant directement sur les oxygénases des bactéries qui peuvent avoir besoin d'une longue période d'adaptation pour induire la voie de dégradation nécessaire (Hinteregger *et al.*, 1992 ; Acuña-Argüelles *et al.*, 2003). Un résultat similaire a été trouvé par Li et Humphrey (1989) où une inhibition de la croissance microbienne a été notée, à des concentrations relativement faibles ( $\geq$  200mg.l<sup>-1</sup>). Le phénol peut inhiber la croissance des microorganismes à des concentrations élevées, même pour les espèces qui peuvent l'utiliser comme substrat (Al-Khalid et El-Naas, 2012). Ceci explique l'absence de croissance des souches bactériennes dans ces milieux.

Afin de caractériser au mieux les capacités de dégradation des bactéries identifiées vis-à-vis des phénols sélectionnés, la quantité des phénols résiduelle a été mesurée par HPLC.

La figure 22 montre qu'une concentration de 100mg.l<sup>-1</sup> en phénol est complètement consommée dans un intervalle de temps allant de 24 à 48h pour les dix cultures bactériennes sélectionnées, alors que dans le témoin abiotique, la concentration du phénol est restée constante. La dégradation commence plus au moins après 6h de latence, et ceux pour l'ensemble des souches. Les vitesses de biodégradation varient d'un isolat à un autre. Les souches Z<sub>11</sub> et Z<sub>22</sub> se sont révélées les plus efficaces avec une vitesse de dégradation de 4,12mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> et 4,10mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivement. L'isolat S<sub>2</sub> est le moins performant avec une vitesse de dégradation de 2,24mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Cette dégradation est corrélée avec l'augmentation de la biomasse (Fig. 21).

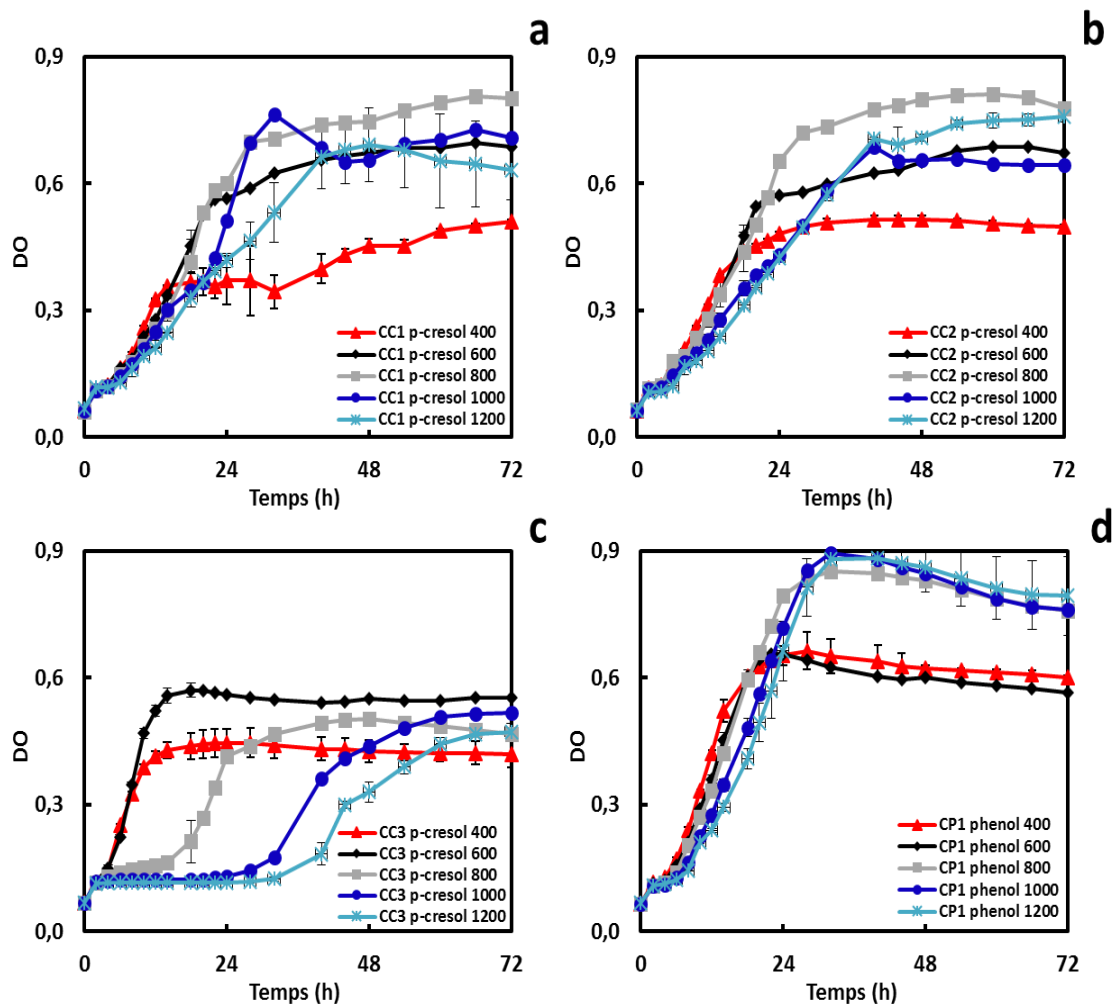


**Figure 22 :** Cinétiques de dégradation de phénol ( $100\text{mg.l}^{-1}$ ) par les souches bactériennes sélectionnées.

Agarry et Solomon (2008) ont étudié le potentiel de biodégradation de *Pseudomonas fluorescence* en culture discontinue et en utilisant le phénol avec un intervalle de concentration variant de  $100\text{mg.l}^{-1}$  à  $500\text{mg.l}^{-1}$ . L'effet de la concentration initiale en phénol sur le processus de dégradation a été étudié. Le phénol a été complètement dégradé à différentes périodes de culture pour les différentes concentrations initiales de phénol. L'augmentation de la concentration initiale en phénol de  $100\text{mg.l}^{-1}$  à  $500\text{mg.l}^{-1}$  a augmenté la phase de latence de 0 à 66h et prolongé de façon correspondante le processus de dégradation de 84h à 354h. Il y avait aussi une diminution du taux de biodégradation lorsque la concentration initiale en phénol augmentait. Une autre étude a montré que deux souches bactériennes *Citrobacter freundii* et *Proteus mirabilis* isolées à partir d'un sol contaminé par les phénols ont pu dégrader environ 90% de  $100\text{mg.l}^{-1}$  de phénol en l'espace de 80h en tant que seule source de carbone et d'énergie. Cependant, l'augmentation de la concentration en phénol a augmenté la durée de la phase de latence (Mohite *et al.*, 2011).

### 7.2. Croissance des bactéries tolérant des concentrations de phénol >800mg/l

Les isolats bactériens résistant aux concentrations élevées de phénols ont été cultivés dans des microplaques à 96 puits contenant du MSM additionné de phénol (pour CP1) ou de *p*-crésol (pour CC1, CC2 et CC3) (variant de 400 à 1200mg.l<sup>-1</sup>, avec un incrément de 200mg.l<sup>-1</sup>). La croissance bactérienne (DO<sub>600</sub>) a été suivie sur une période de 72h dans un incubateur adapté (TECAN, Infinite® 200 PRO) (cf. § 2.8. dans Matériels et Méthodes). Les cinétiques de croissance à différentes concentrations initiales de phénol (CP1) ou de *p*-crésol (CC1, CC2 et CC3) sont représentées sur la figure 23.



**Figure 23** : Effet de différentes concentrations de phénol ou de *p*-crésol sur la croissance des isolats (a) - CC1 – b) - CC2 – c) - CC3 – d) - CP1).



## **Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de souches bactériennes.**

Pour les quatre isolats bactériens, une augmentation de la croissance bactérienne a été observée et ce pour toutes les concentrations de phénols étudiées. La croissance des souches CC1 et CC2 a augmenté de manière significative et atteint un maximum à une concentration de  $800\text{mg.l}^{-1}$  de *p*-crésol dans le milieu. L'isolat CC3 est l'isolat le moins performant. Non seulement, il présente des taux de croissance faible par comparaison aux trois autres isolats mais aussi une phase de latence à partir d'une concentration de  $800\text{mg.l}^{-1}$  de *p*-crésol dans le milieu. Sa durée est variable en fonction de la concentration ; plus la concentration initiale du substrat phénolique est élevée, plus sa durée est prolongée et plus le temps nécessaire à la dégradation complète est important. La souche CP1 s'est révélée la plus efficace. Elle utilise le phénol à des concentrations relativement élevées. Le maximum de croissance a été noté à une concentration de phénol de  $1200\text{mg.l}^{-1}$  dans le milieu.

Les quatre isolats poussent également sur d'autres substrats phénoliques (autre que le substrat d'isolement, phénol, *o*- et *m*-crésol pour CC1 et CC2 et les trois isomères de crésol pour CP1) à une concentration initiale de  $400\text{mg.l}^{-1}$ . Ils présentent une croissance convenable à l'exception de CC3, qui présente des taux de croissance relativement faibles, en particulier en présence de phénol et *m*-crésol dans le milieu (Fig. 24).

Les phénols résiduels ont été mesurés par HPLC à la fin de la période d'incubation, et ce pour les quatre isolats bactériens. C'est l'analyse fine du chromatogramme qui nous permet de quantifier ces phénols résiduels. Les résultats (%) de phénol et de crésols résiduels dans les milieux de cultures sont présentés dans les figures 25 et 26. Ils ont montré d'une part, une biodégradation complète des composés phénoliques testés pour CP1, et d'autre part, la persistance des substrats phénoliques dans le milieu à partir de la concentration  $1000\text{mg.l}^{-1}$  pour CC1 et CC2 et de la concentration  $800\text{mg.l}^{-1}$  pour CC3. En ce qui concerne CC3, le phénol et les deux isomères de crésol (l'*o*-crésol et le *m*-crésol) persistent aussi dans le milieu ce qui indique que dans cette souche ces isomères du crésol sont mal dégradés par la voie métabolique des phénols. Le reliquat de ces composés phénoliques reste appréciable à la fin de la période d'incubation. Il est de 42%, 28% et 87% pour le phénol, l'*o*-crésol et le *m*-crésol, respectivement (Fig. 26).

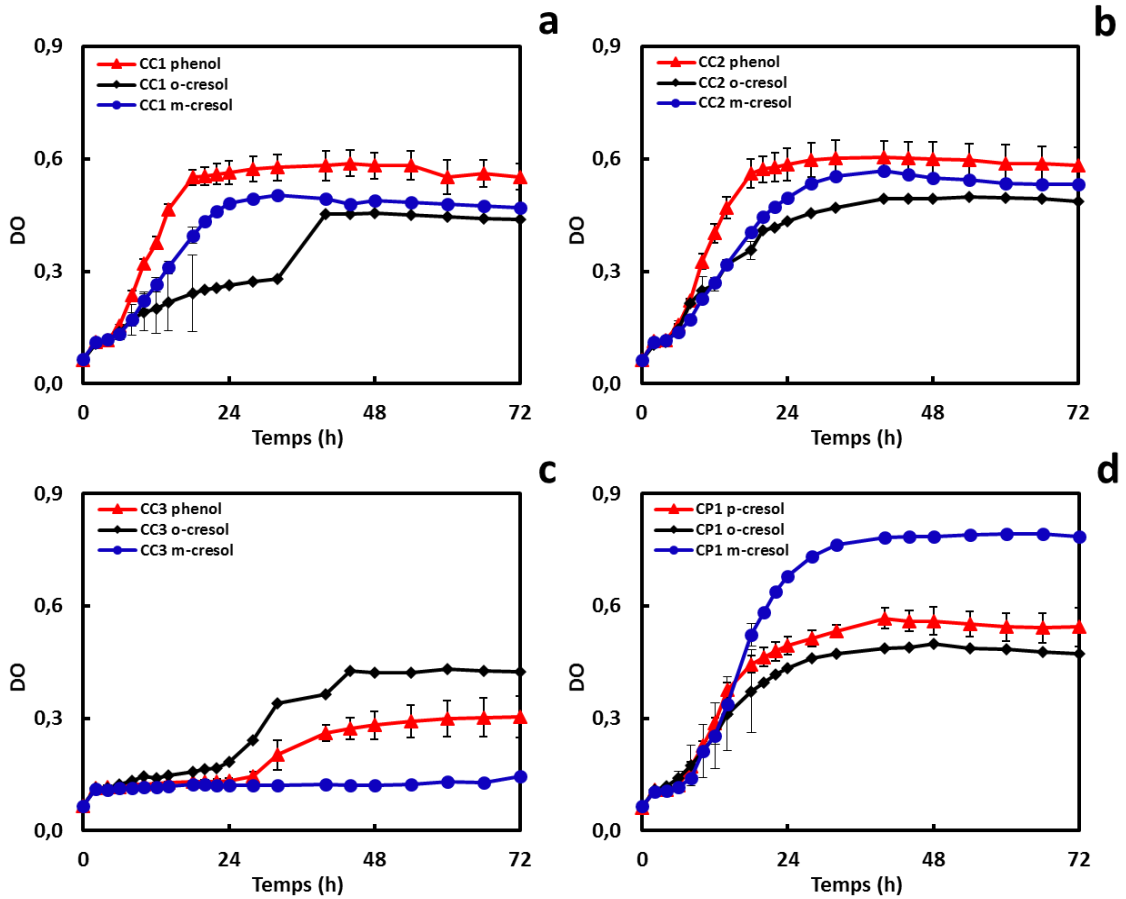


Figure 24 : Croissance des isolats sur phénol ou crésols ((a) - CC1 – b) - CC2 – c) - CC3 – d) - CP1).

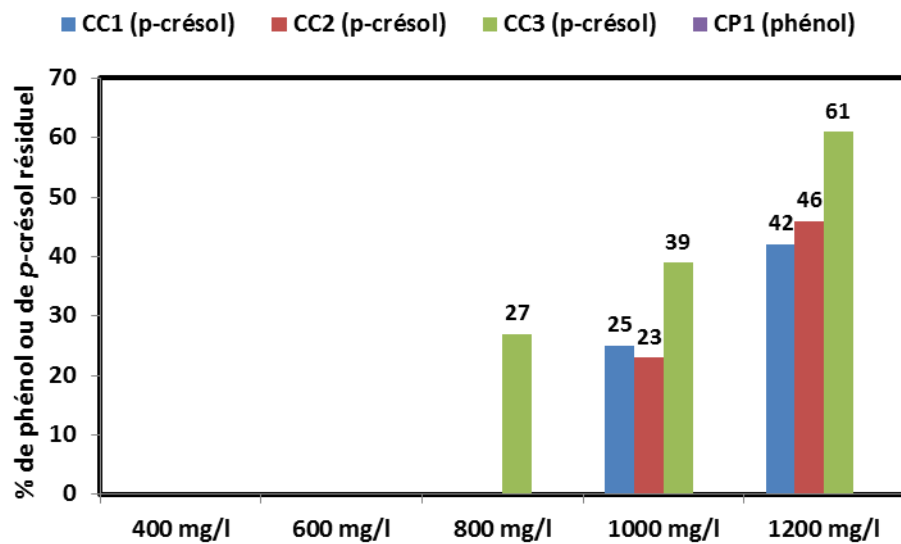
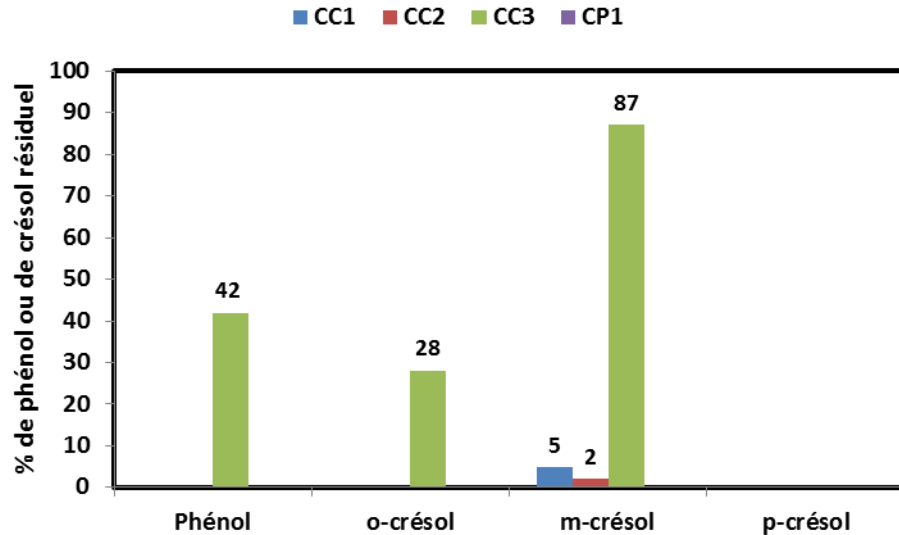


Figure 25 : Histogramme du % de phénol ou de *p*-crésol résiduel dans les cultures des quatre isolats (CC1 – CC2 – CC3 – CP1).



**Figure 26 :** Histogramme du % de phénol ou de crésol résiduel dans les cultures des quatre isolats (CC1 – CC2 – CC3 – CP1).

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs. Acuña-Argüelles *et al.* (2003) ont constaté que l'augmentation des concentrations des alkylphénols dans le milieu prolongeait la phase de latence, pour une culture bactérienne mixte adaptée sur un mélange de composés phénoliques. Kumar *et al.* (2005) ont suivi la cinétique de dégradation de phénol par *P. putida* MTCC 1194 à une concentration initiale de  $1000\text{mg.l}^{-1}$  et ils ont noté que même les cultures bien acclimatées ont montré une phase de latence due à la forte concentration de phénol. Plus la concentration initiale est élevée, plus la phase de latence est longue (effet inhibiteur). Aucune croissance bactérienne n'a pu être détectée à une concentration de phénol de  $1200\text{mg.l}^{-1}$ , même après 20 jours. Ceci est probablement dû à l'inhibition de la croissance bactérienne par les phénols. Ces composés peuvent agir comme substrats inhibiteurs et plus leur concentration dans le milieu est élevée plus l'effet est négatif sur la croissance des bactéries et leur biodégradation (Pradhan et Ingle, 2007).

Günther *et al.* (1995) ont isolé sept souches bactériennes capables de se développer sur du phénol et plusieurs alkylphénols mono- et di-substitués comme seule source de carbone et d'énergie, à partir d'un aquifère contaminé par des composés phénoliques. Cinq isolats appartiennent au genre *Pseudomonas*, deux au genre *Bacillus*. L'isolat le plus actif dans l'utilisation des xénobiotiques a été identifié comme *Bacillus pumilus*. Ali *et al.* (1998) ont isolé une bactérie thermophile appartenant au genre *Bacillus* à partir des effluents d'eaux usées. Cette bactérie était capable de dégrader le phénol en tant que seule source de carbone et

## Chapitre 2 : Isolement et caractérisation de souches bactériennes.

d'énergie. Ils ont découvert que la souche *Bacillus* Cro3.2 était aussi capable de dégrader l'*o*-, *m*- et *p*-crésol et de tolérer le phénol à des concentrations allant jusqu'à 0,1% (w/v) sans inhibition de la croissance. Banerjee et Ghoshal (2010) ont isolé deux souches : *Bacillus cereus* MTCC9817-AKG1 et *B. cereus* MTCC9818-AKG2 d'une raffinerie de pétrole et d'un site d'exploration pétrolière. Ils ont constaté que les bactéries sont capables de dégrader le phénol à des concentrations jusqu'à 2000mg.l<sup>-1</sup>. Ils ont observé que la vitesse de dégradation maximale a été obtenue à une concentration initiale en phénol de 800mg.l<sup>-1</sup> pour la souche AKG1 et de 200mg.l<sup>-1</sup> pour la souche AKG2. Quatre nouvelles souches Gram-positif (*Bacillus* sp. PS1, *Bacillus* sp. PS11, *Streptomyces* sp. PS12 et *Streptomyces* sp. PN1) dégradant le phénol ont été isolées par Djokic *et al.* (2011b) à partir des rhizosphères des plantes endémiques *Ramonda serbica* et *Ramonda nathaliae*. En plus de leur capacité à tolérer et à utiliser de grandes quantités de phénol jusqu'à 800 ou jusqu'à 1400mg.l<sup>-1</sup> sans inhibition apparente de la croissance, les quatre souches ont également pu dégrader une large gamme de substrats aromatiques incluant le benzène, le toluène, l'éthylbenzène, les xylènes, le styrène, les benzènes halogénés et le naphtalène. Une communauté bactérienne composée principalement des genres *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium* et *Nocardioides* pouvait supporter des concentrations élevées en crésols (jusqu'à 1500mg.l<sup>-1</sup>). Cette stabilité peut être attribuée au potentiel de dégradation des crésols par les *Bacillus*, ce qui donne un taux de dégradation élevé (Lee *et al.*, 2011). *Lysinibacillus* sp. SC03, une bactérie capable d'utiliser le *m*-crésol comme seule source de carbone et d'énergie, a été isolée à partir des boues activées dans une usine de traitement des eaux usées de cokéfaction. Elle a été identifiée par analyses morphologiques, biochimiques et moléculaires comme étant *Lysinibacillus cresolivorans*. La croissance cellulaire et la cinétique de biodégradation du substrat ont également été étudiées avec des concentrations initiales de *m*-crésol variant de 0 à 1200mg.l<sup>-1</sup>. Cette bactérie était capable de dégrader le *m*-crésol jusqu'à une concentration maximale de 1000mg.l<sup>-1</sup> (Yao *et al.*, 2011a ; Yao *et al.*, 2011b ; Zhao *et al.*, 2014). Ahmad *et al.* (2015) ont isolés huit souches bactériennes appartenant aux genres : *Comamonas*, *Halomonas*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Stenotrophomonas*. Les résultats des expériences de biodégradation du phénol ont montré que les souches pouvaient dégrader 750 mg.l<sup>-1</sup> de phénol en 40 à 96 heures.

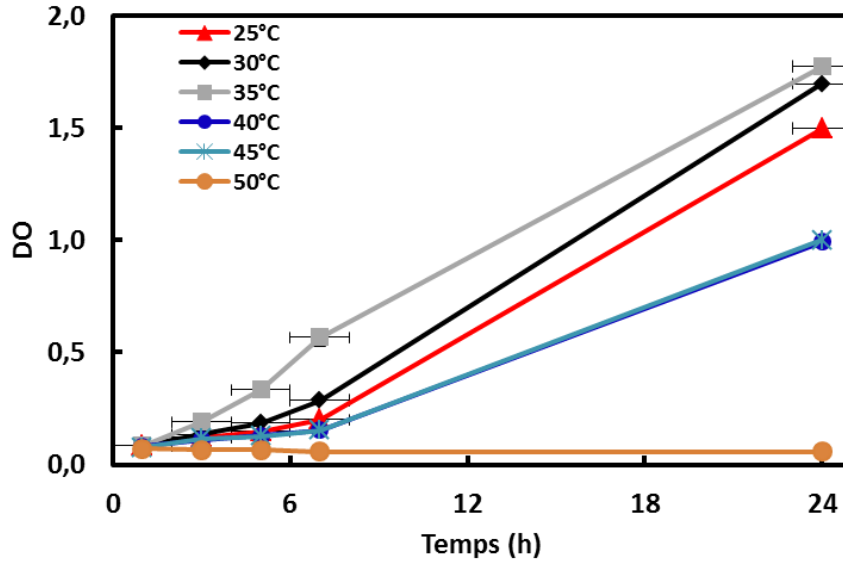
La constitution d'un consortium bactérien peut être nécessaire pour la minéralisation complète des phénols. Il est important de noter que la capacité de dégradation d'une culture microbienne mixte n'est pas nécessairement le résultat d'une simple addition des capacités

des souches individuelles. Les avantages des cultures mixtes dans la bioremédiation des phénols ont été largement démontrés (Acuña-Argüelles *et al.*, 2003 ; DeRito *et al.*, 2005 ; Djokic *et al.*, 2011b ; Pathak *et al.*, 2011 ; García-Peña *et al.*, 2012 ; Senthivelan *et al.*, 2014 ; Pradeep *et al.*, 2015). Ces avantages peuvent être attribués aux effets des interactions synergiques des différents microorganismes. Certaines espèces sont capables d'éliminer les métabolites toxiques, qui entravent les activités des autres espèces. Ensuite, il est possible que les autres espèces dégradent totalement les composés complexes.

### **7.3. Effet de la température sur la croissance de la souche CP1 sur phénol**

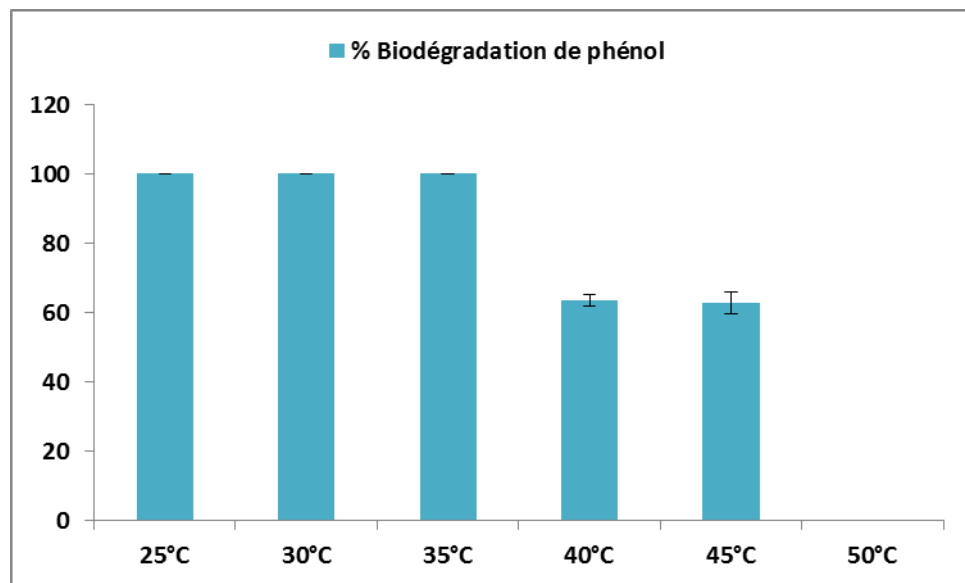
La croissance de l'isolat CP1 en présence de phénol (1g.l<sup>-1</sup>) et à différentes températures d'incubation (de 25°C à 50°C) a été étudiée (cf. § 2.8. dans Matériels et Méthodes). La figure 27 montre l'évolution de la croissance bactérienne à ces différentes températures. Une augmentation significative de la croissance de la souche CP1 a été observée à 25°C, 30°C et 35°C, où les taux de croissance ont atteint presque le même niveau ( $\mu = 0,071h^{-1}$ ,  $0,078h^{-1}$  et  $0,072h^{-1}$ , respectivement). Cependant, la croissance de la souche a été ralentie à 40°C et à 45°C et atteint un taux de croissance de  $0,044h^{-1}$  et  $0,045h^{-1}$ , respectivement. La croissance de la souche CP1 n'a pas été beaucoup affectée par le changement de la température entre 25 et 45°C. L'isolat CP1 a montré une croissance entre 25 et 45°C, avec une croissance optimale à une température comprise entre 25 et 35°C. Au-delà de 45°C, aucune croissance n'a été observée.

Ce résultat est similaire à celui de Yao *et al.* (2011a,b) et Sarwade et Gawai (2014), qui ont trouvé une température optimale comprise entre 30 et 35°C pour la croissance de *Lysinibacillus cresolivorans* et *Bacillusadius* D1 sur phénol. La souche *Bacillus* Cro3.2 isolée par Ali *et al.* (1998) était capable de dégrader le phénol à une température optimale de 50 à 60°C. Annachhatre et Gheewala (1996) considèrent que la température est l'un des facteurs qui influe sur la vitesse de dégradation des phénols dans l'environnement. Ils ont rapporté que la température n'affecte pas seulement la vitesse de dégradation des phénols mais également la croissance des souches bactériennes.



**Figure 27** : Cinétique de croissance de l'isolat CP1 sur phénol ( $1\text{g.l}^{-1}$ ) à des températures différentes.

L'effet de la température sur le taux de dégradation de phénol ( $1\text{g.l}^{-1}$ ) par CP1 est représenté sur la figure 28. D'après la figure, il est clair que la température optimale pour la dégradation se situe entre  $25^{\circ}\text{C}$  et  $35^{\circ}\text{C}$  où la totalité du substrat a été épuisée. À  $40^{\circ}\text{C}$  et  $45^{\circ}\text{C}$ , le taux de dégradation était de  $63,59\%$  et  $62,73\%$ , respectivement. Ces taux étaient encore satisfaisants, mais ils ralentissaient considérablement. La dégradation n'a pas été observée à  $50^{\circ}\text{C}$ . Ces résultats concordent avec ceux de sa croissance (Fig. 27).



**Figure 28** : Histogramme montrant la biodégradation (%) de phénol utilisé par l'isolat CP1 à différentes températures.

## *Conclusion et perspectives*

Le principal objectif de ce travail était d'explorer la diversité des bactéries capables de dégrader les phénols dans une eau polluée de manière chronique par des hydrocarbures d'une raffinerie de pétrole. Notre étude s'est basée sur deux approches :

-une méthode classique qui consiste en l'isolement de souches pures sur milieux sélectifs dont on connaît les limites puisque moins de 5% des espèces bactériennes sont cultivables.

-une stratégie indépendante de la culture qui s'appuie sur le criblage des gènes cataboliques par l'emploi d'outils moléculaires.

Le premier volet de ce projet consistait à isoler de nouvelles souches avec une grande capacité de dégradation et une tolérance aux (alkyl)phénols. Cette méthode classique d'enrichissement/sélection sur phénol ou *p*-crésol a donné une collection de 38 nouveaux isolats. Sur la base des séquences de gènes d'ARNr 16S, les isolats étaient principalement affiliés aux genres suivants : *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Kocuria*, *Escherichia*, *Macrocooccus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Serratia*. Les deux souches appartenant aux genres *Macrocooccus* et *Kocuria* ont rarement été associées à la dégradation des phénols. Les expériences cinétiques ont montré que ces deux isolats avaient la meilleure capacité de dégradation de phénol. Cependant, pour la plupart des souches, la croissance et la biodégradation ont été inhibées à des concentrations de phénol supérieures à 0,2g.l<sup>-1</sup>. En employant une méthode d'enrichissement sur milieu à forte teneur en phénol ou *p*-crésol, nous avons toutefois réussi à isoler quatre souches capables de supporter des concentrations jusqu'à 1g.l<sup>-1</sup>. Ces isolats ont la faculté remarquable d'éliminer totalement ces phénols dans un délai court (24 à 48h). Ils ont en outre le pouvoir de dégrader d'autres composés aromatiques (BTEX, HAP et autres phénols substitués). Sur la base des séquences de gènes de l'ARNr 16S, deux isolats sur quatre étaient affiliés au genre *Bacillus*, le troisième au genre *Comamonas* et le quatrième au genre *Lysinibacillus*.

Cette dernière souche s'est révélée la plus performante. Elle a montré des taux élevés de dégradation de phénol et des trois isomères de crésol. Cet isolat pouvait croître jusqu'à une température de 45°C et dégradait d'autres composés aromatiques (BTEX, Biphényle, Carbazole, Naphtalène, Phénanthrène et 3,4-DMP). Les gènes codant pour la phénol hydroxylase (PH) et la catéchol-2,3-dioxygénase (C23O) ont été détectés dans cette bactérie, suggérant ainsi que la dégradation du phénol se produit via la voie *meta*. Le taux de GC du



gène codant la PH (*pheA1*) était de 61,9%, ce qui est assez proche des PHs des *Rhodococcus* (Actinobacteria). La régulation de ces gènes (*pheA1* et C23O) par RT-PCR nous a permis de confirmer l'induction de ces enzymes lors de la dégradation du phénol par cet isolat. Cette bactérie présente des capacités prometteuses pour les applications biotechnologiques liées à l'élimination du phénol et des crésols des sites pollués, en raison de sa grande tolérance et de sa dégradation rapide des (alkyl)phénols.

Le deuxième volet de ce travail visait, par une approche moléculaire, à sonder la diversité des PHs, enzymes responsables de l'attaque initiale des phénols. Grâce à plusieurs jeux d'amorces dont ceux que nous avons conçus, environ 400 gènes de PHs (LmPH et *pheA1*) ont été amplifiés à partir de l'ADN métagénomique extrait des échantillons d'eaux usées traitées ou non aux (alkyl)phénols. L'analyse des séquences clonées a montré qu'elles correspondaient bien à des hydroxylases, mais la plupart d'entre elles étaient relativement distantes de celles connues jusqu'à présent. Nous avons trouvé que la distribution de ces séquences LmPH variait en fonction de l'exposition de la communauté bactérienne des eaux usées aux (méthyl)phénols. En effet, les boues activées non traitées ou exposées au phénol présentaient une teneur relativement élevée en séquences inconnues dans les bases de données. En revanche, celles exposées au *p*-crésol et au 3,4-DMP ont montré une plus grande richesse en séquences apparentées aux Pseudomonades. L'analyse phylogénétique a confirmé ce changement de diversité des séquences LmPH qui se produit suite à l'addition des méthylphénols. La technique de RT-PCR a permis une identification réussie des transcrits de gènes de type LmPH dans le microbiote complexe des boues activées. Le séquençage d'un échantillon représentatif de ces gènes a montré qu'ils étaient étroitement apparentés aux gènes de LmPH et leur nombre s'est accru lors de l'ajout du *p*-crésol ou du 3,4-DMP. Nous avons aussi développé une méthode de PCR visant à explorer la diversité des sPH. Cette méthode s'est révélée d'une spécificité élevée puisque les amplicons non apparentés aux gènes de PH sont apparus à un très faible taux (11%). La plupart des gènes *pheA1* obtenus avaient des similitudes limitées avec des gènes homologues de bactéries cultivées, ce qui suggère que les hôtes bactériennes sont principalement non-cultivables. Le reste des séquences correspondait aux gènes *pheA1* de *Rhodococcus* sp. Contrairement à ce qui a été observé pour les LmPHs, l'addition des méthylphénols ne provoque pas de changement significatif dans la diversité des séquences *pheA1*. Nos résultats soulignent la contribution majeure des Actinobactéries, Betaprotéobactéries et Gammaprotéobactéries dans la biodégradation des (alkyl)phénols *in situ*. Quant aux Alphaprotéobactéries, ils apparaissent comme des acteurs secondaires

nettement moins abondants, sur la base du pourcentage des séquences de PHs. Nous avons aussi mis en évidence le rôle essentiel que jouent les bactéries non-cultivables dans la biodégradation des (alkyl)phénols. La recherche des gènes cibles fournit des informations précieuses sur le potentiel catabolique des bactéries, y compris des espèces non-cultivables, qui doivent être considérées et surveillées dans les processus de bioremédiation des sites pollués.

Ainsi, chaque approche apporte son lot d'informations différentes et complémentaires, ce qui permet d'avoir une meilleure connaissance des microbiotes impliqués dans la biodégradation des (alkyl)phénols. Même si les points évoqués précédemment ont permis d'apporter de nombreux éléments de réponse quant à la problématique initiale de cette thèse, le sujet n'est pas épuisé et de nouvelles recherches apporteraient d'autres informations. Le travail à réaliser reste vaste et la réponse à plusieurs questions posées devant ce type de pollution est encore à trouver.

Une des perspectives de ce travail serait de caractériser de manière approfondie les bactéries les plus prometteuses dans la dégradation des alkylphénols, avec une identification des enzymes impliquées dans le processus et une étude de leurs activités spécifiques.

Sur la base des séquences de gènes de PHs étudiées, la diversité observée est dépendante de la spécificité des amorces et ne reflète que partiellement la richesse des boues. Il serait nécessaire de concevoir plusieurs autres jeux d'amorces pour sonder cette diversité de façon plus exhaustive. Il serait également intéressant de développer une méthode pour étudier les gènes de type *pheA1 in situ*. L'un des développements possibles de nos travaux serait de concevoir une méthode d'analyse quantitative (qPCR) ciblant certains gènes ou familles de gènes cataboliques ou leurs ARN messagers afin de connaître l'expression du potentiel catalytique des bactéries dégradant les phénols aux cours du temps, et en fonction de différents facteurs environnementaux (concentrations en substrat phénolique, disponibilité en nutriments, température, salinité du milieu, etc.).

D'un point de vue plus appliqué, les résultats que nous avons obtenus pourraient permettre de développer des outils de diagnostic et de suivi des eaux contaminées par les phénols. Connaissant les séquences de PHs, on peut envisager de les détecter *in situ* par une approche FISH (hybridation *in situ* par une sonde fluorescente) ou par qPCR en fonction des conditions environnementales. Appliqué à la gestion des eaux usées contenant des composés

phénoliques, un tel suivi permettrait de mieux comprendre le système de traitement des eaux contaminées et d'améliorer l'efficacité du traitement par bioremédiation.

## *Références bibliographiques*

### *Références bibliographiques*

- Acuña-Argüelles, M.E., Olguin-Lora, P., Razo-Flores, E., 2003. Toxicity and kinetic parameters of the aerobic biodegradation of the phenol and alkylphenols by a mixed culture. *Biotechnol. Lett.* 25, 559–564. <https://doi.org/10.1023/A:1022898321664>.
- Agarry, S.E., Solomon, B.O., 2008. Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas fluorescens*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 5, 223–232.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2008. Toxicological Profile for Phenol. US department of Health and Human services, ATSDR, US.
- Ahmad, N., Ahmed, I., Iqbal, M., Khalid, N., Mehboob, F., Ahad, K., Ali, G.M., 2015. Characterization and identification of phenol degrading bacteria isolated from industrial waste. *Pak. J. Agric. Sci.* 52.
- Alexander, M., 1965. Biodegradation: Problems of molecular recalcitrance and microbial infallibility. *Adv. Appl. Microbiol.* 7, 35–80.
- Ali, S., Fernandez-Lafuente, R., Cowan, D.A., 1998. Meta-pathway degradation of phenolics by thermophilic *Bacilli*. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 462–468. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00072-6).
- Al-Khalid, T., El-Naas, M.H., 2012. Aerobic biodegradation of phenols: a comprehensive review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42, 1631–1690. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.569872>.
- Amoore, J.E., Hautala, E., 1983. Odor as an aid to chemical safety: Odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. *J. Appl. Toxicol.* 3, 272–290. doi:10.1002/jat.2550030603.
- Amrouche, F., Namane, A., Hellal, A., 2011. Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries autochtones librement suspendus dans un réacteur batch. *Rev. Energ. Renouvelables* 14, 533–541.
- An, H., Park, H., Kim, E., 2001. Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2 dioxygenase gene (cat A) from *Streptomyces setonii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 17-22.

Annachhatre, A.P., Gheewala, S.H., 1996. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol. Adv.* 14, 35–56. doi:10.1016/0734-9750(96)00002-X.

Annadurai, G., Balan, M.S., Murugesan, T., 2000. Design of experiments in the biodegradation of phenol using immobilized *Pseudomonas pictorium* (NICM – 2077) on activated carbon. *Bioprocess Eng.* 22, 101–107.

Annadurai, G., Juang, R.S., Lee, D.J., 2002. Factor optimization for phenol removal using activated carbon immobilized with *Pseudomonas putida*. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 37, 149–161.

Anonyme, 2006. Memotec n° 19 : La biodégradabilité des effluents urbains.

Bajaj, M., Gallert, C., Winter, J., 2009. Treatment of phenolic wastewater in an anaerobic fixed bed reactor (AFBR)—Recovery after shock loading. *J. Hazard. Mater.* 162, 1330–1339. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.06.027.

Bajaj, M., Gallert, C., Winter, J., 2008. Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. *Bioresour. Technol.* 99, 8376–8381. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.057.

Bakas, I., Elatmani, K., Qourzal, S., Barka, N., Assabbane, A., Aît-Ichou, I., 2014. A comparative adsorption for the removal of p-cresol from aqueous solution onto granular activated charcoal and granular activated alumina. *J. Mater. Env. Sci.* 5, 675–682.

Banerjee, A., Ghoshal, A.K., 2010. Phenol degradation by *Bacillus cereus*: Pathway and kinetic modeling. *Bioresour. Technol.* 101, 5501–5507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.018>.

Barrios-Martinez, A., Barbot, E., Marrot, B., Moulin, P., Roche, N., 2006. Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. *J. Membr. Sci.* 281, 288–296. doi:10.1016/j.memsci.2006.03.048.

Basha, K.M., Rajendran, A., Thangavelu, V., 2010. Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 1, 219–234.

- Basile, L.A., Erijman, L., 2008. Quantitative assessment of phenol hydroxylase diversity in bioreactors using a functional gene analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 863–872. doi:10.1007/s00253-008-1351-3.
- Beadle, C.A., Smith, A.R.W., 1982. The purification and properties of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a strain of *Acinetobacter* species. *Eur. J. Biochem.* 123, 323–332. doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb19771.x.
- Belaid, C., Kallel, M., Elleuch, B., 2002. Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive (margines). *Déchets-Rev. Francoph d'écologie Ind.* 27, 30–34.
- Bennie, D.T., 1999. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Water Qual. Res. J. Can.* 34, 79–122.
- Berthelot, M., Jungfleisch, E., 1898. *Traité élémentaire de chimie organique*. Paris : Dunod.
- Bliefert, C., Perraud, R., 2008. *Chimie de l'environnement : Air, eau, sols, déchets*, 2e édition. ed. De Boeck, Bruxelles.
- Breinig, S., Schiltz, E., Fuchs, G., 2000. Genes involved in anaerobic metabolism of phenol in the bacterium *Thauera aromatica*. *J. Bacteriol.* 182, 5849–5863.
- Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C., Arrighi, L., 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments. *J. Hazard. Mater.* 160, 265–288. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.03.045.
- Cafaro, V., Izzo, V., Scognamiglio, R., Notomista, E., Capasso, P., Casbarra, A., Pucci, P., Di Donato, A., 2004. Phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *pseudomonas stutzeri* ox1: interplay between two enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2211–2219. doi:10.1128/AEM.70.4.2211-2219.2004.
- Cai, W., Li, J., Zhang, Z., 2007. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. *J. Hazard. Mater.* 148, 38–42. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.02.002.
- Calabrese, E.J., Kenyon, E., 1991. *Air Toxics and Risk Assessment*. CRC Press.

Capasso, R., 1997. The chemistry, biotechnology, and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Curr. Top. Phytochem.* 1, 145–156.

Cejkova, A., Masak, J., Jirku, V., Fialova, A., Moenandar, D., 2002. The level of phenol hydroxylase in *Candida maltosa* – the key activity for efficient aromatic compounds biodegradation. *Proceeding Int. Conf. Waste Manag. Environ. Boston* 99–106.

Chakrabarty, A.M., 1976. Plasmids in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Genet.* 10, 7–30. doi:10.1146/annurev.ge.10.120176.000255.

Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Patel, T.N., Tiwari, K.K., 2010. Biodegradation of phenol by native microorganisms isolated from coke processing wastewater. *J. Environ. Biol.* 31, 293-296.

Chan, C.H., Lim, P.E., 2007. Evaluation of sequencing batch reactor performance with aerated and unaerated FILL periods in treating phenol-containing wastewater. *Bioresour. Technol.* 98, 1333–1338. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.033.

Chandana Lakshmi, M.V.V., Sridevi, V., 2009. A review on biodegradation of phenol from industrial effluents. *J. Ind. Pollut. Control* 25, 13–27.

Chen, Y.-M., Lin, T.-F., Huang, C., Lin, J.-C., Hsieh, F.-M., 2007. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *J. Hazard. Mater.* 148, 660–670. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.03.030.

Cooper, V.A., Nicell, J.A., 1996. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Res.* 30, 954–964. doi:10.1016/0043-1354(95)00237-5.

Dalal, S., Panigrahi, D.P., Randhawa, G.S., Dubey, R.C., 2012. Molecular characterisation of high-strength polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading and phenol-tolerant bacteria obtained from thermal power plant wastewater. *Chem. Ecol.* 28, 187–192. <https://doi.org/10.1080/02757540.2011.650166>.

Das, B., Mandal, T.K., Patra, S., 2016. Biodegradation of phenol by a novel diatom BD1IITG-kinetics and biochemical studies. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13, 529–542. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0857-3>.



Demanèche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J.C., Jouanneau, Y., 2004. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6714–6725. doi:10.1128/AEM.70.11.6714-6725.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469. doi:10.1093/nar/gkn180.

DeRito, C.M., Pumphrey, G.M., Madsen, E.L., 2005. Use of field-based stable isotope probing to identify adapted populations and track carbon flow through a phenol-degrading soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7858–7865. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7858-7865.2005>.

Divari, S., Valetti, F., Caposio, P., Pessione, E., Cavaletto, M., Griva, E., Gribaudo, G., Gilardi, G., Giunta, C., 2003. The oxygenase component of phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Eur. J. Biochem.* 270, 2244–2253. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03592.x.

Djokic, L., Narancic, T., Nikodinovic-Runic, J., Bajkic, S., Vasiljevic, B., 2011a. Four *Bacillus* sp. soil isolates capable of degrading phenol, toluene, biphenyl, naphthalene and other aromatic compounds exhibit different aromatic catabolic potentials. *Arch. Biol. Sci.* 63, 1057–1067. <https://doi.org/10.2298/ABS1104057D>.

Djokic, L., Narancic, T., Nikodinovic-Runic, J., Savic, M., Vasiljevic, B., 2011b. Isolation and characterization of four novel Gram-positive bacteria associated with the rhizosphere of two endemorelict plants capable of degrading a broad range of aromatic substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 1227–1238. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3426-9>.

Dong, F.-M., Wang, L.-L., Wang, C.-M., Cheng, J.-P., He, Z.-Q., Sheng, Z.-J., Shen, R.-Q., 1992. Molecular cloning and mapping of phenol degradation genes from *Bacillus stearothermophilus* FDTP-3 and their expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2531–2535.

Duffner, F.M., Kirchner, U., Bauer, M.P., Müller, R., 2000. Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene* 256, 215–221.

Eiroa, M., Vilar, A., Kennes, C., Veiga, M.C., 2008. Effect of phenol on the biological treatment of wastewaters from a resin producing industry. *Bioresour. Technol.* 99, 3507–3512. doi:10.1016/j.biortech.2007.07.045.

El Maroufy, M., 1992. Traitement des eaux usées dans les bassins de stabilisation d'Ouarzazate et leur réutilisation en agriculture : Aspect parasitologique. Thèse de doctorat. Université de Meknès (Maroc).

Enroth, C., Neujahr, H., Schneider, G., Lindqvist, Y., 1998. The crystal structure of phenol hydroxylase in complex with FAD and phenol provides evidence for a concerted conformational change in the enzyme and its cofactor during catalysis. *Structure* 6, 605–617. doi:10.1016/S0969-2126(98)00062-8.

Environmental Protection Agency (EPA), 1979. Phenol ambient water quality criteria. Office of the planning and standards, EPA, Washington, DC.

Environnement et changement climatique Canada, Santé Canada, 2016. Évaluation préalable, groupe de substances classifiées internationalement: substances de crésol (méthylphénol).

Eppink, M.H., Cammaart, E., van Wassenaar, D., Middelhoven, W.J., van Berkel, W.J., 2000. Purification and properties of hydroquinone hydroxylase, a FAD-dependent monooxygenase involved in the catabolism of 4-hydroxybenzoate in *Candida parapsilosis* CBS604. *FEBS J.* 267, 6832–6840.

Fang, H.H.P., Liang, D.W., Zhang, T., Liu, Y., 2006. Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition. *Water Res.* 40, 427–434. doi:10.1016/j.watres.2005.11.025.

Feist, C.F., Hegeman, G.D., 1969. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways. *J. Bacteriol.* 100, 869–877.

Feitkenhauer, H., Schnicke, S., Müller, R., Märkl, H., 2001. Determination of the kinetic parameters of the phenol-degrading thermophile *Bacillus thymoleovorans* sp. A2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 744–750. doi:10.1007/s002530100823.

Finar, I.L., 1961. *Organic Chemistry Vol.1 - The Fundamental Principles*. Longmans.

Fujii, T., Takeo, M., Maeda, Y., 1997. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA. *Microbiology* 143, 93–99.

Futamata, H., Harayama, S., Watanabe, K., 2001. Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4671–4677. doi:10.1128/AEM.67.10.4671-4677.2001.

Gallego, A., Fortunato, M.S., Foglia, J., Rossi, S., Gemini, V., Gomez, L., Gomez, C.E., Higa, L.E., Korol, S.E., 2003. Biodegradation and detoxification of phenolic compounds by pure and mixed indigenous cultures in aerobic reactors. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52, 261–267. doi:10.1016/j.ibiod.2003.07.001.

García-Peña, E.I., Zarate-Segura, P., Guerra-Blanco, P., Poznyak, T., Chairez, I., 2012. Enhanced phenol and chlorinated phenols removal by combining ozonation and biodegradation. *Water. Air. Soil Pollut.* 223, 4047–4064. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1172-y>.

Goudar, C.T., Ganji, S.H., Pujar, B.G., Strevett, K.A., 2000. Substrate inhibition kinetics of phenol biodegradation. *Water Environ. Res.* 72, 50–55.

Green, M.R., Sambrook, J., 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4th ed. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Grekova-Vasileva, M., Topalova, Y., 2009. Enzyme activities and shifts in microbial populations associated with activated sludge treatment of textile effluents. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 23, 1136–1142. doi:10.1080/13102818.2009.10817628.

Günther, K., Schlosser, D., Fritsche, W., 1995. Phenol and cresol metabolism in *Bacillus pumilus* isolated from contaminated groundwater. *J. Basic Microbiol.* 35, 83–92. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620350205>.

Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R.K., Mohapatra, H., 2000. Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Curr. Sci.* 78, 967–973.

Hanson, G., Berliner, L., 2009. *High Resolution EPR: Applications to Metalloenzymes and Metals in Medicine*. Springer Science & Business Media.

Harayama, S., Kok, M., Neidle, E.L., 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 565–601. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.003025>.

Hashibe, M., Straif, K., Tashkin, D.P., Morgenstern, H., Greenland, S., Zhang, Z.-F., 2005. Epidemiologic review of marijuana use and cancer risk. *Alcohol* 35, 265–275. doi:10.1016/j.alcohol.2005.04.008.

Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U., Heinaru, A., 2000. Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 195–205. doi:10.1016/S0168-6496(99)00095-1.

Hejri, S., Saboora, A., 2009. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewaters by enzymatic treatments. *J. Sci.* 35, 13–19.

Hinteregger, C., Leitner, R., Loidl, M., Ferschl, A., Streichsbier, F., 1992. Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 252–259. <https://doi.org/10.1007/BF00178180>.

Huang, J., Wang, X., Jin, Q., Liu, Y., Wang, Y., 2007. Removal of phenol from aqueous solution by adsorption onto OTMAC-modified attapulgite. *J. Environ. Manage.* 84, 229–236. doi:10.1016/j.jenvman.2006.05.007.

Huang, Y., Ma, X., Liang, G., Yan, H., 2008. Adsorption of phenol with modified rectorite from aqueous solution. *Chem. Eng. J.* 141, 1–8. doi:10.1016/j.cej.2007.10.009.

Institut National de l'Environnement Industriel et des risques (INERIS), 2005. Phénol: Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), 2004. Crésols: Fiche Toxicologique N° 97.

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), 2011. Phénol: Fiche Toxicologique N° 15.

Jones, P.F., Johnson, K.E., 1973. Estimation of phenols by the 4-aminoantipyrine method: identification of the colored reaction products by proton magnetic resonance spectroscopy. *Can. J. Chem.* 51, 2860–2868.

Jouanneau, Y., Meyer, C., Jakoncic, J., Stojanoff, V., Gaillard, J., 2006. Characterization of a naphthalene dioxygenase endowed with an exceptionally broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 12380–12391. doi:10.1021/bi0611311.

Jouanneau, Y., Micoud, J., Meyer, C., 2007. Purification and characterization of a three-component salicylate 1-hydroxylase from *Sphingomonas* sp. strain CHY-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7515–7521. doi:10.1128/AEM.01519-07.

Journal Officiel de la République Algérienne N° 36 (J.O.R.A.), 2009. Décret exécutif n° 09-209 fixant les modalités d'octroi de l'autorisation de déversement des eaux usées autres que domestiques dans un réseau public d'assainissement ou dans une station d'épuration.

Kälin, M., Neujahr, H.Y., Weissmahr, R.N., Sejlitz, T., Jöhl, R., Fiechter, A., Reiser, J., 1992. Phenol hydroxylase from *Trichosporon cutaneum*: gene cloning, sequence analysis, and functional expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 7112–7120.

Kim, I.C., Oriel, P.J., 1995. Characterization of the *Bacillus stearothermophilus* BR219 phenol hydroxylase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1252–1256.

Kirchner, U., Muller, R., Westphal, A.H., Berkel, W.J.H. van, 2003. Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7: a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD. *J. Biol. Chem.* 278, 47545–47553.

Kita, A., Kita, S., Fujisawa, I., Inaka, K., Ishida, T., Horiike, K., Nozaki, M., Miki, K., 1999. An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure* 7, 25–34. doi:10.1016/S0969-2126(99)80006-9.

- Kivistik, P.A., Putrins, M., Puvi, K., Ilves, H., Kivisaar, M., Horak, R., 2006. The ColRS two-component system regulates membrane functions and protects *Pseudomonas putida* against phenol. *J. Bacteriol.* 188, 8109–8117. <https://doi.org/10.1128/JB.01262-06>.
- Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J.C., Jouanneau, Y., 2003. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J. Bacteriol.* 185, 3828–3841. doi:10.1128/JB.185.13.3828-3841.
- Kumar, A., Kumar, S., Kumar, S., 2005. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem. Eng. J.* 22, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.006>.
- Kumaran, P., Paruchuri, Y.L., 1997. Kinetics of phenol biotransformation. *Water Res.* 31, 11–22.
- Lack, A., Fuchs, G., 1994. Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Arch. Microbiol.* 161, 132–139. doi:10.1007/BF00276473.
- Lack, A., Fuchs, G., 1992. Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism. *J. Bacteriol.* 174, 3629–3636.
- Leclère, J., Orgiazzi, J., Rousset, B., Schlienger, J. L., Wémeau, J. L., 2001. *La Thyroïde*. Seconde Edition. Scientifique et médicale Elsevier SAS.
- Lee, D.-J., Ho, K.-L., Chen, Y.-Y., 2011. Degradation of cresols by phenol-acclimated aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 209–215. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2878-7>.
- Li, J., Humphrey, A.E., 1989. Kinetic and fluorometric behavior of a phenol fermentation. *Biotechnol. Lett.* 11, 177–182.
- Lika, K., Papadakis, I.A., 2009. Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. *J. Sea Res.* 62, 135–146. doi:10.1016/j.seares.2009.02.005.
- Lillis, L., Clipson, N., Doyle, E., 2010. Quantification of catechol dioxygenase gene expression in soil during degradation of 2,4-dichlorophenol: Gene expression during

biodegradation of 2,4-dichlorophenol. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 363–369. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00906.x.

Loh, K.-C., Cao, B., 2008. Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*—A review of proteomics studies. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.03.004>.

Loh, K.C., Wang, S.J., 1997. Enhancement of biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources. *Biodegradation* 8, 329–338. doi:10.1023/A:1008267607634.

Luo, H., Liu, G., Zhang, R., Jin, S., 2009. Phenol degradation in microbial fuel cells. *Chem. Eng. J.* 147, 259–264. doi:10.1016/j.cej.2008.07.011.

Martin, F., Malagnoux, L., Violet, F., Jakoncic, J., Jouanneau, Y., 2013. Diversity and catalytic potential of PAH-specific ring-hydroxylating dioxygenases from a hydrocarbon-contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5125–5135. doi:10.1007/s00253-012-4335-2.

Matsumura, E., Ooi, S., Murakami, S., Takenaka, S., Aoki, K., 2004. Constitutive synthesis, purification, and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Rhodococcus* sp. AN-22. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 71–76. doi:10.1016/S1389-1723(04)70245-5.

Mekaikia-Mokhtaria, M., Belabbed, B.E., Djabri, L., Hani, A., Laour, R., 2007. Caractéristiques de la décharge publique de la ville de Tiaret et son impact sur la qualité des eaux souterraines. *Courr. Savoir* N°08, 93–99.

Melo, J.S., Kholi, S., Patwardhan, A.W., D'Souza, S.F., 2005. Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. *Process. Biochem.* 40, 625–628. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.049.

Michalowicz, J., Duda, W., 2007. Phenols—sources and toxicity. *Pol. J. Environ. Stud.* 16, 347-362.

Mishra, V.K., Kumar, N., 2017. Microbial degradation of phenol: a review. *Journal of Water Pollution & Purification Research* 4, 17–22.

- Mohanty, K., Das, D., Biswas, M.N., 2005. Adsorption of phenol from aqueous solutions using activated carbons prepared from *Tectona grandis* sawdust by  $ZnCl_2$  activation. *Chem. Eng. J.* 115, 121–131. doi:10.1016/j.cej.2005.09.016.
- Mohite, B.V., Pawar, S.P., Morankar, A., 2011. Isolation, selection and biodegradation profile of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 143–146. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0322-z>.
- Moussavi, G., Mahmoudi, M., Barikbin, B., 2009. Biological removal of phenol from strong wastewaters using a novel MSBR. *Water Res.* 43, 1295–1302. doi:10.1016/j.watres.2008.12.026.
- Naghibi, F., Pourmorad, F., Honary, S., Shamsi, M., 2003. Decontamination of water polluted with phenol using *Raphanus sativus* root. *Iran. J. Pharm. Res.* 2, 29–32.
- Nair, C.I., Jayachandran, K., Shashidhar, S., 2008. Biodegradation of phenol. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 4951–4958.
- Nakai, C., Kagamiyama, H., Saeki, Y., Nozaki, M., 1979. Nonidentical subunits of pyrocatechase from *Pseudomonas arvilla* C-1. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 12–22. doi:10.1016/0003-9861(79)90322-9.
- Nath, B.S., Suresh, A., Varma, B.M., Kumar, R.P.S., 1997. Changes in Protein Metabolism in Hemolymph and Fat Body of the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in Response to Organophosphorus Insecticides Toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 169–173. doi:10.1006/eesa.1996.1504.
- Nordlund, I., Powlowski, J., Hagström, A., Shingler, V., 1993. Conservation of regulatory and structural genes for a multi-component phenol hydroxylase within phenol-catabolizing bacteria that utilize a meta-cleavage pathway. *Microbiology* 139, 2695–2703.
- Nurk, A., Kasak, L., Kivisaar, M., 1991. Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene* 102, 13–18. doi:10.1016/0378-1119(91)90531-F.



Olujimi, O.O., Fatoki, O.S., Odendaal, J.P., Okonkwo, J.O., 2010. Endocrine disrupting chemicals (phenol and phthalates) in the South African environment: a need for more monitoring: review. *Water SA* 36, 671–682.

Omokoko, B., Jäntges, U.K., Zimmermann, M., Reiss, M., Hartmeier, W., 2008. Isolation of the phe-operon from *G. stearothermophilus* comprising the phenol degradative meta-pathway genes and a novel transcriptional regulator. *BMC Microbiol.* 8, 197. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-197>.

Pan, G., Kurumada, K.I., 2008. Hybrid gel reinforced with coating layer for removal of phenol from aqueous solution. *Chem. Eng. J.* 138, 194–199. doi:10.1016/j.cej.2007.06.025.

Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A., Wackett, L.P., 2002. Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4699–4709. doi:10.1128/AEM.68.10.4699-4709.2002.

Pathak, A., Shanker, R., Garg, S.K., Manickam, N., 2011. Profiling of biodegradation and bacterial 16S rRNA genes in diverse contaminated ecosystems using 60-mer oligonucleotide microarray. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1739–1754. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3268-5>.

Perkins, E.J., Gordon, M.P., Caceres, O., Lurquin, P.F., 1990. Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 172, 2351–2359.

Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A., Nurk, A., 1997. Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, pheBA, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4899–4906.

Powlowski, J., Shingler, V., 1994. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation* 5, 219–236. doi:10.1007/BF00696461.

Pradeep, N.V., Anupama, S., Hampannavar, U.S., 2011. Biodegradation of phenol using rotating biological contactor. *Int. J. Environ. Sci.* 2, 105–113.

Pradeep, N.V., Anupama, S., Navya, K., Shalini, H.N., Idris, M., Hampannavar, U.S., 2015. Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review. *Appl. Water Sci.* 5, 105–112. <https://doi.org/10.1007/s13201-014-0176-8>.

Pradhan, N., Ingle, A.O., 2007. Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 60, 103–108. doi:10.1016/j.ibiod.2007.01.001.

Prieto, M.B., Hidalgo, A., Rodríguez-Fernández, C., Serra, J.L., Llama, M.J., 2002. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 853–859. doi:10.1007/s00253-002-0963-2.

Pühler, A., Timmis, K.N. (Eds.), 1984. *Advanced Molecular Genetics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Ramade, F., 1992. *Précis d'écotoxicologie*. Masson.

Ramakrishnan, A., Gupta, S.K., 2006. Anaerobic biogranulation in a hybrid reactor treating phenolic waste. *J. Hazard. Mater.* 137, 1488–1495. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.04.034.

Riccardi, C., Papacchini, M., Mansi, A., Ciervo, A., Petrucca, A., La Rosa, G., Marianelli, C., Muscillo, M., Marcelloni, A.M., Spicaglia, S., 2005. Characterization of bacterial population coming from a soil contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) able to degrade pyrene in slurry phase. *Ann. Microbiol.* 55, 85-90.

Risne, C.H., Cash, S.L., 1990. A high-performance liquid chromatographic determination of major phenolic compounds in tobacco smoke. *J. Chromatogr. Sci.* 28, 239–244. doi:10.1093/chromsci/28.5.239.

Rodier, J., 2005. *L'Analyse de l'eau : Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer*, 8e édition. ed. Dunod, Paris.

Röling, W.F.M., 2010. Hydrocarbon-Degradation by Acidophilic Microorganisms, in: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1923–1930.

- Saa, L., Jaureguibeitia, A., Largo, E., Llama, M.J., Serra, J.L., 2010. Cloning, purification and characterization of two components of phenol hydroxylase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 201–211. doi:10.1007/s00253-009-2251-x.
- Sandhu, A., Halverson, L.J., Beattie, G.A., 2009. Identification and genetic characterization of phenol-degrading bacteria from leaf microbial communities. *Microb. Ecol.* 57, 276–285. doi:10.1007/s00248-008-9473-9.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467.
- Sarwade, V.D., Gawai, K.R., 2014. Biodegradation of phenol by alkaliphilic *Bacillus badius* D1. *J. Env. Sci Toxicol Food Technol* 8, 28–35.
- Sazinsky, M.H., Bard, J., Di Donato, A., Lippard, S.J., 2004. Crystal structure of the toluene/o-xylene monooxygenase hydroxylase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *J. Biol. Chem.* 279, 30600–30610. doi:10.1074/jbc.M400710200.
- Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875–3883. doi:10.1016/0031-9422(91)83426-L.
- Schie, P.M. van, Young, L.Y., 2000. Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation J.* 4, 1–18. doi:10.1080/10588330008951128.
- Sei, K., Asano, K.I., Tateishi, N., Mori, K., Ike, M., Fujita, M., 1999. Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 542–550. doi:10.1016/S1389-1723(00)87673-2.
- Selvaratnam, S., Schoedel, B.A., McFarland, B.L., Kulpa, C.F., 1995. Application of reverse transcriptase PCR for monitoring expression of the catabolic *dmpN* gene in a phenol-degrading sequencing batch reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3981–3985.
- Senthilvelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R.C., Mandal, A.B., 2014. Biodegradation of phenol by mixed microbial culture: an eco-friendly approach for the pollution reduction. *Clean Technol. Environ. Policy* 16, 113–126. doi:10.1007/s10098-013-0598-2.

Seo, J.S., Keum, Y.S., Li, Q.X., 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 6, 278–309. doi:10.3390/ijerph6010278.

Shingler, V., 2003. Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environ. Microbiol.* 5, 1226–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2003.00472.x>.

Shingler, V., Bartilson, M., Moore, T., 1993. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVI150 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* 175, 1596–1604.

Shingler, V., Franklin, F.C.H., Tsuda, M., Holroyd, D., Bagdasarian, M., 1989. Molecular analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *Microbiology* 135, 1083–1092.

Shingler, V., Powlowski, J., Marklund, U., 1992. Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 174, 711–724.

Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol.* 14, 389–397. doi:10.1016/j.tim.2006.07.001.

Singleton, D.W., Khan, S.A., 2003. Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. *Front. Biosci.* 8, 110–118.

Sirianuntapiboon, S., Yommee, S., 2006. Application of a new type of moving bio-film in aerobic sequencing batch reactor (aerobic-SBR). *J. Environ. Manage.* 78, 149–156. doi:10.1016/j.jenvman.2005.04.012.

Srivastava, J., Naraiyan, R., Kalra, S.J.S., Chandra, H., 2014. Advances in microbial bioremediation and the factors influencing the process. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 11, 1787–1800. doi:10.1007/s13762-013-0412-z.

Sun, J.-Q., Xu, L., Tang, Y.-Q., Chen, F.-M., Liu, W.-Q., Wu, X.-L., 2011. Degradation of pyridine by one *Rhodococcus* strain in the presence of chromium (VI) or phenol. *J. Hazard. Mater.* 191, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.034>.

Szököl, J., Rucká, L., Šimčíková, M., Halada, P., Nešvera, J., Pátek, M., 2014. Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8267–8279. doi:10.1007/s00253-014-5881-6.

Takenaka, S., Okugawa, S., Kadowaki, M., Murakami, S., Aoki, K., 2003. The metabolic pathway of 4-aminophenol in *Burkholderia* sp. strain AK-5 differs from that of Aniline and aniline with C-4 substituents. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5410–5413. doi:10.1128/AEM.69.9.5410-5413.2003.

Takeo, M., Nishimura, M., Shirai, M., Takahashi, H., Negoro, S., 2007. Purification and Characterization of Catechol 2,3-Dioxygenase from the Aniline Degradation Pathway of *Acinetobacter* sp. YAA and Its Mutant Enzyme, Which Resists Substrate Inhibition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1668–1675. doi:10.1271/bbb.70079.

Tay, J.-H., Tay, S.T.-L., Liu, Y., Show, K.Y., Ivanov, V., 2006. *Biogranulation Technologies for Wastewater Treatment: Microbial Granules*. Elsevier.

Tsai, S.C., Li, Y.K., 2007. Purification and characterization of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Candida albicans* TL3. *Arch. Microbiol.* 187, 199–206. doi:10.1007/s00203-006-0187-4.

Tuckwell, D., Denning, D.W., Bowyer, P., 2011. A public resource for metabolic pathway mapping of *Aspergillus fumigatus* Af293. *Med. Mycol.* 49 Suppl 1, S114–119. doi:10.3109/13693786.2010.490243.

Tziotzios, G., Economou, C.N., Lyberatos, G., Vayenas, D.V., 2007. Effect of the specific surface area and operating mode on biological phenol removal using packed bed reactors. *Desalination, Ninth Environmental Science and Technology Symposium 211*, 128–137. doi:10.1016/j.desal.2006.02.087.

Tziotzios, G., Teliou, M., Kaltsouni, V., Lyberatos, G., Vayenas, D.V., 2005. Biological phenol removal using suspended growth and packed bed reactors. *Biochem. Eng. J.* 26, 65–71. doi:10.1016/j.bej.2005.06.006.

Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T., Eltis, L.D., 2006. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 241–267. doi:10.1080/10409230600817422.

van der Meer, J.R., de Vos, W.M., Harayama, S., Zehnder, A.J., 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56, 677–694.

Varga, J., Neujahr, H., 1970. Purification and properties of catechol 1,2–oxygenase from *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Biochem.* 12, 427–434.

Veeranagouda, Y., Lim, E.J., Kim, D.W., Kim, J.-K., Cho, K., Heipieper, H.J., Lee, K., 2009. Formation of specialized aerial architectures by *Rhodococcus* during utilization of vaporized p-cresol. *Microbiol. Read. Engl.* 155, 3788–3796. doi:10.1099/mic.0.029926-0.

Wang, C.L., You, S.L., Wang, S.L., 2006. Purification and characterization of a novel catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a carbon source. *Process Biochem.* 41, 1594–1601. doi:10.1016/j.procbio.2006.03.008.

Wang, Y., Song, J., Zhao, W., He, X., Chen, J., Xiao, M., 2011. In situ degradation of phenol and promotion of plant growth in contaminated environments by a single *Pseudomonas aeruginosa* strain. *J. Hazard. Mater.* 192, 354–360. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.05.031.

Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H., Harayama, S., 1998. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4396–4402.

Watanabe, K., Teramoto, M., Harayama, S., 1999. An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2813–2819.

Wigmore, G.J., Bayly, R.C., Berardino, D.D., 1974. *Pseudomonas putida* Mutants Defective in the Metabolism of the Products of meta Fission of Catechol and Its Methyl Analogues. *J. Bacteriol.* 120, 31–37.

Wilberg, K., Assenhaimer, C., Rubio, J., 2002. Removal of aqueous phenol catalysed by a low purity soybean peroxidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 851–857. doi:10.1002/jctb.646.

Wilberg, K.Q., Nunes, D.G., Rubio, J., 2000. Removal of phenol by enzymatic oxidation and flotation. *Braz. J. Chem. Eng.* 17, 907–914. doi:10.1590/S0104-66322000000400055.

Woolard, C.R., Irvine, R.L., 1995. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Res.* 29, 1159–1168. doi:10.1016/0043-1354(94)00239-4.

Xenofontos, E., Tanase, A.-M., Stoica, I., Vyrides, I., 2016. Newly isolated alkalophilic *Advenella* species bioaugmented in activated sludge for high p-cresol removal. *New Biotechnol.* 33, 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.11.003>.

Yao, H., Ren, Y., Deng, X., Wei, C., 2011a. Dual substrates biodegradation kinetics of m-cresol and pyridine by *Lysinibacillus cresolivorans*. *J. Hazard. Mater.* 186, 1136–1140. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.118>.

Yao, H., Ren, Y., Wei, C., Yue, S., 2011b. Biodegradation characterisation and kinetics of m-cresol by *Lysinibacillus cresolivorans*. *Water SA* 37, 15–20.

Zhan, Y., Yu, H., Yan, Y., Ping, S., Lu, W., Zhang, W., Chen, M., Lin, M., 2009. Benzoate catabolite repression of the phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2. *Curr. Microbiol.* 59, 368–373. doi:10.1007/s00284-009-9446-3.

Zhang, D., Berry, J.P., Zhu, D., Wang, Y., Chen, Y., Jiang, B., Huang, S., Langford, H., Li, G., Davison, P.A., others, 2015. Magnetic nanoparticle-mediated isolation of functional bacteria in a complex microbial community. *ISME J.* 9, 603–614.

Zhao, G., Chen, S., Ren, Y., Wei, C., 2014. Interaction and biodegradation evaluate of m-cresol and quinoline in co-exist system. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 86, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.014>.

# Diversity shift in bacterial phenol hydroxylases driven by alkyl-phenols in oil refinery wastewaters

Besma Harzallah<sup>1,2,3,4,5</sup> · Hacène Bousseboua<sup>6</sup> · Yves Jouanneau<sup>1,2,3</sup> 

Received: 24 January 2017 / Accepted: 27 March 2017 / Published online: 21 April 2017  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

**Abstract** Phenol hydroxylases (PHs) play a primary role in the bacterial degradation of phenol and alkylphenols. They are divided into two main classes, single-component and multi-component PHs, having distinctive catalytic subunits designated as PheA1 and LmPH, respectively. The diversity of these enzymes is still largely unexplored. Here, both LmPH and *pheA1* gene sequences were examined in activated sludge from oil refinery wastewaters. Phenol, *p*-cresol, or 3,4-dimethylphenol (3,4-DMP) supplied as extra carbon sources were rapidly mineralized by the microbial community. Analysis of LmPH genes revealed a wide range of sequences, most of which exhibited moderate similarity with homologs found in Proteobacteria. Moreover, the LmPH diversity profiles showed a dramatic shift upon sludge treatment with *p*-cresol or 3,4-DMP amendment. This resulted in an enrichment in sequences similar to LmPHs from Betaproteobacteria and

Gammaproteobacteria. RT-PCR analysis of RNA extracted from wastewater sludge highlighted LmPH genes best expressed in situ. A PCR approach was implemented to analyze the *pheA1* gene diversity in the same microbial community. Retrieved sequences fell into four clusters and appeared to be distantly related to *pheA1* genes from Actinobacteria. Altogether, our results provide evidence that phenol degraders carrying LmPH are more diverse than PheA1 carrying bacteria and suggest that PHs with best adapted substrate specificity are recruited in response to (methyl)phenol availability.

**Keywords** Phenol hydroxylase · Alkylphenols · Enzyme biodiversity · *pheA1* · LmPH

## Introduction

Phenols are annually produced at around 7 billion kg worldwide. They are released as waste material by various industrial facilities such as oil refineries, coking plants, pharmaceuticals, pesticides, and leather manufactures (Senthivelan et al. 2014). Due to its high water solubility (83 g L<sup>-1</sup>), phenol present in wastewaters easily reaches downstream water sources and may be harmful to life in aquatic environments (Das et al. 2016). Alkylated forms of phenol, such as cresols, dimethylphenol, and trimethylphenol, are also found at significant levels in industrial wastewaters especially when processing generates coal tar (Xenofontos et al. 2016).

Biodegradation of phenols, as well as many petroleum products by microorganisms, represents the primary way by which these compounds are removed from contaminated sites. Diverse microorganisms like bacteria, yeasts, algae, and filamentous fungi have the metabolic capability to degrade phenols (Watanabe et al. 2002; Senthivelan et al. 2014). In aerobic bacteria, phenols are assimilated by two major metabolic

Responsible editor: Philippe Garrigues

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11356-017-8950-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Yves Jouanneau  
yves.jouanneau@cea.fr

- <sup>1</sup> CEA, DRF, BIG, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, F-38054 Cedex 9 Grenoble, France
- <sup>2</sup> CNRS, UMR 5249, F-38054 Grenoble, France
- <sup>3</sup> Université Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France
- <sup>4</sup> Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, FSNV, Université des Frères Mentouri, BP 325 25117 Constantine, Algeria
- <sup>5</sup> Département de Biologie, FSES NV, Université d'Oum El Bouaghi, BP358 04000 Oum El Bouaghi, Algeria
- <sup>6</sup> Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologies, BP E66 25100 Constantine, Algeria



pathways involving either an *ortho* or a *meta* cleavage of the aromatic ring (Harayama et al. 1992; Tuan et al. 2011). A phenol hydroxylase (PH) also called phenol 2-monooxygenase (EC 1.14.13.7) catalyzes the first step in the degradation, consisting of a hydroxylation in *ortho* position to give a catechol (Shingler 2003). In the next step, the aromatic ring is cleaved either intradiol by a catechol 1,2-dioxygenase or extradiol by a catechol 2,3-dioxygenase (Cafaro et al. 2004). Bacterial PHs belong to two distinct enzyme families, which are the multicomponent hydroxylases (mPHs) encoded by six genes and single-component hydroxylases (sPHs), which are functionally associated with a specific reductase (Harayama et al. 1992). The two classes of enzymes are phylogenetically unrelated and show distinctive prosthetic groups at the active site, a binuclear iron center in mPHs, and FAD in sPHs. Nevertheless, the two types of enzymes are thought to fulfill similar functions in the process of phenol degradation.

The mPHs, which are thought to be predominant in the environment (Futamata et al. 2001), are generally found in Gram-negative bacteria, whereas sPHs are mainly found in Gram-positive bacteria. While both types of enzymes also utilize cresols as substrates, only mPHs have been shown to convert dimethylphenol (Powlowski and Shingler 1994). The mPH was first described as the product of the *dmpLMNOP* gene cluster in the 3,4-dimethylphenol-degrading strain *Pseudomonas* CF600 (Powlowski and Shingler 1994). It was later found in strains belonging to *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Ralstonia*, and *Variovorax* among the most common genera (Watanabe et al. 1998; Adav et al. 2007; Zhu et al. 2008; Zhang et al. 2015).

Single-component PHs encoded by *pheA1* are associated with reductase encoded by *pheA2*. They were found in numerous rhodococci, including *R. erythropolis* (Saa et al. 2010), *R. jostii* (Szokoel et al. 2014), and *R. opacus* (Gröning et al. 2014), as well as in bacilli (Banerjee and Ghoshal 2011; Djokic et al. 2011). In rhodococci, sPH-encoding genes are often present as multiple copies which might be involved in catabolism of various phenolic compounds. For instance, the *R. opacus* strain 1CP contains three sPHs which showed different specificities with respect to phenol and chlorophenols (Gröning et al. 2014). Hydroxylases closely related to this enzyme family were found in Gram-negative bacteria, including the 4-nitrophenol monooxygenase (Kadiyala and Spain 1998) and the chlorophenol 4-monooxygenase of *Burkholderia cepacia* (Gisi and Xun 2003). Besides, some distantly related phenol hydroxylases have been reported in the thermophilic *Geobacilli*, *G. thermoglucosidasius*, and *G. thermoleovorans*, which were described as two-component flavin-dependent monooxygenases (Düffner and Müller 1998; Kirchner et al. 2003).

Based on the genes encoding the large subunit of phenol hydroxylase (LmPH) in some representative phenol-degrading bacteria, PCR primers designed to specifically

amplify an internal fragment of the gene sequence were used to probe the mPH diversity. This approach led to the identification of three subclasses of LmPH sequences that showed different enzyme kinetics (Futamata et al. 2001). It has been observed that the diversity of mPHs as highlighted by LmPH gene sequences was much higher when probed on metagenomic DNA of environment samples than that found in genomes of bacterial isolates (Watanabe et al. 2002). These findings suggested that PHs involved in phenol degradation *in situ* mainly arose from uncultured bacteria and might differ from those reported in bacterial isolates. Accordingly, in a study relying on stable isotope probing to detect phenol degraders in soil, bacteria were identified as diverse members of the Proteobacteria or Gram-positive species, many of which were previously unknown to degrade phenol (DeRito et al. 2005). Recently, an elegant method making use of magnetic nanoparticles was implemented to track bacteria of interest in wastewater, resulting in the discovery of unculturable but efficient phenol degraders as new members of the *Burkholderiales* (Zhang et al. 2015). Besides, bioreactor studies showed that the nature of phenol degraders selected from activated sludge varied depending on the phenol concentration, which also led to the selection of distinct sets of LmPH genes (Basile and Erijman 2010).

In the present study, we explored the diversity of PHs in oil refinery wastewaters by culture-independent molecular approaches, targeting the genes encoding the large subunit of either the mPHs or the sPH enzyme classes. We present a new PCR method allowing for the specific recovery of partial sPH subunit gene sequences from metagenomic DNA. We also examined the response of wastewater microbiota to amendments by methylphenols in microcosms and tested whether the degree of phenol methylation changed the diversity profile of PH sequences. Our results suggest that the sets of PH sequences observed arose from the selection of degraders best adapted to the type of methylphenol available as carbon source.

## Materials and methods

### Source and organic carbon content of wastewater samples

The samples were collected from the wastewater treatment plant of an oil refinery (Sonatrach), located 6° 58' 27" E, 36° 52' 23" N in Skikda, Algeria. Sampling was performed close to the inlet of the main treatment basin containing raw wastewaters. The samples were stored at 4 °C in 0.5-L glass bottles closed with Teflon-sealed screw caps until use. Samples were analyzed for the chemical oxygen demand (COD), biological oxygen demand (BOD), pH, ammonium, and the phenol content at the LSEH Laboratory in Lyon (CARSO, France).

### Microcosm setup, incubation conditions, and isolation of methylphenol degraders

A wastewater sample was first treated to remove excess of carbon sources as follows. The sample (250 mL) was centrifuged at 7000 rpm for 15 min at 4 °C. The cell pellet obtained was washed twice with sterilized minimum salt medium (MSM; Krivobok et al. 2003) and resuspended in the same volume of MSM. The suspension was incubated overnight at 25 °C under shaking. Then, the culture was adjusted to an optical density of 1.0 at 600 nm, prior to being used to inoculate 50-mL portions of MSM at 8% (v/v).

Microcosm incubation was carried out in 250-mL conical flasks, sealed with rubber stoppers. The culture medium was supplemented with either phenol (200 mg L<sup>-1</sup>), *p*-cresol, or 3,4-dimethylphenol (3,4-DMP) (Sigma-Aldrich), 100 mg L<sup>-1</sup> each. The microcosms were prepared in triplicate and incubated in the dark at 30 °C under shaking (150 rpm). Flasks that were not inoculated (abiotic) or lacked an exogenous carbon source served as controls.

Isolation of phenol degrading bacteria was carried out as follows. Appropriate dilutions of cultures from microcosms incubated with *p*-cresol or 3,4-DMP were plated on a MSM agar supplemented with 100 mg L<sup>-1</sup> of the respective phenolic substrate and incubated at 30 °C for up to 72 h. Colonies showing different apparent aspects were selected and repeatedly transferred on the same minimum medium. Strains isolated in this way were grown on Luria–Bertani (LB) medium and kept frozen in 25% glycerol for long-term storage.

### Monitoring of phenol and methylphenol degradation in microcosms

In order to evaluate the biodegradation of phenolic compounds (phenol, *p*-cresol, and 3,4-DMP), the CO<sub>2</sub> concentration due to substrate mineralization was measured by gas chromatography (GC) and residual carbon substrate in the cultures was quantified by high-pressure liquid chromatography (HPLC).

Quantification of CO<sub>2</sub> evolved in microcosms was performed with a HP6890 gas chromatograph coupled to a HP5973 mass spectrometer (Agilent Technologies) as previously described (Martin et al. 2012). Gas samples were taken from the headspace of microcosms using a 25-μL gas-tight syringe and injected into the GC column. The system was calibrated by injecting known amounts of CO<sub>2</sub> obtained by dilution in argon-filled vials.

Residual phenolic compounds in culture samples were analyzed by HPLC. One-milliliter samples were centrifuged and supernatants were filtered through 0.45-μm filters (Macherey-Nagel) prior to HPLC analysis using an Agilent 1260 series HPLC system equipped with a UV/VIS diode array detector. Reverse phase chromatography was performed at 30 °C on a

NUCLEODUR Pyramid column (Macherey-Nagel), 250 × 4.6 mm I.D. (5 μm). The column was eluted isocratically at 0.5 mL min<sup>-1</sup> with a mobile phase of 70% methanol in water. Phenolic compounds were detected by their absorbance at 270 nm and quantified based on peak area using calibration curves made with each of the three phenols used as substrates. Results are means of three assay determinations derived from three replicate cultures.

### General DNA manipulations

Genomic DNA was extracted from 1- to 3-mL bacterial culture using the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. PCRs were conducted with a T personal thermocycler (Biometra) using either the GoTaq DNA Polymerase (Promega) or the Q5 hot-start high-fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). DNA fragments were purified by agarose gel electrophoresis and stained with GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Interchim). PCR fragments were cloned in pJET1.2 plasmid using the pJET Cloning Kit (Thermo-Fisher Scientific), and the resulting plasmids were introduced in *Escherichia coli* DH5α by transformation. Plasmid isolation was performed from 3-mL overnight-grown cultures of *E. coli* using the NucleoSpin Plasmid Isolation Kit (Macherey-Nagel). Sanger sequencing was performed on both strands by Eurofins MWG Operon (Germany).

### PCR cloning and sequence analysis of 16S ribosomal ribonucleic acid genes

PCR reactions were carried out in 25 μL reaction mixtures containing 100 ng of genomic DNA, 8.0 μM each forward and reverse primers (27f 5'-AGAGTTTCCTGGCTCAG-3' and 1492r 5'-TACGGGTACCTTGTTACGACTT-3'), 5 μL of 5× Green GoTaq Flexi buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, and 1.25 U of GoTaq DNA Polymerase. The amplification conditions were as follows: 3 min at 95 °C followed by 30 cycles of 30 s at 95 °C/30 s at 54 °C/90 s at 72 °C, and finally a 5 min at 72 °C. After cloning into pJET1.2, the PCR amplicons were subjected to Sanger sequencing as performed by Eurofins Genomics (Germany). The sequences were compared with those available in the RDP database using SeqMatch and with those in GenBank using BLAST (Altschul et al. 1990).

### Extraction of metagenomic DNA

DNA was extracted from the microbial biomass of microcosms using the NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel). The microbial pellets obtained by centrifugation for 15 min at 7000 rpm (~0.6 g) were resuspended in 700 μL of lysis solution (SL1) and 100 μL enhancer and then subjected to

bead beating for 5 min in 2-mL tubes horizontally maintained on a vortex shaker. Next steps were performed as described by the supplier of the kit, and metagenomic DNA was finally eluted in 100  $\mu$ L of SE buffer.

### Primer design and PCR amplification of partial *pheA1* gene sequences

Primer sets used to amplify a fragment internal to the *pheA1* gene were designed after sequence alignments of *pheA1*-like genes found in the genomes of representative phenol degraders, most of which were Gram-positive bacteria. Sequences considered in the alignment are the following (accession number given in parentheses): *Rhodococcus jostii* RHA1 (CP000431/ABG94319), *R. opacus* 1CP (X99622.2), *R. erythropolis* CCM2595 (FM995530.1), *Gordonia polyisoprenivorans* (NC016906), *Pseudonocardia dioxanivorans* (CP002593), *Salinispora arenicola* (CP000850), and *Roseiflexus castenholzii* (CP000804). That *pheA1* encoded a phenol hydroxylase was actually shown only for the three rhodococci (Saa et al. 2010; Szokoel et al. 2014); other sequences were identified as such based on annotations of whole genomes. Short regions partially conserved among the selected sequences were chosen for the design of the following primers:

PheA1Gr + f2 (5'-ACAACCTTCMTYGCSCACTACGG-3'),  
PheA1Gr + f4 (5'-ACCGCYCCSACCGA  
CACSGGCA-3'), and

PheA1Gr + R (5'-TGCCGGMGTAGTTSCGCTCGT-3').

The sequence of these primers matched regions delimited by nucleotides 674–695, 271–292, and 1430–1450 of the *pheA1* gene sequence of strain RHA1, respectively.

Amplification of part of *pheA1* genes from metagenomic DNA was achieved by using a two-step nested PCR method. Both steps were carried out with the hot-start high-fidelity Q5 DNA polymerase. In the first step, template DNA consisted of a mix of metagenomic DNA extracted from three microcosm replicates. Since the concentrations were in the same range, we mixed equal volumes of each preparation without prior adjustment. Reaction mixtures (25 to 50  $\mu$ L) contained 20 ng of metagenomic DNA, 10.0  $\mu$ M each of forward (PheA1Gr + f4) and reverse (PheA1Gr + R) primer, 5 or 10  $\mu$ L of Q5 reaction buffer (5 $\times$ ), dNTPs (2 mM each), and 0.02 U/ $\mu$ L of Q5 DNA polymerase. After initial DNA denaturation for 3 min at 95  $^{\circ}$ C, the PCR program included 5 cycles where the annealing temperature was gradually lowered from 64 to 60  $^{\circ}$ C (1  $^{\circ}$ C/cycle); 25 cycles of 20 s at 95  $^{\circ}$ C, 20 s at 59  $^{\circ}$ C, and 1 min at 72  $^{\circ}$ C; and a final step 5 min at 72  $^{\circ}$ C. In the second PCR, the products of the first PCR served as template, and primer PheA1Gr + f4 was replaced by PheA1Gr + f2. The reaction was carried out under the same conditions except that the first 5 cycles were omitted. The final PCR product, ~790 bp in size, was then purified, cloned, and sequenced.

### PCR amplification and cloning of partial sequences coding for LmPH

An internal fragment of the gene encoding the multicomponent PH large subunit (LmPH) was amplified using the previously described primer pair PheUf/PheUr (Futamata et al. 2001). Template DNA consisted of a mix of metagenomic DNA extracted from three microcosm replicates. PCR reactions were carried out in 25  $\mu$ L reaction mixtures, containing 50 ng of metagenomic DNA, 8.0  $\mu$ M each PheUf and PheUr, 5  $\mu$ L of reaction buffer (5 $\times$ ), 0.2 mM of each dNTPs, and 0.5 U of Q5 DNA polymerase. The amplification conditions were as follows: initial DNA denaturation 2 min at 95  $^{\circ}$ C, then 5 cycles where the annealing temperature was lowered from 61  $^{\circ}$ C to 57  $^{\circ}$ C (1  $^{\circ}$ C/cycle), 25 cycles of 95  $^{\circ}$ C for 30 s/56  $^{\circ}$ C for 30 s/72  $^{\circ}$ C for 1 min, followed by a final step 7 min at 72  $^{\circ}$ C. The PCR product (~600 bp) was then purified and cloned in pJET1.2/blunt. A selection of positive clones was grown in a 96-well microplate and then subjected to sequencing of the plasmid insert.

For the amplification of the LmPH gene from bacterial isolates, PCR conditions were as described above, except that the primer pair was either PheUf/PheLr or PheUf/PheMhr. These primers were previously designed to specifically target group I and group II LmPH genes, respectively (Futamata et al. 2001).

### Sequence comparisons and phylogenetic analyses

The nucleotide sequences were compared with the data in the GenBank database using the BLAST tool. The phylogenetic trees based on the PH gene sequences were constructed with the software available on the phylogeny website using the “One Click” option ([www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr)) (Dereeper et al. 2008). The analysis involves alignment using MUSCLE, curation using Gblocks, phylogeny using PhyML, and tree-rendering using TreeDyn. PhyML is a phylogeny application based on the maximum-likelihood principle. Further details are available on the website.

### RNA extraction from the wastewater microbiota and RT-PCR

Wastewater samples used for RNA extraction were obtained directly from the refinery WWTP. Immediately after collection, wastewater samples (25 mL) were mixed (v/v) with RNA lysis buffer solution (3.5 M ammonium sulfate, 0.02 M sodium citrate, 0.01 M EDTA, pH 5.2), then centrifuged at 4  $^{\circ}$ C, 10,000 g for 10 min. Pellets were kept frozen at  $-20$   $^{\circ}$ C until RNA extraction. Samples were resuspended in NucleoZol (250  $\mu$ L) in 2-mL tubes containing glass beads (Type B, Macherey-Nagel), and bacterial cells were disrupted by horizontal shaking for 5 min. Extracts were adjusted to 0.7 mL with another volume of NucleoZol and 0.2 mL of nuclease-free water, then centrifuged. The aqueous phase was

recovered, treated with 2.5  $\mu\text{L}$  of 4-bromoanisole (Sigma-Aldrich), and finally mixed with an equal volume of isopropanol to precipitate the RNA. The preparation was washed in 75% ethanol, prior to dissolution in 40  $\mu\text{L}$  of nuclease-free water. RNA samples were kept at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

RNA samples were subjected to reverse transcription (RT) using a commercial kit (GoScript Reverse Transcription System, Promega). RNA was adjusted to 100 ng per reaction in a total of 20  $\mu\text{L}$ . Reactions were carried out at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 5 min, then at  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 h as specified by the kit instructions, and eventually stopped by heating 15 min at  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A control reaction lacking reverse transcriptase was included. Subsequently, the complementary DNA (cDNA) preparations from two independent RNA extractions were combined and 5  $\mu\text{L}$  of this was used as template in PCR targeting LmPH genes (see above). The resulting PCR product was cloned as above, and the DNA inserts of 42 randomly picked positive clones were subjected to sequencing.

### Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences of the genes for phenol hydroxylase and for partial 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) determined in this study were deposited in the EBI/ENA database under the following accession numbers: 16S rRNA from LT604129 to LT604134, LmPH from LT604135 to LT604179, and *pheA1* from LT604180 to LT604201.

## Results

### Biodegradation of phenol and alkylphenols in microcosms

The purpose of this study was to investigate the diversity of bacterial PHs in the biosludge of wastewaters and observe the effect of methylphenol amendment on this diversity. Wastewater samples were from an oil refinery located in east Algeria. They showed near neutral pH, high values of chemical and biological oxygen demand (300.25 and 40.5  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{O}_2$ , respectively), and a relatively low content of inorganic nitrogen ( $\text{NH}_4$  2.67  $\text{mg L}^{-1}$  and  $\text{NO}_3$   $<1\text{ mg L}^{-1}$ ). Total phenol concentration was below 0.02  $\text{mg L}^{-1}$ , suggesting that phenolic compounds discharged by the refinery were rapidly degraded by microorganisms in the wastewaters.

In order to test the phenol degradation ability, microcosms containing biosludge samples were set up as described in the “Materials and methods” section and were supplemented with either phenol, *p*-cresol, or 3,4-DMP. From the time course of  $\text{CO}_2$  evolved in the gas phase of microcosms, all three phenolic compounds were rapidly mineralized. A variable proportion of these compounds appeared to be converted into  $\text{CO}_2$  within 22 h (38.2–54.6%), the rest of the carbon source being probably used to form biomass (Table 1). Accordingly, HPLC

measurements of residual substrates in centrifuged culture samples showed that concentrations had declined to below detection limit after 22 h. This confirmed that the phenolic compounds were rapidly degraded and indicated the presence of active phenol degraders in the biosludge.

### Diversity of LmPH genes in biosludge

In order to recover genes coding for the large subunit of multicomponent phenol hydroxylase, a PCR approach was implemented using metagenomic DNA extracted from the microcosms described above as template. As a means to take into account the variability between microbial samples, DNA template was prepared as a mix of genomic DNA extracted from three microcosm replicates. We utilized a primer pair PheUf/PheUr, which was previously described to amplify an internal 620-bp fragment of the LmPH gene (about 1500 bp in length) from a range of phenol-degrading bacteria (Futamata et al. 2001). PCR products obtained with the metagenomic DNA from the four microcosm conditions considered herein were cloned, resulting in four DNA libraries presented in Table 2. After sequence analysis and removal of too short or unrelated sequences, a total of 104 sequences were identified as partial putative LmPH genes. Within each clone library, multiple sequence alignment showed that a large proportion of the sequences were unique, meaning here that referred sequences shared less than 99% identity between each other (Table 2). A phylogenetic analysis was then performed on this set of unique sequences, which also included several related sequences found in the GenBank/EMBL databases. Results are presented as two unrooted trees in Fig. 1, one of which showing the relationships between the partial LmPH genes derived from untreated and phenol-treated biosludge and the other comparing sequences from *p*-cresol- and 3,4-DMP-treated samples. Based on their similarities with reference sequences found in known bacteria, all 104 LmPH sequences appeared to be phylogenetically linked to counterparts from Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria and for a few sequences to Alphaproteobacteria (Fig. 1a). Best matches showed similarities in a range from 75 to 98% (*Acidovorax* sp. JS42 (accession no. CP000539) 88%, *Acinetobacter* sp. SJ-15 (accession no. JQ346083) 97%, *Alcaligenes faecalis* (accession no. EF540866) 89%, *Arhodomonas* sp. (accession no. JX311708) 82%, *Comamonas testosteroni* (accession no. AB024741) 82%, *Marinobacter* sp. (accession no. AB985591) 75%, *Methylibium petroleiphilum* PM1 (accession no. CP000555) 80%, *Oleomonas* sp. SJ-1 (accession no. JQ346085) 98%, *Pseudomonas putida* POXN01 (accession no. KC152907) 80%, *Pseudomonas* sp. 2B32 (accession no. JX177819) 82%, *Ralstonia* sp. clone MFI\_WH1\_phe1 (accession no. KJ174604) 98%).

Nevertheless, many of the LmPH genes resembled those of uncultured bacteria. A comparison of the LmPH diversity

**Table 1** Mineralization of methylphenols by wastewater microbiota

Carbon source added	Initial concentration (mM)	CO <sub>2</sub> produced in headspace (mmol)	Mineralization rate <sup>a</sup> (%)
None	–	0.020 ± 0.003	–
Phenol	2.04	0.335 ± 0.004	54.6
<i>p</i> -Cresol	0.90	0.122 ± 0.004	38.7
3,4-DMP	0.76	0.117 ± 0.008	38.2

<sup>a</sup> The rates indicate the percentage of conversion of each phenolic compounds at the end of the 22-h incubation time

profiles of the four libraries indicated that a significant shift occurred upon amendment of sludge with (methyl)phenols. While LmPH genes distantly related to those of Alphaproteobacteria were predominant in untreated sludge (14 out of 26), the sets of sequences found in *p*-cresol- and 3,4-DMP-treated sludge were greatly enriched in LmPH genes resembling those found in Gammaproteobacteria (05 out of 25 and 14 out of 27, respectively). The set of sequences retrieved from phenol-treated sludge exhibited the largest diversity, with sequences dispersed along the phylogenetic tree (Fig. 1).

**Recovery and analysis of partial *pheA1* sequences from metagenomic DNA**

The diversity of single-component PH has rarely been investigated, and no PCR method had yet been proposed to amplify *pheA1* from metagenomic DNA. In this respect, a primer pair was previously described, which targeted the *pheA1* gene in the genome of isolated rhodococci (Sandhu et al. 2009), but in our hands, these primers failed to give a specific product from biosludge DNA. We therefore designed new primers based on alignments of representative *pheA1* genes present in DNA databases (see the “Materials and methods” section). Nevertheless, since none of the primer combinations tested gave products of the expected size on a single-PCR basis, a two-step nested PCR method was implemented, where the second step was carried out with either the PheA1Gr + f2/PheA1Gr + R or the Pheh-3F/

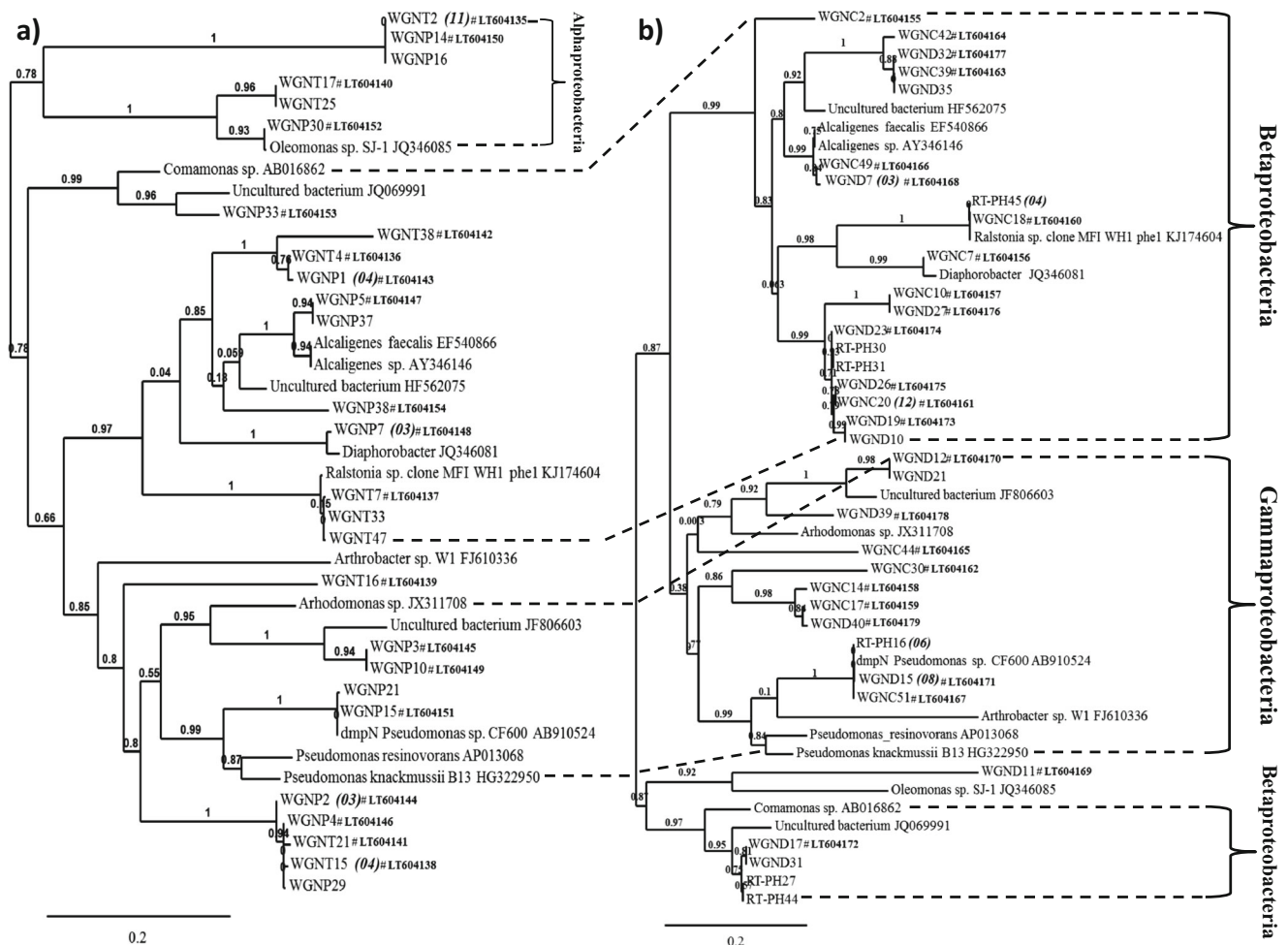
Pheh-3R primer pairs (Sandhu et al. 2009). Using metagenomic DNA from phenol-treated sludge as template, a PCR product of the right size was obtained with both primer pairs. The two PCR products were cloned, and 48 amplicons from each cloning were subjected to DNA sequencing. Results showed that all amplicons analyzed partially matched database sequences annotated as *pheA1* genes, and that the two data sets had a similar sequence content, as judged from comparisons of a gene segment common to both sets (data not shown). This observation suggested that the two PCR approaches targeted the same selection of sequences, each probably reflecting the *pheA1* gene diversity. In later work, the PheA1Gr + f2/PheA1Gr + R primer pair was chosen because it gave a longer PCR product, and the primer sequences of this pair matched a larger range of *pheA1* genes available in GenBank. Using the nested PCR thus defined, four libraries of *pheA1* gene fragments were generated from metagenomic DNA derived from phenol- or methylphenol-treated sludge. After elimination of inappropriate sequences, a total of 145 *pheA1* gene fragments were retained for further analysis. In the four libraries, only a limited number appeared as unique (Table 2). BLAST searches revealed that the majority of these unique sequences best matched *pheA1* genes found in *Actinobacteria*, especially rhodococci. Nevertheless, the degree of identity did not exceed 90% and many of these sequences were similar to putative *pheA1* genes of uncultured bacteria.

A phylogenetic analysis of all unique sequences is shown in Fig. 2. The *pheA1* gene sequences appeared to fall into four

**Table 2** Description of PH gene sequence libraries obtained from microcosms incubated with different C sources

Parameter	Carbon source added			
	None	Phenol	<i>p</i> -Cresol	3,4-DMP
<b>LmPH-type genes</b>				
No. of clones sequenced	48	48	54	42
No. of PH sequences considered <sup>a</sup>	26	26	25	27
No. of unique sequences	8	12	13	12
<b><i>pheA1</i>-type genes</b>				
No. of clones sequenced	48	48	48	48
No. of PH sequences considered <sup>a</sup>	37	34	33	41
No. of unique sequences	5	6	6	5

<sup>a</sup> Sequences retained after elimination of too short or unrelated sequences



**Fig. 1** Phylogenetic trees of partial sequences of LmPH genes from wastewater sludge. Sequences were from untreated and phenol-treated samples (a) or samples amended with *p*-cresol or 3,4-DMP (b). Sequences were from four clone libraries obtained by PCR amplification of a 620-bp fragment of the LmPH gene (see Table 2). Aligned sequences corresponded to amino-acid residues 65–272 of the large subunit of mPHs (numbering refers to the DmpN sequence of *Pseudomonas* CF600). For multiple sequences sharing >99% identity, a number is indicated in parentheses after the sequence designation. For example, WGNC20 (12) means that there were 12 copies almost identical to WGNC20 (12 + 1

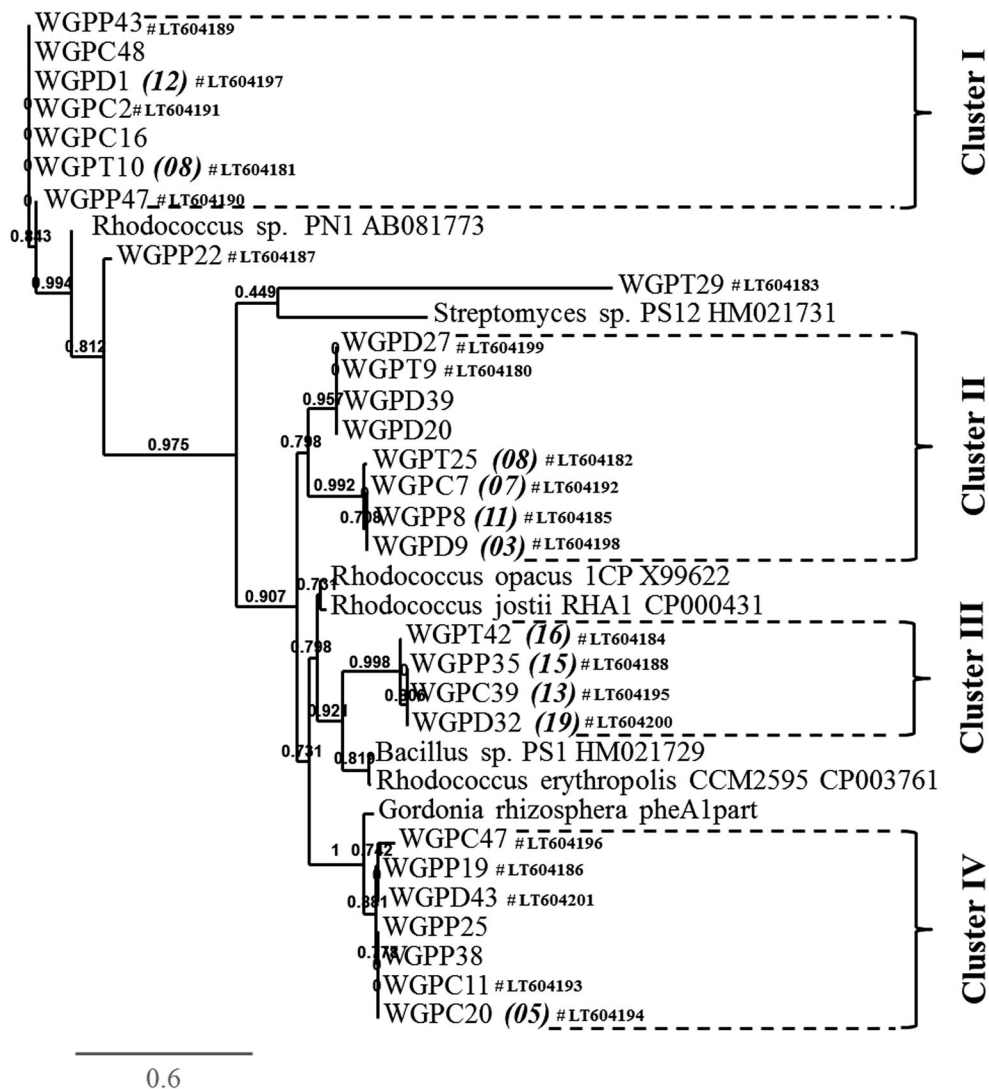
clusters, one cluster being far remote from the other three. The remote set of sequences best matched a nitrophenol hydroxylase (accession no. AB081773), suggesting that it might represent a group of enzymes with distinctive substrate specificities. No group of sequences appeared to be specifically enriched after incubation of sludge with phenol or methylphenols, suggesting that none of these carbon sources did favor the occurrence of a particular group of *pheA1*-containing bacteria.

### In situ detection of phenol hydroxylase messenger RNA in wastewaters

As a means to identify LmPH genes functionary expressed in the wastewater microbiota, we looked for specific messenger RNA (mRNA) transcripts in total RNA extracted from wastewater. To

sequences) in the LmPH sets of genes obtained from the *p*-cresol-treated microcosms. The tree also includes best matching sequences as references, as well as relevant accession numbers. In b, sequences noted as RT-PHxx refer to cDNA obtained by RT-PCR on total RNA from wastewaters. WGNT, WGNP, WGNC, and WGNR refer to the LmPH sequences obtained from untreated, phenol-, *p*-cresol-, and 3,4-DMP-treated wastewater samples, respectively. The branch length is proportional to the number of substitutions per site. The number above the scale bar is the number of substitutions per site

this end, RT-PCR targeting LmPH transcripts was conducted as described in the “Materials and methods” section. A product of the right size was obtained, which was absent in control experiments where the reverse transcriptase was omitted (Fig. S1 in supplementary data). Sequence analysis of 42 clones amplicons revealed that only 19 of them corresponded to LmPH genes, whereas 23 amplicons appeared as copies of a sequence unrelated to LmPH (cloning vector BASIC KP223706), which likely arose from unspecific primer hybridization. Further elimination of three short reads led to a set of 16 sequences, seven of which closely matched the *dmpN* gene from *Pseudomonas* CF600 (Fig. 1b). Five amplicons perfectly matched the LmPH gene of *Ralstonia* sp., and two others were highly related (RT-PH30, RT-PH31; Fig. 1b). These sequences were also very close to the LmPH gene of uncultured member of the Burkholderiales which



**Fig. 2** Phylogenetic tree of partial sequences of *pheA1*-like genes from wastewaters. Sequences were from four clone libraries obtained by PCR amplification of a 780-bp fragment of the *pheA1* gene (see Table 2). For multiple sequences sharing >99% identity, a number is indicated in parentheses after the sequence designation. For example, WGPD1 (12) means that there were 12 copies almost identical to WGPD1 (12 + 1 sequences) in the LmPH sets of genes obtained from the 3,4-DMP-treated microcosms. The analysis showed that sequences fell into four clusters

noted cluster I to IV. The tree includes additional reference sequences chosen as best matches found in DNA databases, as well as relevant accession numbers. WGPT, WGPP, WGPC, and WGPD refer to the *pheA1* sequences obtained from untreated, phenol-, *p*-cresol-, and 3,4-DMP-treated wastewater samples, respectively. The branch length is proportional to the number of substitutions per site. The number above the scale bar is the number of substitutions per site

was recently found to be a predominant phenol degrader in wastewater (Zhang et al. 2015). The last two detected transcripts were from genes close to LmPHs found in uncultured bacteria related to Betaproteobacteria (Fig. 1b).

**Isolation of *p*-cresol and 3,4-DMP degraders**

Microbial samples were taken from microcosms that had been amended with either *p*-cresol or 3,4-DMP and spread on minimal medium containing the same phenolic compound as sole carbon and energy source. Thereby, several bacterial isolates were obtained, seven of which were chosen on each carbon source for further studies. The bacterial isolates were identified

based on determination of their 16S rRNA gene sequence, after PCR amplification of the nearly complete gene (1465 bp) from the genomic DNA. Comparison of these sequences by RFLP analysis revealed that the two groups of seven strains obtained on *p*-cresol and 3,4-DMP each gave three unique profiles. Searches for similar sequences in GenBank using BLAST or in RDP database using SeqMatch showed that all strains belonged to the Proteobacteria, with 2 *p*-cresol-degrading strains affiliated to *Achromobacter* sp. and *Stenotrophomonas* sp. (CS4, CS7) and two 3,4-DMP degraders related to *Brevundimonas* sp. and *Acinetobacter* sp. (DS6 and DS7; Table 3). The last two strains CS5 and DS2, each representing five isolates with almost identical 16S rRNA gene, were closely

**Table 3** Identification and properties of representative strains isolated on *p*-cresol or 3,4-DMP

Isolated strain	Strain identification			Strain properties					
	Genus/species	Accession no. of best match	Identity percent	<i>T</i> (°C)	Carbon sources used for growth				LmPH gene <sup>a</sup>
					Phenol	<i>p</i> -Cresol	3,4-DMP	BTEX	
CS4	<i>Achromobacter</i> sp.	KP996670	99	40	+	+	–	+	I
CS5 (4) <sup>b</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KU682199	100	45	+	+	–	+	II
CS7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	KT748642	99	40	+	+	–	+	ND
DS2 (4) <sup>b</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KU682199	100	45	+	+	+	+	II
DS6	<i>Brevundimonas diminuta</i>	KF453789	99	40	+	+	+	+	ND
DS7	<i>Acinetobacter</i> sp.	GU201827	99	35	+	+	+	+	II

*T* maximum temperature for growth, *BTEX* benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene, *ND* not detected

<sup>a</sup> Roman numbers indicate the group to which the LmPH belongs as deduced from specific PCR (see text)

<sup>b</sup> Numbers in parentheses represent the additional isolates showing the same 16S rRNA sequence as relevant strain

related to *Pseudomonas aeruginosa*. Interestingly, all five *P. aeruginosa* strains isolated on *p*-cresol were able to grow on 3,4-DMP, but not the other two *p*-cresol degraders (strains CS4 and CS7). Based on PCR with group-specific primers, *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* would contain a group-II LmPH, whereas *Achromobacter* would have a group-I LmPH (Table 3; see discussion below for group definition).

## Discussion

The main purpose of this study was to investigate whether or not the catalytic potential of the phenol-degrading bacteria in wastewaters depended on the methylation of phenols available as carbon sources. To this end, we focused on phenol hydroxylases that catalyzed the first step in the degradation pathway. Analysis of sets of LmPH genes recovered from metagenomic DNA provided evidence for a significant diversity shift when bacteria were exposed to methylphenols. On the other hand, no obvious change was observed by comparing sets of *pheA1* gene sequences obtained from phenol- or methylphenol-treated microcosms. These observations suggested that bacteria-degrading methylphenol would contain a LmPH with a substrate specificity different from that present in phenol-degrading bacteria. This is supported by the fact that bacterial isolates selected on *p*-cresol and 3,4-DMP mostly contain a group II LmPH (see discussion below).

PCR approaches targeting essential catabolic genes are valuable tools to assess the biological potential of environmental samples, as illustrated by studies on PAH dioxygenases (Martin et al. 2013) or phenol hydroxylases (Futamata et al. 2001). In the case of PHs, two types of enzyme can be found in bacteria, but, so far, only the diversity of mPHs has been investigated by targeting the LmPH gene

(Futamata et al. 2001). In this work, we present for the first time joint information on both mPHs and sPHs found in the bacterial community of a hydrocarbon-polluted site. Although our analysis took into account a relatively limited number of sequences, the abundance of LmPH sequences appeared to be higher than that of *pheA1* since the proportion of unique sequences was higher (45/104 versus 22/145; Table 2). This observation is consistent with the previous assumption that phenol degraders carrying LmPH are predominant over those carrying *pheA1* in activated sludge (Watanabe et al. 1998).

mPHs have been classified into three groups depending on their relative affinity for substrate, which was measured by the half-saturation constant for the alternate substrate trichloroethylene ( $K_s$ ) (Futamata et al. 2001). Enzymes with low  $K_s$  values were classified as group I, while those with medium and high  $K_s$  were placed in groups II and III, respectively. Corresponding LmPHs could be distinguished based on an internal peptide sequence located between residues 250 and 255 in the *Pseudomonas* CF600 DmpN sequence. This peptide was EQDPDN or EQDPGN in group I and EQHEDN in groups II and III. Analysis of the partial LmPH protein deduced from the sequences described in this study revealed that a majority of them (60/104) did not fit to any group because their relevant peptide sequence showed one or two amino-acid substitutions. The sequences with a single substitution carried a peptide similar to that in group I (EQDPAN), and minor structural changes are expected due to such an amino-acid replacement. Those LmPH sequences, highly represented in our data set (~45%), will be referred to as group I-like below. On the other hand, LmPHs showing two substitutions within the peptide (EQDEAN) presumably display significant differences that might affect enzyme activity. These enzymes will be referred below as unclassified. Whereas group III LmPH sequences were found to be abundant in bacteria from a TCE-



polluted aquifer (Futamata et al. 2001), they were virtually absent in our wastewater samples supplemented with phenols. This is rather unexpected since high concentration of phenols which have been added in microcosms should have favored bacteria containing mPHs with high activity and low affinity (group III). This might be explained by assuming that bacteria containing group I LmPHs were highly predominant in wastewaters. The low occurrence of group III LmPH containing bacteria which might be due to low steady-state level of phenols in wastewaters would not allow them to grow at a level that could be detected in microcosms. This hypothesis is supported by the fact that analysis of untreated microcosms yielded group I or unclassified LmPHs but no group III LmPHs.

The distribution of LmPH sequences in the groups defined above varied widely depending on the exposure of the wastewater bacterial community to (methyl)phenols (Table S1). Untreated and phenol-exposed samples displayed a relatively high content of unclassified sequences (6/26 and 7/26, respectively), but almost none of group II. In contrast, samples exposed to *p*-cresol and 3,4-DMP exhibited a low content of unclassified sequences, but an enrichment in sequences from group II, group I-like, and group I (Table S1). These observations are consistent with the results of our phylogenetic analysis showing a diversity shift of the LmPH sequences mediated by methylphenols. Group II LmPHs, which became abundant in response to 3,4-DMP amendment, are mostly found in *Pseudomonads* such as the archetypal strain CF600 (Powlowski and Shingler 1994). Accordingly, a majority of the strains isolated in this work on 3,4-DMP were identified as *Pseudomonas* sp. (Table 3), and each of them carried a group II LmPH. In a previous study, various *Pseudomonas* species were identified as the main phenol and *p*-cresol degraders in a contaminated river (Heinaru et al. 2000). Among these bacterial isolates, about two thirds appeared to contain a mPH, whereas the last third contained a sPH.

RT-PCR experiments allowed successful identification of LmPH gene transcripts in the complex microbiota of activated sludge, although recovered sequences were somewhat contaminated by transcripts from an unrelated gene. Sequences found were closely related to LmPH genes which became prevalent upon sludge amendment with *p*-cresol and 3,4-DMP. Assuming that the number of cloned sequences somehow reflected the copy number of relevant gene transcripts, our results suggest that LmPH genes associated to *p*-cresol or 3,4-DMP degraders were best expressed in wastewater at the time of sampling. It is inferred that methylphenols were present at higher concentration than phenol in wastewater, perhaps because they are degraded at a slower rate, as shown in studies with bacterial isolated (Djokic et al. 2011).

This work is a first account to the exploration of sPH diversity using a culture-independent approach. We developed a PCR method offering high specificity since amplicons

unrelated to PH genes appeared at very low rate (11%). Most *pheA1* genes obtained had limited similarities with counterparts of cultured bacteria, suggesting that bacterial hosts were mainly unculturable. While our sequences best matched *pheA1* genes from *Rhodococcus* spp., this affiliation should be regarded as tentative since several *Bacillus* strains have been shown to contain genes almost identical to those found in rhodococci (Djokic et al. 2011). Contrary to what was observed for LmPHs, methylphenol amendment did not cause a significant shift in *pheA1* sequence diversity. This might be explained by a lower ability of *pheA1*-carrying bacteria to metabolize alkylphenols. Although such bacteria were found to degrade cresols (Veeranagouda et al. 2009), no bacterial isolate has yet been shown to degrade 3,4-DMP. The apparent absence of selective effect of methylphenols on *pheA1* gene range might also have to do with the concentration of phenolic compounds used as amendments. Perhaps the relative low initial values employed in this study were a too weak signal to favor a specific *pheA1*-containing a bacterial group. Those bacteria are generally Gram-positive and many of them were found to tolerate high concentration of phenol or *p*-cresol (Djokic et al. 2011).

The PCR approaches developed in this study efficiently targeted bacterial PH genes in highly complex microbial systems. They might prove suitable as new tools to monitor the catalytic potential of phenol degrading communities on polluted sites or in facilities used to remove organic pollution. Furthermore, our RT-PCR data prove that it is possible to detect LmPH gene transcripts in wastewater samples, thus giving first insights into the phenol degraders that were active in situ. Future developments will need to implement quantitative methods such as qPCR as means to accurately assess the activity of phenol degraders. A method has already been described for the quantitative estimation of LmPH genes in activated sludge (Basile and Erijman 2008), but no method has yet been proposed to assay *pheA1*-like genes in situ. The implementation of such genetic tools is expected to facilitate the management of bioremediation facilities designed to treat waste containing phenolic compounds.

**Acknowledgements** We thank John C. Willison for the assistance in HPLC analysis. B. Harzallah is grateful to the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for a doctoral fellowship. The authors are grateful to the CNRS and Univ Grenoble Alpes for funding. This work was also supported in part by a grant from the ANR “programme Labex” (ARCANE project no. ANR-11-LABX-003).

## References

- Adav SS, Chen MY, Lee DJ, Ren NQ (2007) Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic granules. *Chemosphere* 67:1566–1572

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Banerjee A, Ghoshal AK (2011) Phenol degradation performance by isolated *Bacillus cereus* immobilized in alginate. *International Biodeter Biodegr* 65:1052–1060. doi:10.1016/j.ibiod.2011.04.011
- Basile LA, Erijman L (2008) Quantitative assessment of phenol hydroxylase diversity in bioreactors using a functional gene analysis. *Appl Microbiol Biot* 78:863–872
- Basile LA, Erijman L (2010) Maintenance of phenol hydroxylase genotypes at high diversity in bioreactors exposed to step increases in phenol loading. *FEMS Microbiol Ecol* 73:336–348. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00898.x
- Cafaro V, Izzo V, Scognamiglio R, Notomista E, Capasso P, Casbarra A, Pucci P, Di Donato A (2004) Phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Appl Environ Microbiol* 70:2211–2219. doi:10.1128/aem.70.4.2211-2219.2004
- Das B, Mandal TK, Patra S (2016) Biodegradation of phenol by a novel diatom BD11ITG-kinetics and biochemical studies. *Intern J Environ Sci Technol* 13:529–542. doi:10.1007/s13762-015-0857-3
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucl acids res* 36(Web Server issue):W465–W469
- DeRito CM, Pumphrey GM, Madsen EL (2005) Use of field-based stable isotope probing to identify adapted populations and track carbon flow through a phenol-degrading soil microbial community. *Appl Environ Microbiol* 71:7858–7865
- Djokic L, Narancic T, Nikodinovic-Runic J, Savic M, Vasiljevic B (2011) Isolation and characterization of four novel Gram-positive bacteria associated with the rhizosphere of two endemorelict plants capable of degrading a broad range of aromatic substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:1227–1238. doi:10.1007/s00253-011-3426-9
- Düffner FM, Müller R (1998) A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes. *FEMS Microbiol Lett* 161:37–45
- Futamata H, Harayama S, Watanabe K (2001) Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 67:4671–4677. doi:10.1128/aem.67.10.4671-4677.2001
- Gisi MR, Xun LY (2003) Characterization of chlorophenol 4-monooxygenase (TfTd) and NADH : flavin adenine dinucleotide oxidoreductase (TfTc) of *Burkholderia cepacia* AC1100. *J Bacteriol* 185:2786–2792. doi:10.1128/jb.185.9.2786-2792-2003
- Gröning JAD, Eulberg D, Tischler D, Kaschabek SR, Schlömann M (2014) Gene redundancy of two-component (chloro)phenol hydroxylases in *Rhodococcus opacus* 1CP. *FEMS Microbiol Lett* 361:68–75
- Harayama S, Kok M, Neidle EL (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Ann Rev Microbiol* 46:565–601. doi:10.1146/annurev.micro.46.1.565
- Heinaru E, Truu J, Stottmeister U, Heinaru A (2000) Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol- and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol Ecol* 31:195–205. doi:10.1016/S0168-6496(99)00095-1
- Kadiyala V, Spain JC (1998) A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of *p*-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. *Appl Environ Microbiol* 64:2479–2484
- Kirchner U, Westphal AH, Müller R, Van Berkel WJ (2003) Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD. *J Biol Chem* 278:47545–47553
- Krivobok S, Kuony S, Meyer C, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y (2003) Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J Bacteriol* 185:3828–3841
- Martin F, Torelli S, Le Paslier D, Barbance A, Martin-Laurent F, Bru D, Geremia R, Blake G, Jouanneau Y (2012) Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene. *Environ Pollut* 162:345–353
- Martin F, Malagnoux L, Violet F, Jakoncic J, Jouanneau Y (2013) Diversity and catalytic potential of PAH-specific ring-hydroxylating dioxygenases from a hydrocarbon-contaminated soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5125–5135. doi:10.1007/s00253-012-4335-2
- Powlowski J, Shingler V (1994) Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation* 5:219–236. doi:10.1007/bf00696461
- Saa L, Jaureguibeitia A, Largo E, Llama MJ, Serra JL (2010) Cloning, purification and characterization of two components of phenol hydroxylase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:201–211. doi:10.1007/s00253-009-2251-x
- Sandhu A, Halverson LJ, Beattie GA (2009) Identification and genetic characterization of phenol-degrading bacteria from leaf microbial community. *Micro Ecol* 57:276–285
- Senthivelan T, Kanagaraj J, Panda R, Mandal A (2014) Biodegradation of phenol by mixed microbial culture: an ecofriendly approach for pollution reduction. *Clean Techn Environ Policy* 16:113–126
- Shingler V (2003) Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environ Microbiol* 5:1226–1241. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00472.x
- Szokoel J, Rucka L, Simcikova M, Halada P, Nesvera J, Patek M (2014) Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8267–8279. doi:10.1007/s00253-014-5881-6
- Tuan NN, Hsieh HC, Lin YW, Huang SL (2011) Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresour Technol* 102:4232–4240
- Veeranagouda Y, Lim EJ, Kim DW, Kim JK, Cho K, Heipieper HJ, Lee K (2009) Formation of specialized aerial architectures by *Rhodococcus* during utilization of vaporized *p*-cresol. *Microbiology-Sgm* 155:3788–3796. doi:10.1099/mic.0.029926-0
- Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, Harayama S (1998) Molecular detection, isolation and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 64:4396–4402
- Watanabe K, Futamata H, Harayama S (2002) Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. *Antonie Van Leeuwenhoek Intern J of Gen and Mol Microbiol* 81:655–663. doi:10.1023/a:1020534328100
- Xenofontos E, Tanase AM, Stoica I, Vyrides I (2016) Newly isolated alkalophilic *Advenella* species bioaugmented in activated sludge for high *p*-cresol removal. *New Biotechnol* 33:305–310. doi:10.1016/j.nbt.2015.11.003
- Zhang D, Berry JP, Zhu D, Wang Y, Chen Y, Jiang B, Huang S, Langford H, Li G, Davison PA, Xu J, Aries E, Huang WE (2015) Magnetic nanoparticle-mediated isolation of functional bacteria in a complex microbial community. *ISME J* 9:603–614. doi:10.1038/ismej.2014.161
- Zhu C, Zhang L, Zhao L (2008) Molecular cloning, genetic organization of gene cluster encoding phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase in *Alcaligenes faecalis* IS-46. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1687–1695

**SUPPLEMENTARY DATA**  
**TO**  
**ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH**

**Bacterial phenol hydroxylases in oil refinery wastewaters: evidence for a diversity shift in relevant gene sequences driven by selection on alkyl-phenols**

Besma Harzallah <sup>a,b,c,d,e</sup>, Hacène Bousseboua <sup>f</sup> and Yves Jouanneau <sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> *CEA, DRF, BIG, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, F-38054 Grenoble, France.*

<sup>b</sup> *CNRS, UMR 5249, F-38054 Grenoble, France.*

<sup>c</sup> *Université Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France.*

<sup>d</sup> *Université des Frères Mentouri, Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, FSNV, BP 325 25117 Constantine, Algérie.*

<sup>e</sup> *Université d'Oum El Bouaghi, Département de Biologie, FSESNV, BP358 04000 Oum El Bouaghi, Algérie.*

<sup>f</sup> *Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologies, BP E66 25100 Constantine, Algérie.*

Running title: Diversity of bacterial phenol hydroxylases

*\*Corresponding author:*

*Yves Jouanneau*

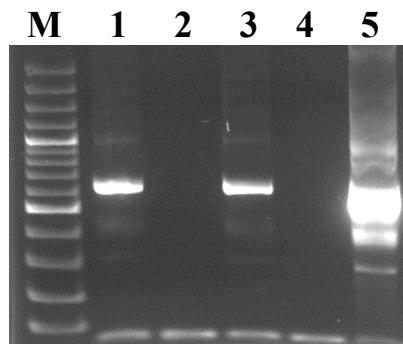
*LCBM/BIG, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble Cedex 9, France.*

*Tel: 33 (0)4 38 78 43 10; Fax: 33 (0)4 38 78 54 87. Email: [yves.jouanneau@cea.fr](mailto:yves.jouanneau@cea.fr)*

**Table S1:** Influence of methylphenol amendment on the distribution of LmPH sequences in functional groups.

Functional group	Carbon source added			
	none	phenol	<i>p</i> -cresol	3,4-DMP
<b>Group I</b>	5	4	2	12
<b>Group I-like</b>	14	11	16	4
<b>Group II</b>	1 <sup>a</sup>	2	3 + 1 <sup>a</sup>	9
<b>Unclassified</b>	6	7	2	0

<sup>a</sup> Sequences included in group II except relevant peptide showed one substitution compared to canonical sequence (EQHPDN).



**Figure S1:** End-point RT-PCR of LmPH from wastewaters samples: Lanes 1 and 3 – wastewaters cDNA (with RT\*); Lanes 2 and 4 – negative control: wastewaters cDNA (without RT\*); Lane 5 – positive control: wastewaters metagenomic DNA.

\*: reverse transcriptase.

Nom : <b>HARZALLAH</b>	Diplôme : <b>Doctorat en Sciences</b>
Prénom : <b>Besma</b>	Date de soutenance : <b>11/07/2018</b>
<b>Titre : Étude de la biodégradation de composés phénoliques par le microbiote des effluents de la raffinerie de pétrole de Skikda. Caractérisation moléculaire des bactéries et du processus enzymatique mis en œuvre.</b>	
<p><b>Résumé</b></p> <p>Cette étude a été réalisée pour évaluer la capacité des microorganismes présents dans les eaux usées d'une raffinerie de pétrole (Sonatrach, Skikda / Algérie) à dégrader les (alkyl)phénols ; Une collection de souches bactériennes a été obtenue dont certaines peuvent également dégrader d'autres composés aromatiques (BTEX, HAP et autres phénols substitués). Sur la base des séquences de gènes d'ARNr 16S, les isolats étaient principalement affiliés aux genres suivants : <i>Achromobacter</i>, <i>Aeromonas</i>, <i>Bacillus</i>, <i>Brevibacillus</i>, <i>Brevibacterium</i>, <i>Brevundimonas</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Escherichia</i>, <i>Kocuria</i>, <i>Macrococcus</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Rhizobium</i> et <i>Serratia</i>. Les expériences cinétiques ont montré que deux souches appartenant au genre <i>Kocuria</i> et <i>Macrococcus</i> présentaient le taux de dégradation du phénol le plus élevé. Pour la plupart des souches, la croissance et la biodégradation ont été inhibées à des concentrations de phénol supérieures à 0,2g.l<sup>-1</sup> sauf pour quatre isolats capables de tolérer et de croître sur phénol ou <i>p</i>-crésol jusqu'à 1g.l<sup>-1</sup>. Sur ces quatre souches, deux appartenaient au genre <i>Bacillus</i>, une au genre <i>Comamonas</i> et la dernière au genre <i>Lysinibacillus</i>. Les souches de <i>Bacillus</i> et <i>Lysinibacillus</i> ont montré un potentiel prometteur pour les applications biotechnologiques en raison de leur grande tolérance et de leur dégradation rapide des alkylphénols. D'autre part, les approches moléculaires ont été utilisées pour explorer le potentiel de dégradation des bactéries des eaux usées lors de l'incubation dans des microcosmes avec du phénol, du <i>p</i>-crésol ou du 3,4-diméthylphénol. Le suivi du CO<sub>2</sub> libéré dans la phase gazeuse par GC/MS a indiqué que les trois substrats étaient rapidement minéralisés. Pour analyser les changements de diversité microbiologique induits par le phénol, le <i>p</i>-crésol ou le 3,4-diméthylphénol, l'ADN métagénomique a été extrait des échantillons d'eaux usées incubées avec chacun de ces composants. Pour chaque famille de phénol hydroxylase (LmPH et <i>pheA1</i>), des ensembles d'amorces ont été utilisés pour amplifier par PCR des gènes codant pour la grande sous-unité de cette enzyme. Après clonage et séquençage des fragments de gènes obtenus, l'analyse de séquence a révélé que la diversité des hydroxylases observées dépendait de l'alkylphénol fourni sous forme de source de carbone. Les résultats suggèrent que les bactéries appartenant au groupe des <i>Actinobacteria</i>, des <i>Betaproteobacteria</i> et des <i>Gammaproteobacteria</i> contribuent majoritairement à la biodégradation. Beaucoup de séquences de PH ne sont pas apparentées à celles de bactéries connues, ce qui laisse suggérer que la dégradation des (alkyl)phénols <i>in situ</i> a été principalement réalisée par des bactéries encore non cultivables.</p> <p>Les résultats obtenus et les outils mis au point dans cette étude pourront servir à développer des méthodes de diagnostic et de suivi de la biodégradation de polluants, par exemple dans le cadre d'opérations de bioremédiation de sites pollués par les phénols.</p> <p><b>Mots-clés</b> : biodégradation ; pollution des eaux ; alkylphénols ; phénol hydroxylase ; LmPH et <i>pheA1</i>.</p>	