

Université de Montréal

Isolement et étude d'une souche bactérienne transformant le  
phénol en benzoate en conditions anaérobies

par

Jaroslav Letowski

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en microbiologie

Février 2000

©Jaroslav Letowski, 2000



W  
4  
U58  
2000  
v. 027

Université de Montréal

Isolément et étude d'une souche bactérienne transformant le  
phéno en benzoin en conditions anaérobies

par

Jacques Lefebvre

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophie Doctor (Ph.D.)  
en microbiologie



Février 2000

Jacques Lefebvre, 2000

## Page d'identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Isolement et étude d'une souche bactérienne transformant le  
phénol en benzoate en conditions anaérobies

présentée par  
Jaroslaw Letowski

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur: Max Drouot  
Directeur de recherche: Jean-Hugues Bissuel  
Membre du jury: François Shareek  
Examinateur externe: André-Martin  
Représentant du doyen de la FES: Patrick Allan Cook

Thèse acceptée le: ..... 9 juin 2000 .....

## Sommaire

À chaque instant à travers le monde, des composés dits polluants sont relâchés dans la nature comme conséquence des activités humaines. Parmi eux, le groupe des composés phénoliques simples (phénol, crésols et chlorophénols) occupe une place importante à cause de leur solubilité dans l'eau relativement élevée, de leur forte toxicité et de leur caractère récalcitrant. Le phénol est le composé le plus simple dans ce groupe. Il se retrouve à des concentrations importantes dans les effluents des industries chimiques, pharmaceutiques, de raffineries de pétrole et quelques autres.

Le but initial du présent projet était l'étude de la souche 6 de Li *et al.* [1996] en croyant qu'elle était pure et qu'elle était responsable de la transformation du phénol en benzoate. Étant donné qu'il n'y avait pas de corrélation étroite entre la croissance de la souche 6 de Li *et al.* [1996] et l'activité de transformation du phénol, nous nous sommes interrogés sur l'implication de cette souche dans cette transformation. À la suite d'un changement des conditions de culture, nous avons observé une deuxième forme bactérienne qui n'avait pas été détectée initialement. Il ne s'agissait pas de spores de la souche 6 et cette nouvelle bactérie a été nommée souche 7. La souche 6 a été purifiée par passages sur milieux solides alors que la souche 7 a été débarrassée de la souche 6 par enrichissement sur gradient de densité et par dilution. La souche 7 effectue la transformation du



phénol et la souche 6 fournirait un élément essentiel à cette transformation. Même si la croissance de la souche 7 reste lente et faible, elle est plus facile et plus stable lorsque le phénol est remplacé par le 4-hydroxybenzoate dans le milieu. Celui-ci est alors décarboxylé en phénol avant d'être recarboxylé et déhydroxylé pour former finalement du benzoate.

La comparaison de la séquence ribosomale de la souche 7 avec les séquences connues indique qu'elle appartient à une nouvelle espèce bactérienne. Elle est le plus apparentée à certaines bactéries qui n'ont jamais été isolées en culture pure. Phylogénétiquement, la souche 7 est aussi apparentée, mais à un degré moindre, aux genres *Desulfotomaculum*, *Desulfitobacterium* et *Sporotomaculum*. Toutefois, le sulfate, le sulfite, le thiosulfate, le nitrate et le fer (III) ne sont pas les accepteurs terminaux d'électrons utilisés par la souche 7 ce qui suggère qu'elle fait probablement partie d'un nouveau genre.

À deux reprises des colonies ont pu être obtenues en milieu semi-solide. Les cultures issues de ces colonies avaient perdu temporairement l'activité de carboxylation/décarboxylation. Seule la déhydroxylation était alors observée. L'ensemble des activités a été retrouvé par la suite. Il semble y avoir une corrélation entre la perte de l'activité et de la détection de la souche 7 par PCR. Il n'est pas complètement claire si ce que nous appelons la souche 7 est une culture pure ou une coculture constituée de deux bactéries très proches génétiquement.

# Table des matières

Identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xv
Liste des sigles et abréviations.....	xvi
Dédicace.....	xvii
Remerciements.....	xviii
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Composés aromatiques.....</b>	<b>9</b>
2.1.1. Structure et importance environnementale des composés aromatiques .....	9
2.1.2. Phénol - ses propriétés et son importance .....	10
<b>2.2. Dégradation des composés aromatiques en conditions aérobies .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies .....</b>	<b>15</b>
2.3.1. Stratégies générales de dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies .....	16

2.3.2. Métabolisme de la dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies .....	21
2.3.2.1. Le photométabolisme .....	23
2.3.2.2. Dénitrification .....	25
2.3.2.3. Réduction du fer et du manganèse.....	25
2.3.2.4. Réduction des sulfates.....	26
2.3.2.5. Dynamique microbienne dans un consortium de bactéries sulfatoréductrices.....	29
2.3.2.6. Fermentation et méthanogénèse .....	30
2.3.2.7. Dynamique microbienne dans un consortium méthanogène.....	34
2.3.2.8. Coexistence des bactéries méthanogènes et sulfatoréductrices.....	40
2.3.2.9. Régimes métaboliques mineurs.....	41
<b>2.4. Dégradation du phénol.....</b>	<b>42</b>
<b>2.5. Importance de l'étude de la diversité microbienne .....</b>	<b>57</b>
2.5.1. Différents types d'interactions microbiennes à l'intérieur d'une communauté.....	59
2.5.2. Identification phylogénétique de micro-organismes .....	63
2.5.3. Liens phylogéniques des bactéries sulfatoréductrices .....	65

<b>3. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>67</b>
<b>3.1. Micro-organismes utilisés et conditions de culture.....</b>	<b>68</b>
<b>3.2. Culture en présence des bactéries méthanogènes .....</b>	<b>71</b>
<b>3.3. Suivi bactérien.....</b>	<b>72</b>
<b>3.4. Coloration au vert de malachite .....</b>	<b>74</b>
<b>3.5. Microscopie électronique .....</b>	<b>74</b>
<b>3.6. Enrichissement des bactéries .....</b>	<b>75</b>
<b>3.7. Isolement de la souche 6 et de la souche 7 .....</b>	<b>76</b>
<b>3.8. Culture en conditions sulfatoréductrices.....</b>	<b>78</b>
<b>3.9. Analyse des composés aromatiques.....</b>	<b>79</b>
<b>3.10. Détermination du H<sub>2</sub>S .....</b>	<b>80</b>
<b>3.11. Détermination du SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> .....</b>	<b>81</b>
<b>3.12. Détermination du SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> .....</b>	<b>82</b>
<b>3.13. Extraction de l'ADN génomique total.....</b>	<b>84</b>
<b>3.14. Extraction plasmidique .....</b>	<b>85</b>
<b>3.15. Clonage du gène de l'ARNr 16S de la souche 7 et étude phylogénétique.</b>	
.....	<b>86</b>
<b>3.16. Identification des souches par RFLP ("Restriction Fragments Length</b>	
<b>Polymorphism").....</b>	<b>89</b>

3.17. Détection des souches par PCR spécifique .....	90
3.18. Détection du gène de la 4-hydroxybenzoate décarboxylase .....	91
4. RÉSULTATS.....	94
4.1. Croissance et activité de la culture de Li et al. [1996] .....	95
4.2. Présence de la souche 7 dans la coculture .....	103
4.3. Purification de la souche 6 et de la souche 7 .....	105
4.4. Activité et croissance des populations enrichies et des souches purifiées .....	109
4.5. Clonage du gène de la sous-unité 16S de l'ARNr et analyse phylogénétique de la souche 7.....	115
4.6. Détection de la présence des souches 6 et 7 .....	120
4.7. Détection du gène de la 4-hydroxybenzoate décarboxylase avec la sonde génomique.....	124
4.8. Obtention de colonies en géloses profondes et analyse de leur activité...	125
5. DISCUSSION.....	128
5.1. Transformation du phénol par la culture de la souche 6 de Li et al. [1996] et sa pureté.....	129

<b>5.2. Isolement des souches 6 et 7 et leurs rôles dans la transformation du phénol.....</b>	<b>132</b>
<b>5.3. Identification partielle de la souche 7 .....</b>	<b>140</b>
<b>5.4. Pureté de la souche 7 .....</b>	<b>142</b>
<b>6. CONCLUSION.....</b>	<b>146</b>
<b>7. RÉFÉRENCES.....</b>	<b>148</b>

## Liste des figures

Fig. 1: Structure chimique de la molécule de phénol.....	11
Fig. 2: Exemples des composés dont la dégradation mène au phénol.....	13
Fig. 3: Composés centraux de la dégradation aérobie.....	15
Fig. 4: Intermédiaires centraux de la dégradation anaérobie.....	18
Fig. 5: Implication de 4-hydroxybenzoyl-CoA en tant qu'intermédiaire central dans la dégradation de différents composés phénoliques (modifié d'après Brackmann et Fuchs, 1993).....	19
Fig. 6: Stratégie générale de biodégradation des composés aromatiques en anaérobiose (modifié d'après Fuchs <i>et al.</i> , 1994).....	20
Fig. 7: Hiérarchie de la succession des principaux régimes d'accepteurs d'électrons dans les habitats naturels (modifié d'après Zehnder et Stumm, 1988).....	22
Fig. 8: Voie métabolique de la dégradation du benzoate qui mène à la fission du cycle par le photométabolisme chez <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (d'après Dutton et Evans, 1969).....	24

Fig. 9: Voie simplifiée de réduction des sulfates.....	28
Fig. 10: Différents groupes microbiens impliqués dans la fermentation sulfidogène (modifié d'après Schink, 1997).....	31
Fig. 11: Différents groupes microbiens impliqués dans la fermentation méthanogène (modifié d'après Zehnder, 1981).....	36
Fig. 12: Dégradation du phénol par la voie réductrice proposée par Evans (1977).....	43
Fig. 13: La voie métabolique de dégradation du phénol par la souche <i>Thauera aromatica</i> (modifié d'après Lack et Fuchs, 1994).....	48
Fig. 14: Dégradation du phénol par <i>Clostridium hydroxybenzoicum</i> , par la souche GS-15 et par la culture de Li <i>et al.</i> .....	49
Fig. 15: Les intermédiaires possibles lors de la dégradation du phénol par la voie métabolique impliquant la carboxylation, tels que retrouvés chez plusieurs consortia méthanogènes.....	53
Fig. 16: Phylogénie des bactéries sulfatoréductrices (tiré de Devereux <i>et al.</i> 1989).....	66



Fig. 17: Effet du milieu BHI et de différentes concentrations de protéose peptone dans le milieu de Boyd sur la croissance de la culture de Li <i>et al.</i> [1996] et sur l'activité de carboxylation de phénol. ....	96
Fig. 18: Dégradation du phénol selon la présence de protéose peptone et de différentes concentrations de 21 acides aminés. ....	97
Fig. 19: La croissance de la culture de Li <i>et al.</i> [1996] et l'activité de transformation du phénol selon les différentes concentrations de phénol dans le milieu de Boyd contenant 5 % (p/v) de protéose peptone. ....	99
Fig. 20: Dégradation du phénol en présence de différents accepteurs terminaux d'électrons potentiels. ....	100
Fig. 21: Effet de certains mélanges d'acides aminés sur la croissance de la culture de Li <i>et al.</i> [1996]. ....	101
Fig. 22: Effet de la concentration du Na <sub>2</sub> S sur la dégradation du phénol. ....	102
Fig. 23: Observation de la souche 7 par microscopie électronique avec coloration négative (grossissement de 36 000 ×). ....	105
Fig. 24: Région de la paroi et de la membrane cellulaire de la souche 7 vue en coupe mince. ....	106

Fig. 25: Enrichissement des souches 6 et 7 de la coculture originale. ....	107
Fig. 26: Colonies en gélose profonde vues à travers le verre du tube sous la loupe stéréoscopique. ....	109
Fig. 27: Activité de transformation du phénol et croissance des souches dans les cultures enrichies.. ....	110
Fig. 28: Activité de carboxylation du phénol par les cultures purifiées et réassociées.. ....	111
Fig. 29: Évolution de la souche 7 vis-à-vis de la capacité à dégrader le phénol dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone..	113
Fig. 30: Transformation du 4-OHB par la souche 7.....	115
Fig. 31: Cartographie du gène de la sous-unité 16S de l'ARNr de la souche 7 amplifié par PCR avec les amorces universelles, cloné dans le vecteur pBluescript et la stratégie de sous-clonage des fragments plus petits en vue de séquencer le gène complet. ....	116
Fig. 32: Séquence du gène de la sous-unité 16S de l'ARNr de la souche 7 (1529 bp) déposée à Genbank sous le numéro AF072863.. ....	117

Fig. 33: Arbre de distances évolutives montrant la position relative de la souche 7 par rapport aux micro-organismes connus les plus apparentés sur la base de leur séquence du gène de la sous-unité 16S de l'ARNr. ....	118
Fig. 34: Détection de produit de PCR spécifique pour la souche 7. ....	121
Fig. 35: Migration de l'ADN amplifié par PCR sur un gel d'agarose 1,9 % (p/v).....	122
Fig. 36: Amplification par PCR, avec les amorces spécifiques à la souche 7, avec l'appariement des amorces à 55°C et 50°C.....	123
Fig. 37: Détection du gène codant pour la carboxylase/décarboxylase. ....	125
Fig. 38: Produit de PCR sur l'ADN extrait de cultures (avec 4-OHB) obtenues à partir de colonies isolées.....	127

## Liste des tableaux

Tableau 1: Les substrats utilisés par différentes bactéries méthanogènes.....35

## Liste des sigles et abréviations

4-OHB	4-hydroxybenzoate
BESA	acide 2-bromoéthano-sulfonique
bp	paires de bases
BPC	biphényles polychlorés
CoA	coenzyme A
EPA	Environmental Protection Agency
HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques
kb	kilopaires de bases
PCR	polymerase chain reaction
ppm	parties par million
SRB	bactéries sulfatoréductrices

*ce travail est dédié à mes parents*

*Je tiens à remercier  
mon directeur de recherche Jean-Guy Bisillon,  
de m'avoir donné sa confiance, ses nombreux conseils et  
son support aussi bien scientifique que personnel, une  
équipe formidable: Louis Racine, Philippe-Antoine  
Ménard, Li Tong, Valérie Rateau, Pierre  
Juteau, Marie-France Duckett et Marco  
Lainesse, ainsi que l'ensemble du groupe de recherche  
pour une atmosphère agréable, remplie de conseils et de  
blagues.*

*Je réserve, un remerciement  
tout particulier à Lilitiana, pour sa patience et pour son  
support. Merci Lili*

# **Introduction**



Depuis les débuts de la chimie organique, l'Homme a créé par la synthèse chimique au-delà d'un million de composés xénobiotiques qui n'existaient pas auparavant dans la nature. Un bon nombre de ces composés étant fortement toxiques et très stables dans l'environnement ont été qualifiés de "polluants". Mais les polluants ne sont pas tous créés par l'Homme. Plusieurs composés dits polluants, tels que les constituants du pétrole, ont été formés par des activités biologiques survenant naturellement. D'une façon très générale, nous pouvons dire que la pollution est une situation dans laquelle un ou plusieurs composés toxiques ou persistants se retrouvent dans l'environnement à des concentrations élevées. Les composés organiques polluants, aussi bien xénobiotiques que naturels, sont aujourd'hui omniprésents. On les retrouve dans l'air, dans l'eau, dans le sol et à travers la chaîne alimentaire [Allen et Allen, 1997; Leuenberger *et al.*, 1985; Montizaan, 1994]. Cette situation est en bonne partie due à l'activité humaine et aux industries. Il est donc compréhensible que la conservation de notre environnement et la remédiation des problèmes environnementaux déjà existants soit une préoccupation de plus en plus importante.

Parmi les différents composés préoccupants vis-à-vis de la conservation de l'environnement, le phénol occupe une place importante. Il fait partie du groupe de composés le plus produit en Amérique du Nord [Webber, 1984] et c'est un

polluant fortement toxique et dangereux [EPA, 1998; Montizaan, 1994; Zhou et Fang, 1997].

Les problèmes de pollution nous incitent à contrôler les émissions et à détruire les polluants déjà présents dans la nature. Dans l'assainissement de l'environnement souillé par les composés anthropogènes, plusieurs options, avec des efficacités qui diffèrent, sont disponibles. D'une façon générale, trois catégories d'approches peuvent être utilisées: les approches physiques, chimiques et biologiques.

À l'exception de l'incinération, les approches physiques et chimiques, telles que l'extraction par solvants, la filtration, la solidification-stabilisation (ex. par le charbon activé), le lavage des sols, l'encapsulation (ex. stockage sous forme concentrée), la désorption thermique, l'électro-osmose, la transformation chimique [Nowatzki *et al.*, 1994; Samson, 1997a, 1997b], même si populaires parmi les ingénieurs, le plus souvent ne détruisent pas les contaminants. Plutôt, ces méthodes concentrent le problème et l'isolent de l'environnement. Dans d'autres cas les composés sont partiellement transformés, mais restent à l'étape organique (pas de minéralisation complète) [Bouwer et Zehnder, 1993]. D'autre part, les technologies physiques et chimiques sont relativement chères. En 1997, les coûts de la restauration utilisant ces technologies variaient entre 60 et 1000 \$/tonne, comparativement aux procédés biologiques qui en coûtaient entre 40 et 150 \$/tonne [Deschênes, 1998].

De son côté, la bioremédiation, qui utilise les micro-organismes, offre une alternative avantageuse. Non seulement les technologies biologiques peuvent être moins chères, mais aussi elles sont généralement plus acceptées par la société qui les considère “plus propres” [Deschênes, 1998]. Dans la majorité des cas, si le composé organique est biodisponible et biodégradable, il sera minéralisé complètement par les différents groupes bactériens.

Parmi les technologies de bioremédiation disponibles, les procédés utilisant des micro-organismes anaérobies offrent un potentiel intéressant. Bien que plus complexes au niveau microbiologique [Ceccanti *et al.*, 1993; Zinder, 1984], les procédés de bioremédiation anaérobie possèdent des avantages économiques non négligeables vis-à-vis des procédés aérobie. La quantité de boues (biomasse) produite est moindre, les boues sont mieux stabilisées (en absence d’oxygène, ne sont plus transformées par les micro-organismes), la demande énergétique est plus faible (l’oxygénation n’est pas nécessaire) et le méthane produit est un combustible à haute valeur énergétique [Samson, 1993, 1997, 1997a, 1997b; Switzenbaum, 1983; Vigneswaran *et al.*, 1986].

Par rapport aux mécanismes microbiens impliqués dans la dégradation des composés aromatiques en conditions aérobie, les mécanismes microbiens en anaérobiose sont moins connus [Ceccanti *et al.*, 1993]. Les micro-organismes anaérobies sont généralement plus spécialisés et agissent fréquemment en

consortiums complexes. La faible connaissance de leurs exigences physiologiques et l'étroite interdépendance des espèces impliquées au niveau des communautés bactériennes expliquent les difficultés rencontrées par les chercheurs à les isoler en souches pures et à les étudier [Berry *et al.*, 1987; Evans, 1977, Evans et Fuchs, 1988; Fuchs *et al.*, 1994; Schink, 1997].

La dégradation du phénol en conditions anaérobies, impliquant divers groupes métaboliques de bactéries organisés en consortiums, a été démontrée par plusieurs auteurs [Beaudet *et al.*, 1986; Knoll et Winter, 1989; Kobayashi *et al.*, 1989; Londry et Fedorak, 1992; Sharak Genthner *et al.*, 1989; Young, 1985]. La dégradation du phénol a été étudiée chez la bactérie dénitrifiante *Thauera aromatica* (appelée initialement *Pseudomonas* sp. K172 [Anders, 1995]) [Dangel *et al.*, 1991; Glöckler *et al.*, 1989; Heider *et al.*, 1998; Lack et Fuchs, 1992; Tschsch et Fuchs, 1987], chez les bactéries sulfatoréductrices telles que *Desulfobacter phenolicum*, *Desulfobacterium anilini* et *Desulfotomaculum* sp. souche Groll [Bak et Widdel, 1986; Londry *et al.*, 1997; Schnell et Schink, 1991], et chez les bactéries réductrices du fer (souche GS-15) [Lovley et Lonergan, 1990]. Toutefois, même si plusieurs chercheurs ont essayé de purifier les souches responsables de la carboxylation du phénol en conditions méthanogènes, à notre connaissance aucun n'y est parvenu. Li *et al.* [1996] ont annoncé l'isolement d'une souche de type *Clostridium* capable d'une telle carboxylation. Le seul cas

qui s'y approche est l'isolement de *Clostridium hydroxybenzoicum* à partir des sédiments d'un lac d'eau douce [Zhang *et al.*, 1994]. Cette souche décarboxyle le 4-OHB en culture, mais la carboxylation du phénol est possible uniquement avec les cellules immobilisées en présence de forte concentration de ce dernier.

Dans ce travail, nous présentons les résultats sur l'étude physiologique de la coculture obtenue par Li *et al.* [1996] composée de deux bactéries (la souche 6 et la souche 7) et sur l'isolement et la caractérisation de la souche 7. Les deux bactéries sont impliquées dans la transformation du phénol en acide benzoïque en conditions strictement anaérobies.

L'intérêt de ce travail ainsi que son originalité sont basés sur le fait que c'est la première fois qu'une souche métaboliquement active (souche 7), capable de carboxyler le phénol en acide benzoïque a été isolée d'un consortium méthanogène. Cette souche appartient à une nouvelle espèce bactérienne et la caractérisation initiale indique qu'il s'agit fort probablement d'un nouveau genre. Étant donné que seulement les cultures dans lesquelles on peut détecter la souche 7 carboxylent le phénol, nous croyons que, dans le consortium d'origine, c'est la souche 7 qui était responsable de l'initiation (première étape) du processus de biodégradation du phénol conduisant à sa minéralisation complète en méthane et dioxyde de carbone [Bécharde *et al.*, 1990; Bisailon *et al.*, 1991, 1993, 1994]. Cette capacité pourrait être probablement mise à profit dans un système appliqué à

la bioremédiation. D'autre part, il existe de l'intérêt pour l'utilisation de l'enzyme phénol carboxylase dans la synthèse chimique du 4-OHB pour remplacer la réaction de Kolbe-Schmitt qui produit un mélange des isomères 2-OHB, 3-OHB et 4-OHB [Aresta, 1998]. Finalement, nous sommes du même avis que Carl Woese [1999] lorsqu'il dit: *“Si nous voulons comprendre cette machine organique, notre biosphère, nous devons porter plus d'attention à la diversité microbienne... tous les “joueurs majeurs” de l'environnement global doivent être découverts et phylogénétiquement caractérisés.”*

Pour bien mener à terme un processus de bioremédiation, pour pouvoir tirer un maximum de ces ouvrières de la biorestauration que sont les bactéries, ou pour les utiliser dans des procédés de synthèse avec un rendement élevé, il est essentiel de mieux les comprendre. Les paramètres permettant une utilisation optimale de ces bactéries doivent être identifiés et les interactions entre les micro-organismes dans leur milieu doivent être précisées. C'est dans cet esprit que nous avons entrepris d'isoler et d'étudier la souche responsable de la carboxylation du phénol en 4-hydroxybenzoate dans la coculture.

# **Revue de littérature**

## 2.1. Composés aromatiques

### 2.1.1. Structure et importance environnementale des composés aromatiques

Les composés dits aromatiques sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques, appelés également les noyaux aromatiques ou radicaux aryles. D'une façon générale nous pouvons dire que le caractère aromatique est synonyme d'une grande stabilité chimique des composés possédant cette structure. Ils forment le deuxième plus grand groupe de produits naturels auquel s'ajoutent des milliers de composés xénobiotiques synthétisés par l'Homme. Les composés tels que les phénols, les HAP, les BPC, le toluène et les xylènes font tous partie des composés aromatiques, pour en nommer que quelques exemples. Plusieurs sont considérés comme polluants prioritaires par l'EPA (*Environmental Protection Agency*). [Arnaud, 1980; Evans, 1977; Fuchs *et al.*, 1994; Karrer, 1947; Sleat et Robinson, 1984].

Une grande variété de composés aromatiques sont impliqués dans les processus biologiques de la biosynthèse et de la biodégradation formant ainsi un chaînon important du cycle du carbone. Ils sont abondants dans le pétrole, dans les dépôts de charbon, dans la tourbe, dans le sol et dans les sédiments aquatiques. Les acides



aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) entrent dans la composition des protéines.

### **2.1.2. Phénol - ses propriétés et son importance**

Le phénol est un composé aromatique (Fig. 1). À une température inférieure à 43°C il apparaît sous la forme cristalline et est relativement soluble dans l'eau. Il a été découvert par Runge en 1834 dans le goudron provenant de la houille. Mais c'est en 1842 que la vraie composition chimique et son poids moléculaire de 94,11 g.mol<sup>-1</sup> ont été donnés par le chimiste français Auguste Laurent [EPA, 1998; Karrer, 1947; Montizaan, 1994]. En tant que groupe, à l'état naturel, la majorité des composés phénoliques est d'origine végétale et comprend les composés phénoliques simples comme par exemple le salicilate, le gallate, l'hydroxyquinone, le protocatéchuate, le catéchol, le benzoate et les arômes ainsi que des composés phénoliques polymères tels que les lignines, les flavonoïdes, les mélanines, les tannins et quelques autres. Au total, quelques milliers de phénols produits par les plantes ont été identifiés [Harborne, 1980; Sleat et Robinson, 1984; Strack, 1997]. Industriellement, le phénol est un composé important. Par exemple, il appartient aux 50 composés chimiques les plus produits aux États-Unis avec une production annuelle de 1.2 milliard de kilogrammes [Webber, 1984]. Il est utilisé dans la fabrication des antioxydants, des herbicides, des développeurs de photos, des adhésifs, des résines synthétiques pour les matériaux de construction et des

peintures. Des utilisations en médecine et dans la production pharmaceutique ont été rapportées [Allen et Allen, 1997; Montizaan, 1994; Zhou et Fang, 1997]. Les eaux usées de ces industries contiennent habituellement des concentrations élevées de phénol, de l'ordre de 10 à 10 000 mg.l<sup>-1</sup> [Neufeld *et al.*, 1980]. D'autres sources de phénol dans la nature sont le traitement du bois, les raffineries de pétrole, le traitement, la conversion et la combustion du charbon, les émanations des voitures, la combustion du bois, l'industrie métallurgique, l'élevage porcin et la photo-dégradation du benzène dans l'atmosphère [Allen et Allen, 1997; Antoine *et al.*, 1997; Beaudet *et al.*, 1986; Montizaan, 1994; Zhou et Fang, 1997].

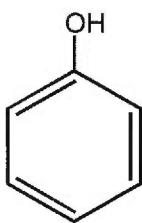


Fig. 1: Structure chimique de la molécule de phénol.

Sur le plan médical, le phénol est un produit dangereux. Chez l'humain, le phénol peut être absorbé à travers la peau, par les voies respiratoires ou par ingestion. Selon la concentration et le mode d'exposition au phénol, les effets observés

peuvent aller de la simple irritation de la peau, au vertige, aux complications neurotoxiques, aux dommages au foie et aux reins, aux brûlures et aux nécroses, à l'arythmie cardiaque, au choc cardio-vasculaire, au coma, à l'anorexie, aux problèmes respiratoires, et même à la mort. À cause de cette importance vis-à-vis de la santé publique, de l'environnement et des industries, le phénol a été désigné en tant que polluant prioritaire par l'EPA et il est soumis à des normes environnementales très strictes [EPA, 1998; Montizaan, 1994; Zenz, 1988].

D'autre part, le phénol peut être considéré comme un composé carrefour, puisqu'il est un intermédiaire dans la dégradation de plusieurs composés aromatiques (Fig. 2) [Cerniglia, 1992; Evans et Fuchs, 1988; Fuchs *et al.*, 1994; Grbic-Galic et Vogel, 1987; Juteau *et al.*, 1995; Londry et Fedorak, 1992; Montizaan, 1994].

## **2.2. Dégradation des composés aromatiques en conditions aérobies**

Quand un composé possède une structure chimique qui peut être attaquée par des enzymes et transformée pour donner une molécule plus simple, on dit qu'il est biodégradable. Les micro-organismes qui sont capables de les transformer peuvent le faire par trois approches générales: par la respiration aérobie, par la respiration anaérobie ou par la fermentation [Evans, 1977, 1988; Fuchs *et al.*, 1994].

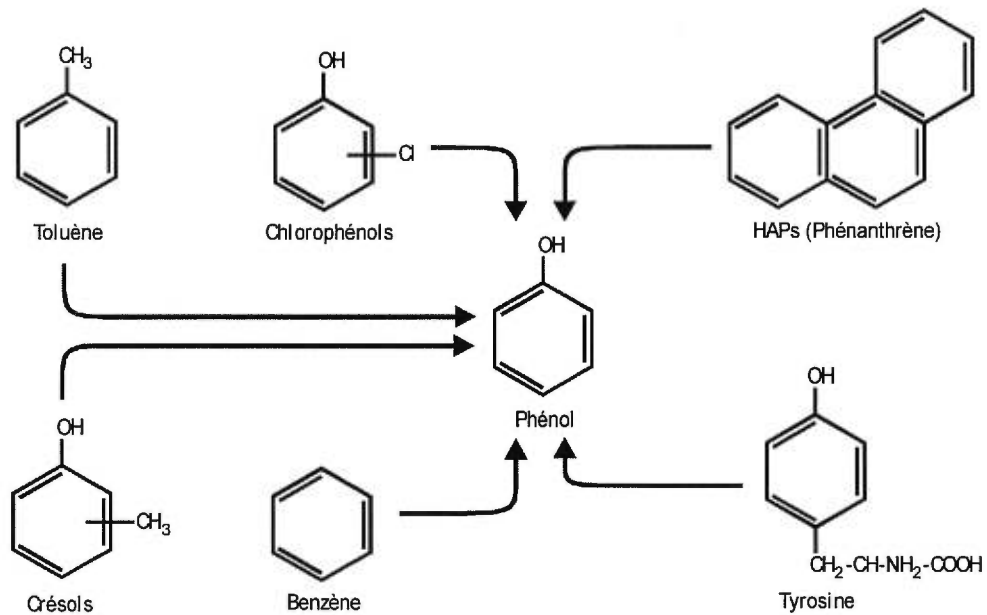


Fig. 2: Exemples de composés dont la dégradation mène au phénol.

L'oxygène est l'accepteur terminal d'électrons qui génère le plus d'énergie pour la bactérie. Pour cette raison, mais aussi parce qu'il est toxique pour plusieurs processus anaérobies, quand l'oxygène est présent dans un environnement, le métabolisme aérobie prédomine même si d'autres accepteurs terminaux d'électrons sont présents.

Un grand nombre de micro-organismes sont capables de dégrader les composés aromatiques en conditions aérobie. Les genres *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Flavobacterium* et *Acinetobacter* ont

tous des représentants capables de dégrader les HAP, [Cerniglia, 1992; Lantz *et al.*, 1995]. Les BPC (biphényles polychlorés) peuvent être dégradés par la bactérie *Alcaligenes* sp. JB1 par exemple [Parsons *et al.*, 1995]. La biodégradation simultanée du xylène, toluène et du chlorobenzène a été observée avec la culture mixte de trois souches de *Pseudomonas*: GJ40, GJ31 et GJ8 [Keuning et Jager, 1994]. Plus proche de notre intérêt, la transformation du phénol a été montrée chez *Bacillus* sp. [Ali *et al.*, 1998], chez *Candida tropicalis* [Chang *et al.*, 1998], chez différentes espèces d'*Acinetobacter* [Hoyle *et al.*, 1995; Jeong *et al.*, 1998], chez *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 [Müller et Babel, 1996], chez *Comamonas testosteroni* CPW301 [Bae *et al.*, 1996], chez plusieurs espèces de *Pseudomonas* [Aneez Ahamad et Kunhi, 1996; Mason et Cammack, 1992; Powlowski et Shingler, 1994].

En présence de l'oxygène, les composés aromatiques peuvent être dégradés soit par la voie de fission *ortho*, soit par la voie de fission *meta* [Bouwer et Zehnder, 1993; Evans, 1977]. Dans les deux cas, l'oxygène est essentiel à la déstabilisation du cycle aromatique car il est incorporé directement dans la molécule attaquée pour former les intermédiaires centraux tels que le catéchol, le protocatéchuate ou le gentisate (Fig. 3). Cette incorporation de l'oxygène, suivie par la fission du cycle, est orchestrée par les enzymes mono- et dioxygénases [Evans et Fuchs, 1988; Fuchs *et al.*, 1994; Mason et Cammack, 1992].

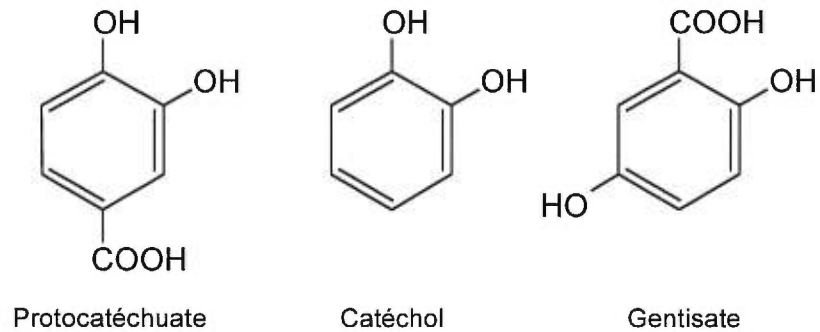


Fig. 3: Composés centraux de la dégradation aérobie

## 2.3. Dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies

Une condition anaérobie est créée quand le taux de consommation de l'oxygène excède le taux d'entrée de ce dernier dans un environnement donné [Berry *et al.*, 1987; Evans, 1988]. Dans un tel habitat l'oxygène n'est pas disponible et pour transformer les composés aromatiques, les micro-organismes qui s'y trouvent doivent employer des mécanismes différents de ceux décrits plus haut. Généralement, la spécialisation métabolique chez les bactéries anaérobies est plus grande que chez les bactéries aérobies [Zinder, 1984].

À l'exception des composés hydrocarbures halogénés, la biodégradation en conditions anaérobies est généralement plus lente en comparaison à la biodégradation en conditions aérobies [Smith, 1997; Walter et Crawford, 1997]. Ceci est principalement dû à la faible énergie que les bactéries sont capables de tirer à partir de la dégradation de la matière organique dans ces conditions [Schink, 1997; Zinder, 1984]. Par exemple, en conditions aérobies, la dégradation d'une mole de glucose ( $C_6H_{12}O_6 \Rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ ) génère 2840 kJ d'énergie, tandis que la dégradation d'une mole de glucose en conditions méthanogènes ( $C_6H_{12}O_6 \Rightarrow 3CO_2 + 3CH_4$ ) en génère sept fois moins (390 kJ). La raison de cette différence est le fait que la majeure partie de l'énergie libre du substrat est conservée dans le méthane produit et n'est pas disponible pour la bactérie. En absence de l'oxygène, les composés aromatiques substitués sont plus faciles à dégrader que ceux dont le cycle ne porte que des atomes d'hydrogène, car la réaction devient thermodynamiquement plus favorable [Bouwer et Zehnder, 1993].

### **2.3.1. Stratégies générales de dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies**

Devant la diversité extrêmement grande de composés aromatiques que les bactéries sont capables d'utiliser en conditions anaérobies et en considérant la faible énergie disponible, il est difficile de croire que chaque composé (et les

intermédiaires subséquents du métabolisme) possède une enzyme qui lui est spécifique dans la voie de biodégradation. Ainsi, pour sauver de l'énergie, les micro-organismes ont développé la stratégie qui permet à une bactérie d'utiliser un plus grand nombre de composés sans pour autant avoir à produire une très grande diversité d'enzymes. Cette stratégie consiste à diminuer la diversité moléculaire par la canalisation ("*channelling*") vers quelques composés intermédiaires centraux. Les composés centraux reconnus jusqu'à présent sont: le benzoyl-CoA, le 4-hydroxybenzoyl-CoA, le resorsinol et le phloroglucinol (Fig. 4 et 5) et il est possible que d'autres composés puissent jouer ce rôle [Brackmann et Fuchs, 1993; Fuchs *et al.*, 1994]. Il est à remarquer que les bactéries anaérobies sont difficiles à étudier, surtout celles possédant des conditions de croissance plus exigeantes telles que les conditions sulfatoréductrices ou les conditions méthanogènes. De plus, les modèles métaboliques ont été obtenus principalement par l'étude des bactéries dénitrifiantes et des bactéries phototrophiques, plus faciles à maintenir [Fuchs *et al.*, 1994].

La biodégradation des composés aromatiques avec la stratégie de "*canalisation*" moléculaire peut être décomposée en trois phases: la phase d'activation et de diminution de la diversité moléculaire, la phase de réduction, et la phase d'hydrolyse (Fig. 6).



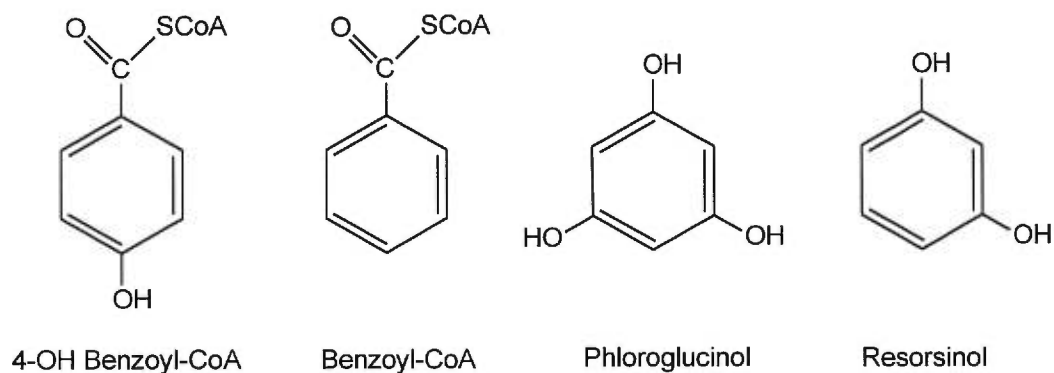


Fig. 4: Intermédiaires centraux de la dégradation anaérobie

La diminution de la diversité moléculaire peut être obtenue par différents mécanismes, mais l'enlèvement des chaînes aliphatiques latérales par les  $\beta$ -oxydations, les deshydroxylations réductrices et les transhydroxylations sont les mieux connues. Ensuite, les molécules chimiquement inertes doivent être activées pour déstabiliser le noyau aromatique et faciliter sa transformation subséquente.

Les réactions caractéristiques de cette activation anaérobie sont la formation de CoA thioesters, la carboxylation et l'hydroxylation. Par la suite, les intermédiaires centraux subissent l'attaque des enzymes réductases et les composés alicycliques qui en résultent sont oxydés à leur tour par les  $\beta$ -oxydations et clivés hydrolytiquement. Finalement, les composés aliphatiques sont transformés en métabolites centraux tel que l'acétyle-CoA.

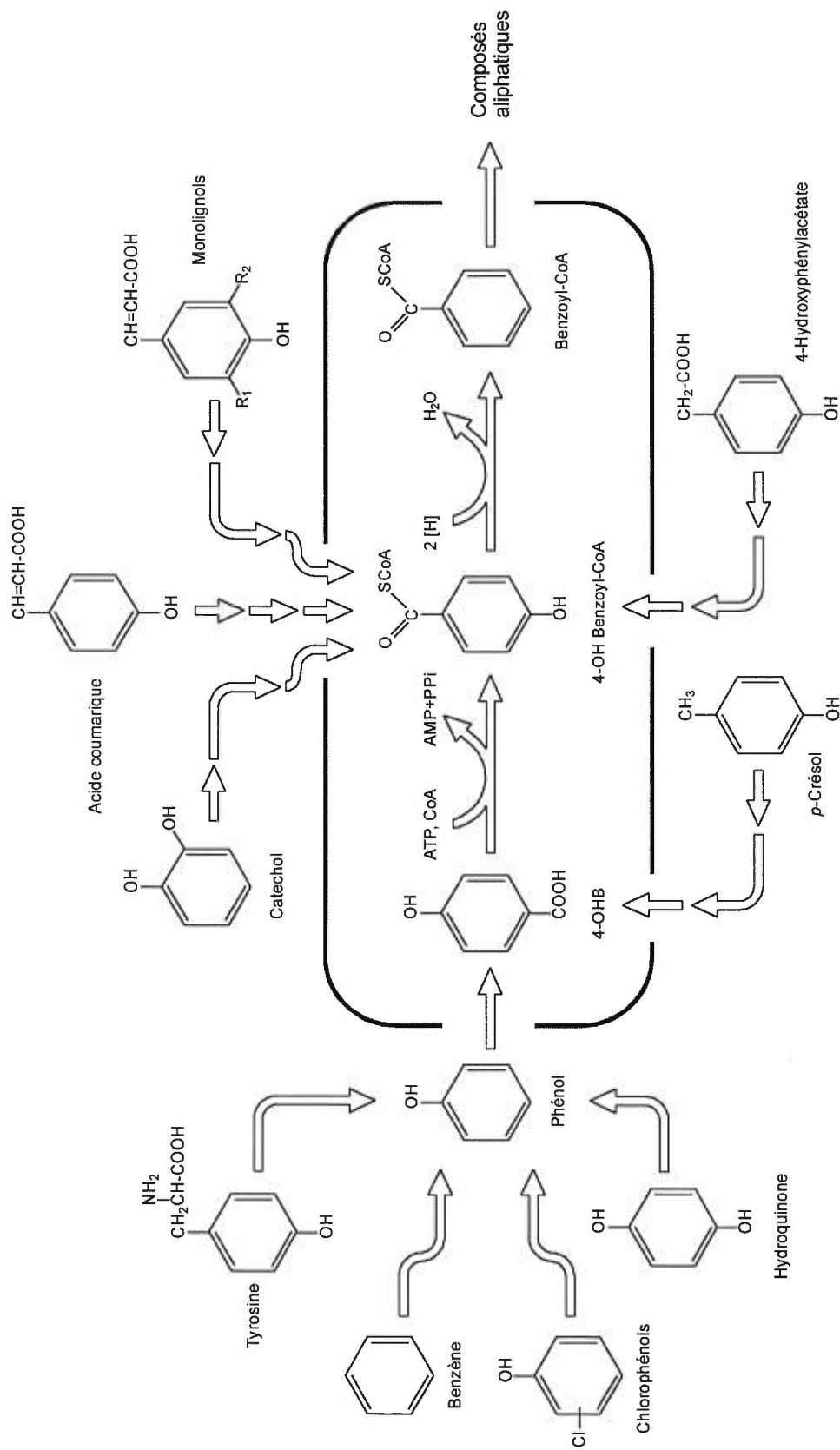


Fig. 5: Implication de 4-hydroxybenzoyl-CoA en tant qu'intermédiaire central dans la dégradation des différents composés phénoliques (modifié d'après Brackmann et Fuchs, 1993).

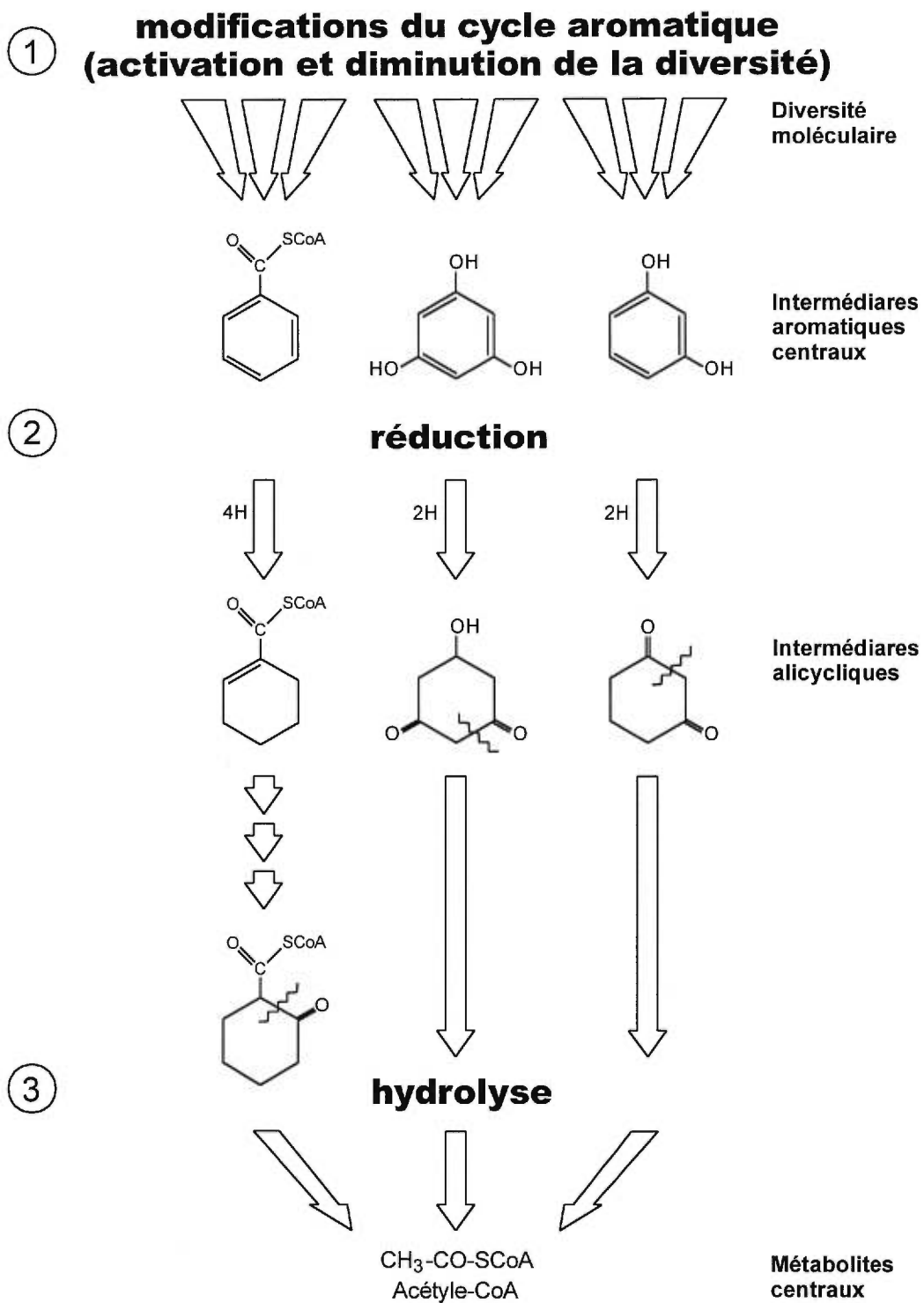


Fig. 6: Stratégie générale de biodégradation des composés aromatiques en anaérobiose (modifié d'après Fuchs *et al.*, 1994).

### **2.3.2. Métabolisme de la dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies**

Dans le contexte de la respiration anaérobie, le catabolisme des composés aromatiques peut être décrit en tant que le couplage des réactions de déshydrogénation à la réduction des accepteurs externes d'électrons [Sleat et Robinson, 1984]. La disponibilité d'accepteurs d'électrons dans un environnement donné joue un rôle primordial dans l'établissement, la diversité et la succession des communautés microbiennes (Fig. 7). Les milieux marins offrent une bonne concentration de sulfates, alors que dans le sol et dans l'eau douce les composés d'azote et les ions métalliques tels que Fe(III) ou Mn(IV) sont plus importants. Mais dans la majorité des habitats anaérobies terrestres, la concentration des accepteurs externes d'électrons pour la communauté bactérienne présente est souvent insuffisante. Quand cela arrive, pour générer de l'énergie, les bactéries utilisent la fermentation [Berry *et al.*, 1987; Fuchs *et al.*, 1994; Smith, 1997].

Durant la fermentation, la présence d'un accepteur d'électron externe n'est pas nécessaire. L'accepteur d'électron est généré à partir de la molécule organique qui est dégradée et l'énergie est obtenue par la phosphorylation au niveau du substrat [Evans, 1977; Sleat et Robinson, 1984].

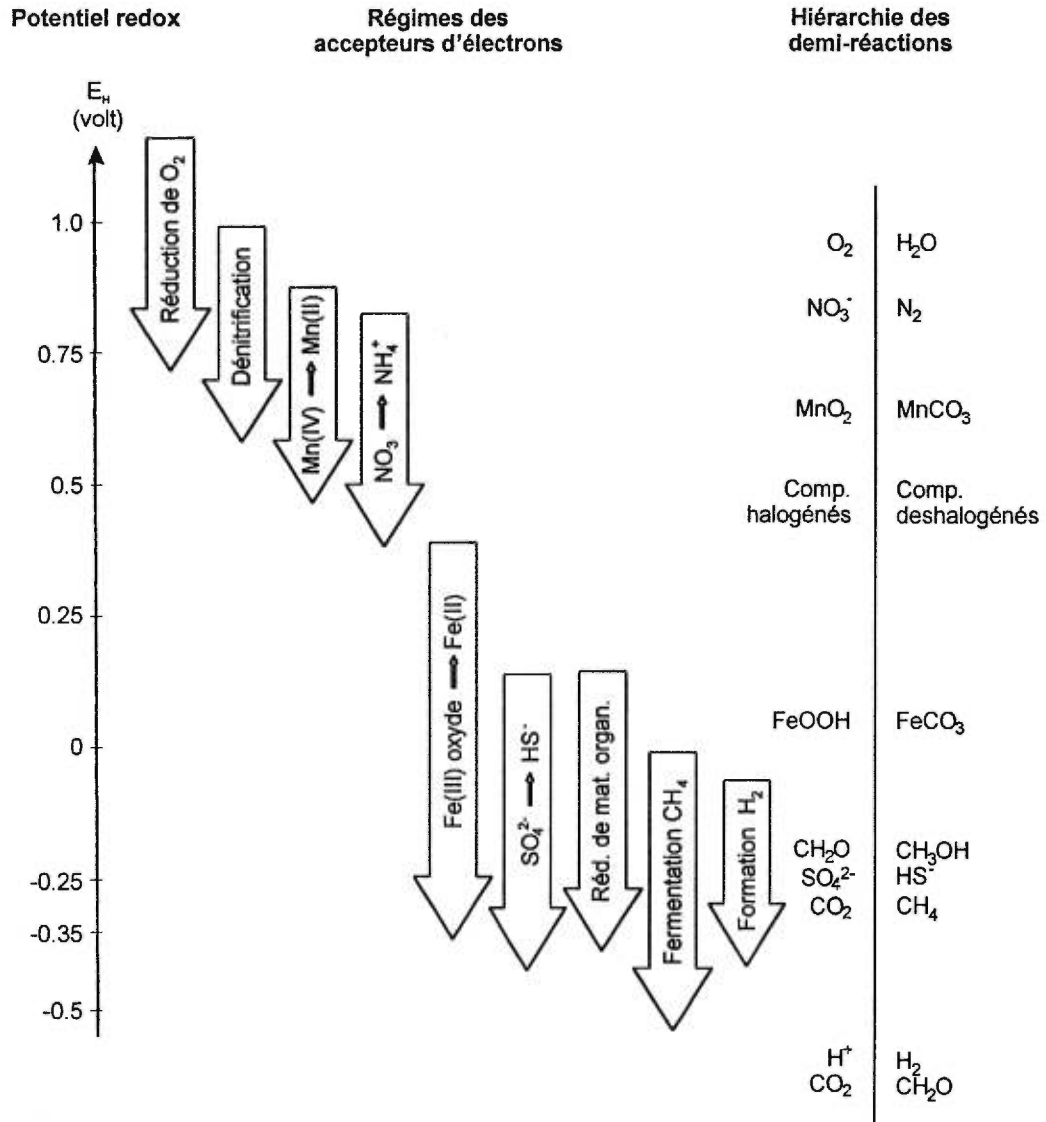


Fig. 7: Hiérarchie de la succession des principaux régimes d'accepteurs d'électrons dans les habitats naturels (modifié d'après Zehnder et Stumm, 1988).

Les principales stratégies microbiennes de la dégradation des composés aromatiques, selon l'ordre de leur efficacité énergétique, sont la réduction des nitrates, le photométabolisme, la réduction du fer et du manganèse, la réduction des sulfates et la méthanogénèse [Berry *et al.*, 1987; Evans, 1977, 1988; Lovley, 1991; Sleat et Robinson, 1984; Tiedje, 1988; Walter et Crawford, 1997; Zehnder et Stumm, 1988].

#### **2.3.2.1. Le photométabolisme**

Les bactéries phototrophes forment un groupe de micro-organismes métaboliquement polyvalents et bien répandus dans l'environnement anaérobie exposé à la lumière. Plusieurs espèces de bactéries dans ce groupe sont capables d'utiliser les composés aromatiques simples comme seule source de carbone. La transformation des composés aromatiques par le photométabolisme s'effectue par une voie réductrice (Fig. 8) et la présence de la lumière est essentielle pour cette transformation. [Dutton et Evans, 1969; Guyer et Hegeman, 1969; Sleat et Robinson, 1984].

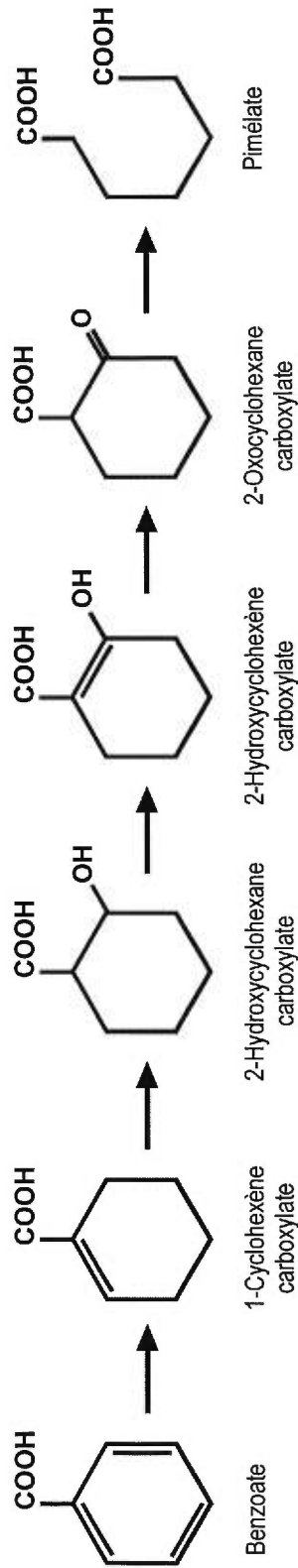


Fig. 8: Voie métabolique de la dégradation du benzoate qui mène à la fission du cycle par le photométabolisme chez *Rhodospseudomonas palustris* (d'après Dutton et Evans, 1969).

### 2.3.2.2. Dénitrification

La grande majorité des bactéries réductrices des nitrates sont des anaérobies facultatives [Capone, 1997; Smith, 1997]. Plusieurs bactéries dans ce groupe sont capables d'utiliser les composés aromatiques. *Alcaligenes xylosoxidans* sous-espèce *denitrificans* (initialement *Pseudomonas* PN-1) et *Paracoccus denitrificans* croissent sur le benzoate. Certaines espèces de *Bacillus* dégradent le *o*-phthalate. *Thauera aromatica* peut utiliser comme seule source de carbone une variété de quatorze composés aromatiques, incluant le benzoate, les 3- et 4-hydroxybenzoate, le phénol, le *p*-crésol et le toluène, qui peuvent être complètement oxydés jusqu'au CO<sub>2</sub>. [Evans et Fuchs, 1988; Fuchs *et al.*, 1994; Heider *et al.*, 1998]

### 2.3.2.3. Réduction du fer et du manganèse

La réduction microbienne du fer (III) et du manganèse (IV) est un processus important qui influence grandement le cycle du carbone et des métaux. La déshalogénéation des bromophénols et la dégradation du phénol ont été observées en conditions réductrices de fer [Monserrate et Häggblom, 1997]. Le premier micro-organisme isolé en culture pure qui montrait la minéralisation complète des composés organiques a été la souche GS-15. C'est une bactérie anaérobie stricte qui est capable de dégrader les composés aromatiques tels que le toluène, le phénol, le *p*-crésol, le benzoate et le *p*-hydroxybenzoate. Dans le cas de l'utilisation du phénol par la souche GS-15, il a été démontré que le métabolisme



passer par la carboxylation en *p*-hydroxybenzoate [Ghiorse, 1988; Lovley et Lonergan, 1990; Lovley, 1991].

#### **2.3.2.4. Réduction des sulfates**

Les bactéries sulfatoréductrices (SRB) sont un groupe de micro-organismes très diversifiés et présents dans un grand nombre d'habitats anaérobies. Ce sont des anaérobies strictes, mais il existe de rares exemples qui tolèrent la présence d'oxygène et même sont capables de le réduire en eau [Cypionka 1985; Devereux *et al.*, 1992; Dilling et Cypionka *et al.*, 1990]. L'environnement qui favorise leur développement en nombre est celui qui contient une bonne concentration de sulfates. Puisque l'eau de mer est riche en sulfates (environ 28 mM) [Hansen, 1993], la réduction dissimilaire de  $\text{SO}_4^{2-}$  est considérée comme le processus majeur dans les sédiments marins [Hines *et al.*, 1997]. Il a été estimé que les SRB sont capables de métaboliser plus de 50 % des déchets organiques retrouvés dans les sédiments des côtes marines [Gibson, 1990]. L'hétérogénéité des SRB repose sur leur morphologie variée, la diversité des niches écologiques qu'elles occupent, les besoins nutritionnels et la flexibilité métabolique. Malgré cette diversité, un trait les unit. Pour générer de l'énergie, toutes les SRB utilisent le  $\text{SO}_4^{2-}$  comme accepteur terminal d'électrons pour oxyder les composés organiques et inorganiques. Certaines espèces peuvent également réduire le soufre et occasionnellement d'autres oxyanions, mais il s'agit de mécanismes secondaires.

En absence de sulfate, plusieurs espèces peuvent croître grâce à la fermentation [Hansen, 1993]. Une autre caractéristique des SRB est la production du malodorant et toxique  $H_2S$  qui est le résultat de la transformation du  $SO_4^{2-}$  (Fig. 9). Les représentants les plus caractéristiques des bactéries sulfatoréductrices sont les genres *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfococcus*, et *Desulfobacter*, mais au moins 14 genres sont présentement reconnus. [Gibson, 1990; Pfennig *et al.*, 1981; Singleton, 1993]

Si la majorité des SRB sont des hétérotrophes, les exemples de croissance par la lithoautotrophie comme chez *Desulfobacterium autotrophicum* existent également. Quelques espèces sont capables de croître par la mixotrophie, en utilisant  $H_2$  et  $SO_4^{2-}$  comme source d'énergie et l'acétate comme source de carbone.

Widdel a suggéré [rapporté par Singleton, 1993] que les SRB peuvent être classées en deux groupes métaboliques. Le premier comprend les bactéries qui sont capables d'oxyder incomplètement le lactate jusqu'à l'acétate et le  $CO_2$ . Le deuxième groupe, qui pousse plus lentement, est métaboliquement plus diversifié. Les micro-organismes de ce groupe sont capables de minéraliser un grand nombre de molécules organiques y compris les composés aromatiques.

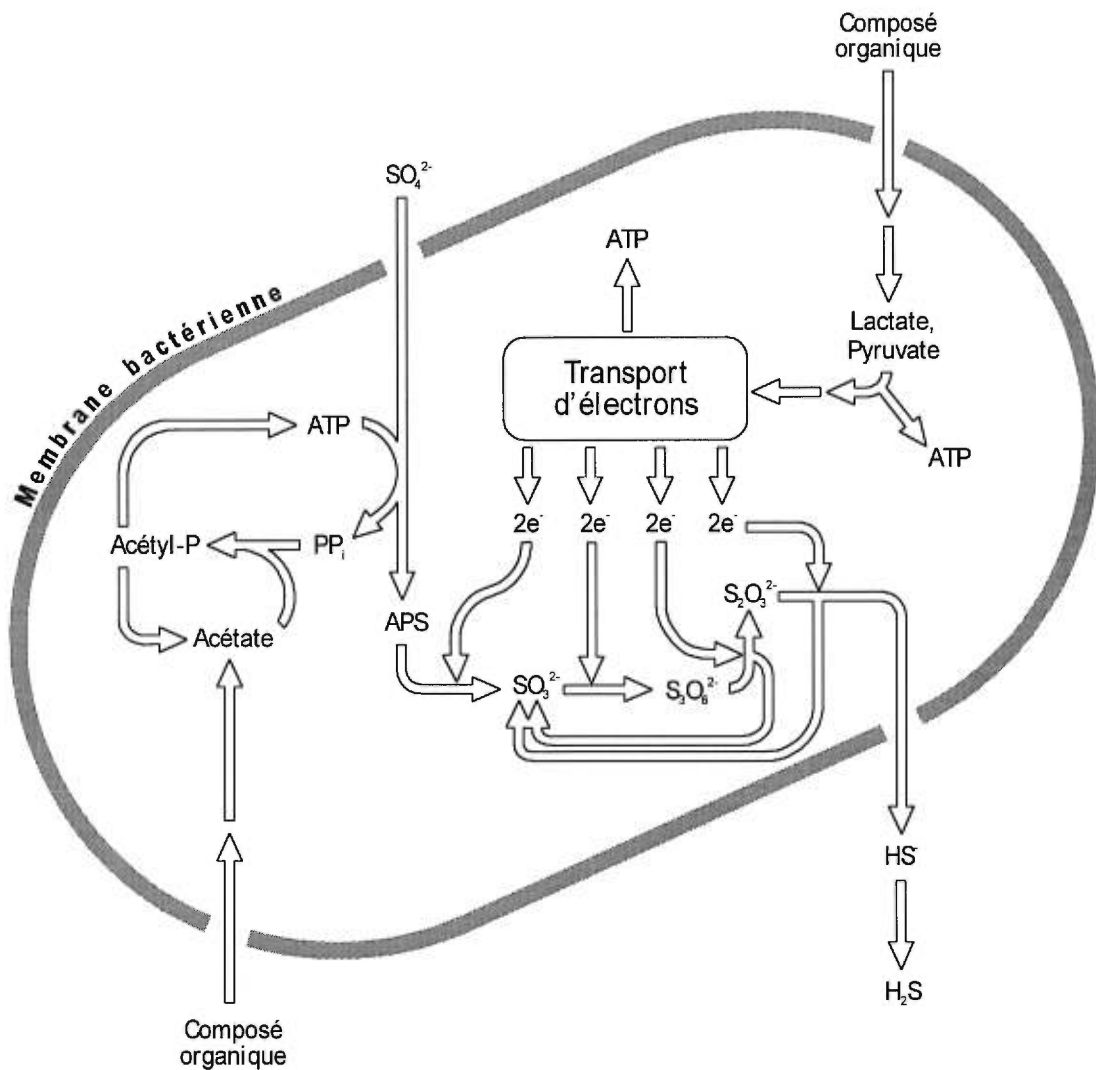


Fig. 9: Voie simplifiée de réduction des sulfates. Elle montre davantage le flux général du soufre et des électrons plutôt que les mécanismes exacts (modifiée d'après Gibson, 1990; Brock et Madigan, 1991; Singleton, 1993). APS = adénosine phosphosulphate;  $\text{PP}_i$  = pyrophosphate;  $e^-$  = électron.

L'éventail des composés aromatiques que les SRB sont capables de dégrader est impressionnant. Les souches *Desulfotomaculum* sp. TEP et TWC sont capables de transformer le triméthoxybenzoate en trihydroxybenzoate [Klemps *et al.*, 1985]. Une autre souche de *Desulfotomaculum* dégrade le *m*-crésol, le 3-hydroxybenzoate et le benzoate [Londry *et al.*, 1997]. La coculture de *Desulfotomaculum* sp. et de *Desulfovibrio* sp. utilise le phénol, le monofluorobenzoate, le 3- et le 4-hydroxybenzoate, le catéchol et le protocatéchuate [Drzyzga *et al.*, 1994]. Bak et Widdel [1986] ont isolé *Desulfobacter phenolicum* et *Desulfobacterium indolicum* qui minéralisent respectivement le phénol et l'indole. *Desulfococcus multivorans* et *Desulfosarcina variabilis* ont été enrichies avec le benzoate comme seule source de carbone respectivement à partir de sédiments d'eau douce et de sédiments marins [Sleat et Robinson, 1984]. Les deux souches étaient aussi capables d'utiliser le phénylacétate, le 3-phénylpropionate et le 2-hydroxybenzoate. De nombreux autres exemples ont aussi été rapportés [revue par Hansen, 1993].

#### **2.3.2.5. Dynamique microbienne dans un consortium de bactéries sulfatoréductrices**

Contrairement aux bactéries méthanogènes (voir plus loin), les bactéries sulfatoréductrices sont beaucoup plus versatiles au niveau de leur métabolisme. Un bon nombre d'entre elles sont capables de minéraliser complètement les

produits du métabolisme des bactéries fermentaires. Par conséquent, les interactions microbiennes dans un consortium sulfidogène sont un peu moins complexes comparativement à celles observées dans un consortium méthanogène. La grande différence réside dans la non nécessité d'associations syntrophiques, et la dégradation de la matière organique complexe procède en deux phases majeures (Fig. 10) [Schink, 1997]. La première phase implique les bactéries fermentaires comme dans le cas de la méthanogénèse et durant la deuxième phase, les SRB oxydent les produits en les couplant à la réduction des sulfates (Fig. 9).

#### **2.3.2.6. Fermentation et méthanogénèse**

Dans les habitats anaérobies dans lesquels l'apport d'accepteurs externes d'électrons est insuffisant, les bactéries qui utilisent la fermentation ont un avantage dans la production de l'énergie sur d'autres groupes bactériens [Brock et Madigan, 1991; Smith, 1997]. Pendant la fermentation, le composé organique n'est pas complètement oxydé. Plus loin dans la voie métabolique, les intermédiaires générés à partir de ce donneur d'électrons seront à leur tour réduits en tant qu'accepteurs terminaux d'électrons. L'énergie est dérivée grâce à la phosphorylation au niveau du substrat. La formation de composés riches en énergie (généralement porteurs du groupe phosphate ou du coenzyme-A) qui par l'hydrolyse libèrent l'énergie emmagasinée est centrale à la synthèse de l'ATP. Pour qu'un composé puisse être fermenté, il ne faut pas qu'il soit ni trop

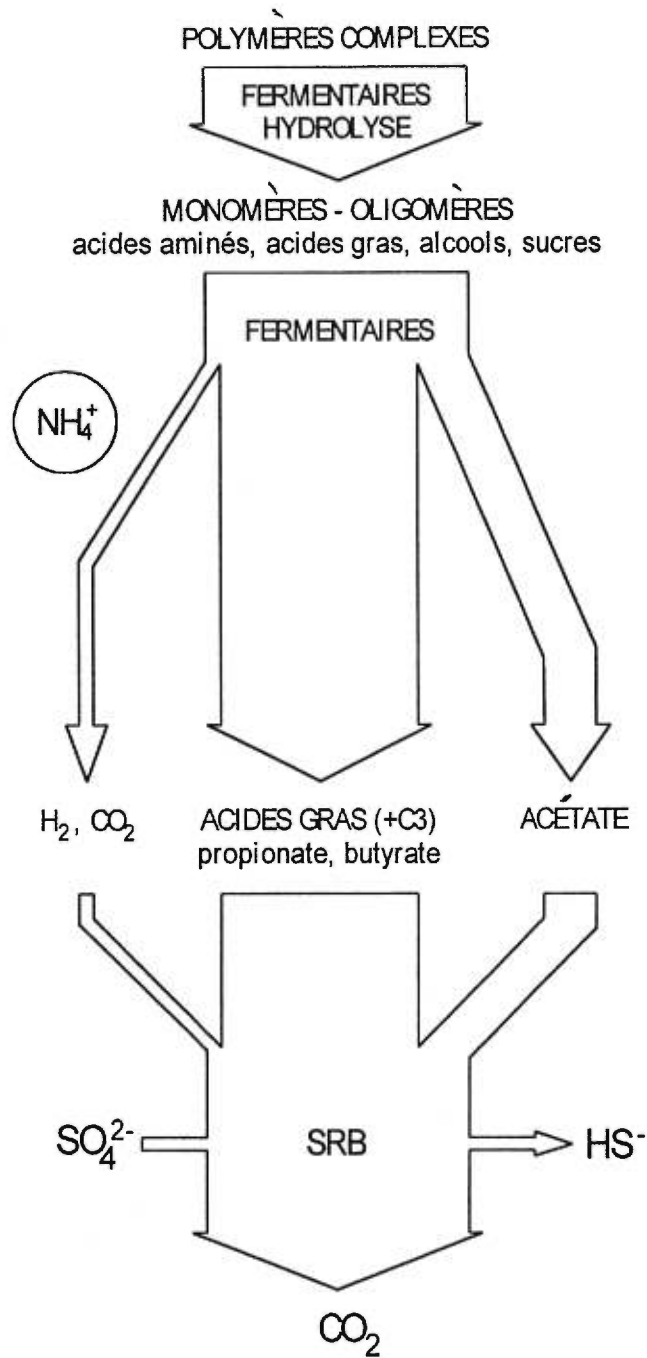


Fig. 10: Différents groupes microbiens impliqués dans la fermentation sulfidogène (modifié d'après Schink, 1997).

oxydé, ni trop réduit et l'équilibre électronique entre les substrats et les produits de la fermentation est un point important. D'une façon générale, la balance des électrons est maintenue par la production de l'hydrogène moléculaire ( $H_2$ ) [Boone *et al.*, 1989; Brock et Madigan, 1991]. Lors de la formation du  $H_2$ , les protons ( $H^+$ ) sont dérivés à partir de l'eau et servent d'accepteur d'électrons. Le transfert d'électrons à partir de la matière organique est facilité par la ferrédoxine, une protéine transporteuse d'électrons qui possède un centre Fe-S. De la ferrédoxine, les électrons sont transférés au  $H^+$  par l'enzyme hydrogénase [Brock et Madigan 1991; Mason et Cammack, 1992].

Les fermentations peuvent être classées selon les substrats utilisés ou les produits finaux de ce métabolisme. Les produits de la transformation fermentaire effectuée par certaines bactéries sont le substrat de fermentation pour d'autres micro-organismes, créant ainsi une chaîne alimentaire. Un exemple parfait d'une telle chaîne alimentaire est la fermentation méthanogène - la méthanogénèse [Blaut, 1994; Rouvière et Wolfe, 1988; Schink, 1997, 1991; Zehnder *et al.*, 1981]. Durant la méthanogénèse les composés organiques sont progressivement fermentés par différents groupes de bactéries jusqu'au méthane ( $CH_4$ ) et dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) (la description détaillée des interactions microbiennes de la méthanogénèse sera présentée plus loin dans la thèse). Le  $CH_4$ , la forme la plus réduite du carbone et le  $CO_2$ , la forme la plus oxydée du carbone, sont les produits terminaux de la

biodégradation anaérobie. Ils ne peuvent pas être fermentés d'avantage et constituent les produits ultimes de la minéralisation [Brock et Madigan, 1991].

Même si les implications précises des souches à différentes étapes de la méthanogénèse sont peu connues, les exemples de la transformation méthanogène des composés aromatiques comme un processus global sont nombreux. Grbic-Galic [1986, 1987] a montré la dégradation méthanique de l'acide férulique, du toluène et du benzène dans un enrichissement de boues d'épuration d'eau. Balba *et al.* [1979] ont observé la transformation du *m*- et *p*-methoxybenzoate respectivement en *m*- et *p*-hydroxybenzoate avec la minéralisation subséquente. Le consortium méthanogène de Young et Rivera [1985] dégradait le phénol, le *p*-crésol, le phloroglucinol et l'hydroquinone. La dégradation du pentachlorophénol jusqu'au méthane était possible avec le consortium de Juteau *et al.* [1995]. Roberts *et al.* [1987] ont montré la dégradation du *m*-crésol. Le consortium méthanogène de Beaudet *et al.* [1986] était capable de dégrader plusieurs composés phénoliques [Bécharde *et al.*, 1990; Bisailon *et al.*, 1991, 1991a, 1993, 1994]. Les consortiums d'autres auteurs minéralisaient le phénol, le 4-hydroxybenzoate, le benzoate et le 3,4-dihydroxybenzoate [Dolfing et Tiedje, 1988; Keith *et al.*, 1978; Knoll et Winter, 1989; Kobayashi *et al.*, 1989; Sharak Genthner *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1990, 1994, 1994a; Zhou et Fang, 1997].



### **2.3.2.7. Dynamique microbienne dans un consortium méthanogène**

La formation du méthane par la méthanogénèse est un phénomène microbien répandu dans l'environnement anaérobie. C'est un processus terminal d'acceptation d'électrons dans les sédiments d'eau douce riches en matière organique tels que les marécages, les rizières et les boues d'épuration. La méthanogénèse est également importante dans la fermentation qui se produit dans le tractus intestinal des animaux, en particulier les ruminants [Blaut, 1994; Schink, 1997; Zehnder *et al.*, 1981]. Comme nous l'avons vu plutôt, une très grande variété de molécules organiques, incluant les composés aromatiques, peuvent être dégradés durant ce processus. Pourtant, les bactéries méthanogènes utilisent seulement un nombre restreint de substrats pour croître (Tableau 1) [Blaut, 1994; Fuchs et Stupperich, 1986; Rouvière et Wolfe, 1988; Zehnder *et al.*, 1981]. La raison est que la méthanogénèse est un processus métabolique qui implique non pas un seul groupe de bactéries, mais plusieurs groupes différents qui forment une chaîne alimentaire.

Les membres en aval de cette chaîne alimentaire dépendent des membres plus en amont pour leur fournir les substrats. De leur côté, les membres en aval exercent une influence importante sur ceux en amont par l'enlèvement des produits du

Tableau 1: Les substrats utilisés par différentes bactéries méthanogènes (seulement les donneurs d'électrons sont indiqués).

Substrat	Exemples de bactéries méthanogènes
H <sub>2</sub>	<i>Methanosarcina barkeri</i> , <i>Methanospirillum hungatei</i> , <i>Methanobacterium bryantii</i> , <i>Methanobacterium formicicum</i>
Formate	<i>Methanobacterium formicicum</i> , <i>Methanospirillum hungatei</i> , <i>Methanococcus voltae</i>
Acétate	<i>Methanosarcina barkeri</i> , <i>Methanococcus mazei</i> , <i>Methanosaeta soehngenii</i>
Méthanol	<i>Methanosarcina barkeri</i> , <i>Methanococcus mazei</i>
CO	<i>Methanosarcina barkeri</i> ,
Méthylamines	<i>Methanosarcina barkeri</i> , <i>Methanococcus mazei</i>

métabolisme de ces premiers. Au moins trois groupes distincts de bactéries, qui correspondent aux trois phases majeures de la dégradation en conditions méthanogènes, sont impliqués dans la conversion de la matière organique complexe en méthane et dioxyde de carbone (Fig. 11) [Blaut, 1994; Schink, 1997; Switzenbaum, 1983; Zehnder, 1981 *et al.*; Zinder, 1984].

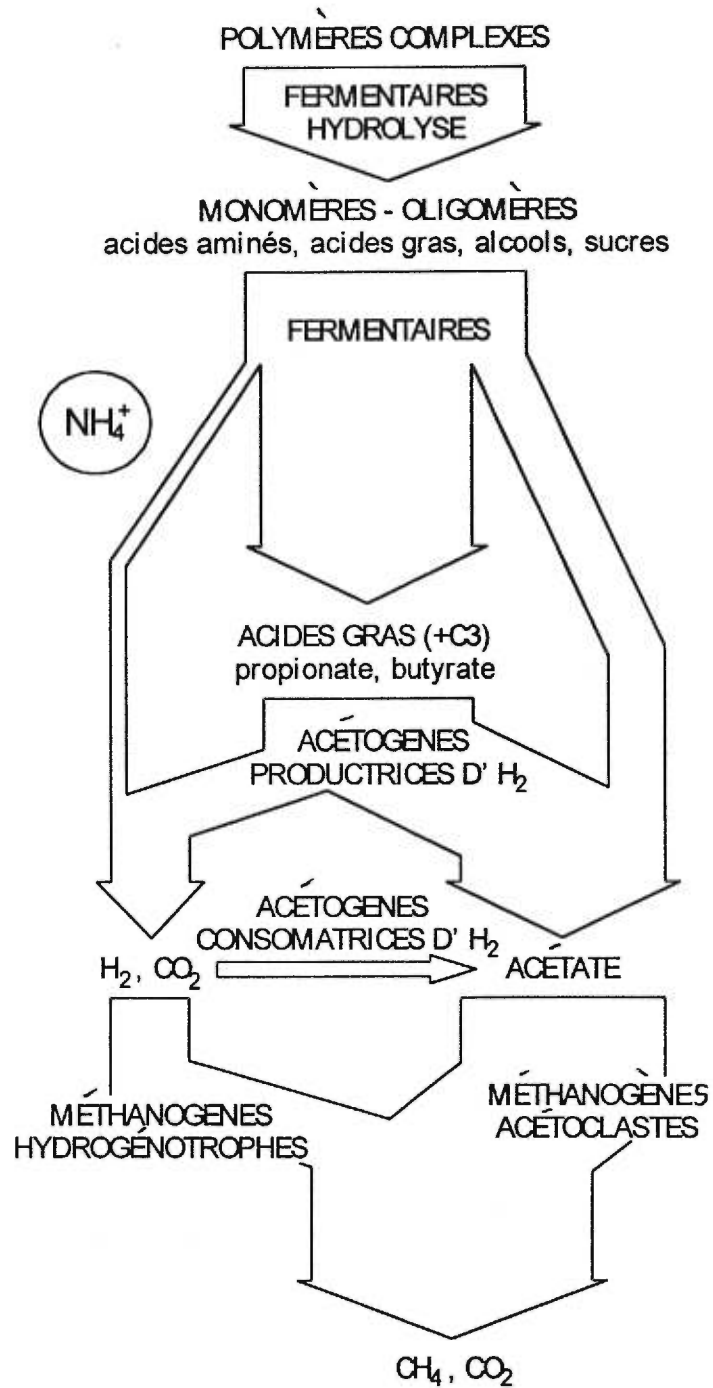


Fig. 11: Différents groupes microbiens impliqués dans la fermentation méthanogène (modifié d'après Zehnder, 1981). La largeur des flèches reflète l'importance relative de la voie métabolique.

Durant la première phase, les bactéries fermentaires, par l'action des enzymes hydrolytiques extracellulaires, transforment les polymères complexes tel que les polysaccharides, les protéines et les lipides en monomères (acides aminés, acides gras, alcools, sucres simples). Par exemple, *Anaerovibrio lipolytica* hydrolyse les triglycérides et phospholipides en glycérol et acides gras. *Butyrivibrio fibrisolvens* hydrolyse les phospholipides en présence de sucres fermentescibles et les activités de lipase et lécithinase ont été observées chez *Clostridium botulinum* et plusieurs espèces d'*Eubacterium*. Dans les sources thermales *C. thermocellum* et dans le rumen, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens* et *Eubacterium cellulosolvens* hydrolysent la cellulose. Du côté des protéines, les *Clostridium* protéolytiques (*C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. proteolyticum*) sont le plus important groupe responsable de leur dégradation dans les digesteurs et les sédiments méthanogènes. D'autres bactéries protéolytiques retrouvées dans cet environnement appartiennent aux genres *Peptococcus*, *Bifidobacterium* et *Staphylococcus* et il y a aussi des bactéries Gram positives non identifiées. Ceci contraste avec le rumen dans lequel on retrouve principalement des bactéries protéolytiques Gram négatives. Les exemples de micro-organismes du rumen utilisant les protéines incluent *Bacteroides ruminicola*, *B. amylophilus*, *Butyrivibrio* sp., *Selenomonas* sp., *Streptococcus bovis*, *Eubacterium ruminantium* et *Lachnospira multiparus*. [Colberg, 1988; Lowe *et al.*, 1993; McInerney, 1988].

Souvent, les mêmes espèces bactériennes qui sont impliquées dans l'hydrolyse de polymères sont également impliquées dans les étapes subséquentes de la fermentation.

Environ 76 % des monomères sont fermentés en acides gras de trois à six carbones. Une partie des monomères est convertie directement d'un côté en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> (environ 4 %) et de l'autre côté en acétate (environ 20 %).

Pendant la phase fermentaire on assiste aussi à la libération du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en provenance de la fermentation des acides aminés par la réaction de Stickland. Plusieurs *Clostridium* sont reconnus pour avoir cette capacité [Doelle, 1975; McInerney, 1988; Nisman, 1954; Stickland, 1934; Zhang *et al.*, 1994].

Dans la deuxième phase, les bactéries acétogènes productrices d'hydrogène (fermentaires réductrices obligatoires des protons) produisent l'acétate (environ 52%), ainsi que l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> (environ 24%). Les exemples des bactéries qui appartiennent à ce groupe sont *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophus buswellii* et *Clostridium bryantii*. Un autre groupe, les bactéries acétogènes consommatrices d'hydrogène (homoacétogènes, appelées aussi réductrices facultatives des protons) convertissent une partie de l'hydrogène et du dioxyde de carbone en acétate. L'appellation "homoacétogènes" est toutefois plus historique qu'autre chose, car il a été montré que si l'hydrogène est enlevé du

milieu par l'action d'autres bactéries consommatrices d'hydrogène, elles sont capables de produire aussi bien l'hydrogène et le CO<sub>2</sub> que l'acétate [Winter et Wolfe, 1980]. Les exemples incluent *Ruminococcus albus*, *Selenomonas ruminantium*, *Clostridium cellobioparum* et *Desulfovibrio vulgaris* qui appartiennent aussi au groupe de bactéries sulfatoréductrices. L'acétate formé durant la phase acétogène ainsi que l'H<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> seront utilisés par les bactéries méthanogènes lors de la troisième phase, la phase productrice du méthane. La phase acétogène peut fonctionner uniquement si la pression partielle d'hydrogène est suffisamment basse ( $< 10^{-3}$  atm). Ceci est dû au fait que l'énergie contenue dans les substrats fermentescibles par les bactéries acétogènes est très faible et que les oxydations deviennent défavorables au point de vue thermodynamique si le produit (hydrogène) s'accumule dans le milieu. La régulation de la concentration de l'hydrogène se fait grâce aux bactéries consommatrices d'hydrogène (hydrogènotrophes). Le mécanisme global de production de l'hydrogène lors de fermentations et sa consommation par les bactéries hydrogènotrophes est appelé le transfert inter-espèce d'hydrogène. [Dolfing et Tiedje, 1988; Lee et Zinder, 1988; Zinder, 1984].

Lors de la phase finale, deux groupes de bactéries méthanogènes produisent le méthane et le CO<sub>2</sub>. Environ 72 % du méthane est formé par les bactéries acétoclastes à partir de l'acétate. Ce sont des méthanogènes qui poussent très

lentement. Le deuxième groupe, les bactéries hydrogénotrophes, qui poussent plus rapidement, est responsable de la formation de 28 % de méthane à partir de l'hydrogène et du dioxyde de carbone.

#### **2.3.2.8. Coexistence des bactéries méthanogènes et sulfatoréductrices**

La présence des SRB dans les habitats méthanogènes a été observée dans de nombreux cas [Gibson, 1990; Oude Elferink *et al.*, 1998; Zehnder *et al.*, 1981; Zhou et Fang, 1998]. Cette présence n'est pas surprenante étant donné que les deux groupes bactériens utilisent les produits de la fermentation des autres bactéries et qu'on les retrouve principalement dans les milieux riches en matière organique. Toutefois, la sulfidogenèse et la méthanogenèse sont très rarement détectées simultanément. Si dans un environnement donné les sulfates sont absents ou présents en faible concentration, plusieurs espèces de SRB sont capables de passer au métabolisme fermentaire [Hansen, 1993]. Les bactéries méthanogènes s'imposent alors comme étant les derniers dans la dégradation de la matière organique. Par contre, si les sulfates sont présents dans le milieu, les bactéries sulfatoréductrices qui peuvent tirer plus d'énergie de la respiration des sulfates que les bactéries méthanogènes de la fermentation de l'acétate ou de l'hydrogène, vont devenir prédominantes. D'autre part, les SRB semblent avoir plus d'affinité vis-à-vis de l'acétate et de l'hydrogène. La principale raison qui favorise l'un ou l'autre

des processus est donc la compétition selon le substrat et la génération de l'énergie pour la cellule. La toxicité du H<sub>2</sub>S produit par les SRB sur les bactéries méthanogènes et la précipitation des métaux essentiels ont été également suggérées. [Gibson, 1990; Smith et Misra, 1993; Zehnder *et al.*, 1981]

### **2.3.2.9. Régimes métaboliques mineurs**

Les régimes métaboliques présentés plus haut correspondent aux stratégies microbiennes les plus répandues dans l'environnement anaérobie. Mais l'incroyable capacité d'adaptation des micro-organismes pour prendre avantage de la moindre ressource environnementale disponible, leur a permis une diversification beaucoup plus importante.

Les bactéries du genre *Desulfitobacterium* sont capables de dégrader les chlorophénols [Bouchard *et al.*, 1996; Christiansen et Ahring, 1996; Dennie *et al.*, 1998; Gerritse *et al.*, 1996; Utkin *et al.*, 1994] et le chloro-hydroxybenzoate [Sanford *et al.*, 1996] avec le sulfite (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) comme seul accepteur terminal d'électrons.

Il est intéressant de mentionner que pour transformer la matière organique, les bactéries peuvent utiliser les accepteurs d'électrons tels que le fumarate [Brock et Madigan, 1991; Stams *et al.*, 1993], le sélénate (Se(VI)) [Oremland *et al.*, 1994], l'arséniate (As(V)) [Laverman *et al.*, 1995; Newman *et al.*, 1998] ou l'uranium



[Laverman *et al.*, 1995], même si la biodégradation des composés aromatiques n'a pas été rapportée jusqu'à présent pour ces conditions. Certaines bactéries ont poussé l'adaptation à l'extrême. La bactérie *Shewanella* sp. peut utiliser selon les conditions du milieu les accepteurs terminaux d'électrons suivants: soufre élémentaire, sulfite, thiosulfate, chromate, uranium, iode, nitrate, nitrite, DMSO (sulfoxyde de diméthyle), fumarate, glycine, TMAO (oxyde de triméthylamine), magnétite, réaction de Stickland et en aérobie l'oxygène [Nealson, 1999].

## 2.4. Dégradation du phénol

En utilisant le nitrate comme accepteur terminal d'électrons Bakker [1977] a montré que le phénol était dégradé en acide *n*-caproïque par une culture mixte. Bakker a conclu que le cycle aromatique du phénol était réduit pour former le cyclohexanone avant d'être dégradé en composés aliphatiques.

Le phénol marqué au  $^{14}\text{C}$  et les intermédiaires de dégradation ont été suivis par Balba et Evans [1980] dans leur consortium méthanogène adapté au catéchol. Le phénol a été métabolisé rapidement et les produits marqués suivants ont été détectés dans le milieu de culture: le cyclohexanone, le 2-hydroxycyclo-hexanone, l'adipate, le succinate, le propionate et l'acétate, confirmant une voie métabolique réductrice (Fig. 12). Le cyclohexanone était aussi l'intermédiaire dans la

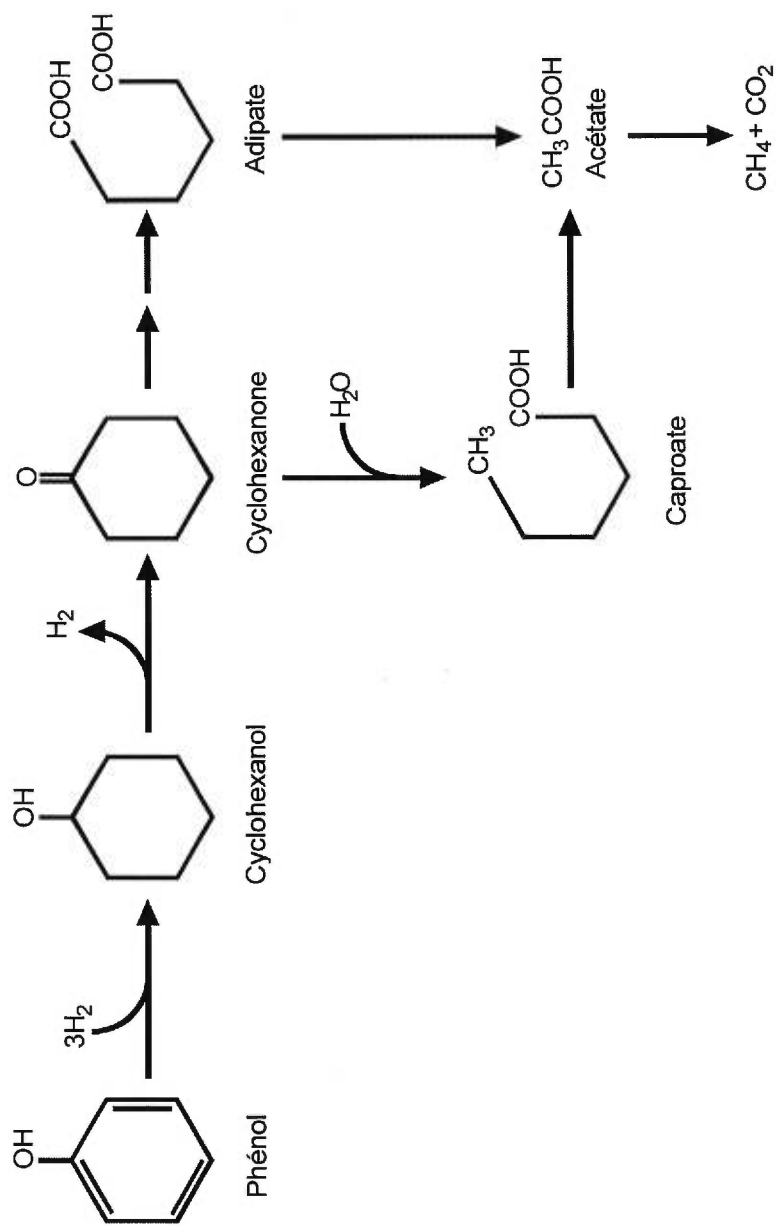


Fig. 12: Dégradation du phénol par la voie métabolique réductrice proposée par Evans [1977].

dégradation du benzoate chez *Moraxella* sp. en conditions dénitrifiantes [Williams et Evans, 1975] et de la dégradation du benzène par le consortium méthanogène [Grbic-Galic et Vogel, 1987].

Plusieurs groupes de recherche étudiant la biodégradation du phénol en conditions anaérobies ont ajouté le cyclohexanone ou le cyclohexanole dans leurs cultures mais ils n'ont pas détecté l'utilisation de ces intermédiaires [Bak et Widdel, 1986; Béchard *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1989; Tschech et Fuchs, 1987].

Une autre voie métabolique de la dégradation du phénol, différente de la voie réductrice, a été rapportée par plusieurs chercheurs [Bisaillon *et al.*, 1994; Gallert *et al.*, 1991; Knoll et Winter, 1987, 1989; Kobayashi *et al.*, 1989; Sharak Genthner *et al.*, 1989, 1991; Zhang *et al.*, 1994]. Quand le phénol non marqué et le CO<sub>2</sub> marqué au <sup>14</sup>C ont été fournis à leur culture méthanogène, Knoll *et al.* [1987] ont observé la formation du benzoate radioactif. Ce résultat indique que la dégradation du phénol passe probablement par la carboxylation du phénol. Le consortium de Kobayashi *et al.* [1989] dégrade rapidement le phénol, le benzoate, le cyclohexane carboxylate, le 1-cyclohexene carboxylate et le caproate, tandis que les intermédiaires potentiels de la voie réductrice (le cyclohexanol, le cyclohexanone, le pimelate et quelques autres) n'ont pas été transformés.

Kobayashi *et al.* [1989] et Knoll et Winter [1987] ont montré, dans leur consortium respectif, que la composition du mélange de gaz avait de l'importance lors de la dégradation du phénol en conditions méthanogènes. En présence du mélange de N<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> (80:20) le benzoate était observé comme produit transitoire, tandis qu'en présence du mélange de H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> (80:20) le benzoate s'accumulait dans le milieu de culture suggérant une relation de type syntrophique entre la bactérie responsable de la transformation du benzoate et les bactéries hydrogénotrophes.

La réaction de carboxylation a été étudiée de façon plus détaillée par Sharak Genthner *et al.* [1989] en suivant des analogues fluorés du phénol lors de la dégradation par le consortium méthanogène. Ils ont conclu que la carboxylation avait lieu en position *para* respectivement à la position du groupement hydroxyle. Cette conclusion était basée sur le fait que le 2-fluorophénol était transformé en 3-fluorobenzoate, le 3-fluorophénol était transformé en 2-fluorobenzoate et que le 4-fluorophénol n'était pas transformé. Une autre étude [Sharak Genthner *et al.*, 1990] a montré que l'addition de 3-fluoro-4-hydroxybenzoate, l'intermédiaire hypothétique mais non détecté de la carboxylation du 2-fluorophénol, produisait d'un côté le 2-fluorophénol (décarboxylation) et de l'autre côté le 3-fluorobenzoate (déhydroxylation). Après une incubation prolongée, le 2-fluorophénol était transformé en 3-fluorobenzoate.

Une preuve additionnelle de la carboxylation en position *para* a été obtenue par Zhang *et al.* [1990a] dans le consortium méthanogène en utilisant le phénol marqué au  $^{13}\text{C}$  et par Tschech *et al.* [1989] *in-vitro* avec les extraits cellulaires de *Thauera aromatica* (initialement *Pseudomonas* sp. K172) et le  $\text{CO}_2$  marqué au  $^{14}\text{C}$ . Dans le premier cas, le phénol marqué à la position du carbone 1 (par rapport au groupement hydroxyle) a donné le benzoate marqué à la position du carbone 4 (par rapport au groupement carboxyle). Dans la deuxième expérience, le  $\text{CO}_2$  radioactif échangeait l'isotope radioactif avec le groupement carboxyle du 4-hydroxybenzoate (4-OHB). D'autre part, dans leur culture mixte, Gallert *et al.* [1991], par une approche similaire, mais en utilisant le phénol deutéré, ont montré que la carboxylation ne pouvait avoir lieu qu'en position *para*.

En conditions sulfatoréductrices, Bak *et al.* [1986] ont décrit une nouvelle espèce bactérienne, *Desulfobacter phenolicum*, capable de dégrader le phénol, le 4-OHB et plusieurs autres composés aromatiques. L'utilisation du 4-OHB suggère que la dégradation du phénol passe probablement par la carboxylation en position *para*. Schnell et Schink [1991] ont montré que la bactérie sulfatoréductrice *Desulfobacterium anilini* nécessite le  $\text{CO}_2$  pour métaboliser l'aniline et le phénol. Toutefois, la voie de dégradation du phénol en conditions sulfatoréductrices n'a pas été étudiée en détail et les métabolites intermédiaires ne sont pas connus.

Par rapport aux communautés microbiennes et dépendamment du régime métabolique, la biodégradation du phénol en cultures pures peut être plus difficile. Bandyopadhyay *et al.* [1998] ont obtenu dans les conditions dénitrifiantes une dégradation efficace de concentrations de 100 à 500 ppm de phénol dans les eaux usées en utilisant *Pseudomonas putida*. Les travaux de Dangel *et al.* [1991], Glöckler *et al.* [1989], Lack *et al.* [1991], Lack et Fuchs [1992, 1994] et Tschuch et Fuchs [1987, 1989] sur des souches de *Thauera aromatica* ont mené à l'élucidation de la voie métabolique utilisée par cet organisme (Fig. 13). La transformation du phénol procède par la phosphorylation initiale pour donner le phénylphosphate qui par la suite est carboxylé en 4-hydroxybenzoate par la phénylphosphate carboxylase. Le 4-OHB est activé par l'ajout du groupement thio-CoA par l'enzyme CoA ligase qui mène à la formation du 4-hydroxybenzoyl-CoA. L'étape suivante est une deshydroxylation catalysée par la 4-hydroxybenzoyl-CoA réductase. Les détails de la première étape, entre le phénol et le phénylphosphate, ne sont pas bien connus au niveau du mécanisme enzymatique. L'enzyme hypothétique impliquée dans la phosphorylation a été nommée la phénol kinase [Lack et Fuchs, 1994].

La souche réductrice de Fe(III), GS-15 de Lovley et Lonergan [1990], minéralise le phénol jusqu'au dioxyde de carbone. L'une des réactions clef de cette

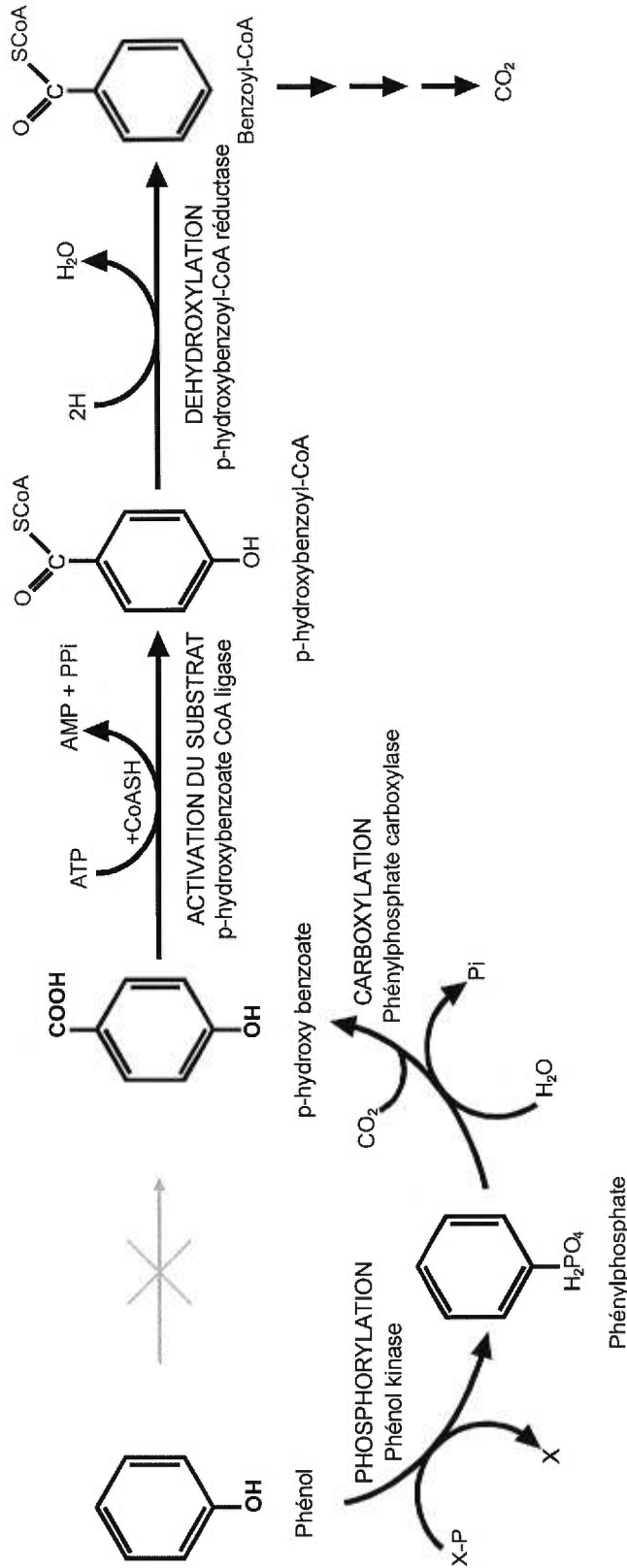


Fig. 13: La voie métabolique de dégradation du phénol par la souche *Thauera aromatica* (modifié d'après Lackett Fuchs, 1994)

dégradation est la carboxylation qui mène au 4-OHB. Mais, à la différence de la voie de dégradation du phénol chez *T. aromatica*, où *in vitro* on ne détecte pas le 4-OHB en fournissant le phénol, les auteurs détectent clairement l'accumulation du 4-OHB à partir de phénol (Fig. 14).

Cependant, pour des raisons thermodynamiques et d'étroite inter-dépendance des bactéries impliquées, l'isolement des bactéries en conditions méthanogènes qui transforment le phénol en méthane et CO<sub>2</sub> a été beaucoup plus difficile et plusieurs

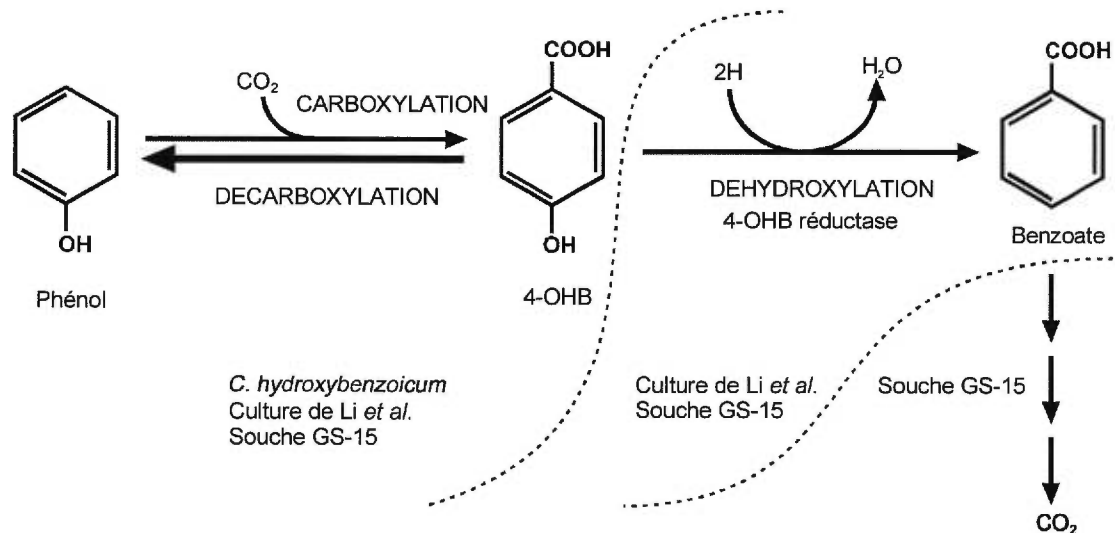


Fig. 14: Dégradation du phénol par *Clostridium hydroxybenzoicum*, par la souche GS-15 et par la culture de Li *et al.*



auteurs n'ont pu suivre cette activité qu'au niveau du consortium. Kobayashi *et al.*, [1989] et Gallert *et al.*, [1991, 1992] ont travaillé avec des consortiums non caractérisés, acclimatés en présence de phénol.

Sharak Genthner *et al.*, [1989, 1991] ont obtenu, par dilution de sédiments d'eau douce, acclimatés initialement en présence de 2-chlorophénol, un consortium capable de minéraliser complètement le phénol en méthane et en CO<sub>2</sub>. La dilution subséquente de ce consortium (dilution 10<sup>-8</sup>) a mené à l'obtention d'une culture (appelée sous-culture B-1) qui était capable de transformer le phénol en benzoate mais ce dernier n'était plus dégradé. Quand le 4-OHB a été ajouté dans le milieu de culture, le phénol et le benzoate ont été détectés comme produits de sa dégradation, suggérant que le 4-OHB d'un côté, était décarboxylé pour donner le phénol, et de l'autre côté, déhydroxylé pour donner le benzoate. L'apparition du phénol était transitoire et il était entièrement transformé en benzoate. Dans cette culture, ils ont observé 5 types de bactéries Gram négatives: un bâtonnet aux bouts arrondis, un coccobacille, un large cocci de forme ovoïde et des bâtonnets semblables à *Methanospirillum* sp. et à *Methanosaeta* sp. Toutefois, la composition exacte de la sous-culture B-1 et les souches responsables des différentes étapes de la dégradation du phénol et du 4-OHB ne sont pas connues.

Knoll et Winter [1989] ont obtenu un consortium défini, composé d'un court bâtonnet Gram négatif mobile, d'un long bâtonnet Gram négatif immobile, de

*Desulfovibrio* sp. et de *Methanospirillum hungatei*. Il a été obtenu à partir des boues diluées provenant d'une usine d'épuration d'eau usée, après 3 ans d'incubation dans un milieu minéral en présence de phénol comme seule source de carbone et d'énergie. Le consortium était capable de minéraliser complètement le phénol et le 4-OHB en méthane et CO<sub>2</sub>. L'étude a montré que le *Desulfovibrio* sp. n'était pas impliqué dans la dégradation du phénol et que le bâtonnet court transformait le benzoate en acétate puis en méthane et CO<sub>2</sub>, mais seulement en présence de *Methanospirillum hungatei*. L'activité de dégradation du phénol et de 4-OHB a été perdue par l'élimination du long bâtonnet Gram négatif immobile, indiquant qu'il est probablement impliqué dans la carboxylation du phénol et de la décarboxylation du 4-OHB. Les essais pour isoler la souche qui transforme le phénol et le 4-OHB ont échoué.

Zhang et Wiegel [1990] et Li *et al.* [1996] ont été les seuls à prétendre avoir isolé des souches (respectivement *Clostridium hydroxybenzoicum* et souche 6) capables de carboxyler le phénol en conditions méthanogènes.

*C. hydroxybenzoicum* (initialement souche JW/Z-1) de Zhang *et al.* [1990, 1994] a été enrichie à partir de sédiments méthanogènes d'eau douce. La culture initiale était adaptée, dans un milieu minéral contenant de l'extrait de levure, au 2,4-dichlorophénol et par la suite au phénol. Les cultures capables de minéraliser le phénol ont été diluées (plusieurs cycles de dilution/incubation) et le phénol a été

remplacé par le 4-OHB. La souche pure a été obtenue par repiquage de colonies isolées après plusieurs séries de dilution en géloses profondes. Étant donné que la présence de spores et d'agrégats cellulaires a été observée, certaines étapes de la purification finale étaient combinées avec le traitement à la chaleur (80°C, 15 min.) et la sonication.

La culture de la souche 6 de Li *et al.* [1996] a été obtenue à partir d'un consortium méthanogène capable de minéraliser complètement le phénol en méthane et en dioxyde de carbone [Beaudet *et al.*, 1986]. Le consortium initial composé d'au moins sept types morphologiques [Bisaillon *et al.*, 1991a] avait été enrichi par acclimatation de cinq semaines en présence de phénol et de protéose peptone à partir d'un mélange de lisier de porc, d'eau de marécage, de boues d'une usine d'épuration d'eau et de sols pollués et non pollués [Beaudet *et al.*, 1986]. Pour identifier la voie de dégradation, des intermédiaires métaboliques potentiels ont été utilisés [Bécharde *et al.*, 1990; Bisaillon *et al.*, 1991a]. Ni le cyclohexanone ni le cyclohexanol n'ont été transformés et ils ont établi que les produits de la dégradation du phénol étaient le benzoate, le 1-cyclohexene carboxylate, le cyclohexane carboxylate et l'heptanoate (Fig. 15). Bécharde *et al.* [1990] ont montré que la dégradation du phénol par le consortium méthanogène passe par la carboxylation du phénol en benzoate et que le protéose peptone était nécessaire dans le milieu de culture pour que la carboxylation puisse avoir lieu. Ils ont émis

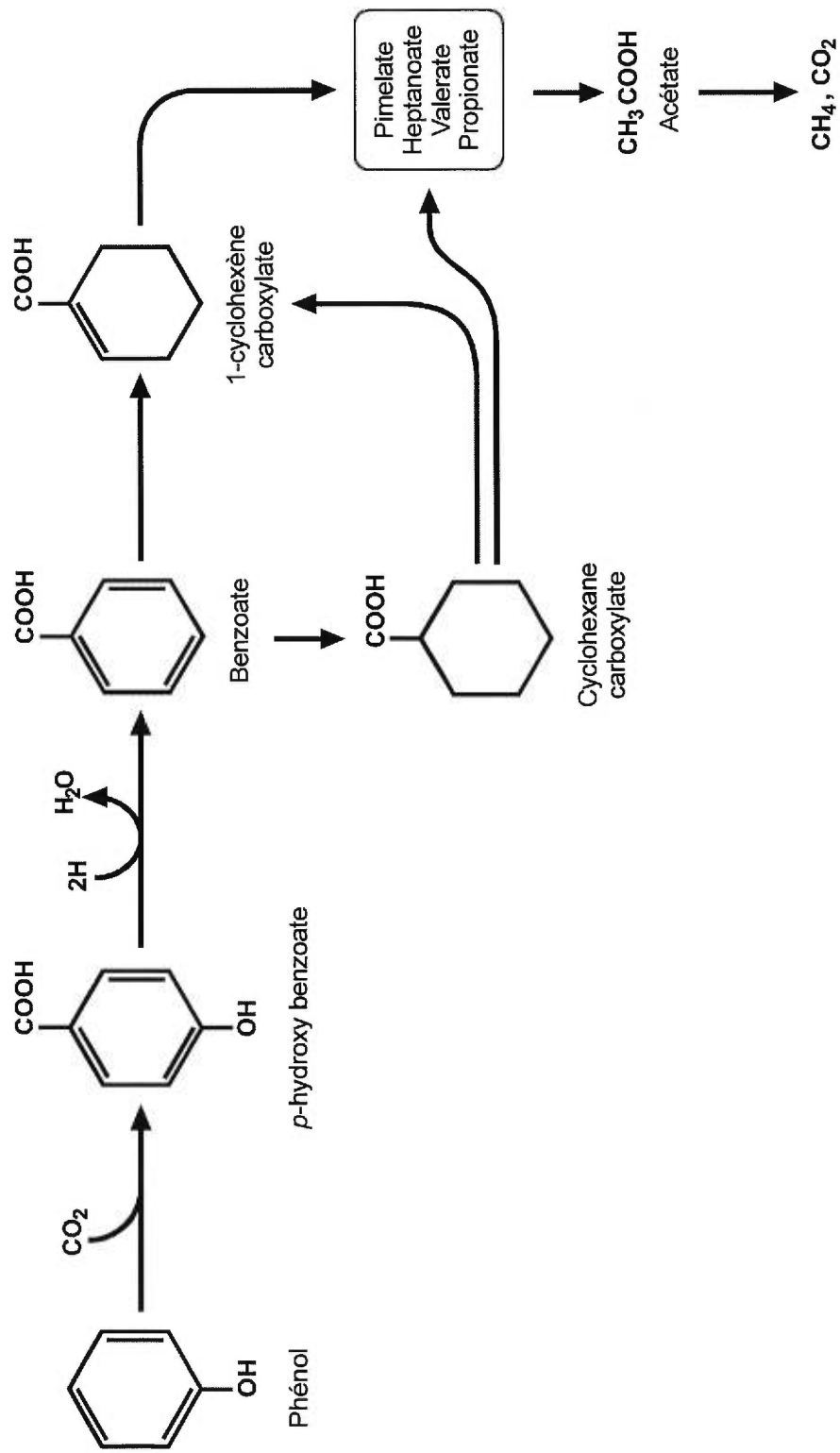


Fig. 15: Les intermédiaires possibles lors de la dégradation du phénol par la voie métabolique impliquant la carboxylation, tels que retrouvés chez plusieurs consortia méthanogènes.

l'hypothèse que le phénol était dégradé par cométabolisme et que le protéose peptone ou l'un des produits de dégradation sert de source de carbone et d'énergie pour permettre la croissance de la bactérie qui transforme le phénol.

Une observation similaire a été faite par Kobayashi *et al.* [1989] puisque la formation du méthane était accélérée en présence de peptone, tandis qu'en son absence, ils observaient une perte occasionnelle d'activité de dégradation du phénol. Dans une étude subséquente, Bisailon *et al.* [1991a] ont montré que l'extrait de levures ou le mélange de tryptophane et de lysine pouvait remplacer le protéose peptone sans affecter l'activité de carboxylation. L'inhibition spécifique des bactéries méthanogènes par l'addition du BESA (acide 2-bromoéthano-sulfonique) n'a pas eu d'effet sur la carboxylation du phénol et le benzoate s'accumulait dans le milieu indépendamment de la présence ou de l'absence d'hydrogène dans le mélange de gaz. Ceci indique que l'organisme responsable de la carboxylation du phénol n'est pas syntrophe vis-à-vis l'hydrogène. Dans le consortium, les micro-organismes carboxylant le phénol ont été évalués à  $1 \times 10^8$  à  $8 \times 10^9$  bactéries par millilitre de culture [Bécharde *et al.*, 1990], indiquant ainsi que les bactéries impliquées dans la carboxylation du phénol font partie des micro-organismes dominants du consortium.

Lors de l'étude du consortium, ce dernier a été traité à la chaleur. L'activité de carboxylation du phénol a été préservée après l'exposition de la culture à 80°C

pendant 15 minutes (elle était perdue à 95°C), mais la production du méthane était perdue et le benzoate accumulait dans le milieu de culture. Cette procédure a permis de diminuer le nombre de formes morphologiques visibles au microscope de sept à cinq. Les souches restantes étaient toutes de type Gram positif et quatre ont été identifiées comme *Clostridium* spp. La cinquième forme observée appartenait à une espèce qui n'a pas pu être identifiée à ce stade. Aucune de ces souches isolées en colonies n'était capable de carboxyler le phénol en culture pure ou en mélange [Bécharde *et al.*, 1990; Bisailon *et al.*, 1991a]. Le traitement subséquent [Li *et al.*, 1996] de la culture avec les antibiotiques (chloramphénicol, tétracycline et clindamycine) a permis d'obtenir une culture composée de deux formes bactériennes. La première, majoritaire, était *C. hastiforme*, l'autre était un bâtonnet Gram positif non identifié. L'addition de l'antibiotique bacitracine dans la culture a eu comme résultat d'inverser la proportion entre les deux souches et *C. hastiforme* a été éliminée par dilution. La culture obtenue était capable de carboxyler le phénol en benzoate, elle était composée d'une seule forme visible au microscope et d'un seul type de colonie sur gélose sang Colombia. Elle a été nommée souche 6 [Li *et al.*, 1996]. L'étude phylogénétique et l'analyse des acides gras membranaires de la souche 6 ont établi qu'elle appartient à une nouvelle espèce apparentée aux groupes III et IV de *Clostridium* [Li *et al.*, 1996].

Zhang *et al.* [1990, 1994, 1994a] et l'équipe de Bisailon [Bécharde *et al.*, 1990; Bisailon *et al.*, 1990, 1991a, 1993, 1994; Létourneau *et al.*, 1995; Li, 1998; Li *et al.*, 1996] ont montré que la dégradation du phénol par leurs souches respectives passe par une carboxylation directe de la molécule du phénol en position *para*.

Contrairement à la situation chez *T. aromatica*, la phosphorylation du phénol et l'activation du 4-OHB par la liaison avec le thio-CoA n'ont pas été observées dans les cultures de Li [1998] ni celles de *C. hydroxybenzoicum* [Zhang et Wiegel, 1994]. Li [1998] a montré que le phénol et non pas le phénylphosphate était le substrat pour la carboxylation en 4-OHB dans la culture. L'enzyme responsable de cette réaction est la phénol carboxylase. Dans le cas de *C. hydroxybenzoicum*, le phénol n'est pas métabolisé par la culture pure en conditions de croissance. Par contre, dans une suspension cellulaire concentrée, avec une concentration élevée de phénol et de bicarbonate, l'activité phénol carboxylase a pu être observée. Le 4-OHB n'est pas deshydroxylé vers le benzoate [Zhang *et al.*, 1994]. De son côté, la culture de Li *et al.* [1996] est capable de carboxyler le phénol et de deshydroxyler le 4-OHB en benzoate sans poursuivre la dégradation (Fig. 14). Quand la culture de Li *et al.* [1996] était étalée sur un milieu solide, la majorité des colonies remises en milieu liquide avait perdu leur capacité à dégrader le phénol. Quelques rares cultures, obtenues de colonies sur milieu solide et qui avait conservé leur activité, ont été utilisées pour la poursuite des travaux.

He et Wiegel [1995] ont proposé que la carboxylation du phénol et la décarboxylation du 4-OHB étaient catalysées par la même enzyme. L'enzyme 4-OHB décarboxylase de la culture de Li [1998], aussi capable de carboxyler le phénol, a été purifiée et comparée avec la décarboxylase de *Clostridium hydroxybenzoicum* [He et Wiegel, 1995; Huang *et al.*, 1999]. Les deux enzymes possèdent des caractéristiques chimiques et des séquences N-terminales différentes. Chez les deux enzymes, l'activité de décarboxylation est favorisée par rapport à l'activité de carboxylation.

## **2.5. Importance de l'étude de la diversité microbienne**

*“Les micro-organismes sont potentiellement partout, mais l'habitat sélectionne”.*

Cette phrase prononcée par Baas Becking en 1934 [rapportée par Leadbetter, 1997] décrit parfaitement “l'origine” de la diversité microbienne. Grâce à leur petite taille, les micro-organismes peuvent être transportés facilement. L'air, les cours d'eau, la poussière et les surfaces des plantes et des animaux leur servent de moyen de transport et de dissémination. On retrouve les bactéries dans les environnements les plus extrêmes de température, pH, salinité, pression, et pauvreté de substrats [Lowe *et al.*, 1993; Schäfer, 1992]. Toutefois, le caractère potentiellement cosmopolite de différentes espèces bactériennes ne peut pas cacher le fait que leur distribution est souvent restreinte à des sites particuliers



[Alexander, 1997]. L'établissement d'une espèce dans un nouvel habitat ne dépend que de sa capacité à survivre et à se multiplier, par conséquent de son adaptation.

Selon Whitman *et al.* [1998], les communautés microbiennes constituent probablement plus de la moitié de la biomasse de notre planète. Les plantes contribuent pour la majeure partie du restant. Rodriguez a estimé à 88 % les populations bactériennes viables mais non cultivables dans les échantillons aquatiques [rapporté par Leung *et al.*, 1994]. Les communautés microbiennes dans le sol ont typiquement des concentrations de l'ordre de  $10^8$  à  $10^9$  cellules par gramme sec de sol et Torsvik a évalué que ce nombre correspond à environ 4 000 génotypes différents [rapporté par Leung *et al.*, 1994]. La balance chimique de la biosphère dépend des micro-organismes [Pace, 1996]. *“Les micro-organismes forment un essentiel et stable support de la biosphère, sans eux, la vie ne pourrait pas continuer à exister. Comprendre la biosphère, au point de vue microbien, est le principal but et nécessaire objectif de la biologie du prochain siècle”* [Woese, 1999].

La compréhension d'un groupe de micro-organismes est basée sur quatre éléments: **Structure-fonction** (quelles sont les composantes d'un organisme et comment elles fonctionnent?), **diversité** (combien, de quelle sorte, comment sont-ils différents ou similaires?), **écologie** (comment interagissent-ils entre eux et avec

leur habitat?) et **évolution** (d'où viennent-ils, comment sont-ils apparentés?) [Woese, 1999]. Mais l'étude de la diversité et de l'écologie microbienne et conséquemment l'étude de la structure-fonction, ont été entravées par le fait que la majorité des bactéries ne pouvait pas être détectée ou identifiée. Jusqu'à récemment, pour pouvoir identifier une bactérie il fallait pouvoir la cultiver. Dans la plupart des cas de communautés microbiennes, moins de 1 % des bactéries peuvent être cultivées dans les conditions du laboratoire [Devereux *et al.*, 1992; Head *et al.*, 1998; Leung *et al.*, 1994; Pace, 1996; Woese, 1999]. Le choix non favorable des nutriments, le manque de micro-éléments, les conditions physiques et chimiques très précises et l'interdépendance des micro-organismes ont été cités comme les raisons de cet échec [Pace, 1996].

### **2.5.1. Différents types d'interactions microbiennes à l'intérieur d'une communauté**

Dans la nature il est extrêmement rare de trouver un habitat composé d'une seule espèce ou lignée cellulaire. L'habitat est défini surtout en termes d'uniformité du point de vue écologique. Sa taille est plus ou moins importante. Il peut être étendu sur plusieurs kilomètres ou restreint à une échelle de quelques millimètres. Différents micro-organismes coexistent, interagissent entre eux et avec l'environnement qui les entoure et par le fait même définissent la communauté.

La communauté microbienne n'est donc ni une culture constituée d'une seule lignée cellulaire, ni un mélange des différentes espèces de bactéries assemblées artificiellement. Par contre, tous les organismes qui occupent le même habitat forment une communauté. Cette distinction est importante pour bien comprendre qu'il s'agit d'un système en constante évolution, mais qui en même temps possède une certaine homéostasie qui reflète les interactions entre tous les membres de cette communauté et l'habitat qu'ils occupent. [Alexander, 1997; Caldwell *et al.*, 1997].

Dans une communauté, les interactions microbiennes sont généralement classées selon l'effet qu'une population exerce sur une autre population [Alexander, 1997; James *et al.*, 1995]. Ces interactions peuvent être positives, neutres ou négatives. Au niveau des interactions négatives, il y a la compétition, le parasitisme et l'amensalisme. Tandis que les interactions positives se classent en commensalisme, en symbiose, en protocoopération et en synergisme. Étant donné que ces interactions peuvent avoir un effet majeur sur la présence de certaines bactéries, sur l'utilisation de sources de carbone et d'énergie, et donc sur la conversion de la matière organique en général, il est important de comprendre comment elles se manifestent.

La syntrophie qui est une interaction de type protocoopération est un cas particulièrement intéressant pour nous. Dans cette relation, les deux populations

échangent un facteur de croissance ou d'énergie. L'exemple le plus classique de syntrophie est le transfert de l'hydrogène (H<sub>2</sub>) entre les bactéries acétogènes et les bactéries méthanogènes [Auburger et Winter, 1995; Berry *et al.*, 1987; Boone *et al.*, 1989; Bryant *et al.*, 1967; Dwyer *et al.*, 1988; Schink, 1991, 1997; Switzenbaum, 1983; Warikoo *et al.*, 1996; Zinder, 1984]. La fermentation de plusieurs composés organiques est favorable au point de vue thermodynamique seulement si la concentration d'hydrogène dans le milieu est faible. En enlevant l'hydrogène, les bactéries hydrogénotrophes déplacent l'équilibre chimique et facilitent la fermentation des composés par les bactéries en amont de la chaîne alimentaire. Une telle coopération a été décrite pour l'utilisation de l'éthanol par la souche S [Bryant *et al.*, 1967], de propionate par *Syntrophobacter wolinii* [Boone et Bryant, 1980], de l'acétate par *Clostridium ultunense* [Schnürer *et al.*, 1996] et de butyrate par la souche NSF-2 [Dwyer *et al.*, 1988]. La syntrophie basée sur le transfert d'hydrogène a été aussi décrite chez les bactéries sulfatoréductrices [Bryant *et al.*, 1977]. Dans ce cas particulier, *Desulfovibrio vulgaris* en absence des sulfates comme accepteur d'électrons, était capable d'oxyder l'éthanol en présence des bactéries méthanogènes utilisatrices d'hydrogène. Les seules cocultures définies connues, impliquées dans la dégradation des composés aromatiques en relation de syntrophie, sont celles pour le benzoate par *Syntrophus buswelli*, par *Syntrophus gentianae* et par la souche SB, et pour le gentisate et l'hydroquinone par *Syntrophus gentianae* [Hopkins *et al.*, 1995; Mountfort et

Bryant, 1982; Wallrabenstein *et al.*, 1995]. Si les bactéries méthanogènes ne sont pas présentes, le rôle de consommateurs d'hydrogène peut être pris en charge par les bactéries homoacétogènes, les bactéries réductrices des sulfates et du soufre, et les bactéries qui réduisent le fumarate ou la glycine. Un autre exemple de syntrophie peut être observé lors de la fermentation des acides aminés quand la réaction de Stickland est partagée entre deux bactéries. Par exemple, la première bactérie oxyde l'alanine à l'acétate, le CO<sub>2</sub>, le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et l'H<sub>2</sub> et la deuxième bactérie utilise l'H<sub>2</sub> produit pour réduire la glycine à l'acétate [Schink, 1997; Zinder, 1984]

L'hydrogène n'est pas le seul composé qui peut être transféré entre deux bactéries. Une telle coopération a été suggérée dans le cas du consortium qui déshalogène le 3-chlorobenzoate [Mohn et Tiedje, 1992]. La souche *Desulfomonile tiedjei* fournissait le benzoate à la bactérie fermentaire (souche BZ-2) et en échange celle-ci produisait les vitamines qui étaient nécessaires à *D. tiedjei* pour la déshalogénéation. Dans un autre exemple, l'équipe de Maymó-Gatell a démontré que durant la déshalogénéation réductrice du tetrachloroéthène, un bâtonnet non identifié fournissait un nutriment qui n'était pas de l'hydrogène à la souche de *Dehalococcoides ethenogenes* [Maymó-Gatell *et al.*, 1997]. Toutefois, de telles coopérations bactériennes sont difficiles à étudier et à mettre en évidence et par conséquent il y a très peu d'exemples qui sont connus.

## 2.5.2. Identification phylogénétique de micro-organismes

Chaque organisme est le produit d'une histoire unique de son évolution. La comparaison des séquences des gènes isolés directement des bactéries dans leur habitat, suggère que les bactéries des espèces rapprochées, mais non identiques de plusieurs groupes microbiens échangent l'ADN entre elles [Pace, 1999; Holzman, 1998]. Les micro-hétérogénéités dans les séquences de certains gènes indiquent que les communautés microbiennes dans l'environnement sont un assemblage non pas d'espèces isolées mais plutôt un groupement de micro-organismes apparentés - le **phylotype**, possédant des caractéristiques physiologiques communes [Pace, 1999]. La connaissance de l'évolution et des liens de parenté qu'une espèce possède avec d'autres espèces peut nous aider, par comparaison et association, à comprendre certaines de ses fonctions physiologiques et métaboliques. La taxonomie, qui n'inclue pas les relations phylogénétiques, ne permet pas facilement de comparer quels traits physiologiques sont communs et de quelle façon ils ont changé au cours de l'évolution dans un groupe de micro-organismes apparentés [Tanner et Woese, 1994]. De son côté, la phylogénie, basée sur la distance évolutive entre les organismes, facilite cette tâche. Les techniques de biologie moléculaire disponibles aujourd'hui permettent aussi d'identifier et de décrire phylogénétiquement les bactéries qui ne peuvent pas être isolées ou cultivées en laboratoire. Certains phylotypes majeurs, présents dans

l'environnement, comme la division OP11, n'ont aucun représentant cultivable [Pace, 1999].

Le gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr 16S) est caractérisé par un faible taux de changement évolutif, par une relativement petite taille, mais qui fournit une information suffisante (environ 1500 bp) et par son omniprésence chez tous les organismes vivants cellulaires. Pour cette raison il a été choisi comme la base moléculaire pour bâtir la phylogénie du monde vivant [Head *et al.*, 1998; Ludwig et Schleifer, 1999; Pace, 1996; Woese, 1999].

L'ARNr 16S contient les régions (domaines) qui ont un degré différent de conservation. Les domaines de forte conservation sont utilisés dans la comparaison des espèces d'organismes éloignés, tandis que les domaines hyper-variables sont plus utiles pour comparer les espèces phylogénétiquement proches. Les domaines conservés sont aussi utilisés lors du développement des amorces universelles (identiques chez un très grand nombre d'espèces) pour le PCR. D'autres régions sont conservées à travers certains groupes d'organismes mais pas d'autres [Devereux *et al.*, 1992; Edwards *et al.*, 1989]. L'établissement du degré de parenté entre deux ou plusieurs souches bactériennes (la phylogénie) est obtenu en dressant un arbre phylogénique. Pour créer un tel arbre, les séquences d'ADN du gène ARNr 16S des bactéries à l'étude sont alignées et le niveau d'homologie est calculé. L'alignement des régions correspondantes est primordial et les régions

de séquence qu'il est impossible d'aligner avec certitude, sont généralement exclues de cette comparaison. Les chiffres sont quelque peu arbitraires, mais de façon générale on considère que deux bactéries appartiennent probablement à la même espèce si l'homologie de leur séquences du gène ARNr 16S est supérieure à 97 %. [Busse *et al.*, 1996; Head *et al.*, 1998; Kimura, 1980].

### **2.5.3. Liens phylogéniques des bactéries sulfatoréductrices**

La diversité phylogénique des bactéries sulfatoréductrices (SRB) excède de beaucoup tout ce qui a pu être envisagé il y a à peine une quinzaine d'années. Même si la connaissance des SRB a commencé avec la formation de deux genres (*Desulfovibrio* et *Desulfotomaculum*), cette diversité est tellement grande qu'elle est comparable avec les lignes évolutives primaires de tous les organismes vivants. Les métabolismes extrêmement diversifiés, les différences au niveau de l'ARNr et le fait que l'on retrouve la réduction dissimilatoire des sulfates chez les *Archaea* et les *Eucarya* sont les indications qui suggèrent de plus en plus que la divergence dans ce groupe bactérien a commencé très tôt durant leur évolution. Par exemple, le genre *Archaeoglobus* est aussi éloigné des autres SRB que des organismes eucaryotes. De plus, il a été montré que *Archaeoglobus* est phylogénétiquement proche des bactéries méthanogènes [Devereux et Stahl, 1993; Singleton, 1993].



Le genre *Desulfotomaculum* est particulièrement diversifié. Certains membres de ce groupe sont phylogénétiquement plus proches des *Bacillus* (Fig. 16) qu'ils le sont des autres *Desulfotomaculum* et plusieurs auteurs [cités par Singleton, 1993] ont suggéré qu'au point de vue évolutif les bactéries *Desulfotomaculum* pourraient représenter la transition de bactéries strictement fermentaires tel que les *Clostridium* vers les SRB. Il n'est donc pas surprenant que de nouvelles espèces de bactéries phylogénétiquement affiliées avec les *Desulfotomaculum* mais possédant une physiologie différente s'ajoutent à la liste [Brauman *et al.*, 1998].

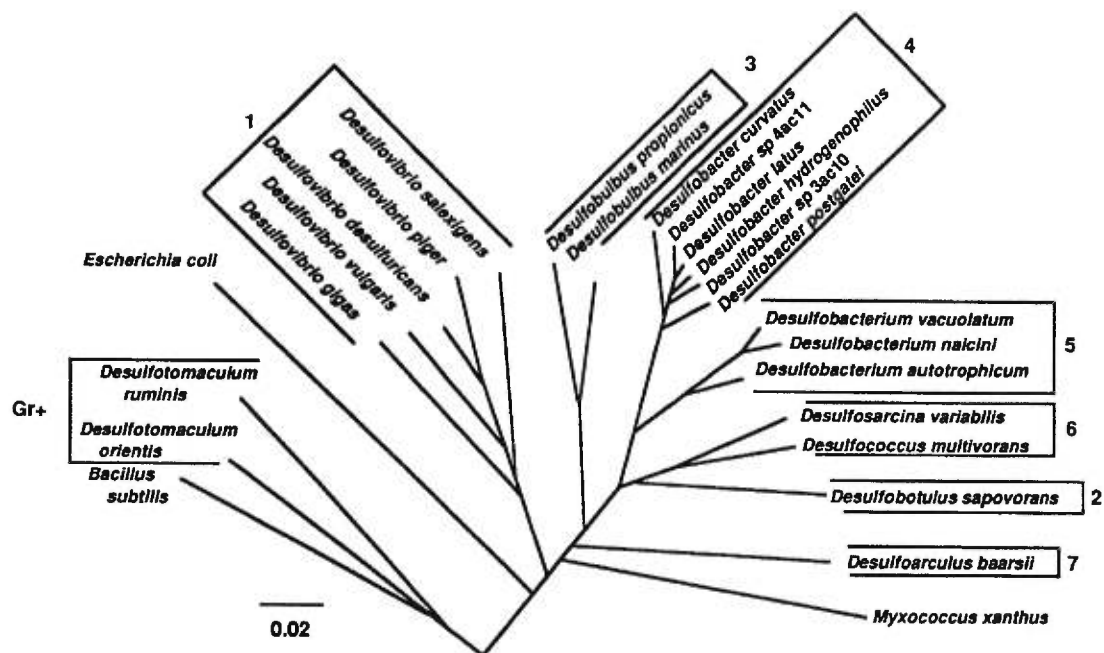


Fig. 16: Phylogénie des bactéries sulfatoréductrices. Les numéros correspondent aux groupements phylogéniques, Gr+ indique affiliation avec les bactéries Gram positives. L'échelle est en nombre de substitutions par la position du nucléotide de l'ARNr 16S (tiré de Devereux *et al.* 1989).

# **Matériel et méthodes**

### 3.1. Micro-organismes utilisés et conditions de culture

Les micro-organismes utilisés dans cette étude sont: la culture de la souche 6 de Li *et al.* [1996] qui est en fait constituée de deux souches: souche 6 de type *Clostridium* et une nouvelle espèce bactérienne purifiée lors de ce projet que nous avons nommée la souche 7. La souche 6 pure a été obtenue aussi lors de ce projet. Ils proviennent originalement du consortium méthanogène de Beudet *et al.* [1986] capable de minéraliser complètement le phénol en méthane et en CO<sub>2</sub>.

La coculture capable de convertir le phénol en benzoate en conditions strictement anaérobies a été initialement décrite comme une culture pure de la souche 6 [Li *et al.*, 1996]. A cette époque, seule la souche 6 pouvait être observée au microscope et sur milieu solide. Après plusieurs repiquages successifs de maintien de la culture présumément pure dans le milieu frais, la présence de la souche 7 pouvait être observée.

Les cultures dans ce projet ont été maintenues sous des conditions anaérobies strictes à 37°C dans l'obscurité. Sauf indications contraires, le milieu de culture utilisé était le milieu minéral de Boyd [Boyd *et al.*, 1983] composé de 0,27 g/l KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,35 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,53 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 0,10 g/l MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,073 g/l CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,020 g/l FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,001 g/l Resazurin, 6,25 ml/l NaOH 1N et 10

ml/l d'une solution d'éléments traces. Le milieu contenait aussi, selon les cas 0,05 ou 0,5 % (p/v) de protéose peptone n° 3 (Difco Laboratories, Detroit, MI) ou 0,5 % (p/v) d'extrait de levures (Difco Laboratories) comme source de carbone. La solution "trace de minéraux" contenait: 100 mg/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l  $\text{ZnCl}_2$ , 100 mg/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$  et 100 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

L'oxygène a été éliminé en faisant bouillir le milieu pendant 20 min. dans un ballon à fond plat branché à un système de refroidissement pour condenser les vapeurs. Le milieu a ensuite été distribué (70 ml par bouteille) dans des bouteilles sérologiques de 120 ml et soumis à un barbotage de 5 min. avec le mélange de gaz  $\text{H}_2:\text{CO}_2:\text{N}_2$  (10:10:80). Les bouteilles ont été hermétiquement fermées avec des bouchons en butyl sous le jet continu du mélange de gaz. Après la stérilisation à l'autoclave (20 min. à 121°C), le milieu a été complété en ajoutant 1 ml de  $\text{NaHCO}_3$  10 % (p/v), 0,37 ml d'une solution de vitamines, 1,5 à 2,0 mM de phénol ou de 4-hydroxybenzoate et 0,5 ml de la solution de l'agent réducteur. La solution de vitamines était composée de: 4 mg/l biotine, 4 mg/l acide folique, 20 mg/l pyridoxine, 10 mg/l riboflavine, 10 mg/l thiamine, 10 mg/l acide nicotinique, 10 mg/l acide pantothénique, 0,2 mg/l vitamine  $\text{B}_{12}$ , 10 mg/l acide *p*-aminobenzoïque et 10 mg/l acide thioctique. L'agent réducteur était généralement le  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (0,05 % (p/v)). Dans certaines expériences, il a été remplacé soit par la cystéine (0,05 % (p/v)), soit par le couple  $\text{H}_2/\text{PdCl}_2$  avec une concentration finale de  $\text{PdCl}_2$

d'environ 330  $\mu\text{g/ml}$  [Breznak et Costilow, 1994]. Les milieux étaient prêts à être utilisés 24 heures après l'ajout du réducteur. Le pH initial des cultures était ajusté entre 7,3 et 7,6.

La stimulation de la culture avec différents accepteurs terminaux d'électrons potentiels a été testée. Pour cela, le milieu de Boyd a été supplémenté selon le cas, avec: 10 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 10 mM  $\text{FeCl}_3$ , 10 mM  $\text{KNO}_3$  ou entre 0,5 et 10 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Dans ces cultures l'agent réducteur  $\text{Na}_2\text{S}$  a été remplacé par la cystéine.

Pour vérifier si le protéose peptone pouvait être remplacé dans le milieu de culture par des composantes plus définies, le mélange de 21 acides aminés (les 20 acides aminés pouvant être utilisés lors de la synthèse protéique plus l'ornithine, le précurseur de l'urée) a été utilisé à sa place. La concentration de chaque acide aminé dans les cultures a été 10 mM. Aussi, afin de voir si les acides aminés pouvaient stimuler la culture, ils étaient ajoutés dans le milieu de Boyd contenant le protéose peptone. La vérification de l'effet inhibiteur sur la carboxylation par les acides aminés tyrosine et phénylalanine, dont la structure chimique est semblable au phénol, a été effectuée, séparément, en les ajoutant (20 mM) dans le milieu de Boyd contenant le protéose peptone.

Quand l'extrait de terre a été ajouté (100 µl et 1 ml) au milieu de culture de Boyd afin de voir s'il pouvait stimuler l'activité phénol carboxylase, il a été préparé de la façon suivante. Un gram de terre noire du jardin (Ferme Bigras, Laval) a été resuspendu dans 100 ml d'eau déionisée. Le tout a été mélangé, incubé 15 min. à 20°C puis laissé 15 min. pour sédimenter. Un volume de 50 ml du surnageant a été récupéré. Il a été rendu anaérobie comme pour les milieux de cultures et stérilisé à l'autoclave (121°C, 20 min.).

### **3.2. Culture en présence des bactéries méthanogènes**

Pour tester l'influence d'un micro-organisme consommateur d'hydrogène sur la croissance de la souche 7 en coculture avec la souche 6, *Methanospirillum hungatei* JF-1 16 (Oregon Collection of Methanogens, Oregon Graduate Institut, Beaverton, OR) a été utilisé pour son caractère hydrogènotrophe. Les cultures ont été effectuées dans le milieu de Boyd, ainsi que dans un milieu anaérobie spécialement défini pour les bactéries méthanogènes à un pH de 7,0 [Daniels *et al.*, 1986]. La composition de ce dernier était la suivante: 0,30 g/l NaCl, 0,064 g/l MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,40 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 0,42 g/l Na-acétate, 0,064 g/l CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,82 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,00 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 ml/l solution minérale et 10 ml/l solution de vitamines. La solution minérale était composée de: 2,02 g/l tricarboxyméthylamine, 0,21 g/l FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,20 g/l CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,10 g/l

MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,10 g/l ZnCl<sub>2</sub>, 0,10 g/l NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,05 g/l CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,05 g/l CuSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,05 g/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O. La composition de la solution de vitamines était la suivante: 10 mg/l pyridoxine-HCl, 5 mg/l riboflavine, 5 mg/l thiamine, 5 mg/l acide nicotinique, 5 mg/l acide *p*-aminobenzoïque, 5 mg/l acide thioctique, 2 mg/l biotine, 2 mg/l acide folique, 1 mg/l cyanocobalamine.

### 3.3. Suivi bactérien

Dans la coculture et dans les cultures pures, la souche 6 et la souche 7 ont été suivies après la coloration Gram [Bartholomew, 1962] par le compte direct avec le microscope Leitz Laborlux D (Leitz, Wetzlar, Allemagne) en observant entre 20 et 50 champs microscopiques pris au hasard (1 bactérie par champ correspondant à une densité de  $3 \times 10^4$  bact./ml dans la culture). Quand la détermination du Gram n'était pas essentielle, seule la première étape (coloration au cristal violet) de la coloration Gram était effectuée pour visualiser les cellules. D'autre part, le compte viable de la souche 6 pouvait être suivi par étalement de dilution des cultures sur le milieu gélose sang de Columbia anaérobie (Columbia Blood Agar de BBL, Cockeysville, MD). Avant d'être utilisées, les géloses ont été pré-réduites durant un minimum de 48 h dans une jarre anaérobie Anapak avec un catalyseur à base de palladium (Scott Laboratories, distribué par Quélab, Montréal, QC) utilisant les enveloppes génératrices de CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> GasPak-70304 (BBL) et l'indicateur

d'anaérobiose GasPak-70504 (BBL). Le suivi du compte viable de la souche 7 n'était pas possible étant donné qu'elle ne poussait pas sur milieu solide.

Dans le processus d'enrichissement des types bactériens (voir plus bas), la souche 6 et la souche 7 ont été également suivies à l'aide du cytofluoromètre (CFM) Coulter XL-MCL (Coulter Electronics, Hialeah, FL) équipé avec un laser à l'argon de 488 nm. Pour ce faire, 1 ml d'une culture de 14 jours a été prélevé à l'aide d'une seringue et centrifugé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml à la température de la pièce pendant 2 min. à 3 000 rpm (environ  $1\,000 \times g$ ). Les cellules ont été resuspendues par vortex dans 1 ml de tampon PBS contenant 10 mM de pyrophosphate et centrifugées de nouveau. La composition du tampon PBS à pH 7 ("Phosphate-buffered saline") était: 0,455 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,948 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8,5 g/l NaCl. Les cellules ainsi lavées ont été resuspendues dans 1 ml de tampon PBS sans pyrophosphate auquel a été ajouté 10  $\mu\text{l}$  de fluorochrome SYTO 16 0,1 mM (Molecular Probes, Eugene, OR). Le tout a été incubé 15 min. à la température de la pièce et injecté dans le CFM. Pour la détection, la limite ("stop-count") de 10 000 événements a été sélectionnée sur l'appareil. Le bruit de fond a été estimé à partir d'un milieu de culture non ensemencé. L'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel XL (Coulter Electronics). Tous les tampons ont été filtrés sur une membrane de 0,2  $\mu\text{m}$  de porosité (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) avant



leur utilisation afin d'éliminer les cristaux ou les précipités formés pendant leur stockage.

### **3.4. Coloration au vert de malachite**

La présence des spores a été vérifiée par la coloration au vert de malachite. Deux à trois gouttes de culture ont été déposées sur une lame de microscope. L'échantillon a été séché à la température de la pièce, puis fixé en passant la lame au dessus de la flamme 4 à 6 fois. La lame a été complètement couverte avec la solution de vert de malachite 5 % (p/v) et la solution a été amenée à l'ébullition pendant 30 s en passant la flamme en dessous de la lame. Après 1 min. d'attente à la température de la pièce, la lame a été rincée pendant 30 s sous l'eau courante, colorée avec la solution de safranine 0,5 % (p/v) pendant 1 min. puis rincée sous l'eau et séchée.

### **3.5. Microscopie électronique**

Les observations des bactéries ont été effectuées avec le microscope à électrons Hitachi 7100 (Hitachi, Tokyo, Japon). Les micro-organismes provenant d'environ 1 ml de culture ont été préalablement fixés avec 1 à 2 % (p/v) de glutaraldéhyde, et colorés négativement avec 2 % (p/v) de phosphotungstate [Kay, 1965].

### 3.6. Enrichissement des bactéries

Afin d'enrichir la souche 7 par rapport à la souche 6, les milieux de culture liquides suivants ont été testés: BHI (Brain Heart Infusion) de Difco, LB (Luria Broth) [Gerhardt *et al.*, 1994], TSB (Trypticase Soy Broth) de BBL, "Super Broth" [Gerhardt *et al.*, 1994] et le milieu minéral de Boyd contenant 2 ou 5 % (p/v) de protéose peptone n° 3.

Finalement, l'enrichissement des types bactériens à partir de la coculture a été réalisé par la centrifugation sur un gradient auto-formé de Percoll (Pharmacia, Baie d'Urfé, Canada) comme l'ont effectué d'autres auteurs [Beaty *et al.*, 1987; MacDonald, 1986; Scherer, 1983]. La suspension de 90 % (v/v) de Percoll dans 0,15 M NaCl désoxygéné a été barbotée 5 min. sous un jet d'azote puis réduite avec Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O (0,05 % (p/v)). Un volume de 11 ml de la suspension de Percoll a été transféré dans un tube stérile (stérilisé à l'autoclave, 20 min. à 121°C) Quick-Seal de 16×76 mm en polyallomer (Beckman Instruments) pour l'ultracentrifugation. La coculture de 14 jours a été préalablement concentrée environ 320 fois par centrifugation à 4°C pendant 20 min. à 10 000 × g dans un rotor JLA-10.500 (Beckman Instruments) et 0,5 ml de cette suspension bactérienne a été déposé sur la suspension de Percoll. Les cellules ont été séparées en bandes distinctes par centrifugation à 20°C pendant 1 h à 25 000 × g dans un rotor à angle fixe de type 40 (Beckman Instruments). Chaque bande formée (2

bandes) a été récupérée à l'aide d'une seringue muni d'une aiguille de calibre 20G1 en perçant à travers la paroi du tube. Les bactéries récupérées ont été resuspendues dans 70 ml de milieu de Boyd. Toutes les manipulations ont été faites stérilement et en absence d'oxygène.

### **3.7. Isolement de la souche 6 et de la souche 7**

À partir de la bande supérieure obtenue sur le gradient de Percoll, la souche 6 a été isolée par une série de dilutions ( $10^{-6}$  –  $10^{-8}$ ) dans le milieu de Boyd frais, suivie par trois repiquages successifs des colonies sur les géloses sang de Columbia incubées en anaérobiose.

La souche 7 débarrassée de la souche 6 a été obtenue comme suit: la bande inférieure du gradient de Percoll a été resuspendue dans le milieu de Boyd contenant 1 µg/ml d'ampicilline (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON). Après 5 jours d'incubation, la culture a été diluée à  $10^{-3}$  et utilisée pour inoculer (inoculum de 12 % (v/v)) un milieu liquide de Boyd sans antibiotique. L'absence de la souche 6 a été vérifiée par l'absence d'opacité de la culture après 40 jours d'incubation, par des étalements sur des géloses sang de Columbia anaérobies et par PCR ("Polymerase Chain Reaction") avec les amorces spécifiques (voir plus loin) pour la souche 6.

La souche 7 débarrassée de la souche 6 a été maintenue à la fois dans le milieu de Boyd et dans le surnageant de la coculture. Ce dernier a été préparé comme suit: la coculture après 10 à 15 jours d'incubation a été centrifugée dans des conditions anaérobies à 4°C pendant 30 min. à 12 000 × g dans un rotor JA-21 à l'aide d'un appareil Beckman J-25 (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Le surnageant recueilli à l'intérieur d'une enceinte anaérobie modèle 1024 (Forma Scientific, Marietta, OH) a été stérilisé par filtration sur une membrane de 0,2 µm de porosité (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) et distribué (60 ml par bouteille) dans des bouteilles sérologiques stériles de 120 ml. Les bouteilles ont été hermétiquement fermées avec des bouchons en butyle. Pour remédier à la perte du CO<sub>2</sub> et du précipité de FeS due aux manipulations, 1 ml de NaHCO<sub>3</sub> 10 % (p/v) et 100 µl de FeCl<sub>2</sub> 1 % (p/v) ont été ajoutés à chacune des bouteilles. De plus, ces dernières ont reçu soit 0,4 ml de phénol 256 mM soit 2,5 ml de 4-hydroxybenzoate 40 mM.

Les milieux semi-solides de Boyd et de surnageant de coculture, tous les deux contenant 0,3 % (p/v) de Bacto-agar (Difco Laboratories), ont été également utilisés pour obtenir des colonies de la souche 7. La même procédure que pour la préparation du milieu liquide a été utilisée, sauf pour l'étape d'addition de vitamines, de NaHCO<sub>3</sub>, de Na<sub>2</sub>S et de phénol ou de 4-hydroxybenzoate. Ces éléments ont été ajoutés pendant que le milieu autoclavé fondu était gardé dans un bain-marie à 40°C. Les milieux complets ont été gardés à l'état liquide pendant 24

h à 40°C pour permettre une bonne réduction, puis inoculés avant de les sortir du bain-marie. Pour permettre une solidification rapide de l'agar, les cultures étaient mises à 4°C pour 20 min., puis incubées à 37°C comme d'habitude.

Dans le but de purifier la souche 7 par repiquages successifs en milieu semi-solide, des colonies obtenues ont été prélevées sous une loupe stéréoscopique. L'ouverture de la bouteille contenant les colonies dans le milieu semi-solide était protégée contre l'entrée d'oxygène par un jet continu du mélange gazeux de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> (10:10:80) stérilisé par filtration (filtre céramique New Brunswick). À l'aide d'une seringue stérile munie d'une aiguille de calibre 18G1.5 et rincée avec le mélange gazeux anoxique, une colonie isolée a été récupérée et transférée immédiatement dans un milieu de culture de Boyd contenant 0,3 % (p/v) de Bacto-agar liquide (gardé à 40°C) et la suspension bactérienne a été diluée dans le même milieu. Après l'incubation dans le milieu gélifié (environ deux semaines à 37°C), les cultures correspondant aux dilutions initiales de 10<sup>-4</sup> à 10<sup>-9</sup> ont été utilisées pour récupérer les colonies isolées.

### **3.8. Culture en conditions sulfatoréductrices**

Pour essayer d'améliorer la croissance de la souche 7 débarrassée de la souche 6, le milieu anaérobie pour les bactéries sulfatoréductrices de Postgate modifié par Lepage *et al.* a été testé [Postgate, 1963; Lepage *et al.*, 1970; Pfennig, 1981]. La

composition de ce milieu était la suivante: 0,5 g/l  $K_2HPO_4$ , 1,0 g/l  $NH_4Cl$ , 1,0 g/l  $Na_2SO_4$ , 0,1 g/l  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 2,0 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 3,5 g/l Na-lactate ou pyruvate, 1,0 g/l extrait de levures, 0,5 g/l  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1 g/l acide ascorbique, 0,1 g/l Na-thioglycolate. L'oxygène a été éliminé par la procédure décrite précédemment pour le milieu de Boyd.

### **3.9. Analyse des composés aromatiques**

La concentration des composés aromatiques dans les cultures tel que le phénol, le 4-hydroxybenzoate et le benzoate a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation par flamme (GC-FID) à l'aide de l'appareil HP 5890 muni d'un injecteur automatique et d'un contrôleur HP 7673A (Hewlett Packard Canada, Kirkland, QC). L'appareil était équipé d'une colonne capillaire HP-5 (5 % phényle-méthyle-silicone) de 25 m. L'acquisition et l'analyse des données se faisaient de façon automatique par le logiciel ChemStation version A.03.34 fourni avec l'appareil (Hewlett Packard). Avant d'être injecté pour l'analyse sur le GC-FID, 1 ml de culture prélevé stérilement avec une seringue munie d'une aiguille de calibre 24G1 a reçu 100  $\mu$ l d'une solution de *m*-crésol (Sigma-Aldrich) de 1 500 ppm. Le *m*-crésol a joué le rôle de standard interne utilisé lors du calcul des concentrations des composés suivis. Par la suite, la solution a été acidifiée avec 200  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  50 % (v/v). Les composés

aromatiques ont été extraits avec 2 ml d'éthyle éther "ultra resi-analyzed" (Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ) par un brassage de 10 s au vortex suivi d'une centrifugation de 1 min. à environ  $1\,000 \times g$ . Approximativement la moitié de la phase organique a été transférée dans un tube contenant une pincée (environ 100 mg) de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  afin de capter les traces d'eau pouvant s'y trouver. Les composés ont été ensuite dérivés pour les rendre plus volatils en mélangeant 250  $\mu\text{l}$  de la phase organique déshydratée avec 50  $\mu\text{l}$  de BSTFA (*N,O*-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide) (Pierce, Rockford, IL) dans un vial pour l'injecteur et en incubant le mélange de 15 à 30 min. à  $70^\circ\text{C}$  [Béchar *et al.*, 1990].

La concentration (en ppm) de chacun des composés a été calculée automatiquement par le logiciel ChemStation selon une courbe d'étalonnage pour chaque produit à l'étude vis-à-vis du standard interne.

### 3.10. Détermination du $\text{H}_2\text{S}$

La production du  $\text{H}_2\text{S}$  par les cultures bactériennes a été suivie d'une façon semi-quantitative par la méthode du précipité colloïdal formé par la réaction chimique:  $\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{S} \rightleftharpoons \text{CuS} + \text{H}_2\text{SO}_4$  [Cord-Ruwisch, 1985]. Dans une éprouvette de 10 ml contenant 4 ml de réactif de cuivre ( $\text{CuSO}_4$  5 mM,  $\text{HCl}$  50 mM) en agitation constante par vortex, 100  $\mu\text{l}$  de culture ont été ajoutés. L'agitation a été poursuivie pendant exactement 5 s, puis le mélange a été immédiatement transféré dans une

cuvette de 4×10×45 mm (Sarstedt, Newton, NC) pour la lecture au spectrophotomètre Spectronic 1001 Plus (Milton Roy, Rochester, NY) à une longueur d'onde de 480 nm. Le mélange de 4 ml de HCl 50 mM avec 100 µl de culture abiotique a servi en tant que blanc.

### **3.11. Détermination du $\text{SO}_4^{2-}$**

L'utilisation des sulfates par les bactéries a été vérifiée par la méthode turbidimétrique semi-quantitative modifiée à partir de celle rapportée par Clesceri *et al.*, [1989]. Cette modification se situe au niveau des volumes utilisés. L'appareil Spectronic 1001 Plus (Milton Roy) ajusté à une longueur d'onde de 420 nm a été utilisé pour la lecture de la densité optique. Environ 1 ml d'une culture a été filtré (0,2 µm) pour enlever les bactéries et d'autres particules non solubles puis dilué 50 fois dans l'eau déionisée (500 µl / 25 ml). Dix millilitres de cette dilution ont été transférés dans un tube de 40 ml et 0,5 ml du conditionneur (50 ml glycérol, 300 ml H<sub>2</sub>O déionisée, 30 ml HCl concentré, 100 ml isopropanol et 75 g NaCl) a été ajouté (un deuxième tube identique a servi pour corriger les valeurs de densité optique, voir plus loin). À ce mélange, en agitation constante par vortex, a été ajouté 100 mg de BaCl<sub>2</sub>. L'agitation a été poursuivie pendant exactement 60 s, puis le mélange a été transféré dans une cuvette pour la lecture au spectrophotomètre (mesure de la suspension colloïdale du BaSO<sub>4</sub> formé)



exactement 3 min. plus tard. Afin de corriger les valeurs de densité optique pour qu'elles reflètent seulement la quantité du colloïde formé, la valeur obtenue avec le mélange dans lequel le  $\text{BaCl}_2$  n'a pas été ajouté a été soustraite de la valeur obtenue avec le mélange contenant le  $\text{BaCl}_2$  (le milieu de culture contient le résazurin, un indicateur d'oxydo-réduction qui en présence d'oxygène donne une teinte rosâtre qui peut varier d'une culture à l'autre et fausser les mesures). Le mélange de 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  avec 0,5 ml du conditionneur et 100 mg du  $\text{BaCl}_2$  a servi en tant que blanc.

### **3.12. Détermination du $\text{SO}_3^{2-}$**

L'utilisation des sulfites par les bactéries a été vérifiée par titration selon la méthode iodométrique [Clesceri *et al.*, 1989]. L'échantillon de culture (4 ml) a été prélevé et fixé immédiatement avec 50  $\mu\text{l}$  d'EDTA 2,5 % (p/v) et acidifié avec 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 % (p/v). À ce mélange, nous avons ajouté 50  $\mu\text{l}$  de solution fraîche d'acide sulfamique ( $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ) 10 % (p/v) et 50  $\mu\text{l}$  de solution d'amidon soluble de patates 0,5 % (p/v) contenant 0,4 % (p/v) de propionate de sodium et 0,2 % (p/v) d'azoture de sodium. Le tout a été titré immédiatement avec le réactif d'iodure-iodate. La composition du réactif d'iodure-iodate était la suivante: 0,4458 g/l  $\text{KIO}_3$  séché pendant la nuit à  $120^\circ\text{C}$ , 4,35 g/l KI, 0,310 g/l  $\text{NaHCO}_3$ .

Pour déterminer la concentration des ions  $\text{SO}_3^{2-}$  le calcul suivant a été effectué:

$$\text{Concentration (mg/l) de sulfites} = \frac{(B - A) \times M \times 40\,000}{\text{vol}}$$

A : volume (ml) du réactif d'iodure-iodate pour l'échantillon abiotique sans  $\text{SO}_3^{2-}$  (blanc)

B : volume (ml) du réactif d'iodure-iodate pour l'échantillon de culture

M : molarité du réactif d'iodure-iodate

vol : volume de l'échantillon (ml)

La constante 40 000 est utilisée pour convertir les unités de g en mg et pour passer de la concentration du composé titrant à la concentration du composé titré.

### **3.13. Extraction de l'ADN génomique total**

Les cellules contenues dans 5 à 10 ml de culture selon le cas ont été récupérées par centrifugation à 4°C pendant 30 min. à 12 000 x g dans un rotor JA-21 (Beckman Instruments). Le culot obtenu a été congelé à -70°C pendant 20 min. puis resuspendu au vortex dans 0,5 ml de la solution TEN composée de: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 8,0 et contenant 10 mg/ml de lysozyme frais (Roche Diagnostics Canada, Laval, QC). Le tout a été transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et incubé 15 min. à la température de la pièce. Du SDS 10 % (p/v) et du 2-mercaptoéthanol (ICN Biochemicals, Aurora, OH) ont été ajoutés pour avoir une concentration finale de 1 % pour chacun des composés.

Trois cycles consécutifs de gel/dégel en alternant entre le bain d'éthanol sur glace sèche (10 min. à -70°C) et le bain-marie (5 min. à 65°C) ont suivi. Une solution de protéinase K (Roche Diagnostics) 10 mg/ml a été ajoutée à la concentration finale de 1 mg/ml et le tout a été incubé pendant 2 h à 45°C [Sambrook *et al.*, 1989].

L'ADN libéré a été purifié par extraction au phénol-chloroforme-isoamyle (50:49:1). Un volume de phénol "Ultra Pure" équilibré à pH 7,5 et saturé avec de l'eau (Gibco BRL, Grand Island, NY) a été ajouté, mélangé délicatement et le tout a été centrifugé pendant 5 min. à 4000 × g pour séparer les phases. La phase aqueuse a été récupérée dans un nouveau tube et le cycle a été répété avec un volume de phénol-chloroforme-isoamyle (50:49:1). Le dernier cycle de purification de la phase aqueuse a été effectué en ajoutant un volume de chloroforme-isoamyle (98:2) et l'ADN de la phase aqueuse récupérée a été précipité avec 2 volumes d'éthanol 95 % (v/v) pendant 2 h à -70°C. L'ADN a été obtenu sous forme de culot suite à la centrifugation (30 min. à 12000 × g) et ce dernier a été rincé avec l'éthanol 70 % (v/v). Après l'évaporation de l'éthanol, l'ADN a été resuspendu dans 25 à 250 µl d'eau déionisée, stérile et la concentration a été évaluée par la migration sur un gel d'agarose (ICN Biochemicals) de 0,7 % (p/v) dans le tampon TBE 1×, par rapport à un ADN de concentration connue migré en parallèle [Sambrook *et al.*, 1989]. Le tampon TBE

1× a été préparé à partir de la solution stock 10× composée de: 108 g/l Tris base, 55 g/l acide borique, 40 ml/l EDTA 0,5 M pH 8,0.

### **3.14. Extraction plasmidique**

Pour analyser les plasmides recombinants introduits dans les bactéries par la transformation, les plasmides ont été extraits des cellules par la méthode modifiée de Holmes et Quigley [1981]. Les cellules bactériennes (environ 100 mg) provenant d'une culture de 18 h sur milieu solide ont été lysées dans un tube Eppendorf de 1,5 ml par l'action simultanée de tampon STET (8 % saccharose, 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 0,5 % Triton X-100) 250 µl, d'une solution fraîche de lysozyme (10 mg/ml) 25 µl et de la température (1 min. dans un bain-marie à 100°C). Les débris cellulaires, les protéines et l'ADN chromosomique ont été précipités par l'addition de 300 µl d'ammonium acétate 7,5 M pH 7,5 et éliminés par centrifugation (10 min. à 12 000 × g). L'ADN plasmidique a été précipité avec 2 volumes d'éthanol 95 % (v/v) pendant 15 min. à -70°C. L'ADN a été obtenu sous forme de culot suite à la centrifugation (15 min. à 12 000 × g). Ce dernier a été rincé avec l'éthanol 70 % (v/v). Après l'évaporation de l'éthanol, l'ADN a été dissout dans 100 µl d'eau déionisée, stérile.

### **3.15. Clonage du gène de l'ARNr 16S de la souche 7 et étude phylogénétique.**

Afin de connaître l'appartenance phylogénétique de la souche 7, le gène de l'ARNr 16S a été amplifié par PCR à partir de l'ADN chromosomique total extrait d'une culture enrichie en souche 7. Lors de cette amplification l'ADN polymérase *Pfu* (Stratagene, La Jolla, CA) et les amorces eubactériennes universelles pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et pH (5'-AAGGAGGTGATCCAGC CGCA-3'), correspondant respectivement aux nucléotides 8 à 27 et 1541 à 1522 de la séquence du gène de l'ARNr 16S d'*E. coli* [Genbank J01695, Massol-Deya *et al.*, 1995] ont été utilisés. Le produit du PCR a été traité avec la protéinase K (concentration finale de 1 mg/ml) pendant 2 h à 45°C, puis purifié par le traitement phénol-chloroforme-isoamyle suivi par la précipitation à l'éthanol comme décrit plus tôt.

Le fragment de 1,5 kb généré par le PCR a été cloné dans le vecteur pBluescript SK (Stratagene) dans le site de restriction *EcoRV* et transformé par la méthode au chlorure de calcium [Sambrook *et al.*, 1989] dans la souche MV1190 d'*E. coli* K12. La souche transformée était incubée sans agitation à 37°C pendant 30 min. dans un bouillon LB et par la suite étalée sur le milieu LB solide (agar 1,5 %) contenant 50 µg/ml d'ampicilline pour permettre la sélection des clones qui ont acquis le plasmide. À partir d'un clone, la cartographie du fragment de 1,5 kb a

été établie par les digestions simples et doubles (en ce qui concerne le nombre d'enzymes utilisés dans une digestion) du plasmide extrait, avec différentes enzymes de restriction. Quatre fragments: *EcoRI* (650 bp), *KpnI-XbaI* (825 bp), *EcoRI-XbaI* (475 bp) et *XbaI-HindIII* (400 bp) ont été sous-clonés dans le pBluescript pour pouvoir séquencer le gène de l'ARNr 16S sur toute sa longueur. Les plasmides obtenus ont été transformés dans la souche MV1190 d'*E. coli* K12.

L'ADN simple brin utilisé lors du séquençage a été préparé de la façon suivante. La souche MV1190 d'*E. coli* K12 porteuse du plasmide pBluescript (avec le fragment cloné) a été incubée à 37°C dans 1,5 ml de milieu 2YT contenant 150 µg/ml d'ampicilline et 0,2 % de glucose jusqu'à l'apparition d'un faible nuage bactérien. Un volume de 5 µl de la suspension du phage M13KO7 ( $3,5 \times 10^{11}$  ufp) ont été ajoutés et la culture a été incubée 60 min. à 37°C. La kanamycine a été ajoutée à une concentration finale de 75 µg/ml et la culture a été incubée un autre 45 min. Un volume de 100 µl de cette culture a été inoculé dans 11 ml de milieu frais équivalent et incubés pendant la nuit à 37°C dans un erlenmeyer de 50 ml. La culture a été centrifugée deux fois à 1000 x g pendant 15 min. et le surnageant a été récupéré. Un volume de 2,5 ml d'une solution composée de 20 % de PEG et d'acétate de sodium 3,5 M a été ajouté au surnageant et le tout a été incubé 45 min. sur la glace puis centrifugé pendant 15 min. à 10 000 rpm dans un rotor JA-20 (Beckman Instruments). Le culot a été resuspendu dans 400 µl de tampon One-

for-All 1x (Pharmacia) contenant la RNAase (20 µg/ml) et la DNAase (40 µg/ml) et incubé 30 min. à 37°C. Un volume de 4 µl d'EDTA 0,5 M et 4 µl de SDS 20 % ont été ajoutés et l'ADN a été purifié par extraction au phénol-chloroforme-isoamyle (50:49:1), précipité avec de l'éthanol et resuspendu dans 50 µl par la méthode habituelle (voir Extraction plasmidique).

Le séquençage d'ADN simple brin a été effectué par la méthode de terminaison de la chaîne par les didéoxynucléotides [Sanger *et al.*, 1977; Sambrook *et al.*, 1989]. La séquence a été vérifiée contre la présence de chimères (molécule composite due aux erreurs d'amplification, dont la séquence appartient à des espèces différentes) avec le logiciel Check\_Chimera de Ribosomal Database Project (Univ. of Illinois, Urbana-Champaign, IL) et alignée avec les séquences connues du gène de l'ARNr 16S dans les banques géniques avec FASTA et BLAST ("National Center for Biotechnology Information", <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov>). L'alignement multi-séquences a été effectué à l'aide du logiciel PILEUP (Genetic Computer Group, Univ. of Wisconsin), puis l'analyse et l'arbre phylogénique ont été réalisés avec les logiciels de l'ensemble PHYLIP v.3.5. tel que décrit auparavant [Li *et al.*, 1996]. La séquence a été déposée dans la banque de données Genbank sous le numéro AF072863 [Villemur *et al.*, 1998].

Chaque réaction d'amplification par PCR a été effectuée dans un volume de 50 µl composé de 48 µl du "cocktail" expérimental et de 2 µl de l'ADN cible (environ 50

à 100 ng) ajoutés au moment du “hot start”. Le mélange était protégé des évaporations par une mince couche d’huile minérale stérile. Le “cocktail” expérimental était préparé pour l’ensemble des réactions et distribué par la suite. Pour chaque réaction, la composition du “cocktail” était la suivante: 41,5 µl H<sub>2</sub>O déionisée stérile, 5 µl de tampon polymérase 10× (Stratagene), 1 µl “amorce 1” (10 pmol/µl), 1 µl “amorce 2” (10 pmol/µl), 1 µl dNTP (200 pmol/µl chaque), 1 µl BSA (Bovine Serum Albumin) (100 µg/ml), 0,5 µl ADN polymérase (5 U/µl). Les conditions du PCR sur l’appareil DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) ont été les suivantes: “hot start” avec 3 min. à 80°C, dénaturation 5 min. à 94°C et appariement des amorces à 55°C pendant 5 min., 35 cycles d’élargissement de 2 min à 72°C, dénaturation 40 s à 94°C, appariement 1 min. à 55°C, suivi par 1 cycle d’élargissement terminale de 10 min. à 72°C.

### **3.16. Identification des souches par RFLP ("Restriction Fragments Length Polymorphism")**

L’identité de la souche 6 et de la souche 7 a été, dans certains cas, vérifiée par la comparaison du profil de restriction (RFLP) [Busse *et al.*, 1996; Massol-Deya *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1998] des bactéries provenant d’une culture donnée avec celui obtenu originalement avec l’ADN amplifié lors de l’étude phylogénétique. Pour ce faire, une région d’ADN chromosomique provenant de la culture a été



amplifiée par PCR en utilisant soit les amorces universelles pA/pH (voir plus haut), soit les amorces universelles de la région intergénique 16S-23S pHr/p23SRO1 (5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3' et 5'-GGCTGCTTCTAAGCCAAC-3' respectivement) [Gürtler et Stanisich, 1996; Massol-Deya *et al.*, 1995]. Au lieu de l'ADN polymérase *Pfu*, la *Taq* polymérase (Pharmacia, Baie d'Urfé, Canada) avec le tampon fourni par le fabricant a été utilisée. Environ 100 à 200 ng de l'ADN généré ont été digérés avec des endonucléases de restriction *RsaI* et *TaqI* (Pharmacia) pendant 3 h dans des conditions optimales pour chaque enzyme pour assurer la digestion complète et le tout a été séparé par migration électrophorétique sur gel d'agarose de 1,2 ou 2 % (p/v). Les conditions d'amplification étaient celles déjà décrites dans la section précédente, sauf pour la température d'appariement qui était de 48°C pour les amorces intergéniques.

### **3.17. Détection des souches par PCR spécifique**

La présence ou l'absence des souches 6 et 7 dans des cultures a été vérifiée par le PCR avec des amorces spécifiques pour ces deux souches bactériennes. À partir de multiples alignements des gènes de l'ARNr 16S des espèces les plus rapprochées, deux séquences uniques à la souche 7 ont été choisies pour les amorces: PAT1G et PAT2D (5'-GGTTACATTGAAACGCAAGTAG-3' position 64-85 de la séquence déposée dans la banque de données Genbank AF072863 et 5'-CACTATAACATG

TGTCACTG-3' position 205-186 respectivement). Les séquences ont été vérifiées contre la présence de séquences homologues chez d'autres espèces avec le logiciel Check\_Probe (Ribosomal Database Project) puis synthétisées avec l'appareil Gene Assembler (Pharmacia). Pour la souche 6 les amorces spécifiques Phen1 et Phen2 déjà décrites [Lévesque *et al.*, 1998] ont été utilisées. Les fragments générés par le PCR spécifique ont été de 931 bp pour les amorces Phen1/Phen2 de la souche 6 et de 142 bp pour les amorces PAT1G/PAT2D de la souche 7. Les conditions d'amplification étaient celles déjà décrites, sauf pour la température d'appariement qui était selon le cas, de 50 ou 55°C.

### **3.18. Détection du gène de la 4-hydroxybenzoate décarboxylase**

À partir de la séquence N-terminale en acides aminés (KMKTMDG, positions 3 à 9) de l'enzyme 4-hydroxybenzoate décarboxylase purifiée par Li [1998], la séquence génomique possible a été déduite (5'-AA<sup>A</sup>/<sub>G</sub>ATGAA<sup>A</sup>/<sub>G</sub>ACNATGGA<sup>T</sup>/<sub>C</sub>GG-3') et les oligonucléotides dégénérés ont été synthétisés sur l'appareil Gene Assembler (Pharmacia).

Les oligonucléotides dégénérés ont été marqués au [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (ICN Biochemicals) avec la T<sub>4</sub> polynucléotide kinase (Pharmacia) et hybridés avec l'ADN total extrait des cultures de la souche 6, de la souche 7 et de la coculture

[Sambrook *et al.*, 1989]. L'ADN (environ 200 ng) a été immobilisé sur la membrane de nylon chargée positivement (Boehringer Mannheim) montée sur l'appareil Bio-Dot (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en suivant le protocole de Bio-Rad. La fixation permanente de l'ADN cible a été obtenue par l'exposition de la membrane humide aux UV (254 nm, 150 mJ/cm<sup>2</sup>) dans un appareil GS Gene Linker UV Chamber (Bio-Rad) [Sambrook *et al.*, 1989].

Pour marquer la sonde, 1 µl d'oligonucléotides dégénérés (56 pmol/µl) a été mis en présence de 10 µl d'ATP (10 mM dilué 1/2061), 2 µl de polynucléotide kinase (9,5 U/µl), 5 µl de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (4500 Ci/mmol) et de 5 µl de tampon 10× One-for-All-Plus (Pharmacia), dans un volume final de 50 µl.

La fourchette de température de dénaturation ("melting temperature")  $T_m$  pour la sonde dégénérée a été calculée selon la formule  $T_m = 2 \times (\text{nombre des A/T}) + 4 \times (\text{nombre des G/C})$  [Brown, 1991] entre 52 et 60°C. La préhybridation a été réalisée pendant la nuit à 32°C dans un volume de 12 ml de la solution composée de 1 ml HEPES 1 M, pH 7,0, 5 ml SSC 20×, 2 ml SDS 10 % (p/v), 0,08 ml EDTA 0,5 M, 4 ml solution de Denhardt 50×, 0,5 ml ADN de sperme de saumon (10 mg/ml), complétée avec de l'eau déionisée à 20 ml. Par la suite, la solution a été changée avec 8 ml de solution fraîche à laquelle a été ajoutée la sonde marquée et l'hybridation a été poursuivie pendant 3 h à 38°C. Les conditions des lavages dans du SSC 6× – SDS 0,1 % ont été les suivantes: 4 rinçages rapides à 38°C, 2 h à

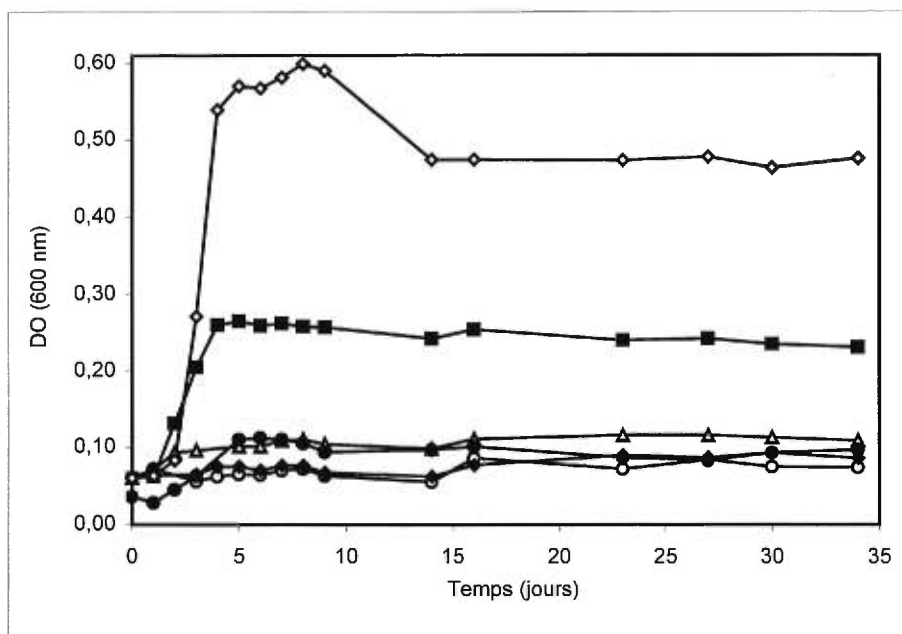
38°C, 2 lavages de 15 min. à 42°C. Toutes ces étapes ont été effectuées dans un four d'hybridation rotatif. Le résultat a été révélé par autoradiographie (exposition de 35 h) sur film photographique transparent de Kodak. La solution de SSC 20×, pH 7,0 était composée de 701,0 g/l NaCl et de 352,8 g/l citrate de sodium. La composition de la solution de Denhardt 50× était la suivante: 1,0 g Ficoll 400, 1,0 g polyvinyl-pyrrolidone, 1,0 g BSA fraction V, complétée avec H<sub>2</sub>O déionisée à 100 ml.

# Résultats

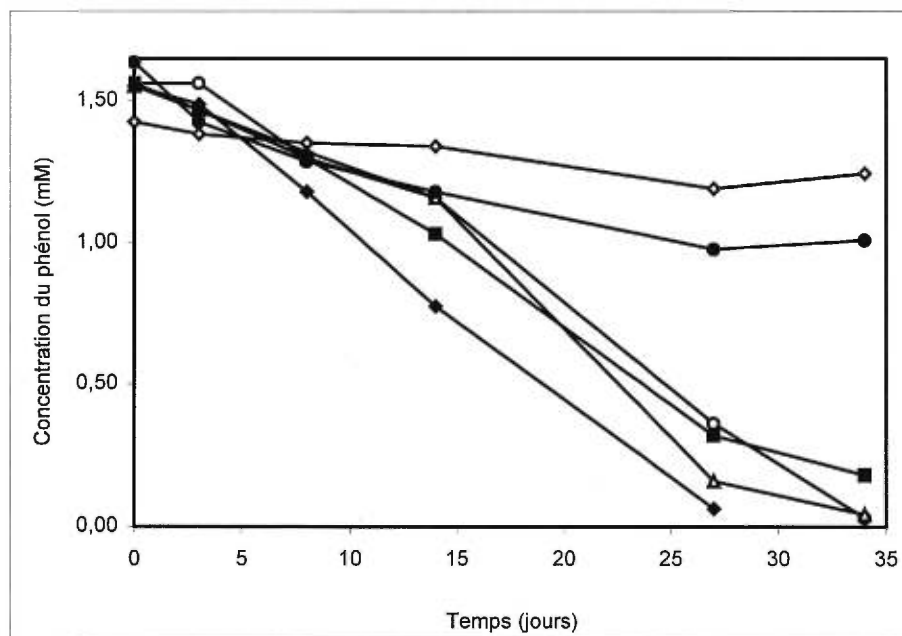
## **4.1. Croissance et activité de la culture de *Li et al.* [1996]**

Nous avons essayé d'améliorer la croissance de la souche 6 et son activité phénol carboxylase en croyant initialement que la culture de *Li et al.*[1996] était constituée seulement de la souche 6. Au début de ce projet, seule la souche 6 pouvait être observée au microscope et sur milieu solide.

La croissance et l'activité de transformation du phénol n'ont pas été observées dans les milieux LB, TSB, et "Super Broth". Par rapport à la concentration de 0,05 % (p/v) en protéose peptone, l'addition de 2 % (p/v) de protéose peptone au milieu de Boyd a permis une augmentation de la biomasse environ 3 fois plus importante (D.O. = 0,28) et celle de 5 % (p/v) environ 6 fois (D.O. = 0,6) (Fig. 17a). En même temps, l'ajout de 5 % (p/v) de protéose peptone a entraîné l'absence d'activité de carboxylation (Fig. 17b). Le milieu BHI a permis une croissance équivalente à celle obtenue avec le milieu de Boyd contenant 0,5 % de protéose peptone (Fig. 17a) mais l'activité phénol carboxylase a été inhibée (Fig. 17b). La quantité de biomasse produite dans ces deux milieux était faible (D.O. d'environ 0,1) et à peine plus forte que celle obtenue avec les concentrations en protéose peptone de 0,025 et de 0,05 % (p/v) (D.O. d'environ 0,07). L'activité dans les cultures de Boyd contenant 0,025, 0,05 et 0,5 % (p/v) de protéose peptone était



a)



b)

Fig 17: Effet du milieu BHI (●) et de différentes concentrations de protéose peptone (○ 0,025, ◆ 0,05, △ 0,5, ■ 2, et ◇ 5 % (p/v)) dans le milieu de Boyd sur la croissance de la culture de Li *et al.*[1996] (a) et sur l'activité de carboxylation de phénol (b).

comparable (Fig. 17b). En absence de protéose peptone dans le milieu de Boyd, il n'y a pas eu de croissance ni de transformation de phénol par la culture de Li *et al.*[1996] (Fig. 18).

Dans le but de définir d'avantage les conditions nécessaires à la croissance de la culture de la souche 6 de Li *et al.*[1996], nous avons entrepris de remplacer le protéose peptone par un mélange composé de 21 acides aminés. Le premier repiquage dans ce milieu a permis une dégradation du phénol légèrement plus

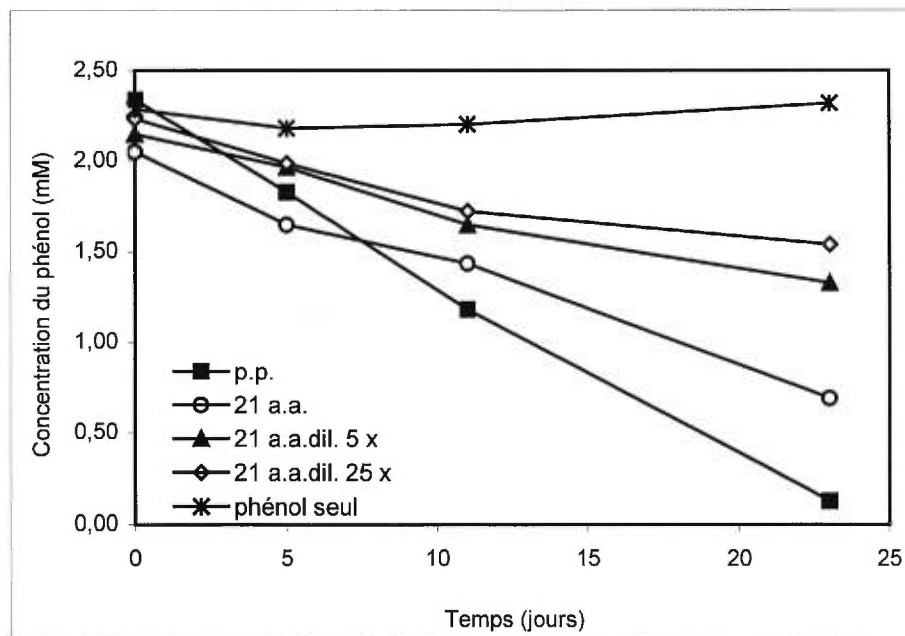


Fig. 18: Dégradation du phénol selon la présence de protéose peptone (p.p.) et de différentes concentrations de 21 acides aminés (21 a.a.).

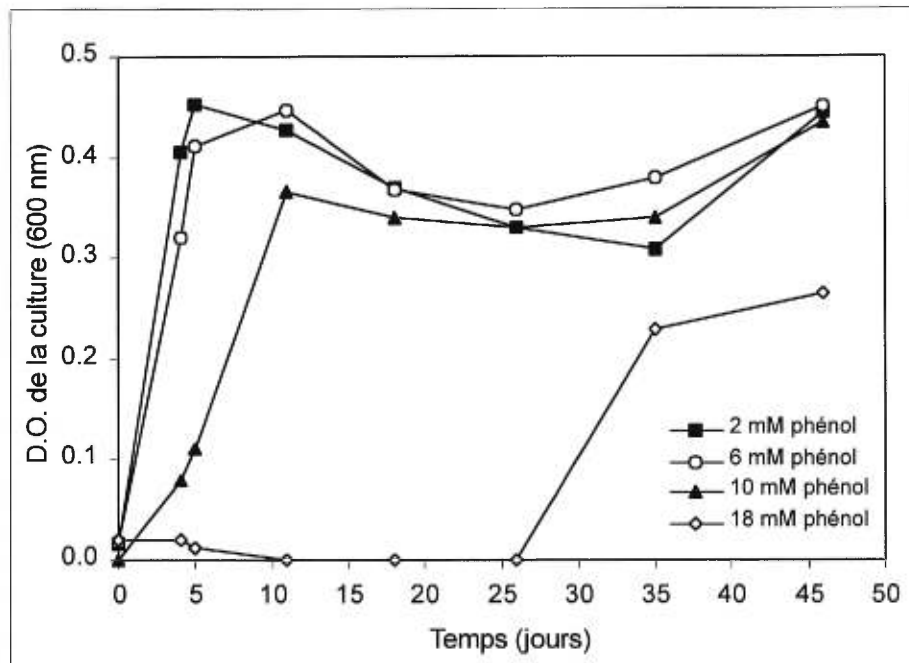


lente que celle dans le milieu contenant le protéose peptone (Fig. 18). Toutefois, le deuxième repiquage, à partir du milieu avec les 21 acides aminés dans un milieu frais équivalent, n'a pas permis d'obtenir une culture active. D'autre part, aucune croissance n'a été observée. Ce résultat suggérait qu'un autre élément fourni avec le protéose peptone était nécessaire pour la croissance et l'activité de la culture.

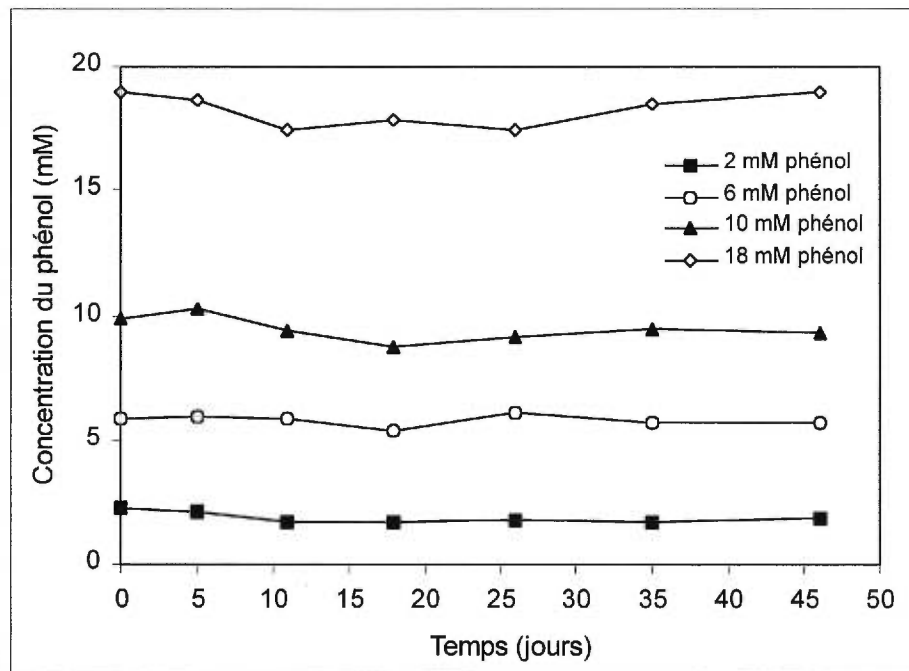
Nous avons augmenté la concentration en phénol dans le milieu de Boyd contenant 5 % (p/v) de protéose peptone afin de voir si l'activité pouvait être restaurée. Une forte croissance était immédiatement observée dans les milieux contenant jusqu'à une concentration 10 mM de phénol et une croissance était possible après une phase d'acclimatation de 25 jours en présence de 18 mM de phénol (Fig. 19a). Mais l'activité n'a pas été restaurée dans aucune de ces cultures (Fig. 19b).

La transformation du phénol n'a pas été ralentie dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,05 % de protéose peptone et additionné de 20 mM tyrosine et seulement faiblement dans le milieu additionné de 20 mM phénylalanine, les deux acides aminés dont la structure chimique est semblable à celle du phénol.

L'addition dans le milieu de Boyd de sulfite, thiosulfate ou nitrate, en tant qu'accepteurs terminaux d'électrons potentiels, a diminué le taux de transformation du phénol, tandis que l'addition du sulfate ou de fer (ferrique) a eu



a)



b)

Fig. 19: La croissance de la culture de Li *et al.* [1996] (a) et l'activité de transformation du phénol (b) selon les différentes concentrations de phénol dans le milieu de Boyd contenant 5 % (p/v) de protéose peptone.

un faible effet stimulant (Fig.20). Cependant, la croissance n'a pas été affectée en présence de ces composés sauf pour le sulfite qui était inhibiteur. Différents mélanges d'acides aminés ont été ajoutés dans le milieu de Boyd contenant 0,05 % (p/v) de protéose peptone afin de déterminer si la culture pouvait les utiliser comme source d'énergie par la réaction de Stickland. Les mélanges d'arginine avec glycine ainsi qu'une combinaison d'alanine, de valine, de leucine, d'isoleucine, de glycine, de proline et d'ornithine ont eu un effet stimulant sur la croissance de la culture de Li *et al.* [1996] (Fig. 21). L'effet de la glycine sans

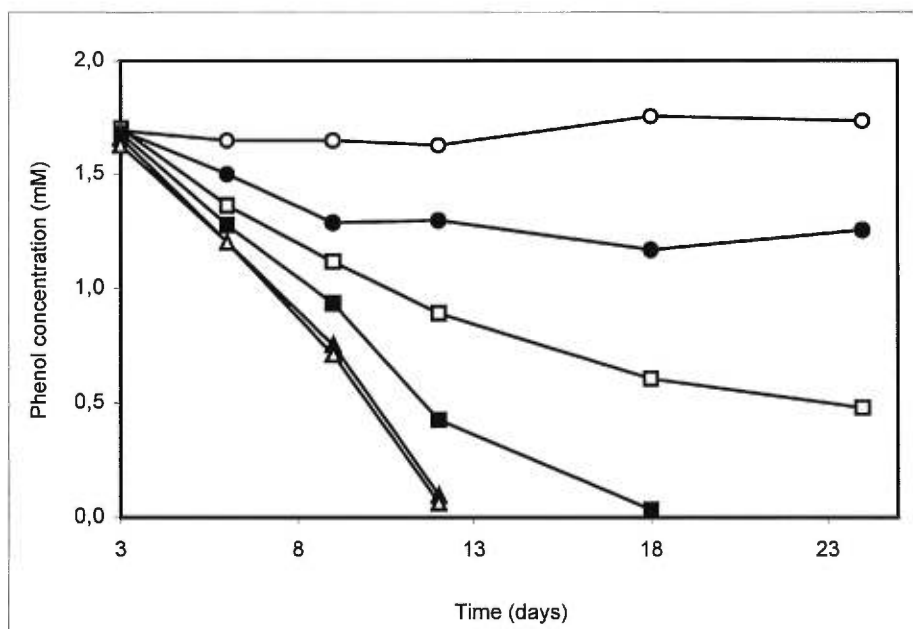


Fig. 20: Dégradation du phénol en présence de différents accepteurs terminaux d'électrons potentiels (● KNO<sub>3</sub>, ○ Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, ■ Boyd standard, □ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ▲ FeCl<sub>3</sub>, △ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

l'arginine ainsi que de l'arginine sans la glycine était moindre que quand les deux acides aminés étaient ajoutés ensemble. La carboxylation du phénol n'était cependant pas stimulée par l'ajout de ces acides aminés. D'autres acides aminés tel que la lysine, la lysine avec le tryptophane, un mélange de sérine, de phénylalanine, d'histidine et de glutamine (non représentés sur la Figure) n'ont pas eu d'effet stimulant sur la croissance et l'activité.

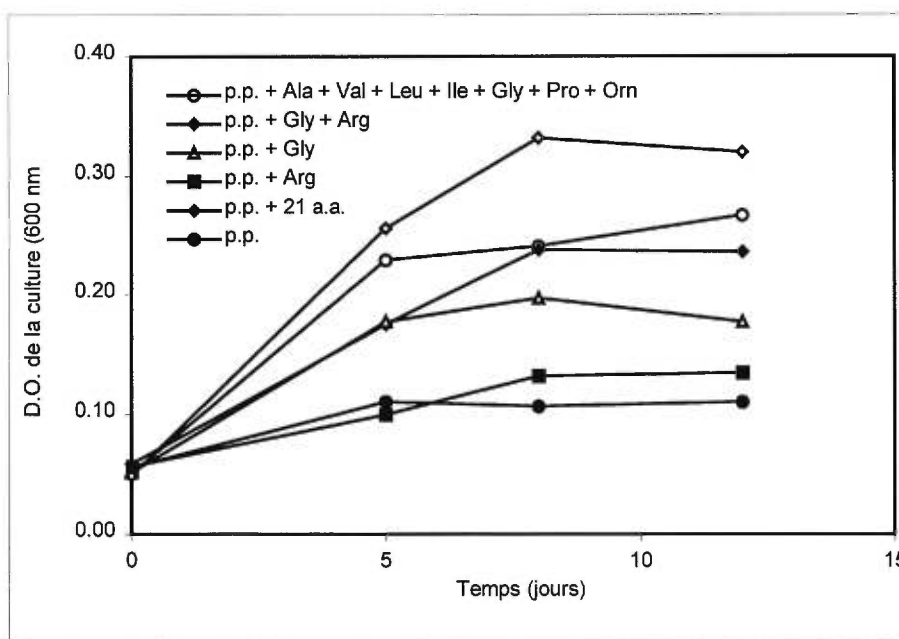


Fig. 21: Effet de certains mélanges d'acides aminés sur la croissance de la culture de Li *et al.* [1996].

L'addition dans le milieu de culture de Cd(II), Co(II), Cu(II) ou de Cr(VI) à une concentration de 0,01 mg/l n'a pas affecté la transformation du phénol, tandis qu'à une concentration de 0,05 mg/l l'activité était ralentie. Dans les deux cas, la croissance n'était pas affectée.

Le Na<sub>2</sub>S a démontré un effet inhibiteur sur la transformation du phénol. Cet effet était plus important quand la concentration de l'agent réducteur Na<sub>2</sub>S dans le milieu de culture était plus élevée (Fig. 22).

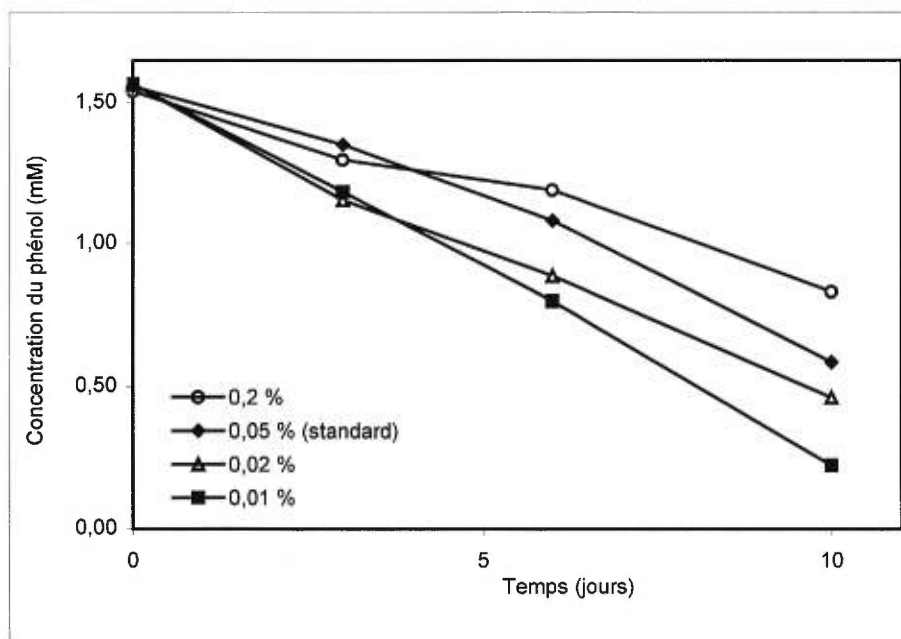


Fig. 22: Effet de la concentration du Na<sub>2</sub>S sur la dégradation du phénol.

À la suite du changement de lot du protéose peptone utilisé dans la préparation du milieu de culture, nous avons éprouvé un ralentissement de plus en plus grand de la dégradation du phénol. Au lieu des 14 à 20 jours nécessaires pour dégrader complètement 150 ppm (1,59 mM) de phénol, certaines cultures prenaient jusqu'à 45 jours pour le faire, d'autres étaient capables de dégrader seulement une partie du phénol.

Pour essayer de remédier au problème, nous avons ajouté au milieu de culture un extrait de terre de jardin pouvant contenir différents micro-éléments, mais l'ajout n'a pas stimulé la carboxylation. Nous avons également essayé différents lots de protéose peptone. Sur trois lots testés, deux ne permettaient pas la carboxylation et le troisième lot stimulait faiblement cette activité. L'augmentation de la concentration de protéose peptone dans le milieu de culture de 0,05 % à 0,5 % (p/v) a permis de retrouver un taux de dégradation du phénol comparable à celui d'avant les difficultés.

## **4.2. Présence de la souche 7 dans la coculture**

À la suite des problèmes rencontrés et du changement des conditions de culture (utilisation d'un lot différent de protéose peptone), une nouvelle forme microbienne, fortement réfringente au microscope, a été observée. Initialement, nous avons pensé qu'il s'agissait de spores de la souche 6.

Aucune croissance n'a été observée dans les milieux inoculés avec un échantillon de culture de Li *et al.* [1996] chauffé à 80°C pendant 15 min. De plus, les cellules réfringentes ne présentaient pas la couleur typique de spores après la coloration au vert de malachite.

Ces résultats, ainsi que l'absence de corrélation entre la croissance de la souche 6 de la culture de Li *et al.* [1996] et l'activité de transformation du phénol, nous ont amenés à considérer que la forme nouvellement observée est une autre souche bactérienne. Nous l'avons nommé souche 7.

La coloration Gram et l'observation par la microscopie électronique ont révélé que la souche 7 est un court bâtonnet Gram positif d'environ 1,2 µm de largeur par 2,2 µm de longueur, très dense aux électrons (Fig. 23 et 24). Des flagelles n'ont pas été observés.

Dans les cultures de 14 jours dans lesquelles la souche 7 était observée, le rapport entre la souche 7 et la souche 6 était initialement de l'ordre de 0,3/300 bactéries par champ microscopique (grossissement 1000×). Ce rapport a évolué avec le temps pour atteindre finalement (environ 1 mois) 10 à 20 cellules de souche 7 pour environ 300 cellules de souche 6 par champ. Dans de rares cas, la souche 7 pouvait atteindre 40 bactéries par champ microscopique (une bactérie par champ microscopique a été évaluée à  $3 \times 10^4$  bactéries/ml de culture). Nous n'avons pas trouvé d'explication claire pour cette variation de la concentration de la souche 7.

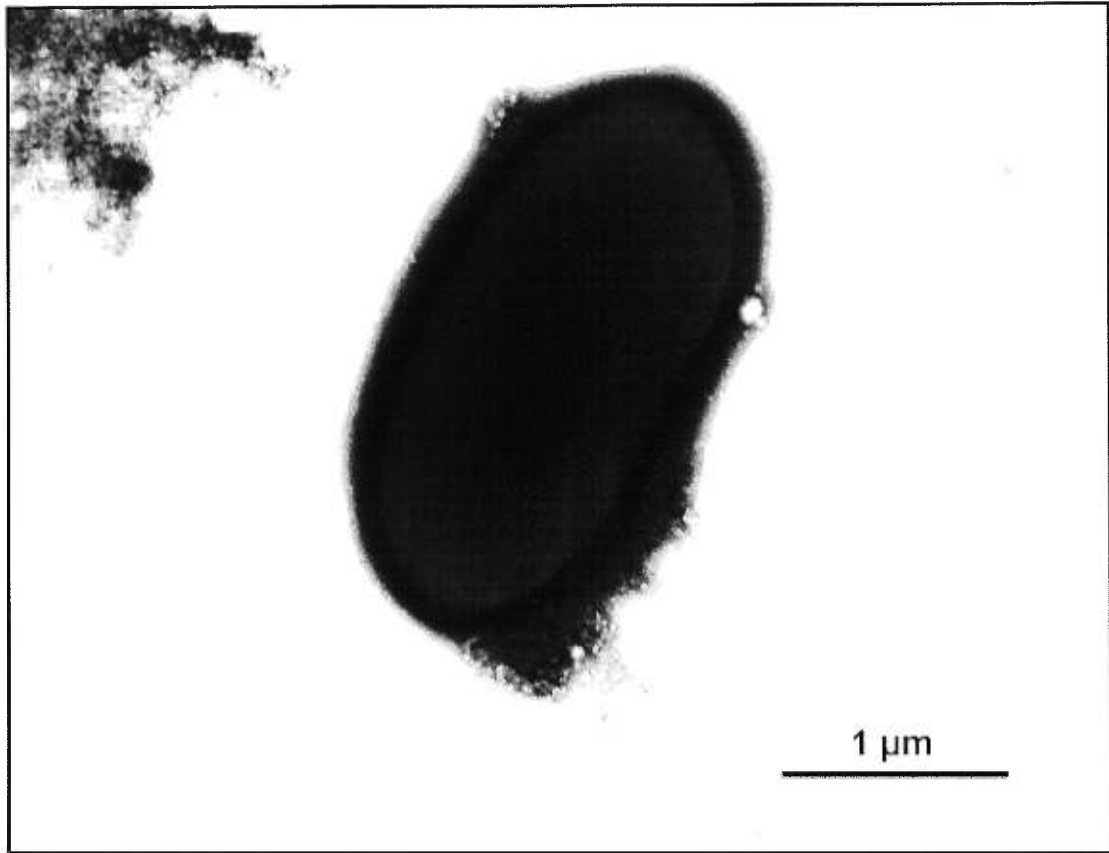


Fig. 23: Observation de la souche 7 par microscopie électronique avec coloration négative (grossissement de 36 000 ×).

### **4.3. Purification de la souche 6 et de la souche 7**

Étant donné que le rapport entre les concentrations des deux souches était très défavorable pour la souche 7, nous avons entrepris de l'enrichir. La centrifugation de bactéries, provenant d'une culture standard, sur un gradient de Percoll auto-formé a produit deux bandes distinctes (Fig. 25B). Tel qu'observé par l'analyse sur



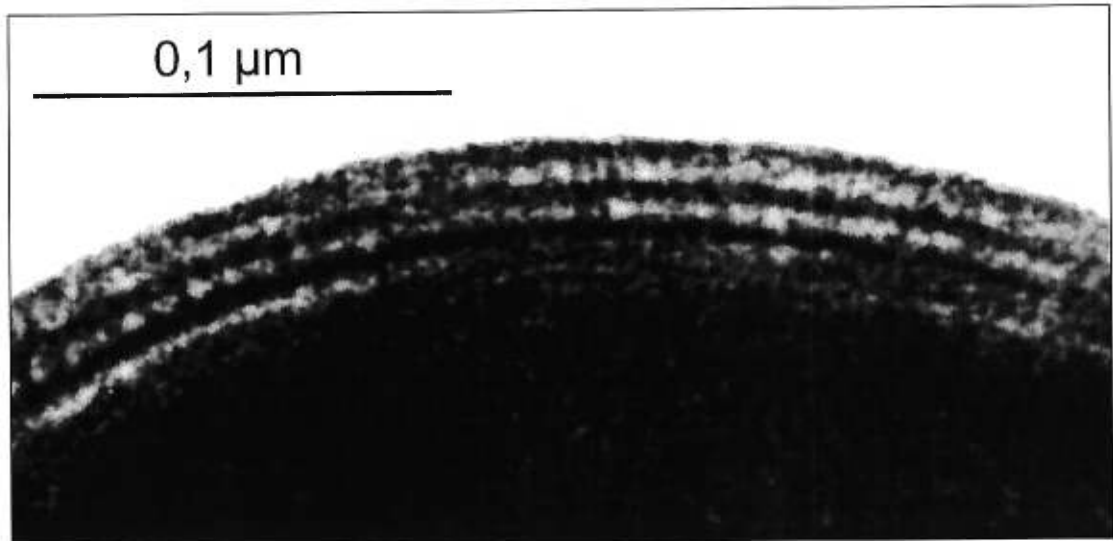


Fig. 24: Région de la paroi et de la membrane cellulaire de la souche 7 vue en coupe mince. D'après un grossissement de  $300\,000\times$  en microscopie électronique.

le cytofluoromètre, la bande supérieure était enrichie avec une population cellulaire (Fig. 25C) alors que la bande inférieure était enrichie avec une autre population (Fig. 25D). L'énumération des cellules de chacune des bandes au microscope optique a révélé que la bande supérieure a été enrichie avec la souche 6 et que la bande inférieure a été enrichie avec la souche 7. La concentration de la souche 6 et de la souche 7 était respectivement de  $8,5\times 10^6$  bactéries/ml et de  $1,1\times 10^8$  bactéries/ml dans la bande inférieure de Percoll et de  $2,8\times 10^9$  bactéries/ml et de  $5,7\times 10^6$  bactéries/ml dans la bande supérieure. Ces concentrations correspondent à un rapport de 13:1 de la souche 7 vis-à-vis de la souche 6 dans la bande inférieure et de 1:500 dans la bande supérieure. En comparant ces ratios

avec celui dans la culture originale (1:10), le facteur d'enrichissement de la souche 6 et 7 était respectivement de 50 (500/10) et de 130 (13/0,1) fois.

À partir de la cultureensemencée avec la bande inférieure de Percoll, au temps 0, un volume de 100 µl d'une dilution  $10^{-4}$  a été intégré dans un milieu de Boyd

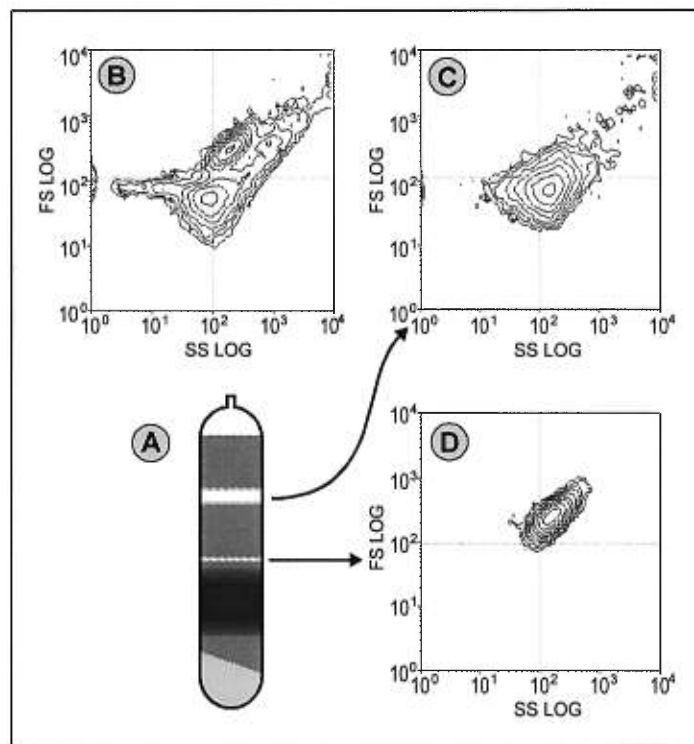


Fig. 25: Enrichissement des souches 6 et 7 de la coculture originale. La section (A) est la représentation schématique du tube de Percoll après la centrifugation. Les sections (B), (C) et (D) représentent les profils de dispersion de la lumière observés au cytofluoromètre pour la culture originale (B), pour la cultureensemencée avec la bande supérieure de Percoll (C) et pour la cultureensemencée avec la bande inférieure (D).

supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone et 1,5 % (p/v) d'agar (gélose profonde). Après 10 jours d'incubation, quelques colonies pouvaient être observées (Fig. 26). Les colonies avaient une forme allongée et comprenaient un centre compact et dense ainsi qu'une périphérie diffuse d'aspect de la ouate. Toutefois, aucune des colonies examinées (une dizaine) au microscope n'était constituée par la souche 7. Seulement la souche 6 pouvait être observée.

La culture pure de la souche 6 a été obtenue par dilution de la bande supérieure et étalement sur milieu solide. Étant donné que la souche 7 ne montrait pas de croissance sur milieu solide, nous avons éliminé la souche 6 de la culture enrichie en souche 7 par l'addition d'antibiotique suivie par des dilutions. Les observations microscopiques de la suspension finale ont montré seulement la souche 7. De plus, aucune croissance de la souche 6 n'a été obtenue après 40 jours d'incubation dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone. Également, dans ce milieu, la souche 6 n'a pas été détectée par PCR ni après étalement sur milieux solides.

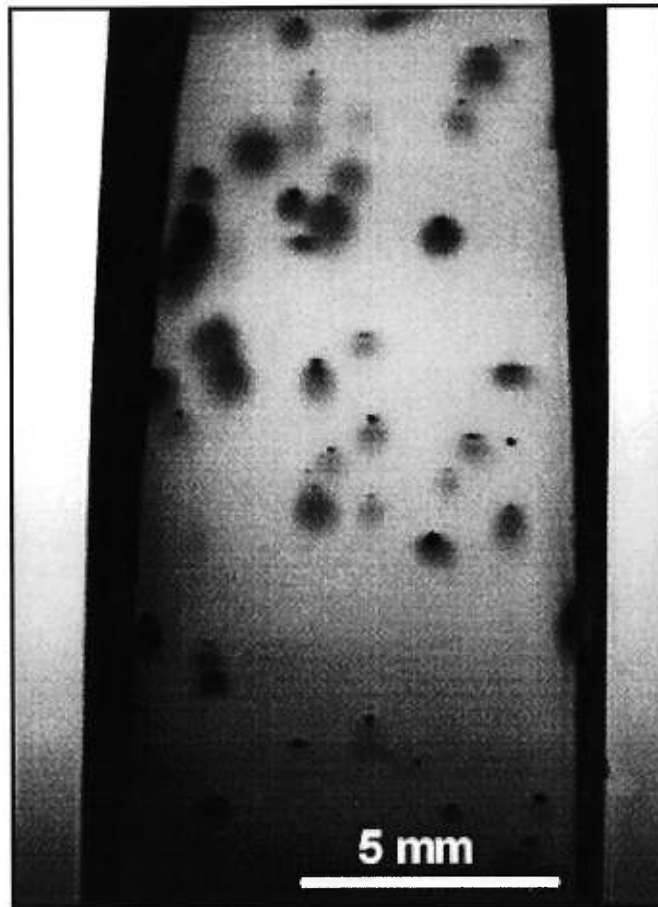


Fig. 26: Colonies en gélose profonde vues à travers le verre du tube sous la loupe stéréoscopique.

#### **4.4. Activité et croissance des populations enrichies et des souches purifiées**

La transformation du phénol dans la culture enrichie en souche 6 par le gradient de Percoll montrait une phase de latence d'environ 3-4 jours (Fig. 27 B). La

transformation du phénol a eu lieu seulement quand la concentration de la souche 7 a augmenté (Fig. 27 A). Au contraire, dans la culture ensemencée avec la souche 7 enrichie, la dégradation du phénol a commencé immédiatement (Fig. 27 D).

Initialement, ni la souche 6 ni la souche 7, purifiées l'une de l'autre, n'étaient capables de transformer le phénol dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone (Fig. 28). Quand les deux souches étaient inoculées

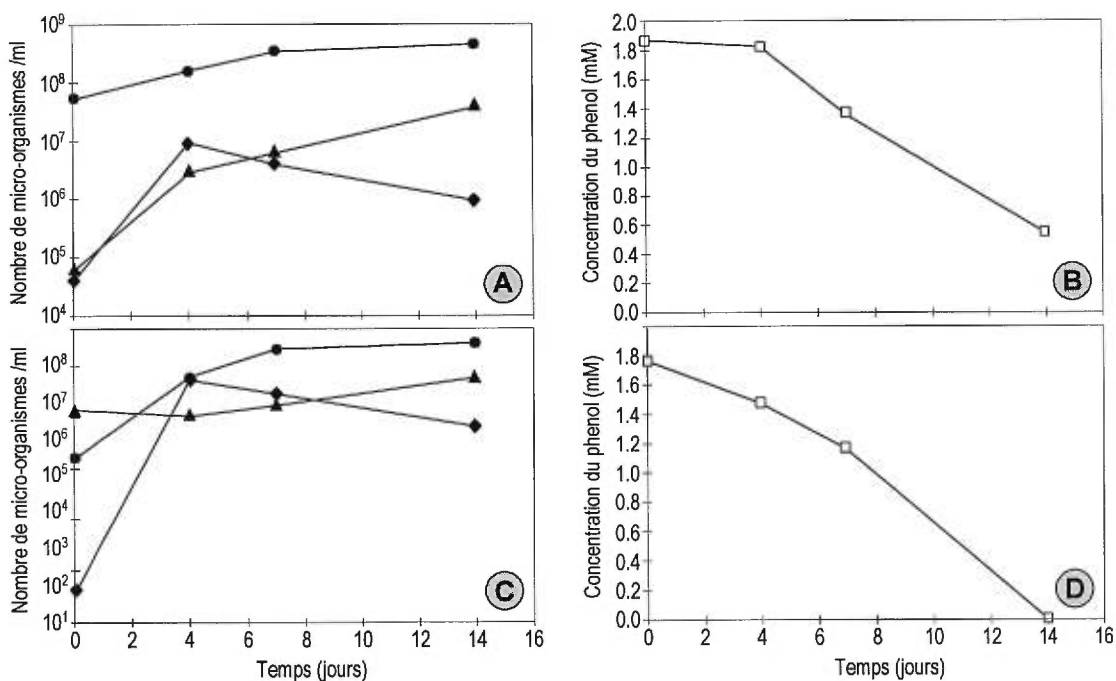


Fig. 27: Activité de transformation du phénol et croissance des souches dans les cultures enrichies. (A) et (B): culture enrichie en souche 6. (C) et (D): culture enrichie en souche 7. ● compte microscopique de la souche 6; ▲ compte microscopique de la souche 7; ◆ compte des unités viables de la souche 6; □ concentration du phénol.

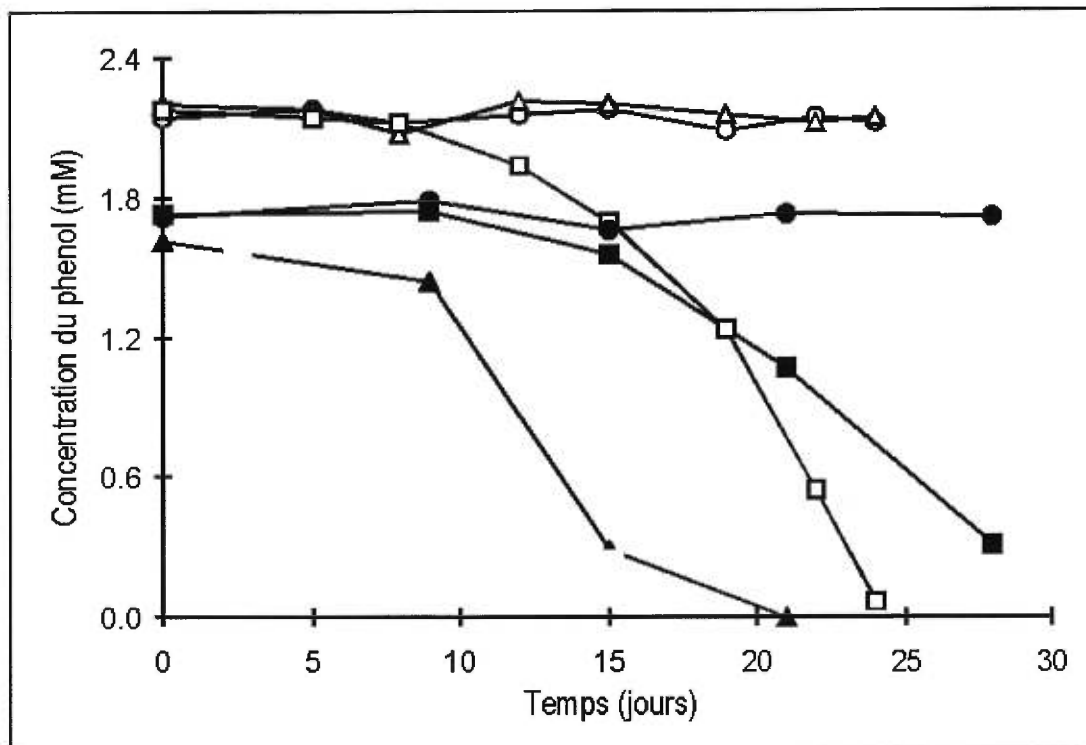


Fig. 28: Activité de carboxylation du phénol par les cultures purifiées et réassociées. Transformation par la souche 6 seule (●, ○), par la souche 7 seule (▲, △) et par la coculture reconstituée (■, □) dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone (les symboles vides) et dans le surnageant de coculture (les symboles remplis).

ensembles, 2,0 mM phénol était complètement transformé en 24 jours. Lorsque inoculé dans le surnageant de coculture, seule la souche 7 était capable de dégrader le phénol (environ 1,6 mM en 16 jours).

Étant donné que la souche 7 débarrassée de la souche 6 ne semblait pas être active dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone, elle

était maintenue par repiquages dans le surnageant de coculture. La croissance de la souche était très faible (pas de turbidité après 15 jours d'incubation), mais elle était suffisante pour contrer l'effet de dilution à chaque repiquage. Toutefois, la stabilité de ces cultures était précaire et plusieurs cultures (toutes ayant pourtant les mêmes conditions, dans les limites de notre contrôle) se sont avérées inactives.

Après plusieurs transferts dans ces conditions (2 mois), la capacité de la souche 7 à transformer le phénol dans le milieu de Boyd frais supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone a été vérifiée de nouveau. Seule une transformation partielle (30 à 50 %) a été observée après 25 jours d'incubation (Fig. 29) et l'activité a été complètement perdue après un deuxième repiquage dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone. D'autres tests de la dégradation du phénol par transfert périodique dans le surnageant de coculture pour un certain temps puis transfert dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone ont montré une adaptation progressive de la souche 7 (Fig. 29). Après 1 an de culture dans le surnageant de coculture, la souche 7 débarrassée de la souche 6 a été capable de dégrader complètement environ 1,8 mM phénol en 15 jours dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone. Toutefois, elle était toujours plus lente en comparaison à une coculture composée de la souche 6 et 7 et l'activité était perdue avec un deuxième ou un troisième repiquage dans le milieu de Boyd frais supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone.

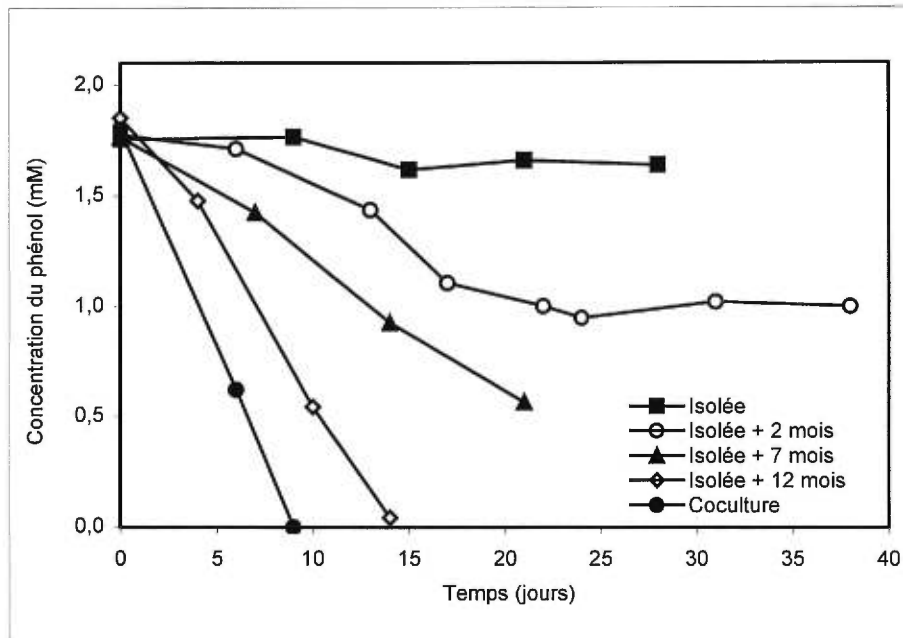


Fig. 29: Évolution de la souche 7 quant à sa capacité à dégrader le phénol dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone. "Isolée" représente la culture immédiatement après avoir débarrassé la souche 7 de la souche 6 et le "+ n mois" correspond à la période qui s'est écoulée depuis ce moment. La "Coculture" désigne la culture de Li *et al.* [1996] composée des souches 6 et 7.

Quand le précipité de fer (FeS) était complètement éliminé du milieu de culture de Boyd ou de surnageant de coculture par filtration, l'activité de carboxylation était inhibée, même si la croissance n'était pas affectée. L'activité pouvait être restaurée par l'ajout subséquent de  $\text{FeCl}_2$  (0,1 mM). Différents agents réducteurs ont été testés afin de déterminer si la croissance et l'activité phénol carboxylase de la souche 7 dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone ou d'extrait de levure pouvait être améliorée. En présence de citrate de



titanium toutes les cultures étaient inhibées, tandis qu'en présence du couple Pd/H<sub>2</sub>, l'efficacité de la carboxylation et de la décarboxylation variaient beaucoup en fonction de la phase gazeuse. En présence du mélange de gaz constitué de 10 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> et 80 % N<sub>2</sub> (mélange "standard") le phénol n'était pas transformé et la transformation du 4-OHB était seulement partielle (environ 30 % en 25 jours). Quand le gaz utilisé était composé de 80 % H<sub>2</sub> et 20 % CO<sub>2</sub>, le phénol 1,8 mM était carboxylé complètement en 25 jours et le 4-OHB pouvait être décarboxylé à 50 % en 30 jours. Mais, aucune des deux activités suivies n'était améliorée par rapport aux cultures dans lesquelles l'agent réducteur était le Na<sub>2</sub>S. Au deuxième repiquage dans le milieu équivalent, les cultures n'étaient plus actives.

Quand dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone le phénol a été remplacé par le 4-hydroxybenzoate (4-OHB), les cultures de la souche 7 pouvaient être transférées plusieurs fois de suite dans un même milieu sans perdre l'activité. Dans ces conditions, la culture de la souche 7 décarboxylait rapidement le 4-OHB pour former le phénol qui à son tour était carboxylé et déhydroxylé en benzoate (Fig. 30). La croissance était légèrement meilleure et la culture pouvait être maintenue dans le milieu de Boyd supplémenté avec 0,5 % (p/v) de protéose peptone sans perte d'activité.

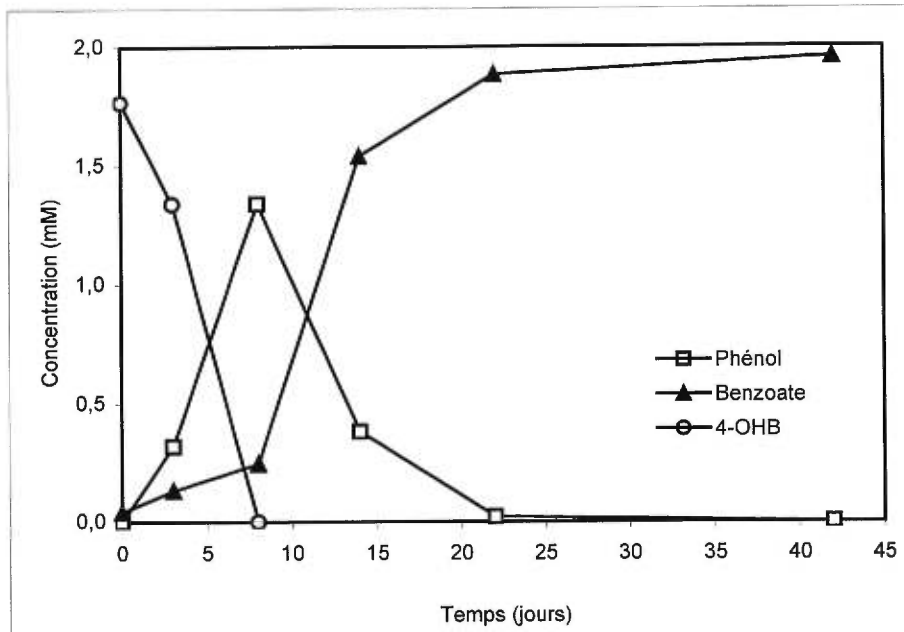


Fig. 30: Transformation du 4-OHB par la souche 7.

#### 4.5. Clonage du gène de la sous-unité 16S de l'ARNr et analyse phylogénétique de la souche 7

L'analyse phylogénétique de la souche 7 a été faite par la comparaison de la séquence de son gène qui code pour la sous-unité 16S de l'ARNr avec les séquences connues d'autres micro-organismes. La région du génome qui a servi pour cette comparaison a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces universelles et clonée dans le vecteur plasmidique. La cartographie du fragment amplifié a été obtenue par les digestions avec les enzymes de restriction *HindIII*, *SmaI*, *XbaI*, *EcoRI* et *KpnI* (Fig. 31). Quatre fragments de restriction plus courts (Fig. 31) ont

été sous-clonés afin de permettre le séquençage complet du gène de la sous-unité 16S de l'ARNr (Fig. 32).

La souche 7 fait partie d'un groupe de bactéries qui n'ont pas encore été isolées en cultures pures (Fig. 33). Deux de ces bactéries, les souches WCHB1-20 et WCHB1-89 [Dojka *et al.*, 1998], n'ont pas été cultivées et sont connues uniquement par leurs séquences ribosomales. Elles ont été retrouvées dans des conditions méthanogènes et leurs séquences ribosomales sont respectivement 96 et 93 % homologues à la séquence de la souche 7. Dans le même groupe on

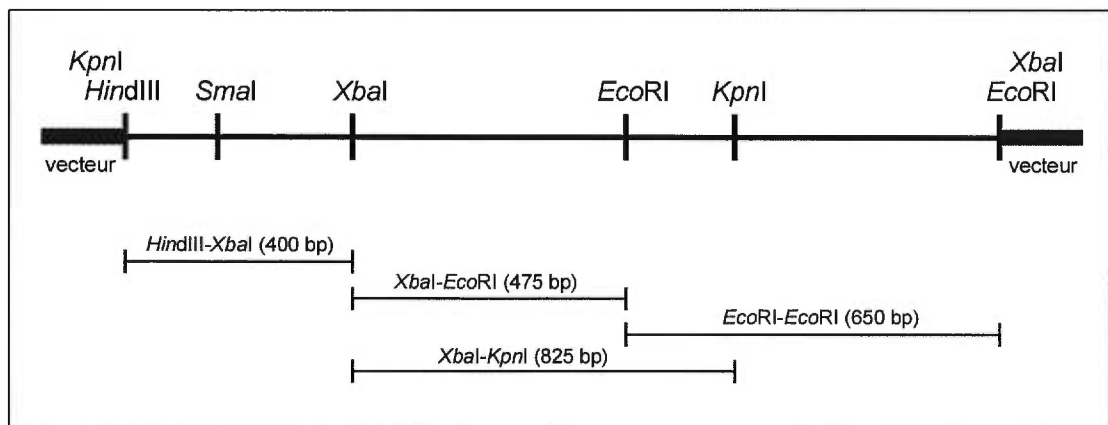


Fig. 31: Cartographie du gène de la sous-unité 16S de l'ARNr de la souche 7 amplifié par PCR avec les amorces universelles, cloné dans le vecteur pBluescript et la stratégie de sous-clonage des fragments plus petits en vue de séquençer le gène complet.

```

AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG GACGAACGCT GCGGCGGTGC TTAACACATG
CAAGTCGAAC GGAGGGTTACA TTGAAACGC▼ AGTAGATATG TAACCTTAGT
GGCGGACGGG TGAGTAACGC GTGGATAACC TGCCTGACTG ACCGGGACAA
CACCGGGAAA CTGGTGCTAA TACCGGATAC GCTCACAGTG ACACATGTTA
TAGTGAGGAA AGGGGAAACC CGCAGACAGA TGGGTCCGCG TCCCATTAGC
TAGTTGGTGG TGTAAGAGAC TACCAAGGCG ACGATGGGTA GCCGGCCTGA
GAGGGTGGAC GGCCACACTG GAACTGAGAC ACGGTCCAGA CTCCTACGGG
AGGCAGCAGT GGGGAATCTT CCGCAATGGG CGAAAGCCTG ACGGAGCAAC
GCCGCGTGAA TGAAGAAGGC CTTCCGGTTG TAAAATTCTG TCTTCAGGGA
AGAAAAAAT GACGGTACCT GAGGAGGAAG CCCC GGCTAA CTACGTGCCA
GCAGCCGCGG TAAACGTAG GGGGCGAGCG TTGTCCGGAA TTACTGGGCG
TAAAGGGCGT GTAGGCGGTC ATTTAAGTCA GAGGTGAAAA CTACCGGCTT
AACCGGTAGC CTGCCTTTGA AACTGGGTGA CTTGAGGGCA GGAGAGGGGA
GTGGAATTCC CAGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGATATTGG GAGGAACACC
AGTGCGAAG GCGGCTCTCT GGCCTGTTTC TGACGCTGAG GCGCGAAAGC
GTGGGTAGCG AACGGGATTA GATACCCCGG TAGTCCACGC CGTAAACGAT
GGGTGCTAGG TGTAGGAGGT ATCGACCCCT TCTGTGCCGT AGCTAACGCA
ATAAGCACCC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGTTGAAA CTCAAAGGAA
TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGACGCAA
CGCGAAGAAC CTTACCAGGG TTTGACATCC TCTGACAGCG TATGAAAGTA
CGTTTTCTGG CTTCCGGTCAG ACAGAGAGAC AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT
CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCC
TACGTTTAGT TGCTAACATG TAGTGATGAG CACTCTAGAA GAACTGCCGT
TGACAAAACG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT
GTCCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCC GGTACAAAGG GAAGCGAAGC
CGCGAGGTGG AGCAAATCCG ATAAAAGCCG GTCTCAGTTC GGATTGCAGG
CTGCAATTCG CCTGCATGAA GTCGGAATCG CTAGTAATCG CAGGTCAGCA
TACTGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA
CGAAAGCGAG CAACACCCGA AGCCGGTGAC TTAACCCGAA AGGGAGAGAG
CTGTCGAAGG TGGGGTTGGT GATTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG
TATCGGAAGG TGCGGCTGGA TCACCTCCT

```

Fig. 32: Séquence du gène de la sous-unité 16S de l'ARNr de la souche 7 (1529 bp) déposée à Genbank sous le numéro AF072863. Les régions choisies pour les amorces spécifiques PAT1G et PAT2D sont soulignées. Le triangle (▼) montre les deux nucléotides substitués (voir plus loin dans le texte).

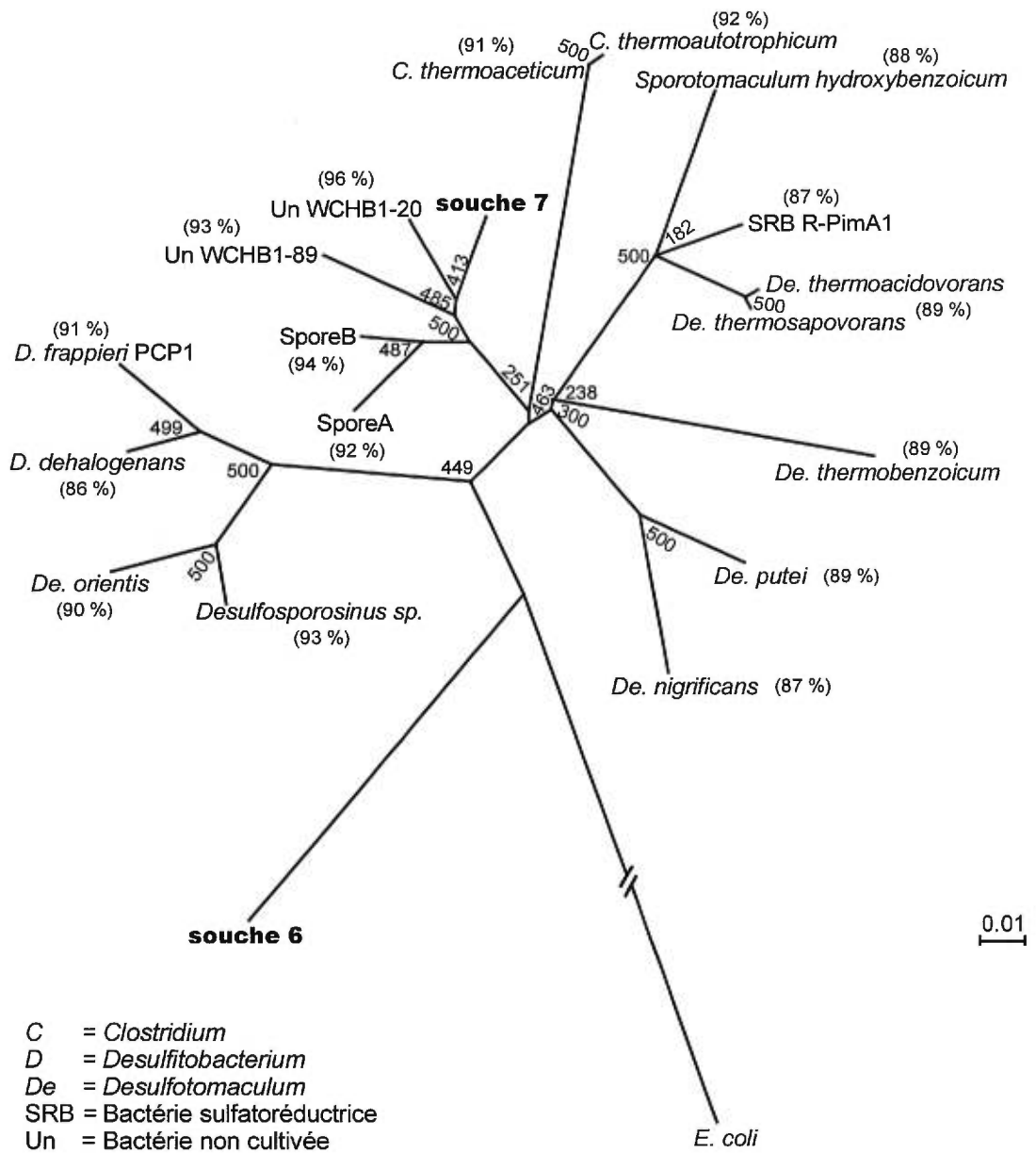


Fig. 33: Arbre de distances évolutives montrant la position relative de la souche 7 par rapport aux micro-organismes connus les plus apparentés sur la base de leur séquence du gène de la sous-unité 16S de l'ARNr. Les chiffres au niveau des embranchements correspondent aux valeurs de confiance d'exactitude de ces embranchements sur 500. Les chiffres entre les parenthèses correspondent aux pourcentages d'homologie avec la séquence de la souche 7. Les valeurs de confiance ont été calculés par les logiciels Seqboot, DNAdist et Fetch et le "meilleur" arbre a été obtenu avec le logiciel Consense.

retrouve aussi SporeA et SporeB, deux bactéries anaérobies, sporulantes qui oxydent le propionate en relation syntrophe avec *Methanospirillum hungatei* [Harmsen *et al.*, 1996]. La souche 7 est aussi apparentée, mais à un degré moindre (homologie de 87 à 92 %), avec les genres *Clostridium* (deux espèces thermophiles: *C. thermoaceticum* et *C. thermoautotrophicum*), *Desulfotomaculum*, *Desulfitobacterium*, *Desulfosporosinus* et *Sporotomaculum*.

Ces affiliations phylogénétiques ont motivé d'autres tests physiologiques. La souche 7 n'a pas été capable de croître en présence de propionate et de *Methanospirillum hungatei*. Sa croissance n'a pas été stimulée par le sulfate ou le sulfite en présence de lactate ou pyruvate comme source additionnelle de carbone. De même, l'incubation dans un milieu de culture pour l'enrichissement de bactéries sulfatoréductrices n'a pas eu d'effet stimulant. L'utilisation de sulfate ou de sulfite et la production du H<sub>2</sub>S, dans une culture en croissance et transformant le phénol, n'ont pas été détectés. L'addition de 10 mM de molybdate (un inhibiteur spécifique des bactéries sulfatoréductrices) dans le milieu de culture n'a pas empêché ni la croissance de la souche 7, ni l'activité de carboxylation. L'amendement du milieu de Boyd contenant 0,5 % (p/v) de protéose peptone avec certains acides gras (valérate, isovalérate, fumarate, succinate, phénylacétate et 4-hydroxyphényl-acétate) n'a pas stimulé la croissance de la souche 7.

## 4.6. Détection de la présence de souches 6 et 7

Étant donné que la souche 7 n'était pas observée dans la culture de la souche 6 de Li *et al.* [1996], il était important de s'assurer que la souche 7 venait du consortium original et qu'elle ne provenait pas d'une contamination de la culture de la souche 6 purifiée. L'ADN chromosomique extrait de cultures à différentes étapes de la purification de la bactérie carboxylant le phénol [Beaudet, 1986; Béchard, 1990; Létourneau, 1995; Li, 1996], qui était conservé à -70°C, a été soumis à l'amplification par PCR avec les amorces spécifiques pour la souche 7. La présence de la souche 7 a été confirmée dans le consortium méthanogène original, dans une culture de septembre 1993, dans le consortium traité à la chaleur (février 1994), dans la coculture composée de la souche 6 et de *Clostridium hastiforme* (avril 1994) et dans la culture de la souche 6 de Li *et al.* (juillet 1995) (Fig. 34).

Afin de s'assurer que la souche 6 avait été éliminée de la culture de la souche 7, nous avons amplifié par PCR une région d'ADN chromosomique, provenant d'une culture active, en utilisant les amorces spécifiques pour la souche 6 (Fig. 35). En parallèle, nous avons vérifié la présence de la souche 7 dans la culture de la souche 6, que nous avons purifiée, en utilisant les amorces spécifiques PAT1G/PAT2D. Comme témoins additionnels, nous avons amplifié, avec les mêmes amorces, l'ADN qui a servi originalement à cloner le gène de la sous-unité 16S de l'ARNr de la souche 7 enrichie.

Tous les échantillons d'ADN ont été également amplifiés avec les amorces universelles pA/pH. Nous n'avons pas détecté la présence de la souche 6 dans la culture de la souche 7 (Fig.35 puits 7) et *vice versa* (Fig.35 puits 5). Par contre, la souche 7 non plus n'était pas détectée dans les cultures dans lesquelles sa présence était confirmée par observation microscopique (Fig.35 puits 8 et 11 les endroits indiqués par les flèches). Pourtant, dans la culture de la souche 7 purifiée, le gène de la sous-unité 16S était très fortement amplifié par les amorces universelles (Fig.35 puits 9). D'autre part, l'amplification avec les amorces spécifiques à la souche 7, à partir de l'ADN qui a servi originalement à cloner le gène de la sous-

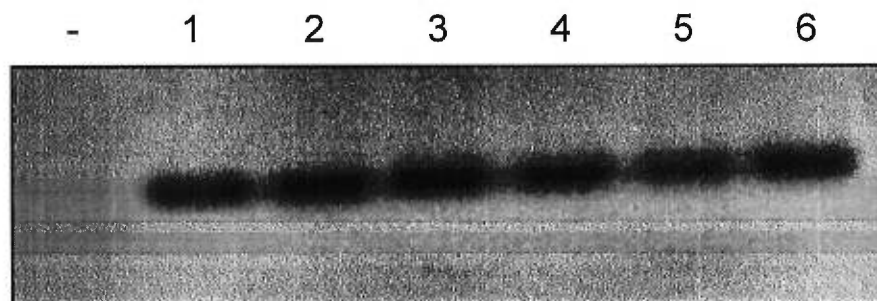


Fig. 34: Détection de produit de PCR spécifique pour la souche 7. Les produits du PCR ont été migrés sur un gel d'agarose de 1 % et les bandes visibles correspondent au poids moléculaire de 141 bp. Les puits correspondent à: 1 - consortium méthanogène original, 2 - culture de septembre 1993, 3 - consortium traité à la chaleur, 4 - coculture de la souche 6 avec *Clostridium hastiform*, 5 - culture de la souche 6 de Li *et al.* en juillet 1995, 6 - culture enrichie de la souche 7 comme témoin positif. Le puits marqué "-" correspond au contrôle négatif sans ADN cible.



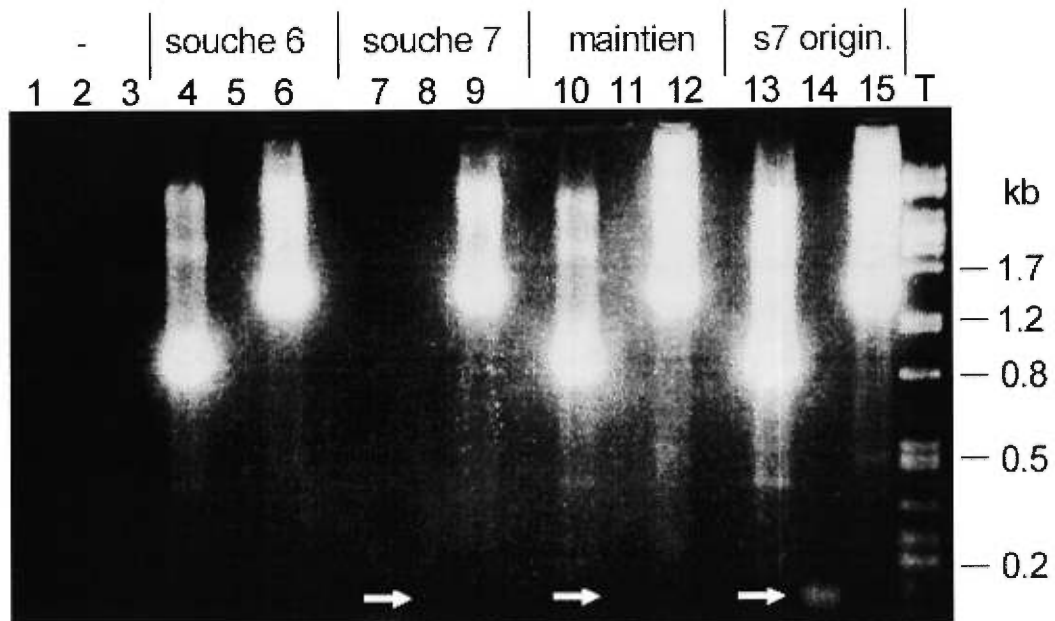


Fig. 35: Migration de l'ADN amplifié par PCR sur un gel d'agarose 1,9 % (p/v). Les puits correspondent à: 1 à 3 - témoins négatifs (mélanges réactionnels sans ADN cible), 4 à 6 - l'ADN d'une culture de la souche 6 purifiée; 7 à 9 - l'ADN d'une culture de la souche 7 purifiée; 10 à 12 - l'ADN d'une coculture composée de la souche 6 et 7; 13 à 15 - l'ADN qui a servi originalement à cloner le gène de la sous-unité 16S de l'ARNr de la souche 7; T - témoins de poids moléculaire ( $\lambda^{PstII}$ ); 1, 4, 7, 10, 13 - les amorces spécifiques pour la souche 6; 2, 5, 8, 11, 14 - les amorces spécifiques pour la souche 7; 3, 6, 9, 12, 15 - les amorces universelles. Les flèches indiquent la position où on aurait dû retrouver la bande d'ADN amplifié avec les amorces spécifiques pour la souche 7 dans les puits 8, 11 et 14.

unité 16S de l'ARNr de la souche 7, montrait un signal clair (Fig.35 puits 14, indiqué par la flèche).

Dans une autre expérience, nous avons vérifié l'effet de l'abaissement de 5°C de la température d'appariement des amorces spécifiques pour la souche 7

(PAT1G/PAT2D) lors de l'amplification par PCR effectuée sur l'ADN extrait de cultures de la souche 7 purifiée (arbitrairement appelées cultures B, C et C') et une coculture de maintien (culture M). L'amplification à 55°C a donné un signal relativement fort avec l'ADN de la coculture (Fig. 36 puits M55) et celui des cultures C' et B de la souche 7 (Fig. 36 puits C'55 et B55). À cette température, le signal n'a pas été détecté avec l'ADN de la culture C (Fig. 36 puits C55). Par contre, pour la culture C, un fort signal était présent à 50°C (Fig. 36 puits C50). Pour les cultures C' et B, à 50°C le signal était plus faible qu'à 55°C.

Différentes cultures de la souche 7 ont été comparées par une technique d'empreinte génétique. Pour ce faire, l'ADN amplifié par PCR avec les amorces universelles pH/pA (gène de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal) et



Fig. 36: Amplification par PCR, avec les amorces spécifiques à la souche 7, avec l'appariement des amorces à 55°C (puits M55, C55, C'55 et B55) et 50°C (puits C50, C'50 et B50). M représente l'ADN extrait d'une coculture de maintien et les C, C' et B sont trois cultures différentes de la souche 7.

pHr/p23SR01 (région intergénique 16S-23S de l'opéron de l'ARN ribosomal) a été digéré par les endonucléases de restriction *RsaI*, *TaqI* et *KpnI*. Le profil RFLP généré par ces digestions était identique pour toutes les cultures que nous avons testées.

Pour comprendre pourquoi l'ADN extrait de certaines cultures de la souche 7 était difficile à amplifier par PCR avec les amorces spécifiques pour la souche 7, nous avons séquencé à nouveau le gène de la sous-unité 16S de l'ARNr. Deux substitutions de nucléotides, à la position 80 (dans la nouvelle séquence un G à la place d'un A) et à la position 158 (dans la nouvelle séquence un G à la place d'un A) et une ambiguïté à la position 20 (nucléotide indéterminé), ont été trouvées en alignant les deux séquences (Fig. 32). La substitution à la position 80 se trouve dans la région utilisée comme site d'appariement de l'amorce spécifique pour la souche 7 PAT1G (positions 64 à 85). La différence de  $T_m$  calculée (voir matériel et méthodes), entre la séquence originale et la nouvelle séquence, pour cette amorce, est de 2°C.

#### **4.7. Détection du gène de la 4-hydroxybenzoate décarboxylase avec la sonde génomique.**

Une sonde génomique dégénérée, obtenue d'après la séquence en acides aminés de l'extrémité N-terminale de la décarboxylase/carboxylase provenant de la

coculture, a été utilisée pour essayer d'identifier la souche responsable de la décarboxylation/ carboxylation (Fig. 37). L'hybridation de la sonde avec les échantillons d'ADN provenant des cultures montrait un faible signal positif, tandis que l'hybridation avec l'ADN dans lequel le gène de la décarboxylase/carboxylase ne pouvait pas être présent (ADN "non spécifique" du phage  $\lambda$ ) n'a donné aucun signal. L'intensité du signal pour la coculture et pour les cultures de la souche 6 et de la souche 7 était comparable.

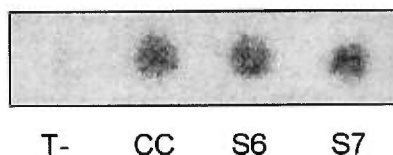


Fig. 37: Détection du gène codant pour la carboxylase/décarboxylase. (CC) représente l'hybridation de la sonde avec l'ADN extrait d'une coculture, (S6) l'hybridation avec l'ADN d'une culture de la souche 6, (S7) l'hybridation avec l'ADN d'une culture de la souche 7 et (T-) représente l'hybridation avec l'ADN "non spécifique" du phage  $\lambda$ .

## 4.8. Obtention de colonies en géloses profondes et analyse de leur activité

Des colonies isolées de la souche 7 ont pu être obtenues dans des géloses profondes semi-solides. Après environ 10 jours d'incubation, les colonies à peine

visibles à l'œil nu ont été observées à l'intérieur des géloses. Au maximum de leur taille (2 à 3 semaines d'incubation), certaines de ces colonies pouvaient atteindre le diamètre d'environ 1 mm.

Quand six colonies ont été transférées dans le milieu de Boyd liquide supplémenté avec protéose peptone et contenant le 4-OHB, seule la déhydroxylation du 4-OHB en benzoate pouvait être observée dans les deux cas. 1,8 mM 4-OHB était transformé complètement en benzoate en 12 jours. Aucune accumulation transitoire de phénol n'a été détectée lors de la transformation du 4-OHB et quand le phénol était initialement présent, il n'était pas dégradé. Après deux autres repiquages en milieu liquide, quatre cultures ont perdu complètement leur activité, tandis que deux autres ont recommencé à transformer le 4-OHB en phénol et le phénol en benzoate. Les cultures obtenues à partir de colonies isolées ont été vérifiées par PCR avec les amorces universelles pA/pH et les amorces spécifiques pour la souche 7 PAT1G/PAT2D. Dans les cultures E5 et E6 dans lesquelles l'activité de décarboxylation/carboxylation était absente, la souche 7 n'était pas détectée malgré un fort signal avec les amorces universelles (Fig. 38, lignes 1 et 2). Dans la culture KC, obtenue initialement aussi d'une colonie qui ne décarboxylait/carboxylait pas, capable maintenant de transformer le phénol et le 4-OHB, un faible signal était détecté dans le milieu de Boyd avec la concentration standard de 4-OHB contenant soit protéose peptone, soit extrait de levure (Fig. 38, lignes 4 et 7) et un signal fort quand la concentration de 4-OHB était trois fois

supérieure (Fig. 38, lignes 5 et 6). Au microscope, la croissance semblait comparable dans toutes les cultures.

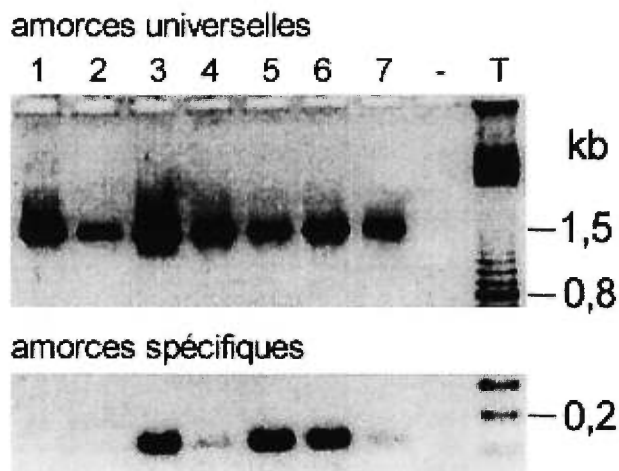


Fig. 38: Produit de PCR sur l'ADN extrait de cultures (avec 4-OHB) obtenues à partir de colonies isolées. Deux cultures sans activité décarboxylase/carboxylase, de colonie E5 dans le milieu de Boyd avec protéose peptone (1) et de colonie E6 dans le milieu de Boyd avec extrait de levure (2). Culture KC (active) dans le milieu de Boyd avec protéose peptone (4), avec protéose peptone et une concentration triple de 4-OHB (5), avec extrait de levure et une concentration triple de 4-OHB (6) et avec extrait de levure (7). Le PCR sur l'ADN d'une coculture est dans la ligne (3) et le PCR sans ADN cible (témoin négatif) est dans la ligne (-). Le témoin de poids moléculaire (T) est un "1kb ladder". Les puits de deux gels ont été alignés pour faciliter la comparaison.

# Discussion

## **5.1. Transformation du phénol par la culture de la souche 6 de Li *et al.* [1996] et sa pureté.**

La souche 6 de type *Clostridium* a été décrite par Li *et al.* [1996] comme étant le micro-organisme capable de transformer le phénol en benzoate. À ce moment, la culture de la souche 6 était considérée pure car aucune autre forme bactérienne n'avait pu être observée par microscopie et seulement un type de colonie était obtenu par l'étalement sur milieu solide.

L'absence de la transformation du phénol quand le protéose peptone n'est pas présent dans le milieu suggère que le phénol n'est pas un substrat pour la croissance. L'utilisation de certains milieux riches et l'amendement du milieu de Boyd contenant le protéose peptone avec les acides aminés reconnus pour leur participation dans la réaction de Stickland (fermentation impliquant des paires d'acides aminés), ont permis d'augmenter la biomasse de la culture, mais l'activité de carboxylation n'a pas été stimulée sous ces conditions. D'autre part, quand le protéose peptone a été remplacé par le mélange de 21 acides aminés, la transformation du phénol était possible seulement pour le premier repiquage et elle était plus faible qu'en présence du protéose peptone. Ceci suggère qu'un élément présent dans le protéose peptone est nécessaire pour que la culture soit active. Le précipité de fer (FeS) qui semble être important pour l'activité n'était pas nécessaire pour la croissance de la culture. L'inhibition de l'activité par la forte



concentration de protéose peptone, malgré une forte croissance de la culture, n'était pas due à la compétition par un substrat analogue au phénol tel que la tyrosine ou la phénylalanine, deux acides aminés présents dans le protéose peptone, car leur ajout dans les cultures actives n'interférait pas avec l'activité de la culture. L'inhibition de l'activité n'était pas due non plus à la diminution de la toxicité du phénol engendrée par l'abondance du substrat (protéose peptone) pour croître, puisque l'augmentation de la concentration du phénol n'a pas restauré l'activité de carboxylation dans ces cultures. Une forte concentration de composés organiques (tel que le protéose peptone ou l'extrait de levure) peut avoir comme effet la séquestration des ions métalliques présents dans une solution et les rendre non disponibles à la bactérie [Mills, 1997]. L'amendement des cultures avec une forte concentration de  $\text{FeCl}_2$ , qui semble être important vis-à-vis de la carboxylation, n'était pas efficace pour restaurer l'activité, ce qui indique que la complexation du fer par les composés organiques présents dans la protéose peptone n'était probablement pas la cause de l'inhibition de l'activité dans les cultures à forte concentration de cette dernière. Étant donné qu'il n'y a aucun lien clair entre la croissance de la souche 6 de Li *et al.* [1996] et l'activité de transformation du phénol, il est possible que cette souche ne soit pas responsable de la carboxylation du phénol. En fait, il semble que la croissance de la souche 6 a été favorisée dans les milieux riches au détriment de la souche active.

Lorsque de rares formes réfringentes ont été détectées, elles étaient considérées initialement comme des spores de la souche 6. C'était en accord avec l'observation de Létourneau *et al.* [1995] qui avait montré que la souche responsable de la carboxylation dans le consortium pouvait résister à un traitement de 15 min. à 80°C. Toutefois, dans la présente étude, nous n'avons pas détecté de spores suite à la coloration au vert de malachite et les bactéries ont été tuées par l'exposition à la chaleur. Ceci est probablement dû au fait que la culture sporule difficilement et que pour ce faire elle nécessite des conditions spécifiques telles que celles trouvées dans le consortium original, comme mentionné par Li *et al.* [1996]. Ces résultats suggéraient fortement que les formes réfringentes n'étaient pas des spores. Il s'agissait donc, plus vraisemblablement, d'une autre souche bactérienne que nous avons nommée souche 7. Cette dernière pourrait même être la souche active dans la transformation du phénol en benzoate.

L'augmentation du nombre de la souche 7 dans la culture de Li *et al.* [1996] jusqu'au niveau de sa détection au microscope pourrait être due à l'utilisation d'un nouveau lot de protéose peptone. Le protéose peptone est un substrat non défini et complexe. Étant donné qu'il est produit à partir de viande, l'état de l'animal, sa diète, etc. peuvent influencer la composition exacte du produit final (protéose peptone). Ces changements, qui peuvent paraître minimes, sont souvent suffisants pour favoriser ou défavoriser certaines souches [Brock et Madigan, 1991a].

## 5.2. Isolement des souches 6 et 7 et leurs rôles dans la transformation du phénol

Des travaux ont été entrepris afin d'isoler la souche 7. Toutefois, celle-ci n'était pas capable de croître sur les milieux solides testés. Également, il n'était pas possible de diluer la coculture pour se débarrasser de la souche 6, étant donné que le rapport entre la souche 6 et la souche 7 était de 10 à 1 dans le meilleur cas. Les différents milieux de culture liquides testés, ce qui inclut les milieux avec les différents accepteurs terminaux d'électrons, n'ont pas été capables de stimuler la croissance de la souche 7 ou de modifier le rapport entre les deux souches en faveur de la souche 7. Dans les cultures mixtes, il a été observé [Kuo et Sharak Genthner, 1996] que certains métaux lourds pouvaient stimuler la dégradation de composés aromatiques tel que le phénol. La raison proposée était la stimulation de la croissance des bactéries qui transformaient le phénol par la répression des bactéries compétitrices. Dans notre cas, les essais avec le cadmium, le cobalt, le cuivre et le chrome n'ont pas permis de changer le rapport entre les deux souches ni de stimuler la transformation du phénol.

La séparation des populations bactériennes par le cytofluoromètre tel qu'utilisée par Thomas *et al.* [1997] et Wallner *et al.* [1997] ou par la méthode de focalisation isoélectrique [Jaspers, 1997] ont été écartées pour des raisons techniques. Dans le

premier cas, il est impossible de travailler en conditions anaérobies et dans le deuxième cas nous ne disposons pas de l'appareillage nécessaire.

Finalement, nous avons obtenu une population enrichie avec la souche 7 en utilisant un gradient de Percoll. Le Percoll est fait de particules colloïdales (15-30 nm en diamètre) de silice enrobé de polyvinylpyrrolidone (PVP). Sa faible viscosité facilite la formation très rapide d'un gradient par centrifugation. D'autre part, il n'induit pratiquement pas de changement de la pression osmotique, il est non toxique, il ne pénètre pas les membranes biologiques et il n'interagit pas chimiquement avec d'autres composés pouvant se trouver dans la solution [Pharmacia Biotechnology, Baie d'Urfé, Canada]. Cette technique a déjà été utilisée par d'autres auteurs pour séparer des populations de bactéries environnementales interdépendantes. Scherer [1983] a réussi à séparer les différentes populations bactériennes d'un consortium méthanogène jusqu'à une apparente homogénéité. Beaty *et al.* [1987] ont enrichi d'environ 70 à 80 fois *Syntrophomonas wolfei* à partir d'une coculture avec *Methanospirillum hungatei*. L'efficacité de l'enrichissement de la souche 7 de la coculture avec la souche 6 était supérieure (130×) comparativement à celle obtenue par Beaty *et al.*, pour leurs souches. Toutefois, contrairement à ces auteurs, nous avons utilisé le gradient auto-formé avec la centrifugation à haute vitesse.

Malgré que le cytofluoromètre a pu être utilisé pour détecter et évaluer les deux populations bactériennes dans la culture de Li *et al.* [1996] et par la suite dans les populations enrichies, cette technique s'est révélée inadéquate pour un dénombrement précis. Ceci est en partie dû au chevauchement des "signatures" (profils de dispersion de la lumière) des deux populations. Pour cette raison et parce que la souche 7 ne croît pas sur milieu solide, nous avons choisi l'énumération directe des cellules au microscope comme méthode pour évaluer la concentration des deux souches dans les différentes cultures tout comme l'ont fait Lovley et Lonergan [1990] et Watson *et al.* [1977] dans leurs travaux.

Une indication que la souche 7 est importante dans la transformation du phénol provient du fait que l'activité phénol carboxylase est survenue sans phase de latence dans la cultureensemencée avec la fraction de Percoll enrichie avec la souche 7 contrairement à ce qui a été obtenu dans la culture inoculée avec la fraction enrichie avec la souche 6. Les résultats des tests effectués avec la souche 7 débarrassée de la souche 6 et avec la souche 6 pure ont appuyé cette hypothèse. Dans le surnageant de coculture, la souche 6 n'était pas capable de transformer le phénol, contrairement à la souche 7. Ce résultat indique clairement que la souche 7 est responsable de la transformation du phénol. D'ailleurs, quand Li a repiqué en cultures liquides les colonies de la souche 6 obtenues sur milieu solide, seules quelques rares cultures étaient capables de transformer le phénol [communication

personnelle]. Ces cultures actives ont été utilisées pour la suite des travaux. Les colonies obtenues par Li qui ont donné les cultures liquides actives devaient être composées de deux souches, tandis que les cultures sans activité phénol carboxylase étaient le plus probablement composées de la souche 6 seule.

Suite à cette observation, on pouvait penser que la souche 7 était porteuse du gène de la phénol carboxylase (capable aussi de l'activité 4-OHB décarboxylase) décrite par Li *et al.* [1996]. Cette enzyme a été purifiée par Li [1998] à partir de la coculture de souches 6 et 7, capable de ces deux activités enzymatiques. Cependant, nous n'avons pas été capables de relier cette activité à l'une ou à l'autre souche par l'utilisation d'une sonde génomique. La séquence d'ADN de la sonde a été déduite à partir de celle en acides aminés de l'extrémité N-terminale de l'enzyme purifiée par Li [1998]. Étant donné que plusieurs séquences d'ADN peuvent coder pour cette unique séquence en acides aminés, la sonde synthétisée et utilisée lors d'hybridation avec l'ADN extrait de cultures de la souche 6 et de la souche 7 ne pouvait pas être homogène ("sonde dégénérée"). Par conséquent l'hybridation, qui devait être effectuée à une température relativement basse, pouvait facilement provoquer des signaux non spécifiques. Par exemple, même si le vrai signal positif (dû à la détection du gène de la phénol carboxylase) était celui observé chez la souche 7, la souche 6 pourrait avoir des enzymes (d'autres carboxylases, enzymes avec les origines communes avec la phénol carboxylase,

etc.) qui ont suffisamment d'homologie de séquence pour donner un faux signal positif.

Il est peu probable que la souche 7 soit un contaminant acquis lors des manipulations. En effet, puisque la souche 7 est porteuse de l'activité phénol carboxylase alors que la souche 6 n'est pas capable de transformer le phénol, il faut nécessairement que la souche 7 ait été présente (même si elle n'était pas observée) dans la culture de Li *et al.* [1996]. Elle devait donc être présente dans le consortium original [Beaudet *et al.*, 1986]. Ceci a été confirmé par PCR en utilisant les amorces spécifiques pour la souche 7. La souche 7 était présente dans le consortium de départ et à toutes les étapes de purification de la bactérie capable de carboxyler le phénol en benzoate, y compris dans la culture présumée pure de Li *et al.* [1996].

Malgré qu'elle ne soit pas capable de carboxyler le phénol, la souche 6 semble être importante pour que la souche 7 puisse effectuer cette transformation. Dans le milieu de Boyd supplémenté avec le protéose peptone, aucune des souches purifiées n'était capable de transformer le phénol. Le phénol a pu être transformé seulement lorsque ces deux souches étaientensemencées ensemble. La souche 6 fournit probablement un élément nécessaire à la souche 7 qui facilite la transformation du phénol. Toutefois, cet élément n'a pas pu être identifié pour le moment. Ce genre de coopération impliquant des bactéries non méthanogènes a

déjà été suggéré dans la déshalogénéation du 3-chlorobenzoate par *Desulfomonile tiedjei* [Mohn et Tiedje, 1992] et du tetrachloroéthène par *Dehalococcoides ethenogenes* [Maymó-Gatell *et al.*, 1997]. Dans ce premier exemple, *D. tiedjei* fournissait le benzoate à la bactérie fermentaire (souche BZ-2) et en échange cette dernière produisait les vitamines nécessaires à *D. tiedjei* pour effectuer la déshalogénéation. Dans le deuxième exemple, le composé échangé n'a pas été identifié mais pour croître, la culture pure de *Dehalococcoides ethenogenes* devait se faire en présence de surnageant ou d'extrait cellulaire de culture mixte de laquelle elle originait. Après plusieurs repiquages de la souche 7 dans le milieu de culture constitué du surnageant de coculture, cette relation de dépendance envers la souche 6 est devenue moins stricte, c'est-à-dire que la souche 7 lorsque inoculée dans le milieu de Boyd contenant du protéose peptone pouvait transformer un pourcentage de plus en plus grand du phénol présent. Cependant, cette activité ne pouvait pas être maintenue quand la souche était transférée une fois de plus dans le milieu de Boyd frais supplémenté avec du protéose peptone. Ceci suggère que l'élément produit par la souche 6 est probablement essentiel à la transformation du phénol. Aussi, celui-ci semble nécessaire en faible concentration puisque l'effet de dilution obtenu par le transfert de l'inoculum (culture dans le surnageant de coculture) dans le milieu de Boyd avec protéose peptone n'était pas suffisant pour empêcher l'activité de la souche 7.



Le fait qu'après plusieurs repiquages dans le milieu de culture constitué du surnageant de coculture la souche 7, lorsque inoculée dans le milieu de Boyd contenant le protéose peptone et le phénol, a commencé à transformer ce dernier (toutefois, juste pour un seul repiquage) témoigne d'un certain degré d'adaptation. Ce comportement n'est pas tout à fait surprenant puisque nombreuses sont les souches bactériennes possédant une grande capacité d'adaptation. Plusieurs chercheurs ont démontré clairement [rapporté par Mlot, 1999] que le simple fait de cultiver des bactéries dans des conditions "synthétiques" de laboratoire, en opposition aux conditions naturelles de l'environnement, peut augmenter l'incidence des mutations et des changements génétiques même jusqu'à produire des hypermutants (des organismes chez qui le taux des changements génétiques dits spontanés est beaucoup plus élevé que le taux normal). Ce phénomène aurait pour conséquence de faciliter l'adaptation rapide aux nouvelles conditions et d'améliorer les chances de survie du micro-organisme.

Le maintien de la souche 7 dans le milieu de Boyd supplémenté avec protéose peptone est devenu possible quand le phénol a été remplacé par le 4-OHB. Dans cette situation, le 4-OHB était d'abord décarboxylé pour donner le phénol qui par la suite était carboxylé puis déhydroxylé en benzoate. Ces cultures étaient plus stables et montraient plus d'uniformité d'un repiquage à l'autre comparativement à celles effectuées en présence de phénol. Cependant, les cultures de la souche 7

dans le milieu de Boyd avec protéose peptone et 4-OHB n'étaient pas aussi stables que les cocultures de la souche 6 et 7. Ceci pourrait être attribuable à l'absence de l'élément produit par la souche 6 qui facilite la transformation du phénol. Selon la littérature [Lack et Fuchs, 1994], la réaction de carboxylation du phénol est endergonique et donc défavorable au point de vue thermodynamique alors que la décarboxylation du 4-OHB est exergonique et théoriquement plus favorable pour la bactérie. La stabilité accrue des cultures en présence de 4-OHB est peut-être due au fait que l'énergie générée lors de la transformation du 4-OHB en phénol est récupérée (au moins partiellement) et utilisée vis-à-vis d'autres fonctions métaboliques chez la bactérie. Une autre explication possible pour une meilleure carboxylation est que le 4-OHB soit meilleur que le phénol pour induire l'activité enzymatique de carboxylation/décarboxylation. Li [1998] a en effet montré l'existence d'une enzyme ayant ces deux activités dans la coculture des souches 6 et 7. Une meilleure activation de la déhydroxylase du 4-OHB est une autre hypothèse. Cette activité est nécessaire pour éliminer le 4-OHB en tant que produit de la carboxylation du phénol et déplacer l'équilibre chimique pour permettre la transformation de ce dernier.

### 5.3. Identification partielle de la souche 7

D'après l'étude phylogénétique, la souche 7 est apparentée aux bactéries anaérobies dont le contenu en G+C est de l'ordre de 38 à 49 % [Bouchard *et al.*, 1996; Brauman *et al.*, 1998; Devereux et Stahl, 1993; Devereux *et al.*, 1989; Utkin *et al.*, 1994]. Toutefois, n'ayant pas déterminé le contenu en G+C de la souche 7 nous ne pouvons pas confirmer qu'elle appartient à ce groupe. Certaines de ces bactéries appartiennent à des genres relativement nouveaux tels *Desulfitobacterium* [Utkin *et al.*, 1994] et *Sporotomaculum* [Brauman *et al.*, 1998]. Aucune des bactéries les plus apparentées à la souche 7 et qui se trouvent dans le même embranchement phylogénétique n'a été isolée en culture pure. Par exemple, les souches WCHB1-20 et WCHB1-89 provenant de conditions méthanogènes ne sont connues que par leurs séquences ribosomales [Dojka *et al.*, 1998].

Certaines similarités avec la souche 7 ont pu être identifiées à partir des résultats publiés pour quelques bactéries apparentées. Par exemple, SporeA et SporeB [Harmsen *et al.*, 1996] sont semblables par le fait qu'elles sont deux courts bâtonnets à croissance lente et très denses aux électrons. Comme dans le cas de la souche 7, la croissance de *Sporotomaculum hydroxybenzoicum* est lente, imprévisible et elle n'est pas stimulée par la présence de sulfate, sulfite, nitrate ou de fer ferrique.

Cependant, la souche 7 montre plusieurs différences physiologiques avec ces bactéries et avec les autres espèces dont le degré d'homologie de la séquence ribosomale est élevé. Par exemple, contrairement à la SporeA et la SporeB, la souche 7 n'était pas capable de croître avec le propionate en présence de *Methanospirillum hungatei*. La température optimale de croissance de *S. hydroxybenzoicum* est de 30°C, tandis que celle de la souche 7 est de 37°C [Duckett, M.-F., communication personnelle]. D'autre part, *S. hydroxybenzoicum* transforme le 3-hydroxy-benzoate (3-OHB) en benzoate et peut l'utiliser comme seule source de carbone. La souche 7 n'est pas capable de transformer le 3-OHB et lors de la transformation du 4-OHB le benzoate n'est pas minéralisé, il s'accumule dans le milieu. La souche 7 est également différente de *Clostridium thermoaceticum* et de *C. thermoautotrophicum*, ces deux espèces étant thermophiles [Cato *et al.*, 1986]. Elle est aussi différente de membres des genres *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* et *Desulfitobacterium* car contrairement à ces derniers la souche 7 ne peut pas effectuer la réduction du sulfate ou du sulfite. De plus, les membres de ces trois genres bactériens, contrairement à la souche 7, croissent très bien sur milieu solide. Ces résultats suggèrent que la souche 7 appartient à un nouveau genre.

## 5.4. Pureté de la souche 7

Certains résultats laissent croire que la culture de la souche 7 n'est peut-être pas une culture pure. D'abord, dans certaines cultures, la souche 7 est difficilement détectable par PCR avec les amorces spécifiques pour la souche 7. Pourtant, au microscope, ces cultures ressemblent en tous points à la souche 7. Il est peu probable qu'il s'agisse d'une mauvaise qualité d'ADN extrait de ces cultures car le produit de PCR obtenu avec les amorces universelles est très bien amplifié et parfois même plus qu'avec l'ADN dans lequel la souche 7 est détectée. La qualité des amorces spécifiques ne semble pas être la cause étant donné que les mélanges réactionnels sont standardisés (même mélange distribué dans les différents tubes) et que dans d'autres échantillons la souche 7 est détectée. Le deuxième séquençage du gène de la sous-unité 16S de l'ARNr de la souche 7 a montré que deux nucléotides étaient différents par rapport au premier séquençage. Une des deux substitutions se situe dans la région utilisée pour l'appariement de l'amorce spécifique. Ceci explique pourquoi l'abaissement de la température d'appariement de 5°C permettait l'obtention d'un produit du PCR pour les échantillons dans lesquels initialement la souche 7 n'était pas détectée par cette méthode. Toutefois, si deux micro-organismes composent la culture de la souche 7, ils doivent être génétiquement très semblables, du moins en ce qui concerne la région de l'opéron ribosomal.

Les deux séquences sont tellement proches qu'on peut se demander s'il ne s'agit pas d'une petite différence au niveau de la séquence du gène de la sous-unité ribosomale 16S de la même souche, plutôt que de deux souches différentes. En effet, en considérant les deux différences dans la séquence (1529 nucléotides), l'homologie est de 99,9 %. De plus, les profils de restriction de la région intergénique 16S-23S de l'opéron de l'ARN ribosomal étaient identiques. Cependant, l'hypothèse des deux souches est soutenue par la corrélation entre la différence de température d'appariement lors du PCR et la différence d'activité. Par exemple, dans les cultures liquides inoculées à partir des colonies de la souche 7 obtenues en milieu semi-solide, le 4-OHB a été directement déhydroxylé en benzoate. Aucune accumulation transitoire de phénol n'a été détectée. Dans ces cultures, la souche 7 n'a pas été détectée par PCR spécifique à 55°C. Le PCR avec la température d'appariement de 50°C n'a pas été effectué pour ces échantillons. Ces résultats suggèrent que la bactérie isolée en milieu semi-solide n'a pas la capacité de décarboxyler le 4-OHB et que c'est une souche qui est différente de la souche 7 dont la séquence ribosomale a été obtenue lors du premier séquençage. Après deux repiquages de ces cultures, certaines ont retrouvé l'ensemble des réactions (décarboxylation, carboxylation et déhydroxylation) et la souche 7 pouvait être détectée par PCR. Les deux souches (ou les deux populations de la souche 7) étaient donc probablement présentes dans la colonie repiquée. Toutefois, la souche 7 devait être initialement en trop faible concentration pour

être détectée par PCR. Dans les meilleures conditions, le seuil de détection par PCR avec les méthodes existantes se situe aux alentours de  $10^2$  à  $10^3$  copies de la séquence cible par gramme de sol [Brockman, 1995] et il est peu probable qu'elle soit plus sensible que la limite de  $10^2$  copies par millilitre d'un milieu synthétique. Un doute subsistera pour savoir si la souche 7 est en réalité composée de deux souches, l'une responsable de la carboxylation/décarboxylation et l'autre de la déhydroxylation, jusqu'au moment où les deux pourront être isolées et étudiées. Si tel était le cas, la souche 7 serait semblable à la culture de SporeA et SporeB qui n'ont pas pu être isolées et qui sont homologues à 96,8 % en ce qui concerne leur séquence ribosomale [Harmsen *et al.*, 1996]. La possibilité que la souche 7 ne soit pas pure existe puisque pour le moment les colonies sont très difficiles à obtenir et elles ont été observées seulement à deux reprises. Le repiquage de colonie à colonie n'a pu être réalisé pour le moment. Étant donné qu'on s'entend généralement sur le fait qu'un minimum de 3 passages successifs sur le milieu solide ou semi-solide à partir de colonie isolée est requis pour qu'une souche soit considérée pure, il devient évident que le degré de purification de cette souche n'est pas encore suffisant. D'ailleurs, même une colonie isolée peut être composée de plusieurs bactéries qui coexistent dans une étroite coopération comme dans le cas de "*Methanobacillus omelianskii*" qui en réalité est une association syntrophique entre *Methanobacterium bryantii* et la souche S [Bryant, 1967]. Il est donc possible que, si deux souches différentes composent ce que nous appelons la

souche 7, elles doivent rester ensemble pour des raisons de syntrophie ou pour que l'activité carboxylase puisse s'exprimer. Le principal obstacle lors de cette étude était, et reste encore, la difficulté à faire croître la souche 7 et sa très faible croissance la rend souvent difficile à détecter.



# Conclusion

Nous avons entrepris ce projet en croyant que la culture de Li *et al.* [1996] était une culture pure constituée par la souche 6 et que cette souche était responsable de la transformation du phénol en benzoate. Les résultats obtenus lors de cette étude indiquent autrement et les conclusions auxquelles nous sommes arrivés sont les suivantes. La souche 6 n'est pas directement impliquée dans aucune étape de cette transformation. C'est la souche 7, non détectée initialement, qui est responsable de la carboxylation du phénol en benzoate et de la décarboxylation du 4-OHB. La souche 6 aide la souche 7 au niveau de la transformation du phénol en lui fournissant un élément essentiel. Par contre, en présence de 4-OHB la souche 7 est capable d'effectuer la carboxylation en absence de la souche 6. La souche 7 est une nouvelle espèce bactérienne et elle appartient probablement à un nouveau genre apparenté phylogénétiquement aux bactéries réductrices de sulfate et de sulfite, quoiqu'elle ne peut pas utiliser ces accepteurs terminaux d'électrons. Le doute subsiste à savoir si ce que nous appelons la souche 7 est une culture pure ou si elle est plutôt une coculture composée de deux souches très apparentées. Notre connaissance de la souche 7 demeure très rudimentaire et plusieurs questions doivent être répondues pour bien comprendre ses exigences précises. Une caractérisation plus poussée de la souche sera nécessaire et l'obstacle majeur vis-à-vis de son étude reste sa très faible croissance. Toutefois, les résultats obtenus nous ont permis d'avancer dans un domaine peu connu et qui doit être exploré davantage.

# Références

**Alexander, M.** (1997). Microbial communities and interactions: a prelude. Dans: Manual of environmental microbiology, (éd.) C. J. Hurst. ASM Press, Washington: 5-13.

**Ali, S., Fernandez-Lafuente, R., Cowan, D. A.** (1998). Meta-pathway degradation of phenolics by thermophilic *Bacilli*. Enzyme and Microbial Technology **23**: 462-468.

**Allen, S. K., Allen, C. W.** (1997). Phenol concentrations in air and rain water samples collected near a wood preserving facility. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **59**: 702-707.

**Anders, A., Kaetzke, A., Kämpfer, P., Ludwig, W., Fuchs, G.** (1995). Taxonomic position of aromatic degrading denitrifying pseudomonad strains K172 and KB740 and their description as new members of the genera *Thauera*, *T. aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, *A. evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of Proteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology **45**: 327-333.

**Aneez Ahamad, P. Y., Kunhi, A. A. M.** (1996). Degradation of phenol through *ortho*-cleavage pathway by *Pseudomonas stutzeri* strain SPC2. Letters in Applied Microbiology **22**: 26-29.

**Antoine, P., Taillieu, X., Thonart, P.** (1997). The degradation of L-tyrosine to phenol and benzoate in pig manure. The role of 4-hydroxy-benzoate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **63-65**: 707-717.

**Aresta, M., Quaranta, E., Liberio, R., Dileo, C., Tommasi, I.** (1998). Enzymatic synthesis of 4-OH-benzoic acid from phenol and CO<sub>2</sub>: the first example of a biotechnological application of a carboxylase enzyme. *Tetrahedron* **54**: 8841-8846.

**Arnaud, P.** (1980). Hydrocarbures benzéniques. Dans: Cours de chimie organique, (éd.) A. Casadevall. Gauthier-Villars, Paris: 175-250.

**Auburger, G., Winter, J.** (1995). Isolation and physiological characterization of *Syntrophus buswellii* strain GA from a syntrophic benzoate-degrading, strictly anaerobic coculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**: 241-248.

**Bae, H. S., Lee, J. M., Kim, Y. B., Lee, S.-T.** (1996). Biodegradation of mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation* **7**: 463-469.

**Bak, F., Widdel, F.** (1986). Anaerobic degradation of phenol and phenolic derivatives by *Desulfobacter phenolicum* sp. nov. *Archives of Microbiology* **146**: 177-80.

**Bakker, G. (1977).** Anaerobic degradation of aromatic compounds in the presence of nitrate. *FEMS Microbiology Letters* **1**: 103-108.

**Balba, M. T., Clarke, N. A., Evans, W. C. (1979).** The methanogenic fermentation of plant phenolics. *Biochemical Society Transactions* **7**: 1115-1116.

**Balba, M. T., Evans, W. C. (1980).** The methanogenic biodegradation of catechol by a microbial consortium: evidence for the production of phenol through *cis*-benzenediol. *Biochemical Society Transactions* **8**: 452-453.

**Bandyopadhyay, K., Das, D., Maiti, B. R. (1998).** Kinetics of phenol degradation using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Bioprocess Engineering* **18**: 373-377.

**Bartholomew, J. W. (1962).** Variables influencing results, and the precise definition of steps in Gram staining as a means of standardizing the results obtained. *Stain Technology* **37**(3): 139-155.

**Beaty, P. S., Wofford, N. Q., McInerney, M. J. (1987).** Separation of *Synthrophomonas wolfei* from *Methanospirillum hungatei* in syntrophic cocultures by using Percoll gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 1183-1185.

**Beudet, R., Bisailon, J.-G., Ishaque, M., Sylvestre, M. (1986).** Isolation of an anaerobic bacterial consortium degrading phenolic compounds - assay in swine waste. *Agricultural Wastes* **17**: 131-140.

**Béchar, G., Bisailon, J.-G., Beudet, R., Sylvestre, M. (1990).** Degradation of phenol by a bacterial consortium under methanogenic conditions. *Canadian Journal of Microbiology* **36**: 573-578.

**Berry, D. F., Francis, A. J., Bollag, J.-M. (1987).** Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiological Reviews* **51**(1): 43-59.

**Bisailon, J.-G., Beudet, R., Lépine, F., Sylvestre, M. (1994).** Microbiological study of the carboxylation of phenols by methanogenic fermentation. *Water Pollution Research in Canada* **29**(1): 117-127.

**Bisailon, J.-G., Lépine, F., Beudet, R., Sylvestre, M. (1991).** Carboxylation of *o*-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **57**(8): 2131-2134.

**Bisailon, J.-G., Lépine, F., Beudet, R. (1991a).** Study of the methanogenic degradation of phenol via carboxylation to benzoate. *Canadian Journal of Microbiology* **37**: 573-576.

**Bisaillon, J.-G., Lépine, F., Beaudet, R., Sylvestre, M.** (1993). Potential for carboxylation-dehydroxylation of phenolic compounds by a methanogenic consortium. *Canadian Journal of Microbiology* **39**: 642-648.

**Blaut, M.** (1994). Metabolism of methanogens. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**: 187-208.

**Boone, D. R., Johnson, R. L., Liu, Y.** (1989). Diffusion of the interspecies electron carriers H<sub>2</sub> and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K<sub>m</sub> for H<sub>2</sub> or formate uptake. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1735-1741.

**Bouchard, B., Beaudet, R., Villemur, R., McSween, G., Lépine, F., Bisaillon, J.-G.** (1996). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**(4): 1010-1015.

**Bouwer, E. J., Zehnder, J. B.** (1993). Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology* **11**: 360-367.

**Boyd, S. A., Shelton, D. R., Berry, D., Tiedje, J. M.** (1983). Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **46**(1): 50-54.



**Brackmann, R., Fuchs, G.** (1993). Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from a denitrifying *Pseudomonas* species. *European Journal of Biochemistry* **213**: 563-571.

**Brauman, A., Muller, J. A., Garcia, J.-L., Brune, A., Schink, B.** (1998). Fermentative degradation of 3-hydroxybenzoate in pure culture by a novel strictly anaerobic bacterium, *Sporotomaculum hydroxybenzoicum* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 215-221.

**Breznak, J. A., Costilow, R. N.** (1994). Physicochemical factors in growth. Dans: *Methods for general and molecular bacteriology*, (éd.) P. Gerhardt. American Society for Microbiology, Washington: 137-154.

**Brock, T. D., Madigan, T. M.** (1991). Metabolic diversity among the microorganisms. Dans: *Biology of microorganisms*. Prentice Hall, Englewood Cliffs: 562-608.

**Brock, T. D., Madigan, T. M.** (1991a). Nutrition, Metabolism, and Biosynthesis. Dans: *Biology of microorganisms*. Prentice Hall, Englewood Cliffs: 92-131.

**Brockman, F. J.** (1995). Overview of biomolecular methods for monitoring bioremediation performance. Dans: *Monitoring and verification of*

bioremediation, (éds) R. E. Hinchee, G. S. Douglas, S. Kee Ong. Battelle Press, Columbus: 39-47.

**Brown, T. A.** (1991). *Molecular Biology Labfax*. Academic Press, New York.

**Bryant, M. P., Campbell, L. L., Reddy, C. A., Crabill, M. R.** (1977). Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H<sub>2</sub>-utilizing methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **33**: 1162-1169.

**Bryant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J., Wolfe, R. S.** (1967). *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Archiv für Microbiologie* **59**: 20-31.

**Busse, H.-J., Denner, E. B. M., Lubitz, W.** (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* **47**: 3-38.

**Caldwell, D. E., Wolfaardt, G. M., Korber, D. R., Lawrence, J. R.** (1997). Cultivation of microbial consortia and communities. Dans: *Manual of environmental microbiology*, (éd.) C. J. Hurst. ASM Press, Washington: 79-90.

**Capone, D. G.** (1997). Microbial nitrogen cycling. Manual of environmental microbiology. Dans: Manual of environmental microbiology, (éd.) C. J. Hurst. ASM Press, Washington: 334-342.

**Cato, E. P., George, W. L., Finegold, S. M.** (1986). Genus *Clostridium*. Dans: Bergey's manual of systematic bacteriology, (éds) P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. Vol. 2: 1141-1149.

**Ceccanti, B., Masciandaro, G., Garcia, C.** (1993). Anaerobic digestion of straw and piggery wastewaters: I. Preliminary studies. *Agrochimica* XXXVII(1-2): 147-156.

**Cerniglia, C. E.** (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3: 351-368.

**Chang, Y. H., Li, C. T., Chang, M. C., Shieh, W. K.** (1998). Batch phenol degradation by *Candida tropicalis* and its fusant. *Biotechnology and Bioengineering* 60(3): 391-395.

**Christiansen, N., Ahring, B. K.** (1996). *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46(2): 442-448.

**Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., Trussell, R. R.** (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington.

**Colberg, P. J.** (1988). Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives. Dans: Biology of anaerobic microorganisms, (éd.) A. J. B. Zehnder. John Wiley & Sons, New York: 333-372.

**Cord-Ruwisch, R.** (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. Journal of Microbiological Methods **4**: 33-36.

**Cypionka, H., Widdel, F., Pfennig, N.** (1985). Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress and growth in sulfate-free oxygen sulfide gradients. FEMS Microbiology Ecology **85**: 31-42.

**Dangel, W., Brackmann, R., Lack, A., Mohamed, M., Koch, J., Oswald, B., Seyfried, B., Tschech, A., Fuchs, G.** (1991). Differential expression of enzyme activities initiating anoxic metabolism of various aromatic compounds via benzoyl-CoA. Archives of Microbiology **155**: 256-262.

**Daniels, L., Belay, N., Rajagopal, B. S.** (1986). Assimilatory reduction of sulfate and sulfite by methanogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology **161**: 703-709.

**Dennie, D., Gladu, I., Lépine, F., Villemur, R., Bisailon, J.-G., Beaudet, R.** (1998). Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Applied and Environmental Microbiology **64**(11): 4603-4606.

**Deschênes, L.** (1998). Biotechnologies d'assainissement des sites, Cours donné à Institut Armand-Frappier, Laval.

**Devereux, R., Delaney, M., Widdel, F., Stahl, D. A.** (1989). Natural Relationships among sulfate-reducing eubacteria. Journal of Bacteriology **171**(12): 6689-6695.

**Devereux, R., Kane, M. D., Winfrey, J., Stahl, D. A.** (1992). Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. Systematic and Applied Microbiology. **15**: 601-609.

**Devereux, R., Stahl, D. A.** (1993). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria and a perspective for analyzing their natural communities. Dans: The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives, (éds) J. M. Odom, R. J. Singleton. Springer-Verlag, New York: 131-160.

**Dilling, W., Cypionka, H.** (1990). Aerobic respiration in the sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiological Letters **71**: 123-128.

**Doelle, H. W.** (1975). Fermentation of proteolytic clostridia. Dans: *Bacterial Metabolism*. Academic Press, New York: 646-691.

**Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K., Pace, N. R.** (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10): 3869-3877.

**Dolfing, J., Tiedje, J. M.** (1988). Acetate Inhibition of methanogenic, syntrophic benzoate degradation. *Applied and Environmental Microbiology* **54**(7): 1871-1873.

**Drzyzga, O., Jannsen, S., Blotevogel, K.-H.** (1994). Mineralization of monofluorobenzoate by a diculture under sulfate-reducing conditions. *FEMS Microbiology Letters* **116**: 215-220.

**Dutton, P. L., Evans, W. C.** (1969). The metabolism of aromatic compounds by *Rhodopseudomonas palustris*. *Biochemical Journal* **113**: 525-535.

**Dwyer, D. F., Weeg-Aerssens, E., Shelton, D. R., Tiedje, J. M.** (1988). Bioenergetic conditions of butyrate metabolism by syntrophic, anaerobic bacterium in coculture with hydrogen-oxidizing methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **54**(6): 1354-1359.

**Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E. C. (1989).**

Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes.

Characterization of a gene coding for ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **17(19): 7843-7853.**

**EPA (1998).** Envirofacts warehouse chemical references Phenol CAS#108-95-2, Environmental Protection Agency, Washington.

**Evans, C. (1977).** Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature* **270(3): 17-22.**

**Evans, W. C., Fuchs, G. (1988).** Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annual Reviews in Microbiology* **42: 289-317.**

**Fuchs, G., El Said, M. M., Altenschmidt, U., Koch, J., Lack, A., Brackmann, R., Lochmeyer, C., Oswald, B. (1994).** Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds. Dans: *Biochemistry of microbial degradation*, (éd.) C. Ratledge. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 513-553.

**Fuchs, G., Stupperich, E. (1986).** Carbon assimilation pathways in archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* **7: 364-369.**

**Gallert, C., Knoll, G., Winter, J.** (1991). Anaerobic carboxylation of phenol to benzoate: use of deuterated phenols revealed carboxylation exclusively in the C4-position. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**: 124-129.

**Gallert, C., Winter, J.** (1992). Comparison of 4-hydroxybenzoate decarboxylase and phenol carboxylase activities in cell-free extracts of a defined, 4-hydroxybenzoate and phenol-degrading anaerobic consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **37**: 119-124.

**Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R.** (1994). *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington.

**Gerritse, J., Renard, V., Pedro Gomes, T. M., Lawson, P. A., Collins, M. D., Gottschal, J. C.** (1996). *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols. *Archives of Microbiology* **165**: 132-140.

**Ghiorse, W. C.** (1988). Microbial reduction of manganese and iron. Dans: *Biology of anaerobic microorganisms*, (éd.) A. J. B. Zehnder. John Wiley & Sons, New York: 305-332.

**Gibson, G. R.** (1990). Physiology and ecology of sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **69**: 769-797.



**Glöckler, R., Tschsch, A., Fuchs, G.** (1989). Reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA to benzoyl-CoA in a denitrifying, phenol-degrading *Pseudomonas* species. *FEBS Letters* **251**(1,2): 237-240.

**Grbic-Galic, D.** (1986). Anaerobic production and transformation of aromatic hydrocarbons and substituted phenols by ferulic acid-degrading BESA-inhibited methanogenic consortia. *FEMS Microbiology Ecology* **38**: 161-169.

**Grbic-Galic, D., Vogel, T. M.** (1987). Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **53**(2): 254-260.

**Gürtler, V., Stanisich, V. A.** (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**: 3-16.

**Guyer, M., Hegeman, G.** (1969). Evidence for a reductive pathway for the anaerobic metabolism of benzoate. *Journal of Bacteriology* **99**: 906-907.

**Hansen, T. A.** (1993). Carbon metabolism of sulfate-reducing bacteria. Dans: *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*, (éds) J. M. Odom, R. J. Singleton. Springer-Verlag, New York: 21-40.

**Harborne, J. B.** (1980). Plant phenolics. Dans: *Secondary plant products*, (éds) E. A. Bell, B. V. Charlwood. Springer-Verlag, New York: 329-402.

**Harmsen, H. J. M., Akkermans, A. D. L., De Vos, W. M., Stams, A. J. M.** (1996). Enrichment and phylogenetic analysis of sporeforming syntrophic propionate-oxidizing bacteria. Dans: Detection, phylogeny and population dynamics of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in anaerobic granular sludge. Thèse de doctorat, Dept. of Microbiology, Wageningen Agricultural University. Wageningen, Pays-Bas: 48-60.

**He, Z., Wiegel, J.** (1995). Purification and characterization of an oxygen-sensitive reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. European Journal of Biochemistry **229**: 77-82.

**Head, I. M., Saunders, J. R., Pickup, R. W.** (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microbial Ecology **35**: 1-21.

**Heider, J., Boll, M., Breese, K., Breining, S., Ebenau-Jehle, C., Feil, U., Gad'on, N., Laempe, D., Leuthner, B., El-Said Mohamed, M., Schneider, S., Burchhardt, G., Fuchs, G.** (1998). Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. Archives of Microbiology **170**: 120-131.

- Hines, M. E., Visscher, P. T., Devereux, R.** (1997). Sulfur cycling. Dans: Manual of environmental microbiology, (éd.) C. J. Hurst. ASM Press, Washington: 324-333.
- Holmes, D. S., Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Annales of Biochemistry* **114**: 193-197.
- Holzman, D.** (1998). Aerobe-to-anaerobe switch provides surprising insights. *ASM News* **64**(10): 552-553.
- Hopkins, B. T., McInerney, M. J., Warikoo, V.** (1995). Evidence for anaerobic syntrophic benzoate degradation threshold and isolation of the syntrophic benzoate degrader. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(2): 526-30.
- Hoyle, B. L., Scow, K. M., Fogg, G. E., Darby, J. L.** (1995). Effect of carbon:nitrogen ratio on kinetics of phenol biodegradation by *Acinetobacter johnsonii* in saturated sand. *Biodegradation* **6**: 283-293.
- Huang, J., He, H., Wiegel, J.** (1999). Cloning, characterization, and expression of a novel gene encoding a reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. *Journal of Bacteriology* **181**(16): 5119-5122.
- James, G. A., Beaudette, L., Costerton, J. W.** (1995). Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* **15**: 257-262.

**Jaspers, E., Overmann, J.** (1997). Separation of bacterial cells by isoelectric focusing, a new method for analysis of complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8): 3176-3181.

**Jeong, K. C., Jeong, E. Y., Hwang, T. E., Choi, S. H.** (1998). Identification and characterization of *Acinetobacter* sp. CNU961 able to grow with phenol at high concentrations. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **62**(9): 1830-1833.

**Juteau, P., Beaudet, R., McSween, G., Lépine, F., Milot, S., Bisailon, J.-G.** (1995). Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**: 218-224.

**Karrer, P.** (1947). Phenols. Dans: *Organic Chemistry*. Elsevier Publishing Company, New York: 420-423.

**Kay, D. H.** (1965). Fixation and embedding of biological specimens. Dans: *Techniques for electron microscopy*, (éd.) D. H. Kay. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 181.

**Keith, C. L., Bridges, R. L., Fina, L. R., Iverson, K. L., Cloran, J. A.** (1978). The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. IV. Dearomatization of the ring and volatile fatty acids formed on ring rupture. *Archives of Microbiology* **118**: 173-176.

**Keuning, S., Jager, D.** (1994). Simultaneous degradation of chlorobenzene, toluene, xylene, and ethanol by pure and mixed *Pseudomonas* cultures. Dans: Applied biotechnology for site remediation, (éds) R. E. Hinchee, D. B. Anderson, J. B. F. Metting, G. D. Sayles. Lewis Publishers, Boca Raton: 332-336.

**Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution **16**: 111-120.

**Klemps, R., Cypionka, H., Widdel, F., Pfennig, N.** (1985). Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. Archives of Microbiology **143**: 203-208.

**Knoll, G., Winter, J.** (1987). Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge. Applied Microbiology and Biotechnology **25**: 384-391.

**Knoll, G., Winter, J.** (1989). Degradation of phenol via carboxylation to benzoate by a defined, obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology **30**: 318-324.

**Kobayashi, T., Hashinaga, T., Mikami, E., Suzuki, T.** (1989). Methanogenic degradation of phenol and benzoate in acclimated sludges. Water Science Technology **21**: 55-65.

**Kuo, C.-W., Sharak Genthner, B. R.** (1996). Effect of added heavy metal ions on biotransformation and biodegradation of 2-chlorophenol and 3-chlorobenzoate in anaerobic bacterial consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(7): 2317-2323.

**Lack, A., Fuchs, G.** (1992). Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism. *Journal of Bacteriology* **174**(11): 3629-3636.

**Lack, A., Fuchs, G.** (1994). Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Archives of Microbiology* **161**: 132-139.

**Lack, A., Tommasi, I., Aresta, M., Fuchs, G.** (1991). Catalytic properties of phenol carboxylase - *in vitro* study of CO<sub>2</sub> : 4-hydroxybenzoate isotope exchange reaction. *European Journal of Biochemistry* **197**: 473-479.

**Lantz, S., Lin, J.-E., Mueller, J. G., Pritchard, P. H.** (1995). Effects of surfactants on fluoranthene mineralization by *Sphingomonas paucimobilis* strain EPA 505. Dans: *Microbial processes for bioremediation*, (éds) R. E. Hinchee, F. J. Brockman, C. M. Vogel. Battelle Press, Columbus: 7-14.

**Laverman, A. M., Switzer Blum, J., Schaefer, J. K., Phillips, E. J. P., Lovley, D. R., Oremland, R. S.** (1995). Growth of strain SES-3 with arsenate and other

diverse electron acceptors. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(10): 3556-3561.

**Leadbetter, E. R.** (1997). Prokaryotic diversity: form, ecophysiology, and habitat. Dans: *Manual of environmental microbiology*, (éd.) C. J. Hurst. ASM Press, Washington: 14-24.

**Lee, M. J., Zinder, S. H.** (1988). Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture. *Applied and Environmental Microbiology* **54**(6): 1457-1461.

**Lepage, S. P., Shelton, J. E., Mitchell, T. G.** (1970). Media for the maintenance and preservation of bacteria. Dans: *Methods in microbiology*, (éds) J. R. Norris, D. W. Ribbons. Academic Press, London. Vol. **3A**: p. 120.

**Létourneau, L., Bisailon, J.-G., Lépine, F., Beaudet, R.** (1995). Spore-forming bacteria that carboxylate phenol to benzoic acid under anaerobic conditions. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 266-272.

**Leuenberger, C., Ligocki, M., Pankow, J.** (1985). Trace organic compounds in rain. Identities, concentrations, and scavenging mechanisms for phenols in urban air and rain. *Environmental Science and Technology* **19**: 1053-58.

**Leung, K., England, L. S., Cassidy, M. B., Trevors, J. T., Weir, S. (1994).**

Microbial diversity in soil: effect of releasing genetically engineered micro-organisms. *Molecular Ecology* **3**: 413-422.

**Lévesque, M.-J., Beaudet, R., Bisailon, J.-G., Villemur, R. (1998).**

Quantification of *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1 and *Clostridium*-like strain 6 in mixed bacterial populations by competitive polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* **32**: 263-271.

**Li, T. (1998).** Isolation of a new anaerobic bacterium transforming phenol to benzoate and purification of the 4-hydroxybenzoate decarboxylase. Thèse de doctorat. Dép. de microbiologie et immunologie, Université de Montréal. Montréal. 161.

**Li, T., Bisailon, J.-G., Villemur, R., Letourneau, L., Bernard, K., Lepine, F.,**

**Beaudet, R. (1996).** Isolation and characterization of a new bacterium carboxylating phenol to benzoic acid under anaerobic conditions. *Journal of Bacteriology* **178**(9): 2551-8.

**Londry, K. L., Fedorak, P. M. (1992).** Benzoic acid intermediates in the anaerobic biodegradation of phenols. *Canadian Journal of Microbiology* **38**: 1-11.



**Londry, K. L., Fedorak, P. M., Suflita, J. M.** (1997). Anaerobic degradation of *m*-cresol by a sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8): 3170-3175.

**Lovley, D. R.** (1991). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews* **55**(2): 259-287.

**Lovley, D. R., Lonergan, D. J.** (1990). Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(6): 1858-1864.

**Lowe, S. E., Jain, M. K., Zeikus, G.** (1993). Biology, ecology, and biotechnological stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. *Microbiological Reviews* **57**(2): 451-509.

**Ludwig, W., Schleifer, K.-H.** (1999). Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News* **65**(11): 752-757.

**MacDonald, R. M.** (1986). Sampling soil microfloras: optimization of density gradient centrifugation in Percoll to separate microorganisms from soil suspensions. *Soil Biology and Biochemistry* **18**(4): 407-410.

**Mason, J. R., Cammack, R.** (1992). The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annual Reviews in Microbiology* **46**: 277-305.

**Massol-Deya, A. A., Odelson, D. A., Hickey, R. F., Tiedje, J. M.** (1995). Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). Dans: *Molecular Microbial Ecology Manual*, (éds) A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, F. J. de Bruijn. Kluwer Academic Publishers, Boston: 3.3.2.1-3.3.2.8.

**Maymó-Gatell, X., Chien, Y.-T., Gossett, J. M., Zinder, S. H.** (1997). Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* **276**(6): 1568-1571.

**McInerney, M. J.** (1988). Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. Dans: *Biology of anaerobic microorganisms*, (éd.) A. J. B. Zehnder. John Wiley & Sons, New York: 373-416.

**Mills, A. L.** (1997). Metal requirements and tolerance. Dans: *Manuel of environmental microbiology*, (éd.) C. J. Hurst. ASM Press, Washington: 349-357.

**Mlot, C.** (1999). Experimental evolution: the medium is (part of) the message. *ASM News* **65**(9): 590-592.

**Mohn, W. W., Tiedje, J. M.** (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological Reviews* **56**(3): 482-507.

**Monserate, E., Häggblom, M. M.** (1997). Dehalogenation and biodegradation of brominated phenols and benzoic acids under iron-reducing, sulfidogenic, and methanogenic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(10): 3911-3915.

**Montizaan, G. K.** (1994). Phenol. World Health Organization, Geneva.

**Mountfort, D. O., Bryant, M. P.** (1982). Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge. *Archives of Microbiology* **133**: 249-256.

**Müller, R. H., Babel, W.** (1996). Growth rate-dependent expression of phenol-assimilation pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 - the influence of formate as an auxiliary energy source on phenol conversion characteristics. *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**: 156-162.

**Nealson, K. H.** (1999). Iron and Manganese reduction: processes, organisms, and genes. 99<sup>th</sup> General Meeting of American Society for Microbiology, Chicago.

**Neufeld, R. D., Mack, J. D., Strakey, J. P.** (1980). Anaerobic phenol biokinetics. *Journal WPCF* **52**(9): 2367-2377.

**Newman, D. K., Ahmann, D., Morel, F. M. M.** (1998). A brief review of microbial arsenate respiration. *Geomicrobiology* **15**: 255-268.

**Nisman, B.** (1954). The Stickland reaction. *Bacteriological Reviews* **18**: 16-42.

**Nowatzki, E. A., Lang, R. J., Medellin, M. C., Sellers, S. M.** (1994).

Electroosmotic bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils *in situ*. Dans:

Applied biotechnology for site remediation, (éds) R. E. Hinchee, D. B. A.

Anderson, J. Metting, F. B. , G. D. Sayles. Lewis Publishers, Boca Raton: 295-299.

**Oremland, R. S., Switzer Blum, J., Culbertson, C. W., Visscher, P. T., Miller, L. G., Dowdle, P., Strohmaier, F. E.** (1994). Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(8): 3011-3019.

**Oude Elferink, S. J. W. H., van Lis, R., Heilig, H. G. H. J., Akkermans, A. D. L., Stams, A. J. M.** (1998). Detection and quantification of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Biodegradation* **9**: 169-177.

**Pace, N. R.** (1996). New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* **62**(9): 463-470.

**Pace, N. R.** (1999). Microbial ecology & diversity. *ASM News* **65**(5): 328-333.

**Parsons, J. R., Goorissen, H., Weiland, A. R., de Bruijne, J. A., Springael, D., van der Lelie, D., Mergeay, M.** (1995). Substrate range of the (chloro)biphenyl degradation pathway of *Alcaligenes* sp. JB1. Dans: Microbial processes for bioremediation, (éds) R. E. Hinchee, F. J. Brockman, C. M. Vogel. Battelle Press, Columbus: 169-175.

**Pfennig, N., Widdel, F., Truper, H. G.** (1981). The Dissimilatory Sulfate-Reducing Bacteria. Dans: The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and identification of Bacteria, (éds) M. P. Starr, Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. Springer-Verlag, Berlin. **1**: 926-940.

**Pharmacia Biotechnology.** (Année inconnue). Percoll - methodology and applications. Manuel du produit. Uppsala, Pharmacia Biotechnology Laboratory, Separation Division: 1-66.

**Postgate, J. R.** (1963). Versatile medium for the enumeration of sulfate-reducing bacteria. *Applied Microbiology* **11**: 265-267.

**Powlowski, J., Shingler, V.** (1994). Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation* **5**: 219-236.

**Roberts, D. J., Fedorak, P. M., Hrudey, S. E.** (1987). Comparison of the fates of the methyl carbons of *m*-cresol and *p*-cresol in methanogenic consortia. *Canadian Journal of Microbiology* **33**: 335-338.

**Rouvière, P. E., Wolfe, R. S.** (1988). Novel biochemistry of methanogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **263**(17): 7913-7916.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning - Laboratory manuals*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

**Samson, R.** (1993). Une place pour la digestion anaérobie dans le traitement des effluents et déchets au Québec. Centre québécois de valorisation de la biomasse, Montréal.

**Samson, R.** (1997). État de la situation de la digestion anaérobie au Québec: Bilan et perspectives. Centre de recherche BIOPRO, Ecole Polytechnique de Montréal, Montréal.

**Samson, R.** (1997a). Biorestauration des sites contaminés - les technologies *ex-situ*. Centre québécois de valorisation de la biomasse, Montréal.

**Samson, R.** (1997b). Biorestauration des sites contaminés - les technologies *in-situ*. Centre québécois de valorisation de la biomasse, Montréal.

**Sanford, R. A., Cole, J. R., Löffler, F. E., Tiedje, J. M.** (1996). Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(10): 3800-3808.

**Sanger, F., Nicklen, A., Coulson, R.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of National Academy of Science USA **74**: 5463-5467.

**Schäfer, G.** (1992). Extremophiles: fascinating organisms with surprising capabilities. Journal of Bioenergetics and Biomembranes **24**(6): 525-527.

**Scherer, P.** (1983). Separation of bacteria from a methanogenic wastewater population by utilizing a self-generating Percoll gradient. Journal of Applied Bacteriology **55**: 481-486.

**Schink, B.** (1991). Syntrophism among prokaryotes. Dans: The prokaryotes, (éds) A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, K. H. Schleifer. Springer-Verlag, New York.

**Schink, B.** (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiology and Molecular Biology Reviews **61**(2): 262-280.

**Schnell, S., Schink, B.** (1991). Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. Archives of Microbiology **155**: 183-190.

**Schnürer, A., Schink, B., Svensson, B. H.** (1996). *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a

hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 1145-1152.

**Sharak Genthner, B. R., Townsend, G. T., Chapman, P. J.** (1989). Anaerobic transformation of phenol to benzoate via *para*-carboxylation: use of fluorinated analogues to elucidate the mechanism of transformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **162**(3): 945-951.

**Sharak Genthner, B. R., Townsend, G. T., Chapman, P. J.** (1990). Effect of fluorinated analogues of phenol and hydroxybenzoates on the anaerobic transformation of phenol to benzoate. *Biodegradation* **1**: 65-74.

**Sharak Genthner, B. R., Townsend, G. T., Chapman, P. J.** (1991). *para*-Hydroxybenzoate as an intermediate in the anaerobic transformation of phenol to benzoate. *FEMS Microbiology Letters* **78**: 265-270.

**Singleton, R. J.** (1993). The sulfate-reducing bacteria: an overview. Dans: *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*, (éds) J. M. Odom, R. J. Singleton. Springer-Verlag, New York: 1-20.

**Sleat, R., Robinson, J. P.** (1984). The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds. *Journal of Applied Bacteriology* **57**: 381-394.



**Smith, R. L.** (1997). Determining the terminal electron-accepting reaction in the saturated-subsurface. Dans: Manual of environmental microbiology, (éd.) C. J. Hurst. ASM Press, Washington: 577-585.

**Smith, R. W., Misra, M.** (1993). Bioprocessing of minerals. The Paul E. Queneau International Symposium. Extractive Metallurgy of Copper, Nickel and Cobalt, The Minerals, Metals & Materials Society.

**Stams, A. J. M., Van Dijk, J. B., Dijkema, C., Plugge, C. M.** (1993). Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology **59**(4): 1114-1119.

**Stickland, L. H.** (1934). Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*). The chemical reactions by which *Cl. sporogenes* obtains its energy. Biochem. J. **28**: 1746-1759.

**Strack, D.** (1997). Phenolic metabolism. Dans: Plant Biochemistry, (éds) P. M., Dey, J. B. Harborne. Academic Press, San Diego: 387-416.

**Switzenbaum, M. S.** (1983). Anaerobic treatment of wastewater: recent developments. ASM News **49**(11): 532-536.

**Tanner, R. S., Woese, C. R. (1994).** A phylogenetic assessment of the acetogens. Dans: *Acetogenesis*, (éd.) H. L. Drake. Chapman & Hall, New York: 254-269.

**Thomas, J. C., Desrosiers, M., St-Pierre, Y., Lirette, P., Bisaillon, J.-G., Beudet, R., Villemur, R. (1997).** Quantitative flow cytometric detection of specific microorganisms in soil samples using rRNA targeted fluorescent probes and ethidium bromide. *Cytometry* **27**(3): 224-32.

**Tiedje, J. M. (1988).** Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. Dans: *Biology of anaerobic microorganisms*, (éd.) A. J. B. Zehnder. John Wiley & Sons, New York: 179-244.

**Tschech, A., Fuchs, G. (1987).** Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Archives of Microbiology* **148**: 213-217.

**Tschech, A., Fuchs, G. (1989).** Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxybenzoate: in vitro study of isotope exchange between  $^{14}\text{CO}_2$  and 4-hydroxybenzoate. *Archives of Microbiology* **152**: 594-599.

**Utkin, I., Woese, C., Wiegel, J. (1994).** Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**(4): 612-619.

**Vigneswaran, S., Balasuriya, B. L. N., Viraraghavan, T. (1986).** Anaerobic wastewater treatment - attached growth and sludge blanket process.

Environmental Sanitation Reviews **19/20**: 1-93.

**Villemur, R., Letowski, J., Bisailon, J.-G. (1998).** Anaerobic bacterium 'strain 7' 16S ribosomal RNA gene, complete sequence. Genbank AF072863.

**Wallner, G., Guchs, B., Spring, S., Beisker, W., Amann, R. (1997).** Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. Applied and Environmental Microbiology **63**(11): 4223-4231.

**Wallrabenstein, C., Gorny, N., Springer, N., Ludwig, W., Schink, B. (1995).** Pure culture of *Syntrophus buwellii* definition of its phylogenetic status, and description of *Syntrophus gentianae* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology **18**: 62-66.

**Walter, M. V., Crawford, R. L. (1997).** Overview: Biotransformation and biodegradation. Dans: Manual of environmental microbiology, (éd.) C. J. Hurst. ASM Press, Washington: 707-708.

**Warikoo, V., McInerney, M. J., Robinson, J. A., Suflita, J. M. (1996).** Interspecies acetate transfer influences the extent of anaerobic benzoate degradation by syntrophic consortia. Applied and Environmental Microbiology **62**(1): 26-32.

**Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H., Harayama, S. (1998).** Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(11): 4396-4402.

**Watson, S. W., Novitsky, T. J., Quinby, H. L., Valois, F. W. (1977).** Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology* **33**: 940-954.

**Webber, D. (1984).** Top fifty chemical products. *Chemical and Engineering News* **62**(7): 8-10.

**Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J. (1998).** Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of National Academy of Science USA* **95**: 6578-6583.

**Williams, R. J., Evans, W. C. (1975).** The metabolism of benzoate by *Moraxella* species through anaerobic nitrate respiration. *Biochemical Journal* **148**: 1-10.

**Winter, J. U., Wolfe, R. S. (1980).** Methane formation from fructose by syntrophic associations of *Acetobacterium woodii* and different strains of methanogens. *Archives of Microbiology* **124**: 73-79.

**Woese, C. (1999).** The quest for Darwin's grail. *ASM News* **65**(5): 260-263.

**Young, L. Y., Rivera, M. D.** (1985). Methanogenic degradation of four phenolic compounds. *Water Research* **19**(10): 1325-1332.

**Zehnder, A. J. B., Ingvorsen, K., Marti, T.** (1981). Microbiology of methane bacteria. Dans: *Anaerobic Digestion*, (éd.) D. E. Hughes. Elsevier Biomedical Press, New York: 45-68.

**Zehnder, A. J. B., Stumm, W.** (1988). Geochemistry and biochemistry of anaerobic habitats. Dans: *Biology of anaerobic microorganisms*, (éd.) A. J. B. Zehnder. John Wiley & Sons, New York: 1-38.

**Zenz, C.** (1988). Occupational medicine principles and practical applications. Mosbey Year Book. Boston.

**Zhang, X., Mandelco, L., Wiegel, J.** (1994). *Clostridium hydroxybenzoicum* sp. nov., an amino acid-utilizing, hydroxybenzoate-decarboxylating bacterium isolated from methanogenic freshwater pond sediment. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**(2): 214-222.

**Zhang, X., Morgan, T. V., Wiegel, J.** (1990a). Conversion of  $^{13}\text{C}$ -1 phenol to  $^{13}\text{C}$  -4 benzoate, an intermediate step in the anaerobic degradation of chlorophenols. *FEMS Microbiology Letters* **67**: 63-66.

**Zhang, X., Wiegel, J.** (1990). Isolation and partial characterization of a *Clostridium* species transforming para-hydroxybenzoate and 3,4-dihydroxybenzoate and producing phenols as the final transformation products. *Microbial Ecology* **20**: 103-121.

**Zhang, X., Wiegel, J.** (1994a). Reversible conversion of 4-hydroxybenzoate and phenol by *Clostridium hydroxybenzoicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(11): 4182-4185.

**Zhou, G.-M., Fang, H. H. P.** (1997). Co-degradation of phenol and *m*-cresol in a UASB reactor. *Bioresource Technology* **61**: 47-52.

**Zhou, G.-M., Fang, H. H. P.** (1998). Competition between methanogenesis and sulfidogenesis in anaerobic wastewater treatment. *Water Science Technology* **38**(8-9): 317-324.

**Zinder, S. H.** (1984). Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments. *ASM News* **50**(7): 294-298.