
Capacités de dégradation des différents enrichissements

Cette partie de l'étude est consacrée à l'évaluation des capacités de dégradation des différents enrichissements présentés dans le tableau 2.1 (Matériel et Méthodes) et obtenus sur MTBE ou sur ETBE. Nous avons étudié les capacités de ces différents enrichissements tout d'abord pour l'ETBE ou le MTBE ainsi que pour le TBA qui est le principal intermédiaire de dégradation de l'ETBE et du MTBE, puis pour les autres composés solubles naturellement présents dans les essences que sont les composés mono-aromatiques (BTEXs) ou pour les *n*-alcanes (octane, hexadécane), composés dont la présence pourrait avoir un impact sur la dégradation des éthers-carburants du fait de contaminations simultanées.

IV – 1 – 1. Biodégradation de l'ETBE et du MTBE

Les capacités de dégradation pour l'ETBE et/ou pour le MTBE ont été testées sur MM pour chaque enrichissement avec comme seule source de carbone l'ETBE ou le MTBE, par suivi CPG de l'ETBE ou du MTBE résiduel ainsi que de la production de CO₂. Un calcul du rendement de production de biomasse est également effectué par mesure de poids sec au début et à la fin de la biodégradation quand cela était possible. Par contre, il n'a pas été possible de suivre la croissance en mesurant l'évolution de la densité optique car la biomasse présente dans les enrichissements adopte la plupart du temps la forme de floculats hétérogènes. Les résultats obtenus pour ces cinétiques de dégradation sont présentés sur les figures 4.1 et 4.2. Les écarts types représentent les différences de quantité de substrat mesurées entre chaque triplicata.

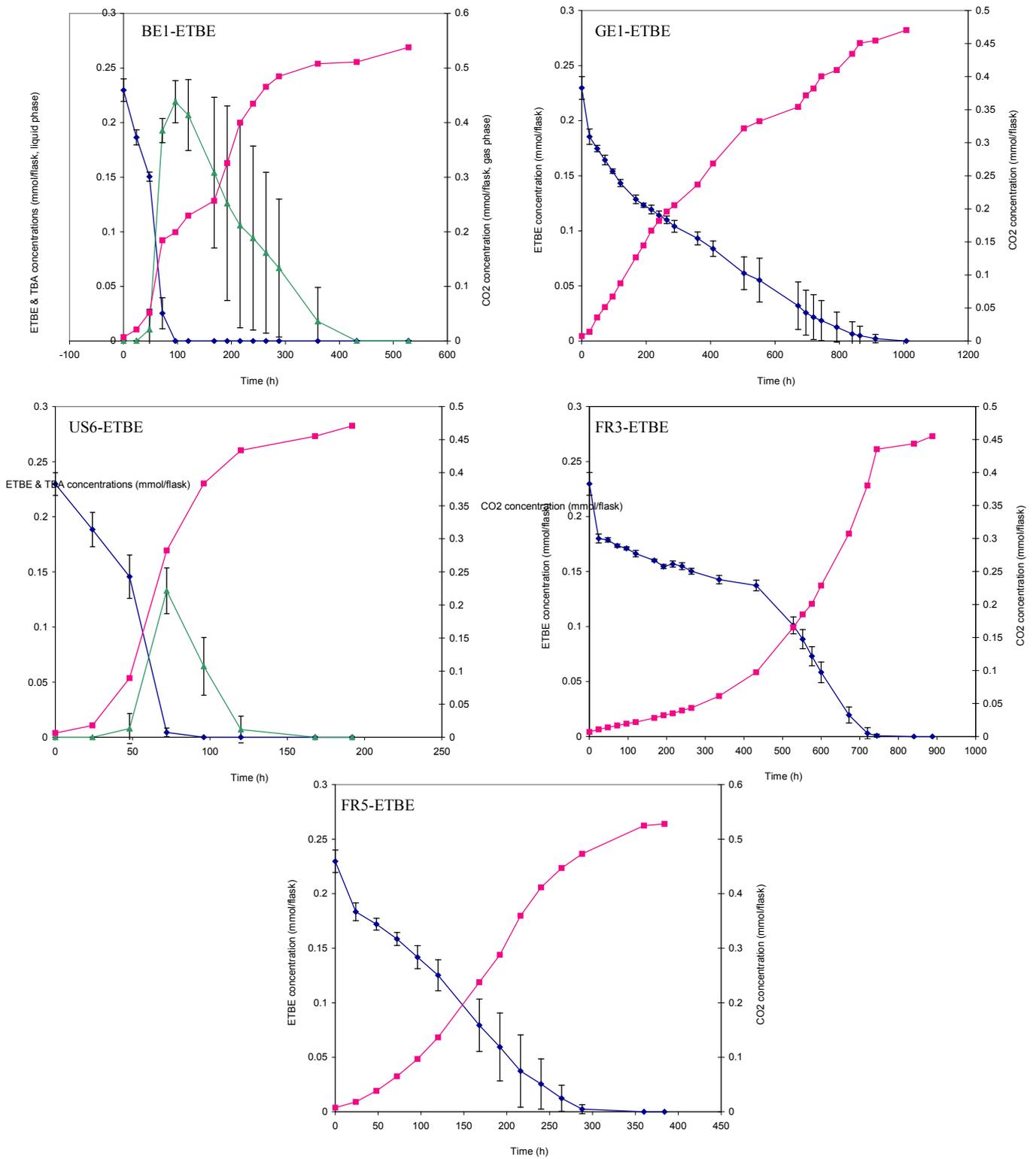


Figure 4.1. Cinétiques de dégradation de l'ETBE par les enrichissements obtenus sur ETBE (BE1-, GE1-, US6-, FR3- et FR5-ETBE)

◆-◆ : concentration en ETBE ; ■-■ : concentration en CO₂ ; ▲-▲ : concentration en TBA
 Dans le cas du CO₂, la courbe présentée est la moyenne de deux mesures.

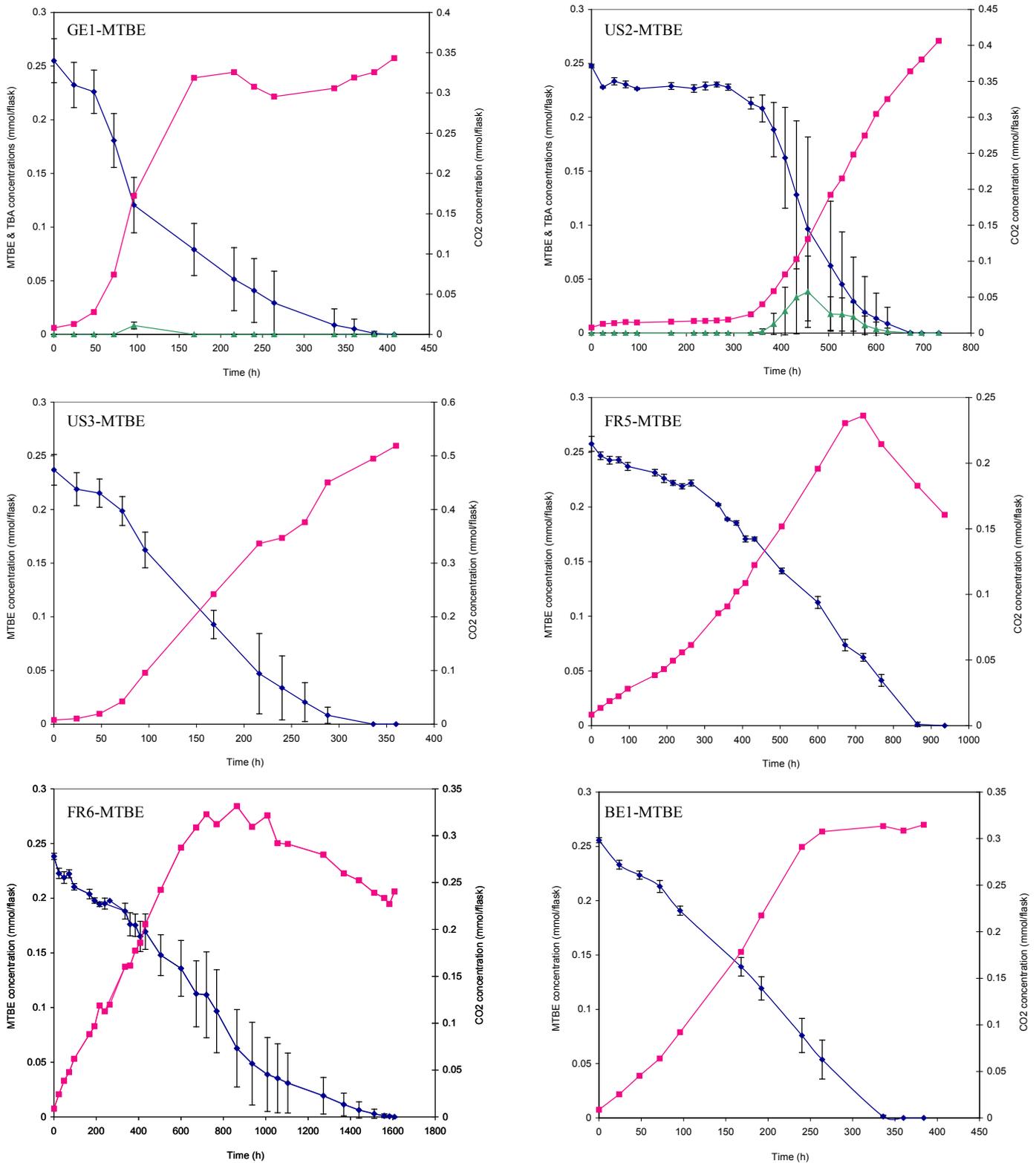


Figure 4.2. Cinétiques de dégradation du MTBE par les enrichissements obtenus sur MTBE (GE1-, US2-, US3-, FR5-, FR6- et BE1-MTBE)

◆-◆ : concentration MTBE ; ■-■ : concentration CO₂ ; ▲-▲ : concentration TBA
 Dans le cas du CO₂, la courbe présentée est la moyenne de deux mesures.

Les bilans de ces cinétiques de dégradation ont été regroupés dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1. Récapitulatif des données sur la biodégradation des différents enrichissements

Nom de l'enrichissement	Durée totale de la dégradation (heures)	Quantité de CO ₂ produite à la fin de la dégradation (mmoles/fioles, phase gazeuse)	Vitesse maximale de dégradation de l'ETBE ou du MTBE (mg de substrat. h ⁻¹ .mg ⁻¹ biomasse initiale)	Biomasse initiale (mg.L ⁻¹)	Rendement biomasse (mg de biomasse produite.mole ⁻¹ de substrat consommé)
BE1-ETBE	408	0,302	0,42	8,5	43,9 ± 12,2
GE1-ETBE	1008	0,481	0,02	20	11,2 ± 4,1
US6-ETBE	168	0,466	0,08	51,6	37,7 ± 8,2
FR3-ETBE	768	0,456	0,02	25,6	19,4 ± 1,0
FR5-ETBE	360	0,537	0,02	30,8	33,7 ± 10,2
GE1-MTBE	408	0,351	0,22	6,7	16,7 ± 2,6
US2-MTBE	696	0,389	0,02	38,2	7,9 ± 0,9
US3-MTBE	336	0,506	0,05	17,2	15,0 ± 3,5
FR5-MTBE	936	0,355	0,03	11,3	28,2 ± 6,2
FR6-MTBE	1608	0,531	0,002	ND	ND
BE1-MTBE	360	0,681	0,02	26,7	30,8 ± 21.1

Concentrations initiales en ETBE ou MTBE : 0,25 mmoles/fioles

ND: Non Déterminé

Les témoins abiotiques de ce test n'ont présenté aucune dégradation du substrat

Au vu des cinétiques de dégradation, nous avons pu constater que pour chaque enrichissement réalisé sur ETBE, les cinétiques de dégradation sont différentes. Dans certains cas, une production intermédiaire de TBA est observée (BE1-ETBE et US6-ETBE). La production de TBA est particulièrement forte dans le cas de BE1-ETBE qui a la vitesse maximale de dégradation de l'ETBE la plus élevée montrant que dans ce cas, c'est la dégradation du TBA qui est l'étape limitante. La production de TBA est par elle-même une donnée importante à prendre en compte car cela montre que dans les aquifères, où les conditions peuvent souvent être limitantes (oxygène,...) par rapport à des études en fioles en conditions contrôlées, la biodégradation de l'ETBE peut conduire à l'accumulation de TBA qui est un composé en lui-même problématique (Rasa et al., 2011 ; Shih et al., 2004). La possibilité d'une dégradation incomplète avec accumulation de TBA avait été évoquée dans le cas du MTBE sur des sites contaminés et attribuée, en effet, à des conditions spécifiques de limitations (Schmidt et al., 2004 ; Wei and Finneran, 2011). La présence de TBA dans les aquifères due à une dégradation limitée d'un des éthers est un problème important, essentiellement pour deux

raisons : (i) il s'agit d'un alcool dont la solubilité est infinie et dont l'extraction à partir de l'eau d'un site contaminé sera encore plus difficile à réaliser par les moyens classiques physico-chimiques ("purge and stripp", essentiellement) ; (ii) ce composé est considéré comme "weak carcinogen" (Chen, 2006). La durée totale de la dégradation de l'ETBE est très variable et peut aller de 168 h (7 jours) pour US6-ETBE, jusqu'à 1008 h (42 jours) pour GE1-ETBE. Dans le cas de FR3-ETBE, nous avons obtenu un profil de dégradation très particulier où la dégradation de l'ETBE n'atteignait sa vitesse maximale qu'après plus de 400 heures d'incubation. Ce point sera discuté plus loin en liaison avec la composition phylogénétique de l'enrichissement. La production de CO₂, ainsi que les rendements en termes de production de biomasse au cours de la dégradation, sont eux aussi variables d'un enrichissement à l'autre. Concernant les enrichissements réalisés sur MTBE, nous avons constaté que, tout comme pour l'ETBE, les cinétiques de dégradation sont différentes d'un enrichissement à l'autre. Dans certains cas, une production intermédiaire de TBA, bien que moindre que sur ETBE, est également observée (GE1-MTBE et US2-MTBE) posant potentiellement les mêmes problèmes soulignés plus haut. La durée totale de la dégradation du MTBE est très variable et peut aller de 360 h (15 jours) pour BE1-MTBE, jusqu'à 1608 h (67 jours) pour FR6-MTBE et dans ce cas la production de biomasse n'était pas quantifiable. C'est pour l'enrichissement GE1-MTBE que la vitesse maximale de dégradation la plus élevée a été observée (0,22 mg de MTBE consommé.h⁻¹.mg⁻¹ de biomasse initiale). La production de CO₂, ainsi que les rendements en termes de production de biomasse au cours de la dégradation, sont eux aussi variables et dépendants de l'enrichissement considéré.

D'une façon générale les rendements en biomasse que nous avons pu mesurer sont faibles mais ceci est plus particulièrement vrai dans le cas des enrichissements sur MTBE pour lesquels la moyenne des valeurs de rendement (19,7 mg de biomasse produite.mole⁻¹ de MTBE consommé) est plus basse que la moyenne des valeurs de rendement mesurées sur ETBE (29,2 mg de biomasse produite.mole⁻¹ de MTBE consommé). Néanmoins, comme dans le cas du MTBE, les rendements en biomasse sur ETBE restent faibles et ceci n'avait pas été montré auparavant. Des valeurs faibles de rendement en biomasse ont été également constatées pour la biodégradation de composés polluants par des échantillons d'aquifères (Gomez et Alvarez, 2010). De façon intéressante, lorsque ces auteurs comparent les rendements obtenus sur *n*-butanol ou iso-butanol (c'est-à-dire un composé linéaire vs. un composé branché), ils obtiennent en conditions aérobies des valeurs respectives de 78,4 et 9,6 mg de biomasse produite.mole⁻¹ de substrat consommé ce qui montre bien que l'assimilation des composés branchés pose un problème spécifique.

Dans certains cas, il est possible de lier une croissance plus lente à un rendement en biomasse faible (GE1-ETBE, FR3-ETBE, US2-MTBE et FR6-MTBE). Une telle constatation avait été faite préalablement en étudiant les paramètres de croissance sur MTBE des différentes souches pures à l'aide d'un modèle (Müller *et al.*, 2008). Les résultats que nous avons obtenus pour ces enrichissements sont en accord avec les calculs effectués d'après le modèle montrant que dans les cas de croissance lente, la production de biomasse, fortement limitée par les flux de substrat entrant dans les voies métaboliques, est faible. Nos résultats confirment donc bien les limitations déjà rapportées et qui ont des conséquences sur l'atténuation naturelle du

MTBE sur sites pollués: faible biomasse produite, et donc faible teneur en micro-organismes dégradeurs dans la population, et en conséquence, lenteur de la biodégradation. Ils montrent également que la situation vis-à-vis de l'ETBE est probablement similaire comme observé, d'ailleurs, lors du traitement d'un site pollué par ETBE (Fayolle-Guichard et al., 2012). Il reste néanmoins que dans le cas de BE1-ETBE, les systèmes enzymatiques présents semblent suffisamment efficaces pour alimenter le métabolisme des micro-organismes et permettre une bonne croissance sur ETBE.

IV – 1 – 2. Biodégradation des composés des essences (BTEXs et *n*-alcanes)

Étant donné que les contaminations d'eaux souterraines par l'ETBE ou le MTBE sont souvent associées à des contaminations par d'autres composés des essences, il était important de connaître les capacités de dégradation de chaque enrichissement obtenu sur ETBE ou MTBE vis-à-vis des possibles co-contaminants qui peuvent leur être associés. C'est pourquoi les capacités de dégradation ont également été testées individuellement pour 11 composés, préalablement dissous dans du HMN pour obtenir une concentration initiale de l'ordre de 200 mg.L⁻¹. Ces composés sont les suivants: ETBE, MTBE, TBA, Benzène, Toluène, Éthylbenzène, *m*-Xylène, *o*-Xylène, *p*-Xylène, Octane et Hexadécane. Après une incubation de 4 semaines, les dosages par CPG des concentrations résiduelles ont été réalisés. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2. Pourcentages de dégradation de différents substrats par les enrichissements ETBE et MTBE

Composés	Capacités de dégradation (%) des différents enrichissements ^a										
	FR3-ETBE	US6-ETBE	FR5-ETBE	GE1-ETBE	BE1-ETBE	GE1-MTBE	US2-MTBE	US3-MTBE	BE1-MTBE	FR5-MTBE	FR6-MTBE
ETBE	55,7 ± 14,4	100	100	100	100	100	3,0 ± 1,9	0	0	100	100
MTBE	0	0	100*	89,1 ± 18,9	16,3 ± 2,7	100	100	100	100	79,5 ± 18,6	25,6 ± 8,4
TBA	91,9 ± 14,0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Benzène	100	99,0 ± 0,8	100	100	61,0 ± 11,0	99,0 ± 0,6	0	100	71,0 ± 5,4	100	56,0 ± 9,0
Toluène	100	0	99,0 ± 0,1	0	0	98,0 ± 0,2	0	80,0 ± 25,2	98,0 ± 0,3	99,0 ± 0,3	80,0 ± 10,6
Éthylbenzène	23,0 ± 14,4	0	100	0	100	0	0	0	98,0 ± 0,4	100	53,0 ± 9,4
<i>m</i>-xylène	100	99,0 ± 0,1	71,0 ± 41,7	0	100	100	0	0	0	100	100
<i>p</i>-xylène	100	97,0 ± 1,8	100	0	97,0 ± 1,7	100	0	0	0	100	99,0 ± 0,3
<i>o</i>-xylène	0	0	99,0 ± 0,1	0	0	0	0	0	0	98,0 ± 1,0	24,0 ± 17,2
Octane	100	99,0 ± 0,3	100	36,0 ± 13,3	100	99,0 ± 0,1	100	83,0 ± 14,8	93,0 ± 10,1	100	100
Hexadécane	100	100	100	100	78,0 ± 20,0	61,0 ± 36,0	100	96,0 ± 4,0	86,0 ± 17,0	98,0 ± 0,3	93,0 ± 0,3

^a Les valeurs indiquées sont les moyennes basées sur les données obtenues pour chaque triplicata.

* MTBE entièrement dégradé en TBA

Les concentrations initiales (en mg.L⁻¹) pour chacun des composés sont les suivantes: TBA: 276,8 ; MTBE: 279,3 ; ETBE: 276,9 ; Benzène: 277,2 ; Toluène: 283,3 ; Ethylbenzène: 237,3 ; *m*-xylène: 227,1 ; *p*-xylène: 204,6 ; *o*-xylène: 239,9 ; octane: 282,8 ; hexadécane: 226,3

Les témoins abiotiques incubés dans des conditions similaires ont été utilisés pour effectuer les calculs des pourcentages de dégradation.

Chaque enrichissement possède des capacités de dégradation qui lui sont propres pour les différents composés étudiés. Seuls le TBA et l'hexadécane ont été dégradés dans tous les cas, tandis que le *o*-xylène n'a été dégradé que dans trois cas (complètement par FR5-ETBE et FR5-MTBE, et partiellement par FR6-MTBE).

C'est l'enrichissement US2-MTBE qui a les capacités les moins importantes, dégradant uniquement le MTBE, le TBA, l'octane et l'hexadécane.

Les enrichissements possédant les capacités de dégradation les plus larges sont FR5-ETBE et FR5-MTBE. Dans le cas de FR5-ETBE, seul le *m*-xylène n'est dégradé qu'à 71 % au terme des 4 semaines d'incubation. Le MTBE est aussi dégradé par cet enrichissement mais la dégradation est plus lente car, dans ce cas, au bout de 4 semaines tout le MTBE a été converti en TBA qui n'est que partiellement reconstitué. Pour FR5-MTBE, tous les composés sont également dégradés de façon totale, mise à part le MTBE, qui n'est dégradé qu'à 79,5 % au terme des 4 semaines. Globalement dans le cas des enrichissements issus de l'échantillon FR5, les capacités sont similaires, que le substrat d'enrichissement soit le MTBE ou l'ETBE. Ceci n'est pas le cas pour les enrichissements effectués à partir de GE1, pour lesquels nous avons montré que GE1-MTBE a des capacités supérieures à GE1-ETBE. De même, les profils de dégradation sont différents pour BE1-ETBE et BE1-MTBE. La sélection de micro-organismes lors de l'enrichissement sur un substrat donné a un impact sur la capacité à dégrader d'autres substrats. Ces résultats seront discutés en liaison avec la composition phylogénétique des enrichissements.

Le cas de l'impact des co-contaminations d'aquifères par du MTBE et par des BTEXs a été étudié dans le cas de *M. petroleiphilum* PM1 (Deeb et al., 2001) montrant que cette souche était capable de dégrader également certains BTEXs: le benzène, le toluène et un des isomères du xylène (non précisé) et que la présence de MTBE retardait la dégradation du benzène et du toluène. Ceci a été montré également pour *R. aetherivorans* IFP 2017 pour lequel la présence de BTEXs avait un effet négatif sur la capacité de dégradation de l'ETBE et du MTBE (Auffret et al., 2009). Par ailleurs, une étude en biofiltre avec une culture dégradant le MTBE a également montré, comme dans plusieurs des cas étudiés ici, des capacités intéressantes de dégradation du TBA, de l'éthylbenzène et du toluène ainsi que partiellement du benzène et des xylènes (Wang et Deshusses, 2007). Dans certains cas de co-contamination, les effets peuvent être inverses selon le co-contaminant comme cela a été montré dans un aquifère avec l'éthanol ayant un effet négatif sur la dégradation des BTEXs et l'iso-butanol ayant un effet positif sur la dégradation des BTEXs (Schaefer et al., 2010).

En conclusion de cette partie de l'étude, nous avons montré que quel que soit le substrat d'enrichissement utilisé, les cinétiques de dégradation varient au cas par cas, mais les limitations déjà notées pour la croissance des micro-organismes sur MTBE (durée et faible croissance) sont retrouvées dans le cas de l'ETBE et peuvent conduire aux mêmes conséquences quant à la remédiation de sites pollués. La production de TBA, qui a toujours été re-constitué dans les conditions du laboratoire, a été observée dans plusieurs cas mettant en évidence le problème qui peut se poser de son accumulation dans les sites contaminés par du MTBE ou de l'ETBE, problème déjà signalé à plusieurs reprises pour le MTBE et dans un cas de pollution par de l'ETBE.

Le substrat d'enrichissement jouant un rôle sur la sélection de certains micro-organismes, il a aussi un impact sur les capacités des microflore enrichies à dégrader des composés des essences qui ne sont pas des éthers-carburants tels que les BTEXs ou les alcanes. Dans le cas de la dégradation de ces composés, nous avons également observé de grandes variabilités et montré que pour les microflore qui avaient pu être enrichies à la fois sur ETBE et sur MTBE, les capacités des enrichissements obtenus vis-à-vis de ces différents composés pouvaient différer.

Les différences quant aux compositions microbienne et génétique présentes dans ces enrichissements peuvent seules permettre d'expliquer les différences de comportement observées d'un enrichissement à l'autre. Cette étude a fait l'objet de la suite du travail.

IV – 2. Souches bactériennes isolées à partir des différents enrichissements

À partir des différents enrichissements, des isolements ont été réalisés afin d'identifier les micro-organismes qui les composent et, qui possèdent des capacités de dégradation pour l'ETBE, le MTBE ou le TBA. Une fois ces capacités confirmées, une caractérisation de ces souches a été effectuée par extraction d'ADN et séquençage des gènes *rrs* codant l'ARNr 16S.

IV – 2 – 1. Étude des capacités de dégradation des souches bactériennes isolées

Des étalements en dilution sur boîte de milieu gélosé ont été réalisés à partir des enrichissements sur ETBE ou MTBE. Après croissance, les différentes colonies obtenues ont été isolées et leur pureté a été vérifiée. Chaque colonie a ensuite été repiquée en fioles de milieu liquide contenant le substrat d'origine de l'enrichissement (MTBE ou ETBE) ainsi que sur TBA en parallèle afin de déterminer ses éventuelles capacités de dégradation.

Nous avons ainsi isolé différents micro-organismes à partir des enrichissements sur ETBE et des enrichissements sur MTBE. Il faut noter que l'isolement de certaines des souches obtenues a été difficile du fait de croissance lente sur boîte qui rend plus difficile l'étape de vérification de pureté du fait de la durée d'incubation nécessaire pour obtenir des colonies bien identifiables. Chaque souche ayant des capacités de biodégradation vis-à-vis d'un des substrats testés (MTBE, ETBE ou TBA) a ensuite été caractérisée après extraction, clonage et séquençage de gènes codant l'ARNr 16S (couple d'amorces pA/pH, voir tableau 3.4.1). Les séquences ont ensuite été annotées sur les sites RDP et NCBI en les comparant aux séquences répertoriées dans les bases de données. L'ensemble de ces résultats est synthétisé dans le tableau 4.3.

Il est à noter que parmi tous les isolements réalisés, plusieurs n'ont pas montré de capacités de dégradation des substrats testés malgré des durées d'incubation prolongées. Ces micro-organismes n'ont donc pas été caractérisés. Leur rôle dans les enrichissements n'est donc pas connu, toutefois, il est possible de supposer qu'ils subsistent en utilisant des produits de la lyse bactérienne, entre autres.

Tableau 4.3. Souches isolées possédant des capacités de dégradation

Enrichissement d'origine	Numéro IFPEN	Access Number	Phylum/Ordre	Genre	Capacités de dégradation	Durée de la dégradation (h)**	Vitesse maximale de dégradation (mg de substrat L ⁻¹ .h ⁻¹)**
BE1-ETBE	IFP 2040	JX049414 (full 16s)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	(ETBE en TBA) + biomasse + CO ₂	23	13,1
GE1-ETBE	IFP 2041	KC758856 (full 16s)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	(ETBE en TBA) + biomasse + CO ₂	30	5,2
US6-ETBE	IFP 2042	JX049415 (full 16s)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	(ETBE en TBA) + biomasse + CO ₂	100	3,5
BE1-ETBE	IFP 2043	KC785086 (full 16s)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	(ETBE en TBA) + biomasse + CO ₂	30	7,8
GE1-ETBE	IFP 2047	JX049412 (full 16s)	<i>Betaproteobacteria</i>	*	ETBE en biomasse + CO ₂	1800	0,2
US6-ETBE	IFP 2049	JX049416 (full 16s)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	TBA en biomasse + CO ₂	190	6,1
FR5-ETBE	IFP 2050	JX049417 (full 16s)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardia</i> sp.	ETBE ou MTBE en biomasse + CO ₂	130 (ETBE) 160 (MTBE)	1,6 (ETBE) 1,1 (MTBE)
US3-MTBE	IFP 2051	JX402119 (full 16S)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	MTBE en biomasse + CO ₂	336	0,7
GE1-MTBE	IFP 2052	JX402118 (full 16S)	<i>Proteobacteria</i>	*	MTBE en biomasse + CO ₂	400	1,4

*: le pourcentage d'identité est inférieur à 95 % et ne permet pas d'associer un nom de genre à la souche.

** : ces données proviennent des figures 4.1 et 4.2

Ainsi, parmi les souches isolées ayant des capacités de dégradation, cinq sont des *Actinobacteria*, et quatre des *Proteobacteria*. Il n'a pas été possible d'isoler des micro-organismes ayant des capacités de biodégradation à partir des enrichissements FR3-ETBE, US2-MTBE, FR5-MTBE, FR6-MTBE et BE1-MTBE. Concernant l'enrichissement FR5-MTBE, nous supposons au vu des résultats de biodégradation que la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050, isolée -avec difficulté- à partir de l'enrichissement sur ETBE, et pouvant dégrader les deux substrats, est également présente et impliquée dans la dégradation du MTBE. Nous reviendrons sur ce point dans l'analyse phylogénétique des enrichissements. Des conditions d'isolement spécifiques permettraient peut-être d'isoler certains autres micro-organismes responsables de la dégradation à condition de savoir vers quel type de micro-organisme orienter les conditions. Ce point particulier sera discuté plus loin. Mais on sait par ailleurs que la très grande majorité des micro-organismes sont considérés comme non cultivés/cultivables (Rappe et Giovannoni, 2003).

- *Actinobacteria* : les capacités de dégradation de l'ETBE par les *Actinobacteria*, et en particulier *Rhodococcus* et *Pseudonocardia* sont connues. D'autres *Rhodococcus* avec ces capacités ont été préalablement isolées (Auffret et al., 2009 ; Hernandez-Perez et al., 2001 ; Malandain et al., 2010). Il a également été montré par une analyse PFLA que l'addition d'ETBE à des sols se traduisait par une prédominance des bactéries Gram-positives (Bartling et al., 2011). De plus, plusieurs souches de *Pseudonocardia* ont été préalablement décrites comme pouvant dégrader l'ETBE et le MTBE par cométabolisme après croissance sur THF (Thiemer et al., 2003 ; Vainberg et al., 2006).

- *Proteobacteria* : D'après les données du site RDP, la souche IFP 2047, capable de dégrader l'ETBE et isolée à partir de GE1-ETBE, peut seulement être caractérisée à 100 % comme appartenant à l'ordre des *Burkholderiales* (*Betaproteobacteria*), et comporte seulement 86 % d'identité avec le genre *Ideonella*. Néanmoins, lorsque cette séquence est soumise à un BLAST dans la base de données NCBI, cette séquence possède 98 % d'identité par rapport à différentes souches du cluster *Rubrivivax-Roseateles-Leptothrix-Ideonella-Aquabacterium*, auquel appartient la souche *A. tertiaricarbonis* L108, dégradant le MTBE (Lechner et al., 2007) et l'ETBE (Schuster et al., 2013). Il faut préciser que GE1 est un échantillon prélevé au site de Leuna en Allemagne, site dont avait été isolée il y a quelques années *A. tertiaricarbonis* L108.

Également, d'après les données du site RDP, la souche IFP 2052, dégradant le MTBE, peut seulement être caractérisée à 91 % comme appartenant à l'ordre des *Gammaproteobacteria* et le pourcentage d'identité le plus élevé est seulement de 91 % d'identité avec le genre *Rhizobacter*. Néanmoins, dans ce cas, lorsque cette séquence est soumise à un BLAST dans la base de données NCBI, cette séquence présente 97 à 98 % d'identité avec des souches des genres *Methylibium*, *Piscinibacter* (*Betaproteobacteria*), mais également *Rhizobacter* (*Gammaproteobacteria*), et serait donc proche de *Methylibium petroleiphilum* PM1 (Kane et al., 2006).

Pour la première fois, *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 (*Gammaproteobacteria*) a été isolée pour ses capacités à dégrader le MTBE. Du fait de cette capacité, cette souche a fait l'objet

d'un brevet pour son utilisation éventuelle dans des opérations de bioremédiation de sites pollués.

C'est également la première fois que la capacité de dégradation du TBA par une bactérie du genre *Bradyrhizobium* est décrite (Le Digabel et al., 2013). Dans le cas de cette bactérie, également, l'isolement a été fastidieux car elle a été isolée à partir de cultures sur boîtes de *Rhodococcus* sp. IFP 2042 dont il a été difficile de la dissocier étant donné les différences de durée nécessaire à la croissance respective de ces deux souches. Le sous-groupe *Bradyrhizobium* (*Alphaproteobacteria*) correspond à des bactéries Gram-négatives du sol qui appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae*. Les bactéries du sous-groupe *Bradyrhizobium* ont surtout été étudiées pour leur capacité à induire sur les racines des plantes des nodules dans lesquels elles effectuent la fixation de l'azote atmosphérique en symbiose avec la plante. Du fait de ces effets bénéfiques, il y a un grand nombre d'études sur *Bradyrhizobium*, son rôle dans la croissance des plantes et sa distribution écologique dans l'environnement (Gage DJ, 2004, Galiana et al., 1994, Martinez-Romero E 2009, Sachs et al., 2009, Torres et al., 2011). *B. japonicum*, dont *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 est très proche (99 % d'identité) n'était semble-t-il, pas présent en Europe avant son introduction pour permettre la culture du soja qui a des besoins spécifiques en azote (Revellin et al., 2005). Il est intéressant de noter que la souche isolée provient justement d'un échantillon d'un site américain où cette souche est naturellement détectée. L'étude des capacités de dégradation de composés xénobiotiques par ces souches est assez réduite et s'est intéressée principalement à la détection de gènes de dégradation dans les génomes séquencés de telles souches.

Nous avons ensuite étudié les cinétiques de dégradation de l'ETBE ou du MTBE pour chacune des souches isolées. Ces résultats sont présentés dans les figures 4.2 et 4.3, respectivement. Le cas de la dégradation du TBA par *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 est présenté dans la figure 4.4. Le cas particulier de la dégradation de l'ETBE et du MTBE par *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 est présenté dans la figure 4.5.

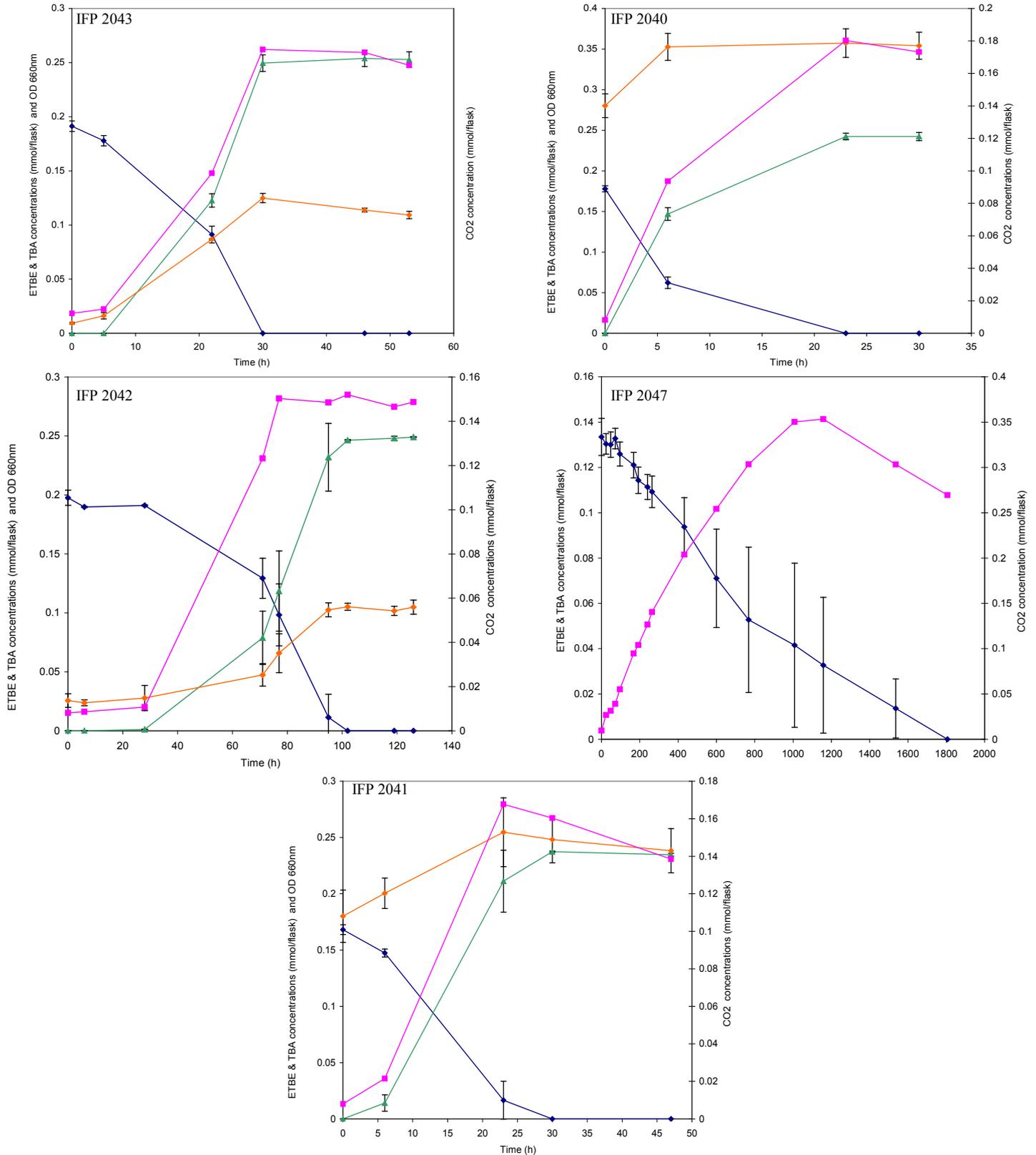


Figure 4.2. Cinétiques de dégradation de l'ETBE par *Rhodococcus* sp. IFP 2040, IFP 2041, IFP 4042 et IFP 2043 et par la souche de *Betaproteobacteria* IFP IFP 2047 isolées à partir des enrichissements ETBE

◆-◆: concentration ETBE ; ■-■: concentration CO₂ ; ▲-▲: concentration TBA ; ◆-◆: DO600nm

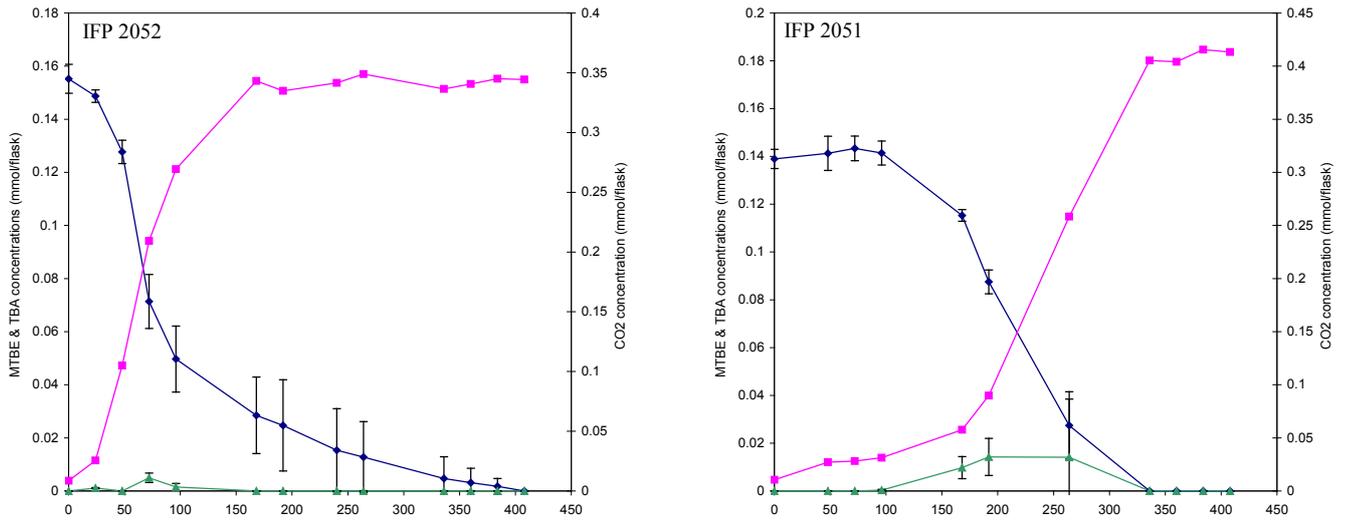


Figure 4.3. Cinétiques de dégradation du MTBE par *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 et par la souche de *Proteobacteria* IFP 2052 isolées à partir des enrichissements sur MTBE
 ◆-◆: concentration MTBE ; ■-■: concentration CO₂ ; ▲-▲: concentration TBA ;

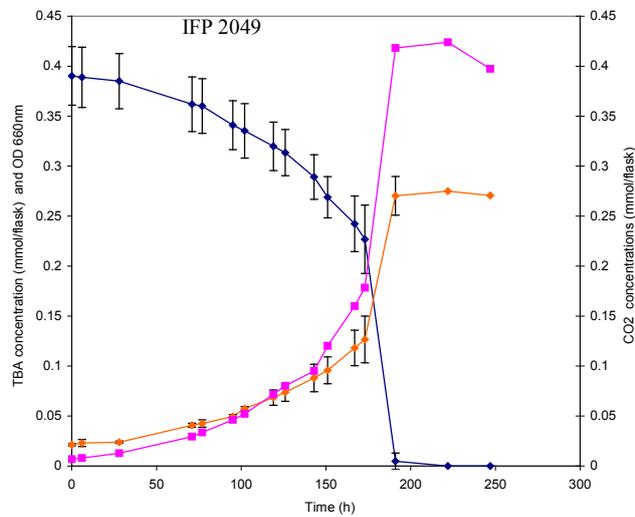


Figure 4.4. Cinétique de dégradation du TBA par *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 isolée à partir de US6-ETBE
 ◆-◆: concentration TBA ; ■-■: concentration CO₂ ; ◆-◆: DO660nm

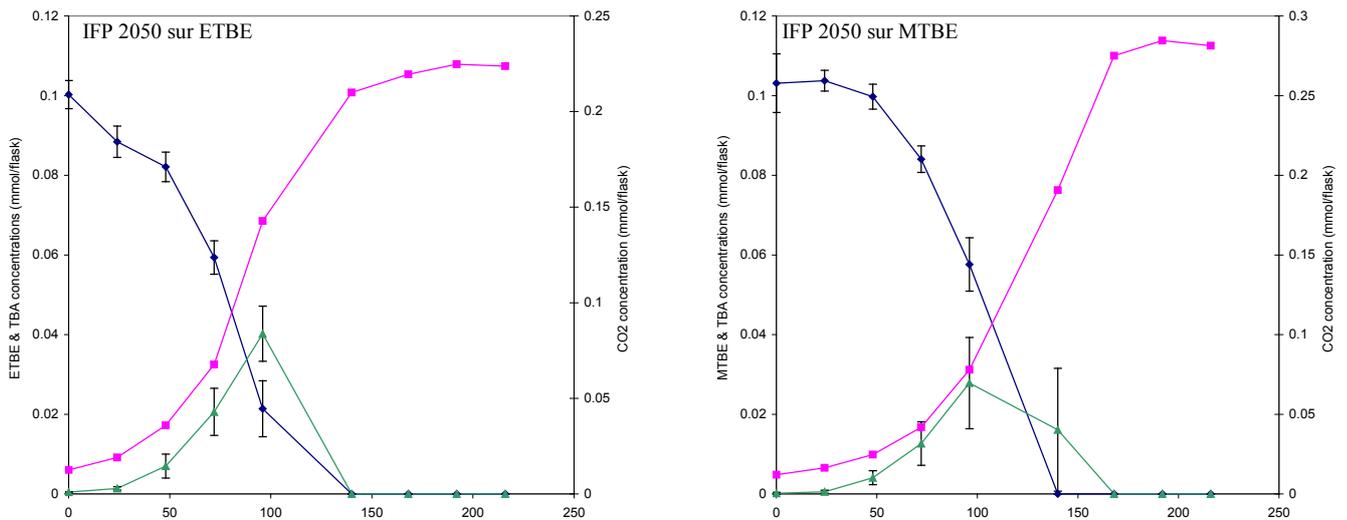


Figure 4.5. Cinétiques de dégradation de l'ETBE et du MTBE par *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 isolée à partir de FR5-ETBE

◆-◆: concentration ETBE/MTBE ; ■-■: concentration CO₂ ; ▲-▲: concentration TBA

Les bilans concernant les durées et vitesses de dégradation sont présentés dans le tableau 4.1. Il n'a pas été possible d'obtenir dans la plupart des cas des mesures de biomasse à l'issue de ces cinétiques de dégradation. Néanmoins dans plusieurs cas nous avons pu suivre l'évolution de la biomasse par mesure de la DO₆₀₀ ce qui n'était pas possible dans l'enrichissement de départ : c'est le cas des quatre souches de *Rhodococcus* sp. IFP 2040, IFP 2041, IFP 2042 et IFP 2047. Néanmoins, on voit que la croissance est faible du fait que la souche ne pousse qu'au dépend de la partie en C2 de la molécule d'ETBE libérée par la coupure de la liaison éther comme cela a été montré précédemment (Malandain et al., 2010) et qu'elle est donc nécessairement limitée.

Dans le cas de la dégradation du TBA par *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049, on voit que la vitesse est lente au début puis s'accélère quand la concentration diminue. Cela pourrait traduire une faible affinité du système enzymatique impliqué pour le TBA.

Du fait que les vitesses de dégradation n'ont pas pu être exprimées dans les mêmes unités, il n'est pas possible de comparer les valeurs obtenues à partir des souches pures (mg de substrat.h⁻¹.L⁻¹) à celles obtenues à partir des enrichissements (mg de substrat.h⁻¹.mg⁻¹ de biomasse). On peut, par contre, comparer les durées nécessaires pour réaliser la biodégradation. Il est ainsi possible de constater pour les deux souches IFP 2051 et IFP 2052, isolées respectivement à partir des enrichissements US3-MTBE et GE1-MTBE, que ces durées coïncident. La comparaison est difficile pour les souches de *Rhodococcus* isolées à partir des enrichissements sur ETBE car elles dégradent l'ETBE jusqu'en TBA et leur "poids relatif" dans les enrichissements est, de ce fait, probablement limité.

D'autres expériences mettant en œuvre la qPCR que nous présenterons plus loin nous permettront de juger pour certaines de ces souches de leur prépondérance dans la population des enrichissements.

IV – 2 – 2. Capacités de dégradation de la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050

Au vu des résultats présentés ci-dessus, la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 présente un intérêt particulier, du fait de sa capacité à dégrader l'ETBE et également le MTBE. Du fait de ces capacités, son utilisation éventuelle dans des opérations de bioremédiation de sites pollués a fait l'objet d'un brevet. Des souches appartenant au même genre et possédant des capacités de dégradation des éthers-carburants ont déjà été décrites : *Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans* K1, dégradant le MTBE, l'ETBE et le *tert*-amyl méthyl éther (TAME) par cométabolisme (Thiemer et al., 2003) après croissance sur tétrahydrofuran (THF), mais ne dégradant ni le TBA, ni le TAA ; et *Pseudonocardia* sp. ENV478 dégradant le MTBE après croissance là aussi sur THF (Vainberg et al., 2006).

Afin de connaître plus en détail le potentiel de cette souche, nous avons déterminé ses capacités de dégradation pour les BTEXs et les *n*-alcane. En outre, un premier essai de cinétique de dégradation sur le composé éther THF a été effectué. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 4.3 et la figure 4.6.

Tableau 4.3. Capacités de dégradation de la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050

Composés	Croissance	Dégradation (%)
ETBE	++	100
MTBE	++	100
TBA	++	100
Benzène	-	0
Toluène	++	100
Ethylbenzène	-	71,0 ± 16,4
<i>m</i> -xylène	-	55,0 ± 5,1
<i>p</i> -xylène	-	58,0 ± 6,5
<i>o</i> -xylène	-	0
Octane	±	44,0 ± 1,8
Hexadécane	-	41,0 ± 1,7

++: croissance ; ±: croissance faible ; -: pas de croissance

Pseudonocardia sp. IFP 2050, outre la capacité à dégrader l'ETBE, le MTBE et le TBA, peut donc également dégrader entièrement le toluène, et partiellement l'éthylbenzène, le *m*- et *p*- xylène, l'octane et l'hexadécane. Seuls le benzène et le *o*-xylène n'ont pas été dégradés du

tout durant les 4 semaines d'incubation. Il faut noter que, dans plusieurs cas (éthylbenzène, *m*-xylène, *p*-xylène, hexadécane, voire octane), quand la dégradation du composé n'est que partielle, la croissance bactérienne observée est inexistante ou très faible. On peut donc supposer qu'il s'agit de cas de cométabolisme. Ce mécanisme de biodégradation est bien connu chez les micro-organismes et a été montré, en particulier, dans le cas de la dégradation des BTEXs (Attaway et Schmidt, 2002 ; Auffret et al., 2009 ; Zhou et al., 2011).

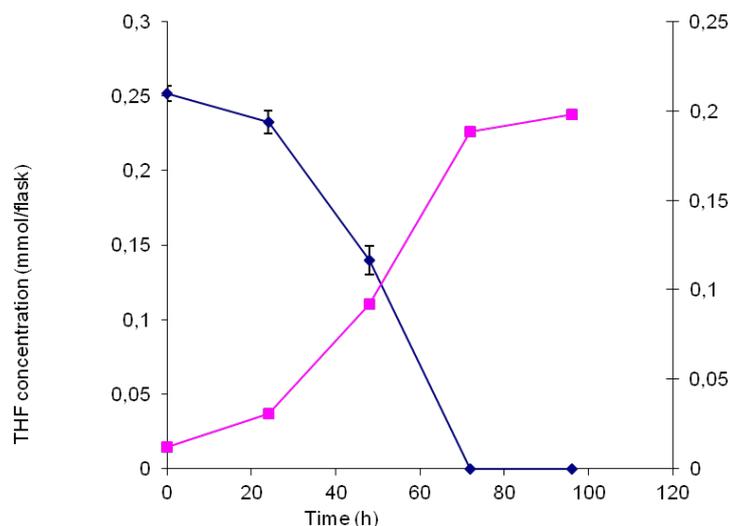


Figure 4.6. Dégradation du THF par *Pseudonocardia* sp. IFP 2050

◆-◆: concentration THF ; ■-■: concentration CO₂

La totalité du THF a été dégradée (concentration initiale d'environ 200 mg.L⁻¹). Néanmoins, ce suivi ne constitue qu'un premier essai de dégradation, et une étude plus précise de la dégradation sera nécessaire. Cependant ce premier essai montre que la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 possède également la capacité à dégrader le THF comme K1 et ENV478.

IV – 2 – 3. Cas de commensalisme dans l'enrichissement US6-ETBE

À partir de l'enrichissement US6-ETBE, deux souches ont pu être isolées : *Rhodococcus* sp. 2042, ainsi que *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049. La première de ces souches peut dégrader l'ETBE jusqu'au TBA, alors que la seconde peut dégrader le TBA entièrement (en biomasse et CO₂).

Nous avons donc étudié la dégradation de l'ETBE en co-culture avec *Rhodococcus* sp. 2042, et *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049. Le résultat est présenté sur la figure 4.7.

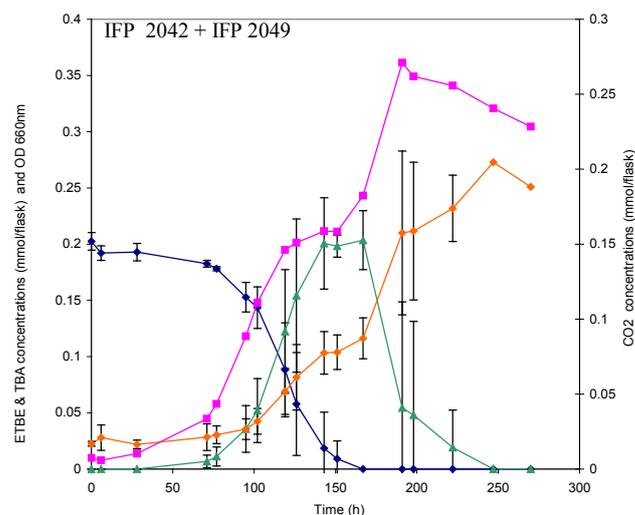


Figure 4.7. Cinétique de dégradation de l'ETBE du mélange des souches *Rhodococcus* sp. IFP 2042 et *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049

◆-◆: concentration ETBE ; ■-■: concentration CO₂ ; ▲-▲: concentration TBA ; ◆-◆: DO600nm

Ce consortium reconstitué de deux souches isolées est capable de dégrader la totalité de l'ETBE en 250 h environ. L'ETBE est dégradé en TBA en environ 170 h puis le TBA est lui-même utilisé comme source de carbone et d'énergie. Contrairement à l'enrichissement d'origine, US6-ETBE, il a été possible de suivre la croissance par mesure de la densité optique. La vitesse maximale de dégradation mesurée est de $2,96 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Il s'agit d'un cas illustrant un autre mécanisme de dégradation de composés xénobiotiques par les micro-organismes : le commensalisme dans lequel deux souches associées entre elles, et présentes dans le même environnement, arrivent à dégrader entièrement un composé à l'aide de leurs enzymes respectives. L'association de micro-organismes présents naturellement dans un même environnement (commensalisme) et permettant la biodégradation de composés xénobiotiques n'a été décrite que dans quelques cas (Rieger et al., 2002, Brune and Bayer, 2012). La dégradation du fenitrothion est ainsi réalisée par *Sphingomonas* sp. et *Burkholderia* sp. (Katsuyama et al., 2009).

Ce cas particulier a fait l'objet d'un article (Le Digabel et al., 2013).

En conclusion à cette partie du travail, nous avons pu isoler à partir des enrichissements étudiés différents micro-organismes. Parmi ceux-ci, plusieurs ne possèdent aucune capacité de dégradation pour l'ETBE, le MTBE ou le TBA. Parmi les souches isolées et qui possèdent ces capacités de dégradation, cinq sont des *Actinobacteria*, et quatre des *Proteobacteria*. Les capacités de dégradation de ces souches sont variables. Les quatre souches de *Rhodococcus* sp. dégradent l'ETBE en TBA avec une faible croissance liée à la consommation du composé en C₂ libéré par la coupure de la liaison éther. Une souche de *Pseudonocardia* avec des capacités intéressantes, aussi bien vis-à-vis de l'ETBE que du MTBE, a pu être obtenue. En ce qui concerne les *Proteobacteria*, une souche apparentée à *A. tertiaricarbonis*, IFP 2047, et capable de dégrader l'ETBE a été isolée de GE1-ETBE ; une souche IFP 2052 apparentée à

Methylibium sp. a été isolée de GE1-MTBE. *Pseuxanthomonas* sp. IFP 2051 capable de dégrader le MTBE a été isolée de US3-MTBE et le rôle d'une telle souche dans la dégradation du MTBE n'avait pas été montré auparavant. Enfin, nous avons pu mettre en évidence un cas de commensalisme à partir de deux micro-organismes isolés d'un même enrichissement, US6-ETBE. Il s'agit de *Rhodococcus* sp. IFP 2042 dégradant l'ETBE en TBA et *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 poussant sur TBA. Le rôle de *Bradyrhizobium* dans la dégradation des éthers-carburants n'avait pas été montré auparavant et cette partie du travail a fait l'objet d'une publication dans la revue internationale "Applied Microbiology and Biotechnology".

IV – 3. Comparaisons de la diversité bactérienne dans les enrichissements ETBE/MTBE

Lors de l'étude des capacités de dégradation des différents enrichissements obtenus sur ETBE et sur MTBE, de réelles différences ont été observées, non seulement en ce qui concerne la dégradation de ces substrats, mais également celles d'autres composés, les BTEXs et des *n*-alcane. De telles différences de capacités de dégradation font supposer que la composition phylogénétique varie au sein de ces enrichissements. Afin d'étudier cette diversité bactérienne, et hormis l'isolement de micro-organismes ayant des capacités de dégradation décrites ci-dessus, des approches d'empreinte moléculaire ont été mises en œuvre afin de comparer les populations obtenues sur un substrat donné. Ces approches sont la RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) et la DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis).

IV – 3 – 1. Étude de la flore bactérienne par RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

Cette technique a permis d'avoir une première image de la diversité bactérienne au sein des enrichissements étudiés. Pour cette analyse et afin d'effectuer le traitement statistique qui suit l'analyse par électrophorèse, il est nécessaire de travailler sur au moins trois groupes de micro-organismes ayant des capacités différentes. Hormis les enrichissements obtenus sur ETBE ou sur MTBE, nous avons donc ajouté à cette étude les enrichissements de même origine obtenus sur TBA (soient, BE1-TBA, GE1-TBA, FR3-TBA, FR5-TBA, FR6-TBA, US2-TBA, US3-TBA et US6-TBA (voir tableau 2.1, Matériel et Méthodes). Après extraction de l'ADN des différents enrichissements et amplification par PCR de la zone IGS 16S-23S de l'ADN, une série d'électrophorèses sur puces à ADN d'Agilent a été réalisée afin de visualiser la totalité des 19 échantillons (enrichis sur ETBE, MTBE et TBA). Le résultat de ces électrophorèses est présenté sur les figures 4.8.1 et 4.8.2.

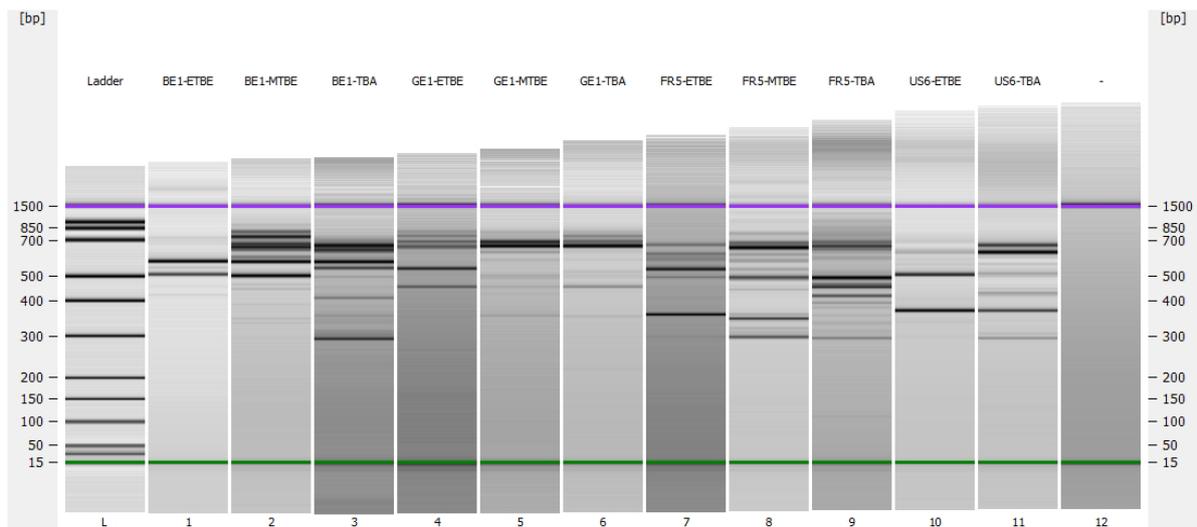


Figure 4.8.1. Résultats RISA sur la première puce Agilent

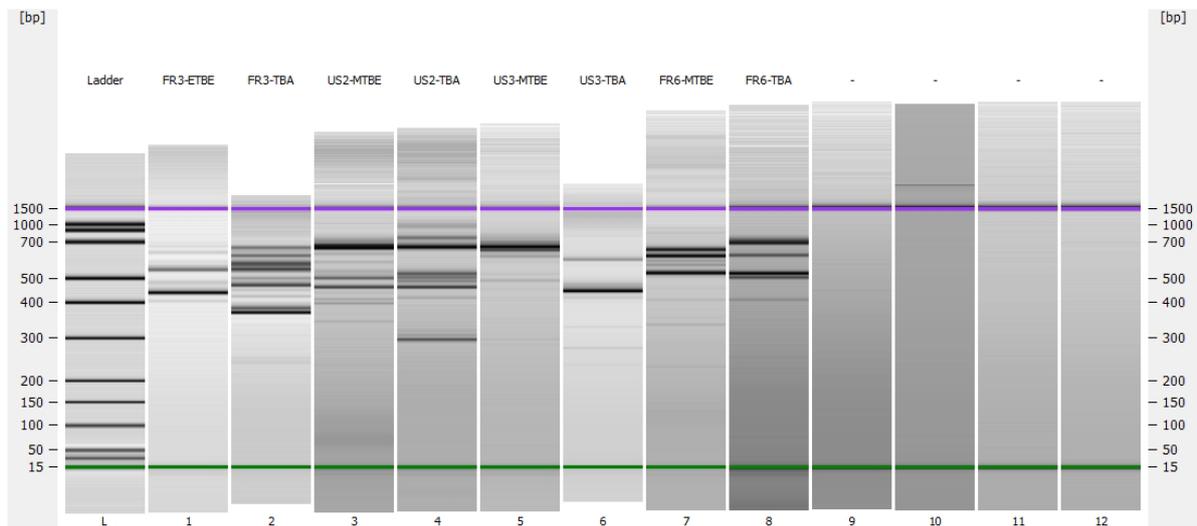


Figure 4.8.2. Résultats RISA sur la seconde puce Agilent

Chaque piste correspond à l'électrophorèse de l'ADN d'un enrichissement donné dont le nom est indiqué au-dessus de la piste.

Les tailles sont calculées par rapport à un standard contenant des fragments d'ADN de tailles connues (Ladder : piste à gauche)

Cette approche via la technique RISA, nous permet, au vu de ces gels, d'avoir une première idée de la biodiversité des enrichissements. En effet, pour chaque échantillon, on observe plusieurs bandes, ce qui implique la présence de micro-organismes différents, particulièrement pour les enrichissements sur TBA, où la biodiversité semble plus importante (nombre de bandes supérieur). La quasi-totalité des bandes se situe entre 300 et 900 pb environ. De plus, plusieurs bandes semblent redondantes d'un échantillon à l'autre, plus ou moins visibles en fonction de l'enrichissement. Afin de compléter ces observations, des analyses statistiques sur la base des tailles des fragments obtenus sur gel Agilent ont été

effectuées grâce au logiciel R. Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée afin d'analyser les données (figure 4.9).

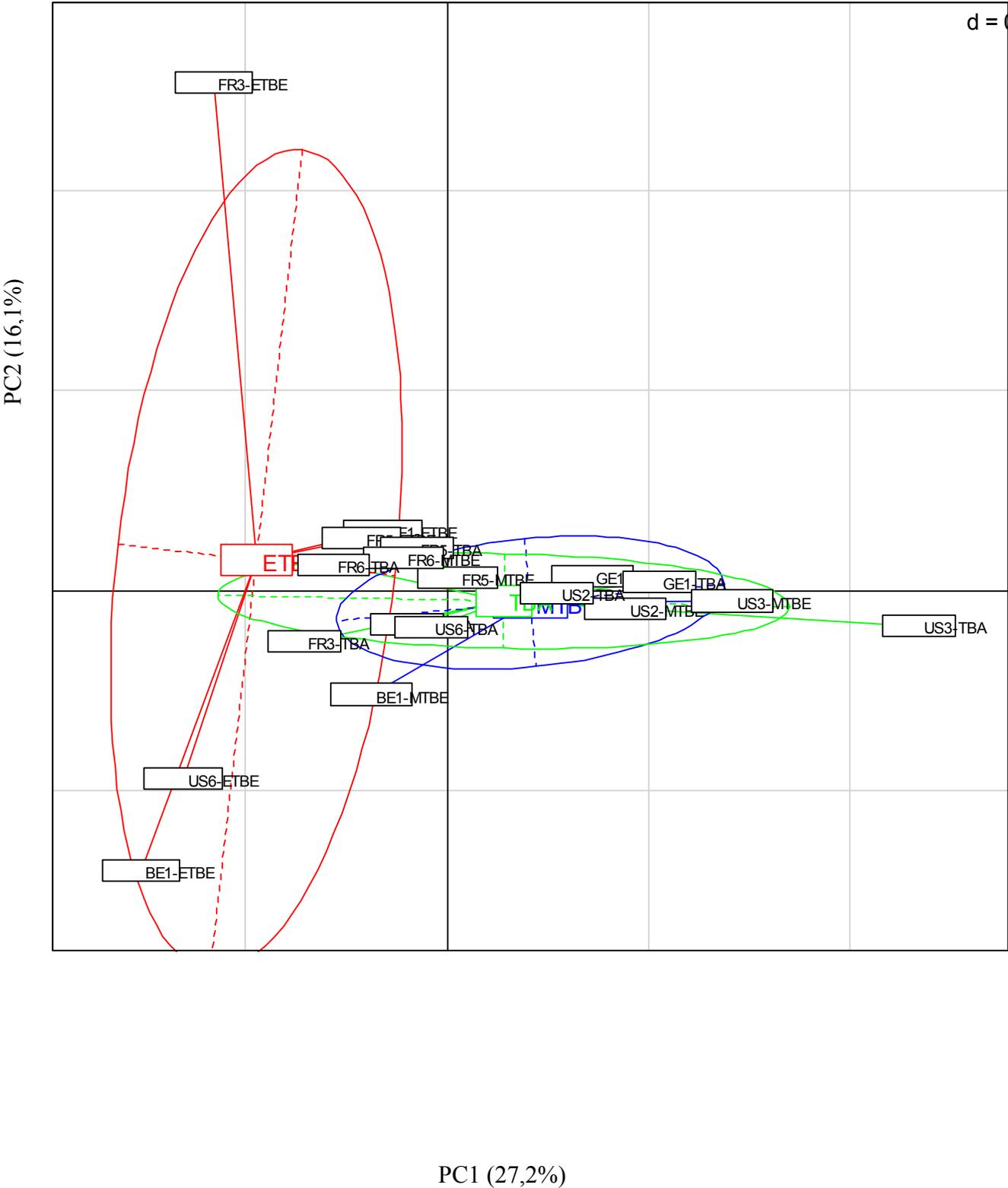


Figure 4.9. ACP réalisée à partir des résultats RISA sur les 19 enrichissements (sur ETBE, MTBE et TBA)

La visualisation des échantillons en fonction du substrat dans l'analyse en composante principale (ACP) des données de RISA montre une forte dispersion concernant les profils microbiens présents dans les enrichissements sur ETBE comparés à ceux obtenus sur TBA ou sur MTBE. Ceci laisse supposer une diversité plus importante, avec des populations de micro-organismes très diverses malgré le même substrat d'enrichissement. Les enrichissements FR3, US6 et BE1 sont particulièrement différents des autres. L'autre point remarquable de cette analyse est le fait que les enrichissements cultivés sur MTBE sont superposés avec ceux sur TBA, ce qui implique que les profils des régions intergéniques des communautés microbiennes des enrichissements obtenus sur MTBE et sur TBA ne sont pas statistiquement différenciables, tout comme les profils des enrichissements obtenus sur ETBE et sur TBA, ou même entre les enrichissements obtenus sur ETBE et sur MTBE, à l'exception des enrichissements FR3, US6 et BE1 sur ETBE qui sont séparés des autres enrichissements à la fois selon le premier axe, mais surtout selon le 2ème axe de l'ACP qui explique 16 % de la variation observée entre les échantillons. Cette analyse confirme que la diversité des micro-organismes présents dans certains enrichissements ETBE (FR3, US6 et BE1) est différente de celle observée pour les enrichissements MTBE. Hormis les micro-organismes utilisant le MTBE comme source de carbone et d'énergie et qui ont par conséquent la capacité de pousser sur TBA - *Hydrogenophaga flava* ENV 735 (Hatzinger et al., 2001), *Aquicola tertiaricarbonis* L108 (Lechner et al., 2007), *Variovorax paradoxus* CL-8 (Zaitsev et al., 2007) et *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 (François et al., 2001) - d'autres micro-organismes capables de pousser uniquement sur TBA ont été isolés comme *A. tertiaricarbonis* I-2152 (Piveteau et al., 2001 ; Rohwerder et al., 2006). Cependant, l'écologie des micro-organismes dégradant le TBA est peu connue (Schmidt et al., 2004). Une autre étude disponible (Aslett et al., 2011) réalisée sur des populations bactériennes présentes dans des bioréacteurs pour la dégradation du TBA couplée à une identification des micro-organismes dégradant le TBA par marquage au ¹³C de leur ADN (¹³C-DNA-stable isotope probing ou SIP) montre en effet que les organismes utilisant le TBA sont des *Betaproteobacteria* appartenant à l'ordre des *Burkholderiales* comme *Methylibium*. Ceci va bien dans le sens du résultat que nous avons obtenu. En fonction de ces résultats, il reste que la nature de la plupart des micro-organismes dégradant le TBA dans les enrichissements réalisés sur ETBE est différente. Nous en avons d'ailleurs eu la preuve en isolant une *Alphaproteobacteria*, *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049, de l'enrichissement US6 cultivé sur ETBE.

Enfin, étant donné que la variation observée dans les échantillons selon les deux premiers axes de l'ACP représente 43 % de l'inertie totale, le substrat utilisé pour réaliser les enrichissements n'est pas le seul facteur influençant la nature des microflores présentes (caractéristiques physico-chimiques des sites d'origine, etc...).