

# Amélioration de la biodégradation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et de nanoparticules de fer encapsulées dans un xérogel de silice

Wissal Wannoussa<sup>1,\*</sup>, Serge Hiligsmann<sup>1</sup>, Ludivine Tasseroul<sup>1,2</sup>, Stéphanie D. Lambert<sup>2</sup>,  
Benoît Heinrichs<sup>2</sup>, Thibaut Masy<sup>1</sup>, Frédéric Weekers<sup>3</sup>, Benoît Lavigne<sup>4</sup>,  
Frank Delvigne<sup>5</sup>, Philippe Jacques<sup>5</sup>, Philippe Thonart<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Département des Sciences de la Vie, B40, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique

<sup>2</sup> Laboratoire de Génie Chimique, B6a, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique

<sup>3</sup> Artechno S.A., rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les Isnes, Belgique

<sup>4</sup> Sanifox SPRL, rue Enhet-Centre 47, B-5590 Chevetogne, Belgique

<sup>5</sup> Unité de Bio-industries, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgique

**\*Auteur Correspondant : Tel : +32/4366.28.61; Fax : +32/4366.28.62.  
E-mail : wissal.wannoussa@doct.ulg.ac.be, s.hiligsmann@ulg.ac.be**

## RÉSUMÉ

Dans ce travail, l'effet de particules d'oxyde de fer Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et de nanoparticules de fer encapsulées dans des particules poreuses de silice (xérogel Fe/SiO<sub>2</sub>) a été étudié sur la biodégradation du biphényle par la souche *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Les pourcentages de biodégradation après 18 jours d'incubation en présence du xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> à 10<sup>-5</sup> M en fer atteignent 75 % et 85 % respectivement pour les conditions sans ou après autoclavage ; c'est-à-dire 42 et 60 % de dégradation supplémentaire par rapport aux conditions standards sans xérogel Fe/SiO<sub>2</sub>. L'impact dû à l'autoclavage serait directement associé à la libération d'une certaine quantité de fer moins bien ancré dans la matrice de silice. Cette étude a jeté la lumière sur la liaison entre la sécrétion de sidérophores par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 et la présence de nanoparticules de fer dans le milieu de culture. Elle suggère une diminution de la sécrétion de sidérophores avec l'augmentation de la quantité d'ions ferriques mobilisés à partir du xérogel Fe/SiO<sub>2</sub>. Finalement, la majorité des surfactants glycolipidiques contenant du trehalose (hexose) produits par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 sont liés à la surface de la cellule et ne sont pas excrétés dans le milieu de culture ; leur concentration a augmenté de 85 % en présence de nanoparticules de fer.

**MOTS-CLÉS :** fer, nanoparticules, biphényle, surfactants, sidérophores

## ABSTRACT

In this work, the effect of iron oxide particles Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and iron nanoparticles encapsulated in a porous silica matrix (xerogel Fe/SiO<sub>2</sub>) was investigated on biphenyl biodegradation by the strain *Rhodococcus erythropolis* T902.1. After 18 days of incubation biodegradation yields of 75% and 85% were achieved respectively in presence of non-autoclaved or autoclaved xerogel Fe/SiO<sub>2</sub> at 10<sup>-5</sup> M iron. These results are 42 and 60% higher than in standard conditions without nanoparticles. They suggest that the autoclave procedure lead to the release of some iron less anchored in the silica matrix. This study highlights that siderophore production by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 would be related to the presence of iron nanoparticles in the culture. It suggests that the production of these strong chelating compounds decreases with increase of iron release from xerogel Fe/SiO<sub>2</sub>. Moreover, most of the surfactants synthesized by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 which are glycolipids containing trehalose (hexose), would be linked to cell surface and not excreted in the culture medium; the biomass hexose content also increased by 85% in presence of iron nanoparticles.

**KEYWORDS :** iron, nanoparticles, biphenyl, surfactant, siderophore

## Amélioration de la biodégradation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et de nanoparticules de fer encapsulées dans un xérogel de silice

Wissal Wannoussa, Serge Hiligsmann, Ludivine Tasseroul, Stéphanie D. Lambert,  
Benoît Heinrichs, Thibaut Masy, Frédéric Weekers, Benoît Lavigne,  
Frank Delvigne, Philippe Jacques, Philippe Thonart

### I. Introduction

Les activités humaines sont à l'origine de nombreuses pollutions par hydrocarbures aromatiques ou polycycliques

(HAP) tels que le pyrène, anthracène et biphényle. Il s'agit le plus souvent de pollutions générées de longue date par exemple par l'industrie pétrochimique, les zones de dépôts de bus, l'usage domestique d'hydrocarbures (cuve à mazout), etc. Ce sont aussi des pollutions ponctuelles générées via des rejets accidentels, marées noires, catastrophes terrestres, etc. Afin de préserver la santé humaine et l'environnement, ces polluants (HAP) doivent être éliminés car ils sont toxiques et cancérigènes. En effet, ils s'accumulent dans l'environnement (sols, sédiments, eaux souterraines et atmosphère) où ils comptent parmi les composés les plus récalcitrants et peuvent entrer dans la chaîne alimentaire.

Diverses technologies de traitement ont été développées pour faire face à ces pollutions. Ce sont principalement des procédés physiques ou chimiques (Lebkowska *et al.*, 2011). Plus récemment, les techniques de bioremédiation sont apparues et sont aujourd'hui considérées comme une réelle alternative aux techniques classiques. Elles sont basées sur l'utilisation de différents types de microorganismes, de nutriments adéquats et parfois d'adjuvants pour décontaminer les zones polluées. La bioremédiation présente des avantages non négligeables au niveau : (i) de la diversité des molécules dégradables, (ii) de l'efficacité du traitement sans accroissement important des coûts (Boopathy, 2000). Les principales souches de bactéries aérobies étudiées dans cette optique font partie du genre *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* ou *Burkholderia* (Rehmann et Daugulis, 2006 ; Nicolau *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2010). Les mécanismes biologiques de dégradation sont similaires, que ce soit pour les différentes souches bactériennes aérobies ou pour les différents HAP. Les voies les plus représentées mettent en œuvre des enzymes dioxygénases et déhydrogénases menant à la formation du catéchol qui est oxydé complètement par la suite (Rehmann et Daugulis, 2006). La biotransformation de ces polluants peut aussi s'effectuer en milieu anaérobie par des populations mixtes endogènes issues de sites pollués ou sélectionnées à partir de ces écosystèmes particuliers (Levén *et al.*, 2012).

Le genre *Rhodococcus* a la capacité de métaboliser différents hydrocarbures : aliphatiques, aromatiques, sulfurés ou encore halogénés (Cerniglia, 1992 ; Aldric, 2009). Les travaux menés dans notre laboratoire se sont focalisés sur une souche de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 isolée à partir d'un sol pollué

et particulièrement résistante à la dessiccation (Weekers *et al.*, 1999). Dans le cadre de ce travail (résultats non publiés), on a observé que sa capacité de dégrader les hydrocarbures aromatiques biphényle, naphthalène, phénanthrène et pyrène diminue avec l'augmentation du nombre de cycles : taux de biodégradation de ces composés de 53 %, 54 %, 32 % et 15 % respectivement en 18 jours. Il en est de même selon Cerniglia (1992) pour les HAP de haut poids moléculaire dont le nombre de noyaux aromatiques est supérieur ou égal à 4. Cela résulte notamment des caractéristiques physicochimiques qui rendent ces composés relativement peu solubles dans les milieux aqueux où se développent les microorganismes : la solubilité diminuant avec l'augmentation de masse molaire de 7.48 mg/L à 0.16 mg/L par exemple pour le biphényle et le pyrène dans l'eau à 25°C (Bouchez *et al.*, 1995).

Le biphényle a toutefois été choisi comme modèle pour nos travaux (Wannoussa *et al.*, 2015a, b) en raison de sa moindre toxicité pour les expérimentations. Ces résultats antérieurs ont indiqué que le biphényle est partiellement métabolisé par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 ; deux métabolites intermédiaires ont été identifiés. Le catéchol apparaît dans la culture pendant la phase de croissance et disparaît pendant la phase stationnaire. En revanche, une production progressive d'acide benzoïque a été observée au cours de la biodégradation du biphényle. En outre, le biphényle est encore régulièrement utilisé à l'heure actuelle dans certains pays comme matière de base pour la synthèse de composés polychlorobiphényles (PCB), comme additifs dans certaines formulations des pesticides, etc. Il est aussi un des produits de la dégradation et/ou déchloration de ces composés hautement toxiques et récalcitrants présents dans certains sols depuis de nombreuses années (Van Doesburg *et al.*, 2005, Gramaglia et Babut 2014).

La bioremédiation est cependant un procédé de dégradation assez lent, ce qui nécessite encore de nombreuses investigations en vue d'améliorer les performances des microorganismes

impliqués. La présence d'éléments métalliques de palladium, nickel, cobalt ou fer en faible concentration est reconnue depuis plusieurs années pour accélérer les réactions de biodégradation (Chorao, 2008 ; Bunesco *et al.*, 2008 ; Murugesan *et al.*, 2011). De nombreuses études ont porté sur la biodégradation des polluants en présence de fer sous différentes formes : sels, complexes, nanoparticules (Bunesco *et al.*, 2008, Chorao, 2008 ; Santos *et al.*, 2008 ; Ansari *et al.*, 2008 ; Aldric, 2009). Ansari *et al.* (2008) ont démontré l'impact positif de la présence de nanoparticules de magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sur la cinétique de désulfuration de dibenzothiophène par *Rhodococcus erythropolis* IGST8 en augmentant la perméabilité de la membrane vis-à-vis du polluant et des produits de la réaction. Chorao (2008) a étudié la biodégradation du 2-aminobenzothiazole par *Rhodococcus rhodochrous* en présence de différents complexes organiques de fer ( $10^{-3}$  M) : nitrilotriacétate de fer (FeNTA), éthylène diamine dissuccinate de fer (FeEDDS) et citrate de fer. Le complexe avec l'acide nitrilotriacétique (NTA) par exemple, ayant une constante de complexation élevée ( $\log K = 15.9$ ) conférant à l'élément une stabilité et solubilité élevées dans une large gamme de pH où les bactéries sont actives, conduit à une augmentation importante de la cinétique de biodégradation.

La biodisponibilité des substrats HAP est également un facteur essentiel qui a un impact non négligeable sur l'efficacité des procédés de biodégradation (Doyle *et al.*, 2008). Les microorganismes ont ainsi développé des mécanismes pour augmenter la solubilité des polluants hydrophobes ou pour améliorer les interactions substrat-microorganisme. En effet, certaines cellules microbiennes sont capables de s'adsorber aux polluants hydrophobes grâce à leur paroi hydrophobe (MacLeod *et al.*, 2005) ou ont la capacité de produire des surfactants ayant la propriété d'augmenter la solubilité des composés hydrophobes afin de faciliter leur biotransformation dans le milieu aqueux (Zhang *et al.*, 1997 ; Lang et Philp, 1998 ; Cameotra et Bollag, 2003). Zhang *et al.* (1997) ont par exemple montré que la solubilité du phénanthrène dans le milieu de culture pouvait être accrue de 0.7 à 35 mg/L en présence des surfactants synthétisés par *Pseudomonas*. D'autres études ont par ailleurs montré que la production bactérienne de surfactants peut être améliorée en présence d'éléments tels que le fer à des concentrations relativement faibles de l'ordre de  $10^{-4}$  M en  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ou  $\text{FeSO}_4$  (Santos *et al.*, 2008).

En cas de carence en ions métalliques essentiels pour la formation de certains cofacteurs, enzymes, ... les bactéries sont également capables de sécréter des sidérophores, des petites molécules entre 200 et 2000 Da de poids moléculaire, permettant d'augmenter l'accessibilité du fer ferrique au sein du milieu de culture (Pierre *et al.*, 2002 ; Kraemer, 2003 ; Bosello *et al.*, 2013). L'ajout d'éléments métalliques sous différentes

formes (sels, complexes, nanoparticules) pour améliorer la cinétique des réactions de biodégradation pose cependant trois problèmes majeurs au niveau (i) de la séparation de ces adjuvants/catalyseurs des produits finaux (par exemple en traitement d'eau) ; (ii) du recyclage de ces composés et (iii) du pH du milieu réactionnel étant donné son impact majeur sur la solubilité des métaux.

Pour limiter ces inconvénients, les catalyseurs métalliques peuvent être dispersés sur un support inerte et poreux de type  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$  offrant une surface spécifique suffisamment importante pour assurer une bonne dispersion des métaux sous forme de particules de taille nanométrique. Parmi les procédures envisageables dans ce sens, la cogélification sol-gel semble très prometteuse (Lambert *et al.*, 2004 ; Heinrichs *et al.*, 2008). Elle a déjà conduit à des résultats fort intéressants dans le cas de la production de biohydrogène par des bactéries du genre *Clostridium* (Beckers *et al.*, 2011). Cette procédure bien maîtrisée et développée par le laboratoire de Génie Chimique - Génie Catalytique (LGC) a été mise en œuvre pour encapsuler des nanoparticules (2 à 3 nm) de différents métaux au sein d'une matrice de silice (particules de 10 à 20 nm de diamètre parcourues par des pores de 0,6 à 0,8 nm de diamètre). L'encapsulation assure ainsi la stabilité de la réactivité du catalyseur (absence d'agglomération, de relargage....) et limite donc leur apport aux quantités les plus faibles (inférieures aux seuils environnementaux). Mahy *et al.* (2014) ont évalué le relargage de fer à partir de nanoparticules de fer encapsulées dans des particules de silice : la concentration en fer dans l'eau milliQ augmente durant les 7 premiers jours d'incubation puis se stabilise à environ 0.4 % de la concentration initiale encapsulée. Ils ont supposé qu'une partie du fer était moins ancrée dans la matrice, probablement les nanoparticules les plus proches de la surface du support poreux.

Nos travaux précédents (Wannoussa *et al.*, 2015 a,b) n'ont pas observé une dégradation abiotique du biphenyle en présence de xérogel ( $\text{Fe}/\text{SiO}_2$ ) ou du xérogel seul ( $\text{SiO}_2$ ). En outre, celui-ci n'apporte aucune toxicité :  $55 \pm 0.4$  % de biodégradation du biphenyle contre  $53 \pm 2.1$  % en absence de silice. De plus, ils ont permis de classer les xérogels métalliques renfermant des nanoparticules en deux catégories opposées : (i) les nanoparticules telles que l'argent et le cuivre ayant un impact inhibiteur sur *Rhodococcus erythropolis* T902.1 et (ii) les nanoparticules activant la biodégradation dont le fer, le cobalt et le palladium. En outre, cet impact positif augmente avec la concentration des nanoparticules testées : le pourcentage de biodégradation passe de  $75 \pm 6.3$  % en présence de  $10^{-6}$  M en fer à  $90 \pm 3.5$  % en présence de  $10^{-4}$  M après 18 jours d'incubation dans un milieu de culture relativement pauvre (milieu 284) contenant comme seul substrat carboné 500 ppm de biphenyle (Wannoussa *et al.*, 2015 a). Ces travaux

montrent aussi que la présence de nanoparticules de fer ou cobalt stimule l'activité des enzymes biphényle dioxygénase et 1,2- catéchol dioxygénase qui sont susceptibles d'être impliquées dans la biodégradation du biphényle.

La compréhension des mécanismes améliorant la biodégradation du biphényle en présence de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> reste cependant limitée. Des questionnements subsistent au niveau des quantités de métal mobilisables par les bactéries ou directement relarguées suite à l'autoclavage du milieu de culture (121 °C ; 1.02 bar) et leur impact direct sur la croissance et/ou le métabolisme de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 via la production de biosurfactants et de sidérophores.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Préparation des suspensions concentrées en fer

La synthèse par le procédé sol-gel des particules de SiO<sub>2</sub> (xérogel) ou de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> renfermant des nanoparticules de fer a été réalisée selon un mode opératoire semblable à celui décrit par Mahy *et al.* (2014). Les nanoparticules de fer au sein du xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> étant présentes sous la forme d'oxyde Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, certains essais comparatifs ont également été réalisés avec le sel de fer Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Des suspensions de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> (xérogel fer-silice contenant 1.5 % de Fe) ou Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, concentrées à 10<sup>-3</sup> M en fer, ont été préparées par dispersion de 0.187 g et 0.008 g respectivement dans 50 mL d'eau milliQ.

Une suspension de xérogel appauvri (xérogel Fe/SiO<sub>2</sub><sup>\*</sup>) a été constituée après neuf répétitions de trois étapes successives d'incubation (3 à 5 j à 30°C, 140 rpm), centrifugation (13000 rpm) et remise en suspension du culot dans l'eau milliQ. Une période totale de 36 jours a été couverte en vue d'épuiser les nanoparticules relargables dans le sens mis en évidence par Mahy *et al.* (2014).

Lors des expériences sans traitement par autoclavage le xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> ou particules de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ont été stérilisées par lavages successifs dans trois solutions de SDS 5 % (5 fois), sodium hypochlorite 4 % (5 fois) et enfin l'éthanol à 90 % dans l'eau (7 fois).

### 2.2 Cultures

La préparation des cultures en fioles de 100 mL contenant 20 mL de milieu 284 stérile à pH neutre est décrite ailleurs (Wanoussa *et al.*, 2015a). Le sel Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou le xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> est ajouté au milieu à partir de la suspension concentrée à 10<sup>-3</sup> M en fer (décrite dans la section 2.1.) pour obtenir la concentration finale en fer de 10<sup>-5</sup> M.

La production de sidérophores par les microorganismes a été mise en évidence sur milieu gélosé contenant 30 mg de chrome azuro

S (CAS) et 36 mg de HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide) selon la méthode de Verma *et al.* (2012). Les boîtes de Petri sont ensemencées par le dépôt de 100 µL de culture (DO<sub>600 nm</sub> 0.5) dans un puits central réalisé dans la gélose et incubées à 30°C pendant 7 jours.

### 2.3 Techniques analytiques

Le méthode de dosage des hydrocarbures par HPLC après extraction dans l'hexane est décrite ailleurs (Wanoussa *et al.*, 2015 a). Le tréhalose est dosé à 490 nm selon la méthode de Dubois *et al.* (1956) (décrite dans Aldric, 2009). La méthode qualitative d'Iyer *et al.* (2006) a été appliquée pour mettre en évidence une zone d'émulsification associée à des surfactants à l'interface entre le milieu de culture et différents solvants organiques ajoutés (hexane, pentane et paraffine).

## 3. Résultats et discussion

### 3.1 Biodégradation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* t902.1 en présence du xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> et Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

En vue de tester l'impact potentiel sur la microbiologie du fer libéré lors de l'autoclavage du xérogel Fe/SiO<sub>2</sub>, des cultures de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 sur substrat biphényle ont été mises en oeuvre en présence de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> M en fer) autoclavé et non-autoclavé. Ce dernier a été préparé à partir de la suspension concentrée de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> et stérilisée par contact avec trois solutions désinfectantes successives (Section 2.1). A des fins de comparaison, la même procédure a été appliquée (i) à des particules de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et (ii) au xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> non-autoclavé et autoclavé (xérogel Fe/SiO<sub>2</sub><sup>\*</sup>) préparés à partir des culots récupérés après 36 j d'incubation du xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> dans l'eau milliQ (Section 2.1). Dans ces conditions, la quantité de fer soluble initiale de 1.1 × 10<sup>-5</sup> M ou 9.7 × 10<sup>-6</sup> M respectivement après autoclavage ou non a été réduite à moins de 10<sup>-6</sup> M. Les résultats (Tableau 1) montrent que le taux de biodégradation du biphényle est plus important en présence de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> autoclavé ou non (85 % et 75 %) que dans les témoins sans fer ajouté (53 %). Les résultats sont intermédiaires pour les cultures en présence des xérogels Fe/SiO<sub>2</sub><sup>\*</sup> appauvris en fer et encore moindres en présence de particules de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> autoclavées ou non. Bien qu'une certaine libération naturelle de fer et l'autoclavage aient apporté un certain biais dans les expérimentations, ces résultats confirment l'intérêt des nanoparticules de fer encapsulées dans une matrice poreuse de type silice (xérogel Fe/SiO<sub>2</sub>) pour améliorer la biodégradation des PAH. Ils sont également en accord avec la littérature (Zhang, 2003 ; Ansari *et al.*, 2008). En outre, Santos *et al.* (2008) ont montré que la croissance de la biomasse de *Pseudomonas* sp en présence de 250 ppm d'antracène comme seule source de carbone et d'énergie augmente avec l'augmentation de la solubilité du fer

**Tableau 1. Pourcentages de biodégradation du biphényle après 18 jours d'incubation de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> M en fer), xérogel Fe/SiO<sub>2</sub>\* (10<sup>-5</sup> M en fer initial et appauvri par 36 jours d'incubation abiotique préalable) et Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, autoclavés ou non (trois désinfectants successifs)**

Conditions expérimentales	% de biphényle dégradé après 18 jours d'expérience
Témoin	53 % ±0,4
Fe/SiO <sub>2</sub> autoclavé	85 % ±5,2
Fe/SiO <sub>2</sub> non-autoclavé	75 % ±0,8
Fe/SiO <sub>2</sub> * autoclavé	70 % ±0,8
Fe/SiO <sub>2</sub> * non-autoclavé	65 % ±1,6
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> autoclavé	67 % ±0,9
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> non-autoclavé	62 % ±5,9

dans le milieu de culture : augmentation de 2 unités Log du nombre de cellules par mL en présence de 10<sup>-4</sup> M de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

Ces résultats ne permettent cependant pas d'expliquer les mécanismes par lesquels la souche de *Rhodococcus* a pu améliorer ses performances en présence de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> par rapport aux conditions standards. En effet, on peut imaginer que, vu ses caractéristiques morphologiques, la matrice de SiO<sub>2</sub> a un rôle de cage d'où les nanoparticules de fer ne peuvent sortir facilement dans des conditions environnementales habituelles et où les bactéries ne peuvent entrer.

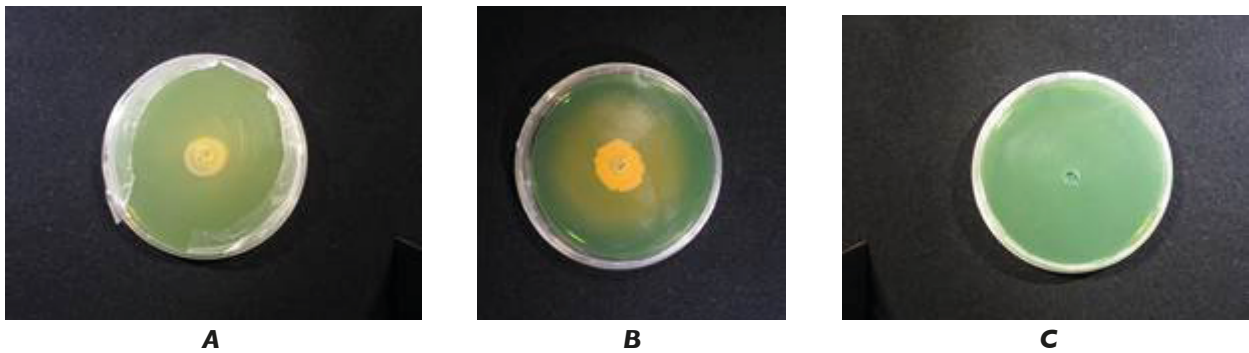
### 3.2 Mise en évidence de la production de sidérophores sur milieu gélosé cas

Afin de mettre en évidence la production de sidérophores par *Rhodococcus erythropolis* T902.1, des échantillons de cultures liquides ont été transférés sur milieu gélosé contenant du chrome azuroil S (CAS). La modification de couleur du milieu, du vert au jaune-orangé, témoigne du déplacement du fer par les sidérophores produits par la souche (Figure. 1). Les zones circulaires ou halos formés à partir du dépôt de la culture (DO600nm 0.5) incubée en présence de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> à 10<sup>-4</sup> M en fer et 500 ppm de biphényle ont été caractérisés. Les diamètres moyens des halos formés au départ du culot remis en suspension après 3, 8 et 20 jours d'incubation sont similaires (16±2 à 19.6±2 mm) pour les différents temps d'incubation en absence de nanoparticules de fer. Par contre, les diamètres des halos relatifs aux cultures incubées pendant 3 et 8 jours en présence du xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> sont significativement différents (47±4 et 32±3 mm respectivement) mettant en évidence des concentrations supérieures en sidérophores par rapport

aux autres conditions de culture. Par conséquent, la sécrétion de ces puissants chélatants serait davantage effective dans les premiers jours de culture, correspondant par ailleurs aux plus grands taux de dégradation du biphényle et de croissance de la population microbienne de *Rhodococcus erythropolis* T902.1. La présence de nanoparticules au sein du xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> activerait ainsi la surproduction de sidérophores utiles à la mobilisation du fer.

### 3.3 Mise en évidence de la production de surfactants

L'impact direct du fer issu des nanoparticules sur la production de biosurfactants par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 a également été investigué. La souche est en effet capable de produire des exopolysaccharides (Aldric, 2009) qui pourraient favoriser la solubilisation des hydrocarbures ou leur adhésion à la surface de la bactérie. Les biosurfactants produits par les souches du genre *Rhodococcus* sont des glycolipides contenant du tréhalose (hexose), lequel peut être synthétisé soit par voie directe soit par réversion de la glycolyse (Lang et Philip, 1998). Ce composé est également important pour la bactérie en tant que réserve en carbone. Deux tests ont été appliqués en vue de confirmer la présence de ces surfactants (glycolipides) chez *Rhodococcus erythropolis* T902.1 et en particulier à la surface des cellules : il s'agit (i) du dosage des hexoses (tréhalose) et (ii) du test de la propriété émulsifiante. Les résultats d'une analyse des trehaloses montrent une teneur en hexoses 85 % plus élevée dans la biomasse cellulaire produite en présence de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> par rapport aux conditions sans xérogel Fe/SiO<sub>2</sub>. En outre, ils ne sont pas présents dans les surnageants de culture. Ceci est en accord avec les résultats de la deuxième

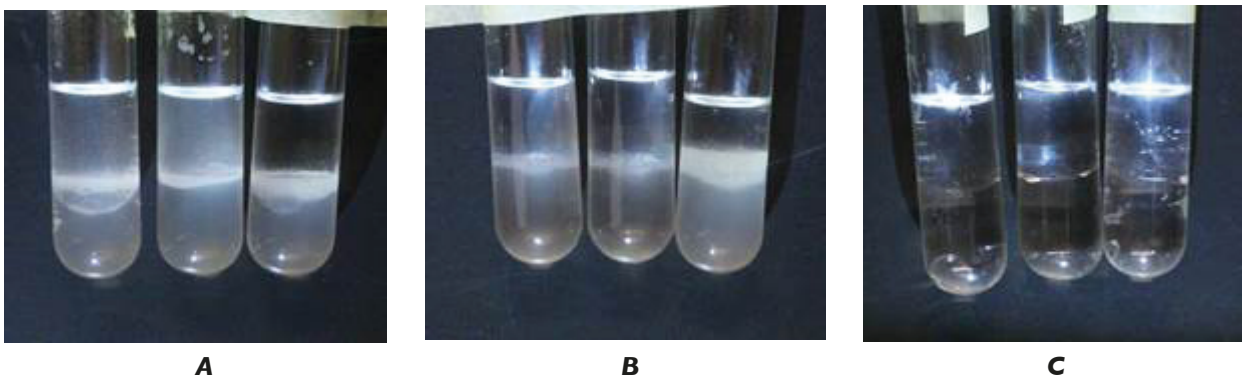


**Figure 1. Mise en évidence sur milieu gélosé (CAS) de la sécrétion de sidérophores par *Rhodococcus erythropolis* T902.1** : inoculum issu d'une culture de 3 jours d'incubation à 30 °C sans (A) ou en présence (B) de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> à 10<sup>-4</sup> M en fer ou absence d'inoculum (C).

expérience dans laquelle le culot de la culture, remis en suspension dans un même volume d'eau après centrifugation, ou le surnageant a été mélangé avec différents solvants organiques. La mise en évidence d'une zone d'émulsification à l'interface eau/solvant organique donne une indication sur la production de biosurfactants par la bactérie. La propriété émulsifiante est clairement visible (Figure 2) en présence des cellules microbiennes (culot remis en suspension), avec ou sans nanoparticules de fer, mais absente dans le cas des surnageants. Ces résultats sont cohérents avec les études de Lang et Philip (1998) et Choroa (2008). Notons que les travaux n'ont pas cherché à distinguer l'éventuel impact direct de la présence des nanoparticules sur la production des biosurfactants de l'impact indirect connu via l'accroissement de la concentration cellulaire.

## 4. Conclusion

Notre étude a montré l'impact important que pouvait avoir le fer sous forme de nanoparticules sur l'activation de la biodégradation du biphenyle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Les pourcentages de biodégradation après 18 jours d'incubation en présence du xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> à 10<sup>-5</sup> M en fer atteignent 75 % et 85 % respectivement pour les conditions sans ou après autoclavage ; c'est-à-dire 42 et 60 % de dégradation supplémentaire par rapport aux conditions standards sans nanoparticules. L'impact dû à l'autoclavage serait en partie associé à la libération d'une certaine quantité de fer moins bien ancré dans la matrice de silice. Cette étude a toutefois jeté la lumière sur la liaison entre la sécrétion de sidérophores par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 et la présence de nanoparticules de fer dans le milieu de culture. Elle suggère une diminution de production de sidérophores avec l'augmentation de la libération d'ions ferriques au départ des nanoparticules encapsulées dans le xérogel Fe/SiO<sub>2</sub>. Ces résultats confirment l'intérêt des nanoparticules de fer encapsulées dans une matrice de silice pour améliorer la biodégradation des PAH.



**Figure 2. Tests d'émulsion à l'interface eau/hydrocarbure en présence du culot (remis en suspension dans l'eau déminéralisée) de bactéries incubées sans (A) ou en présence de xérogel Fe/SiO<sub>2</sub> à 10<sup>-4</sup> M en fer (B) ou du surnageant (C) de culture (hydrocarbure de gauche à droite : paraffine ; hexane ; pentane).**

## Références bibliographiques

- Aldric JM. Mise au point d'un réacteur biphasique eau/huile de silicone destiné au traitement des composés organiques volatils hydrophobes au sein des effluents gazeux. Thèse de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique, 2009, 292 p.
- Ansari F., Grigoriev P., Libor S., Tothill IE. & Ramsden JJ. (2008) DBT degradation enhancement by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGST8 with magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Biotechnology & Bioengineering*, **102**, 1505-1512.
- Beckers L., Hiligsmann S., Lambert S., Heinrichs B. & Thonart P. (2013). Improving effect of metal and oxide nanoparticles encapsulated in porous silica on fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology*, **133C**, 109-117
- Boopathy R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, **75**, 63-67.
- Bosello M., Zeyadi M., Kraas Fl., Linne U., Xie X. & Marahiel MA. (2013) Structural characterization of the heterobactin siderophores from *Rhodococcus erythropolis* PR4 and elucidation of their biosynthetic machinery. *Journal of Natural Products*, **76**, 2282-2290.
- Bouchez M., Blanchet D. & Vandecasteele JP. (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **43**, 156-164.
- Bunescu A., Besse-Hoggan P., Sancelme M., Mailhot G. & Delort AM. (2008) Comparison of microbial and photochemical processes and their combination for degradation of 2-aminobenzothiazole. *Applied Environmental Microbiology*, **74**, 2976-2984.
- Cameotra SS. & Bollag J-M. (2003) Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Critical Review in Environmental Science & Technology*, **30**, 111-126.
- Cerniglia C. (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, **3**, 351-368.
- Chorao C. (2008) Etude du métabolisme de *Rhodococcus rhodochrous* lors de la photobiodégradation du 2-aminobenzothiazol : effet de l'immobilisation des cellules et rôle du fer. Thèse de l'université Blaise Pascal, (Clermont-Ferrand), France, 218 p. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00731145>. Accessed 12 September 2012
- Doyle E., Muckian L., Hickey AM. & Clipson N. (2008) Microbial PAH degradation. *Advances in Applied Microbiology*, **65**, 27-66.
- Gramaglia C. & Babut M. (2014) L'expertise à l'épreuve d'une controverse environnementale et sanitaire : la production des savoirs et des ignorances à propos des PCB du Rhône (France). *Revue électronique en sciences de l'environnement* Vol, 14, N 2
- Heinrichs B., Rebbouh L., Geus JW., Lambert S., Abbenhuis HCL., Grandjean F., Long GJ., Pirard J-P. & van Santen RA. (2008) Iron (III) species dispersed in porous silica through sol-gel chemistry. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **354**, 665-672.
- Iyer A., Kalpana M. & Jha B. (2006) Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme & Microbiology Technology*, **38**, 200-222.
- Kim SJ., Kweon O. & Cerniglia CE. (2010) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Mycobacterium* Strains. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* pp, 1865-1879.
- Kraemer SM. (2003) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Journal of Aquatic Science*, **66**, 3-18.
- Lambert S., Cellier C., Grange P., Pirard J-P. & Heinrichs B. (2004) Synthesis of Pd/SiO<sub>2</sub>, Ag/SiO<sub>2</sub>, and Cu/SiO<sub>2</sub> cogelled xerogel catalysts: study of metal dispersion and catalytic activity. *Journal of Catalysis*, **221**, 335-346 .
- Lang S. & Philip JC. (1998) Surface-active lipids in *Rhodococci*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **74**, 59-70.
- Łebkowska M., Zborowska E., Karwowska E., Mias'kiewicz-Peska E., Muszynski A., Tabernacka A., Naumczyk J. & Jeczalik M. (2011) Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. *Ecological Engineering*, **37**, 1895-1900.
- Levén L., Nyberg K. & Schnürer A. (2010) Conversion of phenols during anaerobic digestion of organic solid waste. A review of important microorganisms and impact of temperature. *Journal of Environmental Management*, **95**, 99-103.
- Macleod CT. & Daugulis AJ. (2005) Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by hydrophobic *Mycobacterium*. *Process Biochemistry*, **40**, 1799-1805.
- Mahy JG., Tasseroul L., Zubiaur A., Geens J., Brisbois M., Herlitschke M., Hermann R., Heinrichs B. & Lambert SD. (2014) Highly dispersed iron xerogel catalysts for *p*-nitrophenol degradation by photo-Fenton effects. *Microporous and Mesoporous Materials*, **197**, 164-173.
- Mahy J. (2013). Assainissement des sols pollués par l'action couplée de micro-organismes et de nanoparticules métalliques. TFE. Faculté des Sciences Appliquées. Université de Liège, Belgique.
- Murugesan K., Bokare V., Jeon JR., Kim EJ., Kim JH. & Chang YS. (2011) Effect of Fe-Pd bimetallic nanoparticles on *Sphingomonas* sp. PH-07 and a nano-bio hybrid process for triclosan degradation. *Bioresource Technology*, **102**, 6019-6025.
- Pierre JL., Fontecave M. & Crichton RR. (2002) Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biometals*, **15**, 341-346.

Rehmann L. & Daugulis AJ. (2006) Biphenyl degradation kinetics by *Burkholderia xenovorans* LB400 in two-phase partitioning bioreactors. *Chemosphere*, **63**, 972-979.

Rodier J., Bazin C., Broutin J-P., Chambon P., Champsaur H. & Rodi L. (1996) L'analyse de l'eau ; eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. Dosage du fer, pp 351. 8<sup>e</sup> édition, Dunod, Paris.

Santos EC., Jacques RJS., Bento FM., Peralba MCR., Selbach PA., Sa EL. & Camargo FA. (2008) Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*, **99**, 2644-2649.

Van Doesburg W., Van Eekert MH., Middeldorp PJ., Balk M., Schraa G. & Stams AJ. (2005) Reductive dechlorination of  $\beta$ -hexachlorocyclohexane ( $\beta$ -HCH) by a *Dehalobacter* species in coculture with a *Sedimentibacter* sp. *FEMS Microbiology Ecology*, **54**, 87 - 95.

Verma V., Joshi K. & Mazumdar B. (2012) Study of siderophore formation in nodule-forming bacterial species. *Research Journal of Chemical Sciences*, **2**, 26-29.

Wannoussa W., Masy T., Lambert SD., Heinrichs B., Tasseroul L., Al-Ahmad A., Weekers F., Thonart P. & Hilgsmann S. (2015a) Effect of iron nanoparticles synthesized by a sol-gel process on *Rhodococcus erythropolis* T902.1 for biphenyl degradation. *Journal of Water Resource and Protection*, **7**, 264-277.

Wannoussa W., Hilgsmann S., Tasseroul L., Masy T., Lambert SD., Heinrichs B., Tasseroul L., Al-Ahmad A., Weekers F. & Thonart P. (2015b) Effect of metal ions and metal nanoparticles encapsulated in porous silica on biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 1-11.

Weekers F., Jacques P., Springael D., Mergeay M., Diels L. & Thonart P. (1999) Improving the catabolic functions of desiccation-tolerant soil bacteria. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, **77**, 251-266.

Zhang YM., Maier WJ. & Miller RM. (1997) Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene. *Environmental & Science Technology*, **31**, 2211-2217.

Zhang WX. (2003) Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *Journal of Nanoparticle Research*, **5**, 323-332.