

Académie Universitaire Wallonie – Europe

Université de Liège

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la vie

Centre Wallon de Biologie Industrielle

Unité de Recherches en Biochimie et Microbiologie industrielles

Bioremédiation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de nanoparticules métalliques encapsulées dans une matrice de SiO₂



Dissertation présentée par

Wissal WANNOUSSA

En vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences

Année Académique 2014 – 2015

Collège de doctorat: Biochimie, biologie moléculaire et cellulaire, bioinformatique et modélisation

RESUME

La souche *Rhodococcus erythropolis* dégrade plusieurs types d'hydrocarbures (aliphatiques, cycliques et aromatiques). Ces derniers, notamment les hydrocarbures aromatiques, présentent des propriétés physico-chimiques particulières. En effet, ils sont très stables, peu volatils et hydrophobes. Ces propriétés les rendent relativement résistants à la bioremédiation. De ce fait, ils persistent dans l'environnement et causent des effets néfastes, comme les mutations génétiques, les cancers....., sur les êtres vivants.

Dans ce travail, le biphényle a été choisi comme modèle en raison de son utilisation, à l'heure actuelle, comme matière de base pour la synthèse de composés polychlorobiphényles (PCB), comme additifs dans certaines formulations de pesticides etc. Cependant, la bioremédiation du biphényle est assez lente, ce qui nécessite encore de nombreuses investigations en vue d'améliorer les performances des microorganismes impliqués.

De nombreux travaux mentionnés dans la littérature ont porté sur l'amélioration de la bioremédiation des polluants par l'utilisation d'éléments métalliques tel que le palladium, nickel, cobalt ou le fer à faible concentration. Leur utilisation pose cependant trois problèmes majeurs au niveau (i) de la séparation de ces adjuvants/catalyseurs des produits finaux (*e.i.* 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 Al_2O_3 , SiO_2 , TiO_2 offrant une surface spécifique suffisamment importante pour assurer une bonne dispersion des métaux sous forme de particules de taille nanométrique.

Dans mes travaux, les nanoparticules métalliques (2 à 3 nm) encapsulées au sein d'une matrice de silice (10 à 20 nm) ont été réalisées. Ces dernières ont été synthétisées par le procédé sol-gel qui assure ainsi la stabilité de la réactivité du catalyseur (absence d'agglomération, relargage contrôlé.....). Les résultats expérimentaux ont montré que, les nanoparticules métalliques encapsulées (le fer, le cobalt et le palladium) activent la bioremédiation du biphényle. En outre, cet impact positif augmente avec la concentration des nanoparticules testées: le pourcentage de bioremédiation passe de 75 ± 6.3 % en présence de 10^{-6} M en nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) à 90 ± 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 biphényle. D'autre part, l'ajout à une concentration de 10^{-4} M en nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) ou cobalt (Co/SiO_2) a stimulé l'activité des enzymes 1,2-catéchol dioxygénases susceptibles d'être impliquées dans la bioremédiation du biphényle. En outre, la présence de 10^{-4} M de

nanoparticules en fer (Fe/SiO₂) pourrait avoir un effet sur la production des biosurfactants notamment des glycolipides contenant du tréhalose. Ces derniers pourraient favoriser la solubilisation des hydrocarbures ou leur adhésion à la surface de la *Rhodococcus erythropolis* T902.1. En effet, la présence d'une concentration de 10⁻⁴ M des nanoparticules en fer (Fe/SiO₂) induit une augmentation de 85 % en tréhalose.

Ce travail se termine par une discussion générale mettant en évidence les avantages d'utilisation des nanoparticules et une comparaison avec les études récemment publiées dans la littérature scientifique. Des perspectives de recherches sont soulevées afin de permettre une extrapolation de la bioremédiation d'autres polluants avec d'autres souches bactériennes en présence des nanoparticules.

ABSTRACT

The strain of *Rhodococcus erythropolis* degrades several of hydrocarbons (aliphatic, cyclic, and aromatic). These, in particular, aromatic hydrocarbons have of a physico-chemical property. Indeed, they are very stable, low volatility and hydrophobic. These properties make it relatively resistant to bioremediation. Thus, they persist in the environment and cause various adverse effects, such as genetic mutations and cancer.... etc, on living beings.

In this work, biphenyl, however, was chosen as a model because of its use, at present, as a feedstock for the synthesis of compounds polychlorinated biphenyl (PCB), as additives in some formation of pesticides.... etc. However, the bioremediation kinetics are very limited, which further requires many investigation in order to improve the performance of the microorganisms involved.

Some works mentioned in the literature have reported on improving the bioremediation of pollutants by the use of metallic elements such as palladium, nickel, cobalt or iron at low concentrations. However, their use poses three major problems (i) the separation of these additives / catalysts of the final products (*i.e.* water treatment); (ii) recycling of these compounds and (iii) the pH of the reaction medium its since major impact on metal solubility.

To limit these drawbacks, metal catalysts may be dispersed on an inert support and porous of type Al_2O_3 , SiO_2 , TiO_2 providing a large surface area for good metal dispersion on the from of nonmetallic particles.

In my work, the metallic nanoparticles (2 to 3 nm) encapsulated inside in a porous silica (10 to 20 nm) were carried. These were synthesized by the sol-gel process which ensures the stability of the catalyst reactivity (absence of agglomeration, controlled release.....). The experimental results showed that the metallic nanoparticles encapsulated (iron, cobalt and palladium) increased the bioremediation of biphenyl. Moreover, this positive impact increases with the concentration of nanoparticles tested. The percentage of bioremediation of biphenyl increases from 75 ± 6.3 % in the presence of 10^{-6} M of iron nanoparticles (Fe/SiO_2) to 90 ± 3.5 % in presence of 10^{-4} M after 18 day of incubation in a relatively poor culture medium (medium 284) containing 500 ppm of biphenyl as the sole carbon substrate. On the other hand, the addition of iron nanoparticles (Fe/SiO_2) or cobalt nanoparticles (Co/SiO_2) at concentration 10^{-4} M stimulated the activity of enzymes 1,2-catechol dioxygenases responsible of the Bioremediation of biphenyl. Similarly, the presence of 10^{-4} M iron nanoparticles (Fe/SiO_2) may have an

effect on optimizing the production of biosurfactants in particular glycolipids containing the trehalose. These may optimize the solubilize of hydrocarbons which their accession to the surface of the *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Indeed, the presence of 10^{-4} M of iron nanoparticles (Fe/SiO₂) induced an increase of 85 % of trehalose.

Ending this work, the general discussion evidences the advantages of using nanoparticules and compares them to the recent scientific literature. Furthermore, perspectives are given in terms of scientific outlooks, are raised in order to bring the bioremediation other pollutants with other bacterial strains in presence of nanoparticules.

Encadrement de thèse

Promoteurs de thèse

Prof. Franck DELVIGNE

Prof. Philippe THONART

Comité de thèse

Prof. Bernard JORIS

Université de Liège, Belgique

Prof. Jean-Paul PIRARD

Université de Liège, Belgique

Dr. Serge HILIGSMANN

Université de Liège, Belgique

Jury de thèse

Madame et Messieurs les promoteurs et membres du comité de thèse

Prof. Bernard JORIS (Président)

Université de Liège, Belgique

Prof. Jean-Paul PIRARD

Université de Liège, Belgique

Prof. Franck DELVIGNE

Université de Liège, Belgique

Prof. Philippe THONART

Université de Liège, Belgique

Prof. Frédéric NGUYEN

Université de Liège, Belgique

Prof. Anne-Lise HANTSON

Université de Mons, Belgique

Prof. Remy GOURDON

Université de Lyon, France

Prof. Philippe JACQUES (Secrétaire)

Université de Liège, Belgique

©Université de Liège, 2015

Thèse réalisée au Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Département des Sciences de la Vie, Service de Technologie Microbienne.

Les travaux présentés dans ce document ont reçu le soutien financier du Ministère de l'Éducation Supérieur de la Syrie (Université de Damas) par l'octroi d'une bourse d'aspirant de 2010 à 2015.



Université de Liège

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la vie

Centre Wallon de Biologie Industrielle

Unité de Recherches en Biochimie et Microbiologie industrielles

Bioremédiation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de nanoparticules métalliques encapsulées dans une matrice de SiO₂

Dissertation présentée par

Wissal WANNOUSSA

En vue de l'obtention du grade Docteur en Sciences

Année Académique 2014 – 2015

Collège de doctorat: Biochimie, biologie moléculaire et cellulaire, bioinformatique
et modélisation

Dédicace

A mes parents,

Pour leur encouragement, pour leur compréhension. Aucune dédicace ne saura vous exprimer la profondeur de mes sentiments.

Je vous aime très fort.

A mes copains

Waseem, Ssafa, Nassim, Ramzia

Fais de ta vie un rêve Et d'un rêve, une réalité

Antoine de Saint-Exupéry

*Tout grand progrès scientifique est né
d'une nouvelle audace de l'imagination.*

John Dewey, philosophe américain (1859-1952)

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au sein du Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), elle est le fruit de cinq années de recherche, ne serait-ce sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes. Je tiens ainsi à remercier toutes celles qui ont suivi de près ou de loin cette formidable aventure :

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus vifs et sincères remerciements à mon promoteur et co-promoteur de thèse, Prof. Frank DELVIGNE et Prof. Philippe THONART et, qui m'ont accordé toute leur confiance tout au long de ces années et qui m'ont fait vivre cette unique expérience très enrichissante. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon entière gratitude et le témoignage de ma grande estime.

Ma reconnaissance s'adresse également à Serge HILIGSMANN (Dr. Ir.) qui m'a accompagnée, conseillée et orientée dès le début de la thèse. Je le remercie pour sa gentillesse, sa compréhension et ses précieuses directives qui m'ont été d'une grande aide au cours de ce travail. J'espère m'être améliorée à votre contact dans mon approche du métier de chercheur.

Je tiens à remercier également les membres du comité de thèse, Prof. Jean-Paul PIRARD, Prof. Bernard JORIS et Dr. Serge HILIGSMANN pour leurs encouragements et conseils avisés lors de nos réunions de présentation de résultats et de (re-)orientation de la thèse, malgré toutes leurs occupations et leurs responsabilités, ils m'ont permis de poursuivre ce travail dans les meilleures conditions possibles.

Merci aux Messieurs les membres du Jury, Prof. Bernard JORIS (Président), Prof. Anne-Lise. Hantson (Université de Mons), Prof. Remy GOURDON (Université de Lyon), Prof. Philippe JACQUES (Secrétaire), Prof. Frédéric NGUYEN d'avoir accepté de juger mon travail et pour tout l'intérêt que vous y avez porté.

Sans oublier le lieu de travail au quotidien, merci à tous les chercheurs, doctorants, docteurs et employés du CWBI, car ce fut vraiment un plaisir de travailler avec vous. Merci, chère Cécile, pour ton aide et tes conseils pendant ma vie à l'étranger. Merci aussi à Chi, Alina, Dehlia, Thibaut, Michaël, Jean, Ludivine, Bribi, Slim, Moustafa, Leticia, Jérémie, Florent, Alaa, Rasool, Rosi,

Xavier, Laurent, Omran, Mouaad, Fadwa, Assma, dont le rire communicatif mettait de la joie dans notre bureau. Merci pour tous ces bons moments!;

Un peu plus tard est arrivé Ahmad Sabri, que je remercie vivement pour sa gentillesse et qui m'a apporté à l'occasion une aide précieuse et qui m'a toujours bien soutenue. A vrai dire, je lui dois tout ou presque sur le sujet !

Je remercie chaleureusement mon amie et chère sœur Khadija AL TANTAOUI d'avoir accepté de corriger ce travail. Tu as toujours été là pour me filer un coup de main. Merci pour tout, je ne m'étends pas, j'ai déjà dit tout le bien que je pense de toi.

Ce qui me permet de faire la transition avec toute la joyeuse bande à Liège sans qui il m'est difficile de survivre au quotidien de la vie du thésard souvent remplie de frustration. Je vais de toute manière oublier des gens, mais j'aimerais remercier particulièrement Wafa ALTAHIRI qui pour moi cumule le titre vraie amie.

Je remercie également Dania ALTICHA qui m'a sauvé la vie en acceptant de m'aider faire tous mes affaires en Syrie. Encore une fois, je me sens coupable de ne pouvoir rendre le coup de main.

Merci aussi à mes amis, Amin, Tammam et sa femme: Wasen. Mouhamad AALAN et sa femme : Soyhire, Manal, Mouhamad Rajabe, Zina, Nour, Faten, Amir, Dalila, Malaz et Sarha pour le soutien pratique et moral qu'ils m'ont toujours apporté au cours de ce travail.

Enfin, je me devais de garder une place particulière pour mon père et ma mère le soleil de ma vie, ces deux personnes les dernières citées mais les toutes premières en mon coeur. Leur patience et leur compréhension m'enrichissent et me comblent, leur soutien me permet d'avancer et leur sourire m'inspire. Je remercie bien évidemment mes sœurs (Haifaa, Intissar, Ssafa, Zainab) et mes frères (Hamdan, Adnan, Ammar) qui ont toujours entretenu à la maison un climat de découverte et de curiosité, ce qui a probablement conditionné mon goût pour la recherche. Je me souviens de vos réserves quand j'ai voulu faire de la recherche, j'avais envie de vous répondre: c'est de votre faute!!

Avant-propos

De très grandes quantités d'hydrocarbures sont introduites dans la biosphère, soit par rejets non accidentels au cours des différentes opérations de l'industrie pétrochimique notamment lors du transport, du raffinage..., soit et surtout, par rejets accidentels résultant des marées noires, des catastrophes terrestres.... Ces polluants s'accumulent dans les sols, les lacs, les rivières, les eaux souterraines et l'atmosphère. La biodégradation ou bioremédiation par les micro-organismes est considérée comme la composante majeure des réactions de transformation auxquelles sont soumis ces polluants. En effet, les micro-organismes peuvent se développer dans des environnements très diversifiés et font appel à des mécanismes variés parfois uniques au sein du règne vivant.

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi la souche, *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en raison de sa capacité à consommer une large gamme de polluants comme seule source de carbone. Cette dernière a été isolée d'un sol pollué au CWBI (Centre Wallon de Biologie Industrielle).

Le biphényle est hydrophobe, peu volatil et sa persistance dans les écosystèmes est due principalement à sa faible solubilité aqueuse. Il a tendance à s'adsorber sur les sols et les sédiments à cause de son caractère hydrophobe. Notre choix s'est porté sur le biphényle en tant que HPA résistant afin d'étudier et d'évaluer les capacités de dégradation de notre souche.

La bioremédiation apparaît en comparaison comme la solution idéale. Cependant, le principal inconvénient réside dans la durée du traitement que cela demande. Effectivement, quand on travaille dans des conditions 'naturelles', la vitesse de bioremédiation est beaucoup plus lente ce qui demandera éventuellement d'utiliser des catalyseurs comme solution envisageable pour accélérer la réaction de la bioremédiation du biphényle.

Dans cette perspective, nous avons montré que la souche *Rhodococcus erythropolis*, en question, est stimulée dans sa croissance lorsqu'elle est en présence de nanoparticules dont la taille est d'environ 2-3 nm. Ces nanoparticules présentent ici la spécificité d'être encapsulées dans une matrice inerte comme la silice qui les empêche de s'agglomérer et également d'être dispersées de façon aléatoire et non-contrôlée dans la nature. Le recours à cette spécificité ne correspond pas à la voie développée par d'autres recherches dont l'objectif est d'injecter directement des nanoparticules

dans le sol. En effet, un certain risque environnemental existe quant à l'utilisation des nanoparticules classiques (non encapsulées) dans les processus de bioremédiation.

Après une introduction générale, une première partie bibliographique présente l'état de l'art sur la description du biphényle et sa bioremédiation ainsi que sur la description des différents métaux (Ag, Cu, Co, Pd et Fe) présents dans l'environnement et leur réactivité chimique en présence des microorganismes dans le milieu. Dans cet ordre d'idée, le rôle du fer dans les processus de la bioremédiation des polluants a été présenté. Ce premier chapitre décrit, également, le procédé sol-gel pour synthétiser les nanoparticules métalliques utilisées pendant cette thèse.

Depuis la découverte de la bioremédiation par les micro-organismes, de nombreuses recherches se sont penchées sur le sujet et ont permis de développer, d'améliorer et de comprendre la technique de la bioremédiation. Les différentes voies de l'amélioration de la bioremédiation des polluants ainsi que les voies d'utilisation des métaux sont passées en revue, de même que les moyens d'optimisation déjà mis en évidence. Cette section se termine par le développement des objectifs du travail.

La deuxième partie est consacrée à la présentation des résultats. Elle est subdivisée en 4 sections reprenant les 4 articles de recherches publiés, soumis ou à soumettre dans des journaux scientifiques avec comité de lecture. La première section de cette partie de résultats (2^e section) est consacrée à l'étude de l'impact des nanoparticules (Co/SiO₂, Pd/SiO₂, Cu/SiO₂ ou Ag/SiO₂) et des sels métalliques (Co²⁺, Cu²⁺ ou Ag⁺) sur le potentiel de la souche aérobie *Rhodococcus erythropolis* 902T.1 en présence du biphényle comme source de carbone et d'énergie. Le travail a mis en évidence l'impact positif des nanoparticules de cobalt et de palladium sur l'amélioration de la bioremédiation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis*T902.1. Cet impact dépend de l'augmentation de la concentration des nanoparticules dans le milieu de culture (10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M ou 10⁻⁴ M). De plus, les résultats de la première étude avaient démontré que les propriétés physico-chimique des nanoparticules (séchées, calcinées ou réduites) jouent aussi un rôle important dans le procédé bioremédiation du biphényle. En effet, la présence des nanoparticules de cobalt (Co/SiO₂) sous forme réduite induit une bioremédiation du biphényle inférieure à celle obtenue lors de l'utilisation des nanoparticules de cobalt sous les autres formes (séchées, calcinées). D'un autre côté, les sels métalliques ont des effets plus marqués que les nanoparticules. Cependant,

l'encapsulation des nanoparticules par une matrice de silice diminue considérablement leur effet toxique sur l'activité d'enzyme 1,2-catéchol dioxygénase (responsable du clivage de noyau aromatique) par rapport aux sels métalliques (Cu^{2+} ou Ag^+).

La troisième section de cette deuxième partie présente les résultats de l'étude sur la bioremédiation du biphényle en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2). Le travail a été orienté vers l'utilisation des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) connus comme bons activateurs pour la bioremédiation de polluants organiques. Cette étude a montré que la présence de fer à l'intérieur d'une matrice de silice (SiO_2) empêche l'utilisation trop rapide du fer par *Rhodococcus erythropolis* T902.1. En effet, le fer est un élément très important pour la synthèse des enzymes impliquées dans la bioremédiation des polluants. Pour la compréhension de l'interaction entre les microorganismes et les nanoparticules de fer (Fe/SiO_2), nous suggérons que *Rhodococcus erythropolis* T902.1 synthétise des sidérophores qui sont des ligands organiques, de faible poids moléculaire, avec une haute affinité et spécificité le fer. Ce dernier est chélaté par le sidérophore puis intégré à l'intérieur de la cellule où il est réduit. Notre étude a montré que le couplage de ces nanoparticules avec *Rhodococcus erythropolis* 902T.1 a induit une disponibilité en fer supplémentaire permettant ainsi aux enzymes une capacité de dégradation plus élevée.

La troisième partie des résultats (4^e section) concerne l'effet des propriétés physico- chimique du milieu de culture (pH, stérilisation, temps) sur la libération de fer à l'extérieur des capsules de dioxyde de silicium (SiO_2). En effet, nous avons montré une augmentation du relargage du fer après stérilisation et suite à une diminution du pH en fonction du temps. Par contre, une augmentation du pH influence négativement la disponibilité du fer dans le milieu de culture. Signalons également que l'addition du glucose ou d'éthanol, en très faible concentration, a stimulé la viabilité des cellules et a amélioré la bioremédiation du biphényle. D'ailleurs, nous avons montré que la concentration de NAD (H) augmente en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2), et d'une faible concentration d'éthanol. De ce fait nous avons constaté que les nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) et l'éthanol jouent un rôle important dans l'augmentation de la concentration de NAD ou /et de NADH. Nous avons ensuite étudié l'impact de la concentration des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) et du temps d'incubation sur l'augmentation de la taille de la cellule de *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Nos résultats ont montré qu'une faible concentration de 10^{-4} M en nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) avec un temps d'incubation long, augmente la taille de la cellule.

La quatrième partie des résultats (5^e section) traite l'étude de bioremédiation du biphényle en présence d'une concentration de 10^{-5} M des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) ou sel de fer (Fe₂O₃) (autoclavées et non autoclavées). Notre étude a trouvé que l'autoclavage a un fort impact sur 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 concentration en fer dans le milieu de culture. En effet, la production de sidérophores diminue avec l'augmentation de la quantité de fer relarguée en milieux aqueux par les nanoparticules de fer (Fe/SiO₂).

La dernière partie de ce travail porte sur une synthèse des principaux résultats obtenus dans les chapitres précédents et sur une discussion comparative des différentes données de la littérature scientifique. Enfin une partie « discussion générale et conclusion » clôt ce document de thèse.

Table de Matières

Première section: Introduction et revue bibliographique	1
I. Introduction	2
II. Revue bibliographique	4
II.1. Identité de la substance	4
II.1.1. Structure et propriétés physico-chimiques	4
II.1.2. Sources	5
II.1.3. Utilisations	5
II.1.4. Risques toxicologiques	5
II.2. Bioremédiation	7
II.2.1. Les dioxygénases	10
II.2.1.1. Enzymes de type I	10
II.2.1.2. Enzymes de type II	11
II.2.2. Mécanisme réactionnel de catéchol 1,2-dioxygénase	11
II. 3. Optimisation de la bioremédiation réductive	12
II.3.1. Source de carbone complémentaire	12
II.3.2. Impact des métaux	13
II.3.2.1. Définition des métaux lourds	13
II.3.2.2. Potentiel de toxicité	15
II.3.2.3. Mécanismes de résistance	16
II.3.2.4. Effet des métaux sur la bioremédiation des polluants	18
II.4. Nanoparticules	23
II.4.1. Définition	23
II.4.2. Toxicité des nanoparticules	24
II.4.3. Procédés de synthèse	25
II.4.4. Procédé sol-gel	26
II.5. Objectifs de la thèse	30
Deuxième section: Effets des ions des métaux et des nanoparticules métalliques encapsulées dans une matrice de silice poreuse sur la biodégradation du biphenyle par <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1	32
Présentation de l'article	33
Abstract	35
I. Introduction	36
II. Material and methods	39
II.1. Preparation concentrated suspensions of metal nanoparticles and concentrated solutions of metal ions	39

II.2. Culture.....	39
II.3. Biphenylanalysis.....	40
II.4. HPLCanalyses.....	41
II.5. Enzymeassays.....	41
II.6. Protein concentration.....	42
II.7. Statisticalanalysis.....	42
III. Results and Discussion.....	42
III.1. Effects of metal nanoparticles (Ag, cu, Pd and Co) on biphenyl biodegradation.	42
III.2. Effect of metal ions Co^{2+} and nanoparticles Co/SiO_2 concentration on biphenyl biodegradation	48
III.3. Effect of metal ions (Ag^+ or Cu^{2+}) and nanoparticles (Ag/SiO_2 or Cu/SiO_2) concentration on biphenyl biodegradation.....	50
III.4. Effect of metal ions (Co^{2+} , Ag^+ or Cu^{2+}) and nanoparticles (Co/SiO_2 , Ag/SiO_2 or Cu/SiO_2) on catechol 1,2-dioxygenase activity.....	51
IV. Conclusions.....	53
Troisième section: Effets des nanoparticules de fer encapsulées dans une matrice de silice poreuse sur la biodégradation du biphenyle par <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1	54
Présentation de l'article.....	55
Abstract.....	57
I. Introduction.....	58
II. Material and Methods.....	60
II.1. Preparation concentrated suspensions of iron nanoparticles and SiO_2	60
II.2. Culture.....	61
II.3. Biphenyl and major metabolites analysis.....	62
II.4. Recycling of calcined iron NP_s	63
II.5. Irontitration.....	63
II.6. Enzymeassays.....	64
II.7. Protein concentration.....	65
II.8. Statisticalanalysis.....	65
III. Results and Discussion.....	66
III.1. Biodegradation of biphenyl in the presence of iron NP_s Fe/SiO_2 synthesized by sol- gel process.	66
III.2. Effect of NP_s concentration.....	66
III.3. Effect of dried or calcined NP_s	70
III.4. Effect of NP_s recycling.....	72

III.5. Iron distribution in the different compartments of RT902.1.....	73
III.6. Effect of NP _s on major enzymes activity.....	74
IV. Conclusions.....	77
Quatrième section: Stimulation de la biodégradation du Biphényle par <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1 en présence de FeCl ₃ et de nanoparticules de fer encapsulées dans une matrice de silice poreuse.....	78
Présentation de l'article	79
Abstract.....	81
I. Introduction.....	82
II. Material and methods	84
II.1.Preparation of suspension of iron oxide nanoparticles Fe/SiO ₂ , Fe(OH) ₃ and concentrated solution FeCl ₃	84
II.2. Effect of pH, time and temperature of sterilization on the release of iron from the capsule of SiO ₂ without <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1	85
II.3. Effect of pH on the rate of biphenyl biodegradation by <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1 in presence of Fe/SiO ₂ , FeCl ₃ or Fe(OH) ₃	85
II.4. Iron titration.....	86
II.5.Cellular viability.....	87
II.6. Determination of NAD(H) concentration.....	87
II.7. Statistical analysis.....	88
III. Results and discussion	88
III.1. Effect of pH, time and temperature of sterilization on the release of iron from the capsule of SiO ₂ without <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1	88
III.2. Effect of pH on the rate of biphenyl biodegradation by <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1 in the presence FeCl ₃ or Fe/SiO ₂	90
III.3. Effect of carbon sources on the rate biphenyl biodegradation and cellular viability	93
III.4. Determination of concentration NADH/NAD.....	96
III.5. Microscopic observation.....	97
IV. Conclusions.....	98
Cinquième section : Amélioration de la biodégradation du biphényle par <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1 en présence de Fe ₂ O ₃ et nanoparticules de fer encapsulées dans un xérogel de silice.....	100
Présentation de l'article	Error! Bookmark not defined.
Abstract.....	103
I. Introduction.....	104
II. Matériels et Methods	108
II.1. Préparation des suspensions concentrée en fer.....	108

II.2. Mesure de la quantité de fer restant à l'intérieur ou relarguée des capsules de dioxyde de silicium (SiO ₂)	108
II.3. Cultures.	109
II.4. Techniques analytiques	110
III. Résultats et Discussion	110
III.I. Mesurer de la quantité de fer (restant à l'intérieur) ou (relarguée à l'extérieur) des capsules dioxyde de silicium (SiO ₂)	110
III.2. Biodégradation du biphenyle par <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1 en présence de xérogel Fe/SiO ₂ et Fe ₂ O ₃	112
III.3. Mise en évidence de la production de sidérophores sur milieu gélosé CAS	113
III.4. Mise en évidence de la production de surfactants	115
IV. Conclusion	116
Sixième section: Discussion générale et Conclusions.....	118
Discussion générale.....	119
I. Synthèse des résultats de la thèse.....	121
I.1. Amélioration du procédé de bioremédiation	121
I.2. Impact des nanoparticules de fer sur les métabolites de <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1.....	122
I.3. Recyclage des nanoparticules de fer	123
I.4. Dosage du fer dans différents compartiments cellulaires et influence sur l'activité enzymatique.....	124
I.5. Relargage du fer par les capsules de dioxyde de silicium (SiO ₂)	125
I.6. Impact des propriétés texturales des nanoparticules (surface spécifique) sur la bioremédiation du biphenyle.....	127
I.7. Impact du pH sur la bioremédiation du biphenyle en présence de sel de fer et des nanoparticules de fer	128
I.8. Utilisation du glucose et de l'éthanol comme source supplémentaire de carbone.....	130
I.9. Améliorations globales apportées par les travaux de la thèse sur la bioremédiation du biphenyle par <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1	134
I.10. Impact des nanoparticules de fer sur la production des surfactants	135
I.11. Impact des nanoparticules de fer sur la sécrétion des sidérophores par <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1	136
II. Perspectives de recherches et d'applications industrielles	137
II.1. Traitement des sols pollués par hydrocarbures aromatiques (HAP)	138
II.2. Traitement des sols pollués par hydrocarbures chlorés et polychlorobiphényles (PCB)	140
II.2.1. La déchloration anaérobie	141

II.2.2. La bioremédiation aérobie.....	142
Conclusions	145
Références bibliographiques	146

Liste des figures

	Page
Figure I.1: Structure chimique du biphényle	4
Figure I.2: Métabolites du biphényle excrétés dans l'urine des animaux (souris, jeunes rat, lapins).....	6
Figure I.3: Chemin catabolique du biphényle de <i>C. testosteroni</i> B-356 et de <i>Burkholderia</i> sp. LB400. Le schéma montre chaque étape évoluant vers la conversion du biphényle en benzoate. Les enzymes des étapes sont (1) BPDO encodé par <i>bphA</i> <i>EFG</i> ; (2) Cis-2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl 2,3-dehydrogenase encodé par <i>bphB</i> ; (3) 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase encodé par <i>bphC</i> ; (4) HOPDA hydrolase encodé par <i>bphD</i> . (Sylvestre, 2004).....	9
Figure I.4: La dihydroxylation du substrat par dioxygénases hydroxylantes (KUONY, 2005).....	10
Figure I.5: Structure 3D d'une catéchol 1,2-dioxygénase de <i>Rhodococcus</i> sp. RHA1 contient un cluster [2Fe-2S] et les ions de Fe ³⁺ (Furusawa <i>et al.</i> , 2004).....	12
Figure I.6: Mécanisme de clivage de cycle aromatique par une cathécol 1,2-dioxygénase (Pelmont, 1993).....	12
Figure I.7: Réaction de déchloration par les nanoparticules de Palladium (Pd(0)) à la surface des cellules de <i>Shewanella oneidensis</i> . (A) Réaction d'oxydoréduction couplant la réduction de Pd(II) soluble avec l'oxydation de donneurs d'électrons comme le lactate. Les Pd(0) précipitent et se lient à la surface de cellules. La réactivité de ces particules nanocatalyseurs est obtenue en les chargeant d'hydrogène. Les radicaux d'hydrogène proviennent d'un donneur d'électron comme H ₂ . (B) Les PCB entrent en contacte avec les nanoparticules de palladium chargées d'hydrogène. (C) La réaction catalytique entre les PCB et les radicaux d'hydrogène du palladium a comme conséquence la déchloration du composé chloré (De Windt <i>et al.</i> , 2005)	19
Figure I.8: Structure différents complexes organiques: A. aminopolycarboxylique de fer ou (FeNTA), B. éthylène diamine dissuccinique de fer ou (FeEDDS), C. Structure du citrate (Chorao, 2008).....	21
Figure I.9: Evolution de la concentration d'ABT en présence <i>Rhodococcus rhodochrous</i> avec différentes concentrations de FeNTA (■ 0, ● 0.1, ▲ 0.2, ▼ 0.5, ◆ 1.0 mM)	21

Figure I.10: Les nanoparticules de métal complexé avec Si (OC₂H₅)₄ (Regalbuto.J 2007)26

Figure I.11: A. Structure chimique de l'EDAS (A), Structure chimique du TEOS (B)
(<http://webbook.nist.gov/chemistry>).....28

Figure I.12: Structure chimique du Fe(acac)₃ (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)29

Figure I.13: Photo de Fe0.1 prise au microscop électronique à transmission (Mahy *et al.*, 2014).....29

Figure II.1: Evolution of (A) biphenyl concentration and (B) growth measured by optical density of *Rhodococcus erythropolis*T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 culture medium with 500 ppm initial biphenyl concentration and 10⁻⁴ M of calcined (cobalt, palladium, copper or silver) nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix by sol-gel method: control (-) and control (-) + Co/SiO₂ without microorganisms, control (+) without NP_s nor SiO₂, control (+) +SiO₂ without NP (the % indicated on the figure refer to % of biphenyl degraded). The similar letters (aa, bb, cc and dd) indicate that in the presence of nanoparticles, no significant statistical differences were observed (*p*-value > 0.05) at different time points of biphenyl biodegradation. The error bars means standard deviation on triplicates.44

Figure II.2: Evolution (A) of biphenyl concentration and (B) growth measured by optical density of *Rhodococcus erythropolis*T902.1 in 100 mL flasks or 250 mL baffled flasks* containing 20 mL of M284 culture medium with 500 ppm initial biphenyl and a concentration of 10⁻⁴ M calcined cobalt nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix by sol-gel method. The similar letters (aa, bb, cc and dd) indicate that in the presence of nanoparticles, no significant statistical differences were observed (*p*-value > 0.05) at different time points of biphenyl biodegradation. The error bars means standard deviation on triplicates.47

Figure II.5: Effect of 10⁻⁴ M of (cobalt, copper or silver) nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix by sol-gel method or (cobalt, copper or silver) ions on catechol 1,2-dioxygenase activity. Different letters above histograms means that the results are significantly different from the control (*p* < 0.05). The error bars means standard deviation on triplicates.....52

Figure III.1: Evolution of biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium, 500 ppm biphenyl and different concentrations of calcined iron nanoparticles from 10⁻⁶ to 10⁻⁴ M : (A) biphenyl concentration, (B) growth measured by optical density at 600 nm, (C) biphenyl biodegradation rate after 3, 8 and 18 days of culture. Control (-) and control (-) + Fe/SiO₂ were carried out without microorganisms, control (+) without NP_s nor SiO₂, control (+) +SiO₂

without NP_s. The similar letters (aa, bb, cc, dd and ee) indicate that no significant statistical differences were observed (p -value > 0.05) at different time points of biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1.68

Figure III.2: Evolution of biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium, 500 ppm biphenyl and 10^{-4} M of calcined or dried iron nanoparticles : (A) biphenyl concentration and (B) growth measured by optical density at 600 nm. The similar letters (aa, bb, and cc) indicate that no significant statistical differences were observed (p -value > 0.05) in the presence of 10^{-4} M of calcined or dried iron nanoparticles.71

Figure III.3: Evolution of biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium, 500 ppm biphenyl and 10^{-4} M of calcined iron nanoparticles : (A) Biphenyl dioxygenase activity defined as the rate of indigo formation per mg protein and (B) 1,2-catechol dioxygenase specific activity versus time. The similar letters indicate that no significant statistical differences were observed between the two curves (p -value > 0.05).76

Figure IV.1: Evolution of liberated iron from the capsule of SiO₂ measured by complexometry. In 100 mL flasks containing 20 mL of ultrapure water with 10^{-4} M of iron nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix at pH 6.4, 7, 7.6 before or after sterilization at different time points of incubation at 30 °C and 150 rpm. (A) After 3 days. (B) After 8 days and (C) After 18 days. The similar letters (aa, bb and cc) indicate that in, the effect of pH on the on the release of iron from the capsule of SiO₂ in the presence of 10^{-4} M iron nanoparticles before or after sterilization no significant statistical differences were observed (p -value > 0.05) at different time points.89

Figure IV.2: Evolution of iron inside the cells measured by complexometry after 18 days of incubation. In 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm biphenyl and 10^{-4} M of iron nanoparticles, 10^{-4} M of FeCl₃ or 10^{-4} M of Fe(OH)₃ at pH 6.4, 7 or 7.6.92

Figure IV.3: Evolution of cell viability *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm of biphenyl without /with 10^{-4} M of iron nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix (NP_s) at pH 7 and without /with 0.1g/L glucose or 0.75 g/L ethanol after 36 hours. Viable cells appeared green and non-viable cells appeared red. as observed under fluorescence microscopy. A: *Rhodococcus erythropolis* T902.1 with 500 ppm of biphenyl, B: A + 0.1g/L glucose, C: A+ 0.75g/L ethanol.95

Figure IV.4: Evolution of NAD(H) in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm biphenyl, 10^{-4} M of Fe/SiO₂ and *Rhodococcus erythropolis*T902.1 at pH 6.4 or 7. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) from the control. Error bars represent standard deviations of triplicate tests.....**96**

Figure IV.5 : *Rhodococcus erythropolis*T902.1 grown under normal condition after 18 days of incubation (A). Increase in *Rhodococcus erythropolis*T902.1 cell length under the influence of 10^{-4} M of iron nanoparticles, as observed under fluorescence microscopy after 18 days of incubation (B). *Rhodococcus erythropolis*T902.1 grown after 36 hours of incubation with 10^{-4} M of iron nanoparticles (C).1: iron nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix. 2: biphenyl crystals. 3: *Rhodococcus erythropolis*T902.1 as observed under optical microscopy 400X after 18 days of incubation (D).....**98**

Figure V.1: Quantité de fer relarguée en phase aqueuse (eau milli Q) en présence de 10^{-3} M en nanoparticules calcinées de fer (Fe/SiO₂) autoclavées ou non.....**111**

Figure V.2: 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/SiO₂ à 10^{-4} M en fer ou absence d'inoculum (C).....**114**

Figure V.3: Tests d'émulsion à l'interface eau/hydrocarbure en présence du culot de bactéries incubées sans (A) ou en présence de xérogel Fe/SiO₂ à 10^{-4} M en fer (B) ou du surnageant (C) de culture (hydrocarbure de gauche à droite : paraffine; hexane; pentane).....**116**

Figure VI.1: Réactions d'oxydoréduction du NAD (Thèse de Pétriacq, 2011).**132**

Figure VI.2: Synthèses des performances de bioremédiation du biphenyle après 18 jours d'incubation obtenues pour les cultures de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 à pH initial 7**134**

Figure VI.3: Représentation schématique du bioréacteur montrant le traitement des sols pollués par hydrocarbures aromatiques (HAP) en condition aérobies. Bioréacteur contenant *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de glucose et des nanoparticules de fer**139**

Figure VI.4: L'utilisation complémentaire du venting et bioréacteur biphasique pour traitement des sols par hydrocarbures volatils hydrophiles ou hydrophobes**140**

Figure VI.5: Schéma du chemin de la déchloration réductive du 2, 3, 4,6-tetrachlorobiphényle (Wiegel et Wu, 2000).....142

Figure VI.6: Représentation schématique du bioréacteur montrant le traitement des sols pollués par hydrocarbures aromatiques (HAP) ou polychlorobiphényles (PCB) en conditions anaérobies et aérobies combinées. (A) bioréacteur contenant *Clostridium butyricum* (comme productrice d'hydrogène) et *Pseudomonas fluorescens* (comme biocatalyseur) additionnées de nanoparticules de fer. (B) bioréacteur contenant *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence des nanoparticules de fer144

Liste des tableaux

	Page
Tableau I.1: Propriétés physiques et chimiques du biphenyle	4
Tableau I.2: Tableau périodique des éléments.....	14
Table II.1: Physico-chemical properties of the used (Cu, Co, Ag, Pd) nanoparticles encapsulated in SiO ₂ matrix by sol-gel method: diameters of metallic (d_{MX+}) and SiO ₂ (d_{SiO_2}) particles measured by TEM and specific surface area obtained by BET method.....	48
Table II.2: Biphenyl biodegradation yields (and standard deviation on triplicates) after 18 days of incubation with <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm biphenyl and different concentrations 10 ⁻⁶ M, 10 ⁻⁵ M, 10 ⁻⁴ M of (dried, calcined or reduced) cobalt nanoparticles encapsulated in SiO ₂ matrix by sol-gel method or cobalt ions.....	49
Table II.3: Biphenyl biodegradation yields (and standard deviation on triplicates) after 18 days of incubation with <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm biphenyl and different concentrations 10 ⁻⁶ M, 10 ⁻⁵ M, 10 ⁻⁴ M of calcined (copper or silver) nanoparticles encapsulated in SiO ₂ matrix by sol-gel method or (copper or silver) ions.....	50
Tableau III.1: Evolution of benzoic acid and catechol production from biphenyl biodegradation (500 ppm initial concentration) by <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1 cultured for 18 days in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with or without 10 ⁻⁴ M of calcined iron NP _s	69
Tableau III.2: Evolution of total iron concentration, biphenyl biodegradation yield in % and growth measured by optical density of <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1 after three successive cycles of 18 days of incubation in 100 mL flasks containing 20 mL of minimal medium and 500 ppm biphenyl with or without 10 ⁻⁴ M of calcined iron NP _s	72
Tableau III.3: Iron concentration in the different compartments of <i>Rhodococcus erythropolis</i> T902.1 cells (extracellular, intracellular and at the cell surface) after 18 days of incubation in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium, 500 ppm biphenyl and 10 ⁻⁴ M of calcined iron NP _s (first cycle).....	74

Tableau IV.1: Percentages of biphenyl biodegradation after 18 days of incubation. In 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm biphenyl and 10^{-4} M of Fe/SiO₂, 10^{-4} M of FeCl₃ at pH 6.4, 7 or 7.6 or Fe(OH)₃ at pH 7**91**

Tableau IV.2: Effect of carbon sources (0.1 g/L of glucose or 0.75 g/L of ethanol) with 10^{-4} M of Fe/SiO₂ on the rate biphenyl biodegradation and the ratio viable cells/ non-viable cells after 18 days of incubation.....**93**

Tableau V.1: Pourcentages de biodégradation du biphényle après 18 jours d'incubation de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence des nanoparticules Fe/SiO₂ (10^{-5} M en fer), nanoparticules Fe/SiO₂* (10^{-5} M en fer initial et appauvri par 36 jours d'incubation abiotique préalable) et Fe₂O₃, autoclavés ou non (trois désinfectants successifs)**113**

Liste des équations

	Page
Equation I.1: $\text{Cu}^{1+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{HO}\cdot + \text{HO}^-$	16
Equation I.2: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{HO}^-$	23
Equation I.3: $\text{HO}\cdot + \text{R-H} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{R}\cdot$	233
Equation I.4: $\text{M}(\text{OR})_z + x \text{XHO} = [\text{M}(\text{OR})_{z-x}, (\text{OX})_x] + x \text{ROH}$	27
Equation I.5: $\text{M-OR} + \text{H}_2\text{O} = \text{M-OH} + \text{R-OH}$	27
Equation I.6: $\text{M-OH} + \text{YO-M} = \text{M-O-M} + \text{Y-OH}$	27
Equation I.7: $\text{Si-OR} + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{Si-OH} + \text{ROH}$	27
Equation I.8: $\text{Si-OH} + \text{RO-Si} \Rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{ROH}$ ou $\text{Si-OH} + \text{HO-Si} \Rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O}$	27
Equation V.1: $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{s}) \rightarrow \text{Fe}^{+3} + 3\text{OH}^-$	129
Equation V.2: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$ (Aldric, 2009)	131
Equation V.3: $\text{Fe}^{3+} + \text{NADH} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{NAD}^+$ Ou $\text{Fe}_2\text{O}_3 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{FeO} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$	132
Equation V.4: $\text{R-Cl} + 2 \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{R-H} + \text{Cl}^-$	141

Liste des abréviations, symboles et unités

% : Pourcent

ABT: 2-aminobenzothiazole

ADN: acides nucléiques

ATP: Adenosine Di-Phosphate

Al: aluminum

BT: benzothiazole

°C: degré Celsius

CDF: Cation Diffusion Facilitator

Ce: cérium

cm: centimètre

CO₂: dioxyde de carbone

cSt: viscosité cinématique était exprimée en centistokes (1 cSt = 1 mm²/s = 10⁻⁶ m²/s)

CT: tétrachlorure

CWBI: Centre Wallon de Biologie Industrielle

EDAS: aminopropyltriméthoxysilane

Fe²⁺: ion ferreux

Fe³⁺: ion ferrique

FeEDDS: éthylène diamine dissuccinique de fer

FeNTA: aminopolycarboxylique de fer

FER: ferredoxine

g: gramme

HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques

HPLC: chromatographie liquide à haute performance

h: heure

H₂: hydrogène

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

ISP: Iron Sulfur Protein

kDa: kilodalton

K_{co}: coefficient de partage carbone organique-eau.

kg: kilogramme

kPa: kilopascal

L: litre

LGC: laboratoire de Génie Chimique-Génie Catalytique de l'Université de Liège

m: mètre

m²: mètre carré

m³: mètre cube

M: molaire

mg: milligramme

mg/kg p.c. jour: dose journalière admissible fixé par l'union européenne (en mg/kg de poids corporel/ jour)

mg/l: milligramme par litre

min: minute

mL: millilitre

NAD (H) : cofacteur enzymatique ; nicotinamide adénine dinucléotide (H)

NP: nanoparticules

NTA : Acide nitrilotriacétique

nFe-Pd: nanoparticules bimétalliques palladium-fer

nm: nanomètre

nmol: nanomol

•OH: radicaux hydroxyles

OH: groupement hydroxyl

PCA: Plaque de comptage microbiologique sur milieu gélose (pour Plate Count Agar)

PCB: polychlorobiphényle

PCE: perchloroéthylène

POP: polluants organiques persistants

PSS: polystyrène sulfonate

ppm: particule par million

RED: réductase

R-Cl: hydrocarbures chlorés

RND: Resistance- Nodulation-Cell Division

Ru: ruthénium

RPM: rotation par minute

S_{BET} : surface spécifique déterminée par la méthode BET

SiE0.2 Fe2.5-B_CA: nanoparticules de fer calcinées et autoclavés ; Si=Silice, E nombre = EDAS+ rapport EDAS/TEOS, Fe nombre = fer + pourcentage massique en fer dans le xérogel.

SiFe1-SA: nanoparticules de fer séchées et autoclavé ; Si=Silice, Fe nombre = fer + pourcentage massique en fer dans le xérogel

SiO₂: dioxyde de silicium

TEM: microscop électronique à transmission

TEOS: tétraéthoxysilane

TCE: trichloroéthylène

TCS: 2, 4, 40-trichloro-20-hydroxydiphenyl ether

TiO₂: oxyde de titane

TR: temps de rétention

T_{sp}: taux de biodégradation spécifique

UFC: Unités Formatrices de Colonies

Zr: zirconium

μM/L: micromol par litre

μL: microlitre

μm: micromètre

**Première section: Introduction et revue
bibliographique**

I. Introduction

Les activités humaines (industrielles, économiques et sociales) sont à l'origine de la production de composés chimiques, dont la plupart présentent une grande toxicité pour les organismes vivants; tel est le cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des solvants halogénés et des métaux lourds (arsenic, plomb, mercure, cadmium). Ces substances contaminent tous les compartiments de l'environnement notamment le sol, l'eau, l'air et la biosphère.

Les hydrocarbures, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), sont une menace majeure pour l'environnement, à cause de leurs caractéristiques physico-chimiques (Phale *et al.*, 2007). En effet, les HAP sont classés comme des polluants organiques persistants (POP) car ils possèdent un temps de rétention important dans l'environnement lié à leur faible solubilité aqueuse. En tant qu'hydrocarbures, les HAP ont tendance à s'adsorber sur les sols et sédiments et finissent également, à terme, par s'introduire dans la chaîne alimentaire. Par exemple, la contamination des eaux entraîne la mort des poissons et le développement d'algues toxiques qui pourraient être à l'origine de la mort d'autres espèces aquatiques (Khan *et al.*, 2011).

Chez l'homme, les hydrocarbures aromatiques deviennent toxiques après une oxydation enzymatique, provoquant la formation des métabolites électrophiles solubles. Ces métabolites peuvent alors avoir un impact négatif sur les acides nucléiques ainsi que sur les protéines. Ceci pourrait engendrer un dérèglement de la division cellulaire donnant ainsi la formation de tumeurs (Szeliga et Dipple, 1998).

De nombreux environnements sont susceptibles d'être contaminés, tels que les sites de l'industrie chimique, du transport, de l'industrie automobile ou pétrolière (production et raffinage). D'autres sites privés sont également touchés par les pollutions ponctuelles c'est le cas des fuites de citernes à mazout (zones de dépôts de bus, cuve à mazout, stations-services,.....) (Schadeck *et al.*, 2007).

Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des méthodes de traitement des sites contaminés. Leur réhabilitation peut être réalisée par un traitement physico-chimique sur le sol ou l'eau

contaminée qui peut en être extrait. Grâce à ces méthodes, certains polluants organiques (les hydrocarbures, les HAP, certains solvants) peuvent être détruits pour réduire leur impact toxique sur la santé et sur l'environnement (Khan *et al.*, 2004). Cependant, ces techniques sont coûteuses et peu respectueuses des écosystèmes. Elles peuvent entraîner le rejet de composés toxiques.

Il existe cependant une alternative à ces techniques qui pourrait être envisagée: la remédiation biologique. Cette technique utilise le pouvoir naturel des microorganismes, en particulier les bactéries, qui dégradent les polluants, voire mènent à leur minéralisation complète (Gan *et al.*, 2009). En conséquence, la bioremédiation des hydrocarbures aromatiques par les bactéries aérobies et/ou anaérobies a été largement étudiée (Bevinakatti *et al.*, 1992; Hurtubise *et al.*, 1995; Grund *et al.*, 1995; Grishchenkov *et al.*, 2002; Rehwann et Daugulis, 2006; Furukawa et Fujihara, 2008; Mrozik *et al.*, 2010). Cependant, les études scientifiques sur les paramètres susceptibles d'influencer les phénomènes de bioremédiation sont très limitées. Hormis le fait que la bioremédiation des hydrocarbures aromatiques est potentiellement efficace, elle reste cependant assez lente du fait que ces derniers sont très stables, peu volatils et hydrophobes. Ces propriétés les rendent relativement résistants à la bioremédiation qui ne peut s'opérer qu'en phase aqueux, là où les microorganismes sont capables de se développer.

Pour contrecarrer ce problème cinétique et optimiser l'efficacité de cette technique, l'utilisation de catalyseurs est une solution appropriée pour accélérer la réaction.

En effet, depuis cette dernière décennie, une attention toute particulière a été portée à l'étude des métaux, sous forme de nanoparticules de métal ou des sels de métaux, notamment le fer, le palladium et le manganèse utilisés en faible concentration pour améliorer la cinétique de ces réactions de bioremédiation (De Windt *et al.*, 2005; Choro C, 2008; Ansari *et al.*, 2008; Forrez *et al.*, 2011; Sridevi *et al.*, 2011).

C'est dans cette ligne de recherche que se situe notre travail de thèse. Ainsi, nous nous proposons d'utiliser les nanoparticules de métal synthétisées par procédé sol- gel pour améliorer le potentiel de la souche *Rhodococcus erythropolis* T902.1, pour la bioremédiation du biphényle.

La stratégie mise en œuvre dans le cadre du procédé sol- gel, sera présentée dans le paragraphe qui suit l'étude bibliographique.

II. Revue bibliographique

II.1. Identité de la substance

II.1.1. Structure et propriétés physico-chimiques

Le biphényle est un composé aromatique neutre, de formule chimique $C_{12}H_{10}$ (Figure I.1). Il a 15 appellations différentes (1,1'-biphényle; bibenzène; Carolid AL; dibenzène; biphényle; E 230; NSC 14916; phénylbenzène; Tetrosin LY; Lemonene; PHPH; Xenene, CP 390; MCS 1572; et Phenador-X).

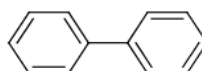


Figure I. 1: Structure chimique du biphényle

Il se présente sous forme solide cristalline, blanc ou légèrement jaunâtre et possède une odeur aromatique caractéristique. Il est stable chimiquement, peu volatil, hydrophobe et soluble dans certains solvants organiques, notamment dans l'éthanol mais insoluble dans l'eau (environ 4 mg/L à 20 °C). Les caractéristiques physico-chimiques de biphényle sont détaillées dans le tableau I.1.

Tableau I. 1: Propriétés physico-chimiques du biphényle

Masse molaire (g/mol)	154.21
Point de fusion (°C)	69-70
Point d'ébullition (°C)	254-256
Masse volumique (g/mL à 20 °C)	1.04
Densité de vapeur (air= 1)	5.31
Pression de vapeur (Pa à 25 °C)	1.19
Température d'auto- inflammation (°C)	540
Limites d'explosivité dans l'air (% en volume)	
Limite inférieure	0.6% à 111 °C
Limite supérieure	5.8% à 155 °C
Constante de la loi de Henry (Pa·m ³ /mol)	28
Log Kco	3.71

II.1.2. Sources

Le biphényle est présent de façon naturelle dans le goudron de houille, le pétrole brut et le gaz naturel (PISSC, 1999). Il provient également de sources anthropiques (Waid, 1986)

II.1.3. Utilisations

Il existe de nombreux usages pour cette substance (Ambrose *et al.*, 1960; Weaver *et al.*, 1979; Nagy and Wardowski, 198; Bevinakatti and Ninnekar, 1992; UK Marine SAC, 2001):

- Additifs dans certaines formulations des pesticides;
- Conservation des agrumes (antifongique) et comme agent de protection contre les intempéries pour le bois;
- Fabrication des produits chimiques pour chauffer ou refroidir les mélanges de réaction;
- Synthèse organique: fabrication des dérivés chlorés, textiles (fibres polyester) et papiers;
- Solvants dans les produits pharmaceutiques;
- Fabrication des produits de calfeutrage pour la chaussée;
- Fabrication des carburants à indice d'octane élevé pour moteur et pour l'aviation.

II.1.4. Risques toxicologiques

La plupart des hydrocarbures aromatiques polycycliques, notamment les hydrocarbures halogénés présentent des propriétés nocives, voire toxiques. Les humains peuvent être exposés aux hydrocarbures (aromatiques ou halogénés) par leur alimentation, lors d'accidents du travail ou tout simplement dans un environnement pollué. En effet la toxicité de ces substances dépend de leurs propriétés chimiques et physiques. Ils sont très stables et très peu solubles dans l'eau et très solubles dans les graisses. En raison de ces propriétés, les hydrocarbures traversent d'une part, facilement la structure phospholipidique des membranes des organismes et s'accumulent dans les lipides. D'autre part, ces substances deviennent toxiques après une oxydation enzymatique provoquant la formation de métabolites électrophiles solubles. Ces métabolites, plus réactifs que les composés initiaux, sont capables de se fixer sur l'ADN (acides nucléiques) sous forme des adduits. Si l'ADN n'est pas

réparé, ces adduits peuvent provoquer des mutations géniques donnant naissance à la formation de tumeurs (Santodonato *et al.*, 1981; Szeliga et Dippel, 1998). Plusieurs études *in vitro*, ont démontré que le biphenyle est mutagène. Des changements morphologiques et histopathologiques ont été observés dans le système urinaire (Boehncke *et al.*, 2005). Une étude *in vivo* sur la cancérogénicité a été réalisée sur des rats mâles et femelles de type F344. Dans cette étude, des rats ont reçu des doses de biphenyle de 0, 500, 1500 ou 4500 ppm (0, 38, 113 ou 338 mg/kg p.c. jour respectivement) par voie alimentaire pendant deux ans. Cette étude a prouvé une augmentation significative de l'incidence des papillomes ou des carcinomes de la vessie, chez les rats mâles seulement avec la dose élevée du biphenyle (4500 ppm). On a également signalé une augmentation significative de l'hyperplasie et de la minéralisation dans le bassinet du rein chez les deux sexes à la dose élevée. Les changements dans les paramètres hématologiques (réduction de la concentration d'hémoglobine et de l'hématocrite) ont été également observés chez les femelles allant de la dose moyenne à la plus élevée du biphenyle (500 ppm, 4500 ppm) et chez les mâles exposés à des doses élevées (4500 ppm) (Japan Bioassay Research Center, 1996). Les métabolites observés dans l'urine de rat sont principalement le 4- hydroxydiphényl et son conjugué l'acide glucuronique ainsi que de faibles pourcentages de divers métabolites (Bonnard *et al.*, 2011) (Figure I.2).

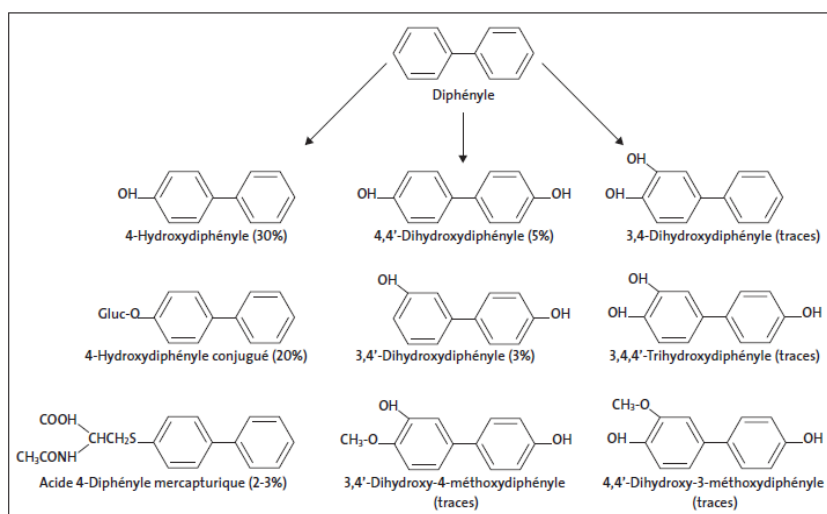


Figure I.2: Les différents métabolites du biphenyle excrétés dans l'urine des animaux (souris, jeunes rat, lapins)

Une autre étude a proposé que la formation de calculs représente un processus de carcinogenèse avec un seuil pour certains produits chimiques, y compris le biphenyle (Cohen, 2002). Il est donc intéressant de noter que les habitants qui sont situés aux régions contaminés par

les hydrocarbures (aromatiques ou halogénés) courent un grand risque pour leur santé. Par exemple, dans le Sud-Est de la Turquie, le chlorure de benzène a causé la mort de 90% des personnes qui ont été exposés à une intoxication alimentaire et l'apparition de cirrhose hépatique, de porphyrie et de troubles urinaires, arthritiques et neurologiques chez les autres. Une autre étude aux Philippines a montré qu'en 1990, l'endosulfan a été la première cause d'intoxication aiguë liée aux pesticides chez les producteurs de riz de subsistance et les applicateurs de pesticides sur les mangues. Il est souvent difficile de réduire l'exposition des travailleurs et des tiers (personnes exposées par hasard ou vivant dans le voisinage) à des substances chimiques toxiques. Par exemple, Les pêcheurs de la mer baltique, qui consomment quotidiennement du poisson contaminé par polychlorobiphényle (PCB), ingèrent une charge de 80 ng/kg de poids corporel par jour (www.efsa.eu.int/). D'après différentes études antérieures, le biphényle présente des effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine.

Il est devenu rapidement nécessaire de traiter ces pollutions. Différentes méthodes de traitement des polluants environnementaux sont à ce jour disponibles: des méthodes physiques, de remédiation biologique, des méthodes physico-chimiques (Evaporation, Incinération, Coagulation – Floculation – Flottation, Adsorption et Echange d'ions) ou chimiques (Système Fenton, Ozonation. Photocatalyse et Sonolyse). Cependant, même si ces techniques sont potentiellement efficaces (Khan *et al.*, 2004), elles sont coûteuses, peu sûres et parfois néfastes pour l'environnement (Tuli, 2007) car elles nécessitent souvent l'excavation des terres, l'utilisation de sources de chaleur, la consommation de réactifs et solvants et de nombreuses étapes de séparation avant le traitement du polluant.

Nous allons voir dans la partie suivante la méthode de remédiation biologique et en particulier la remédiation par les microorganismes (bioremédiation) car la remédiation par les plantes (phyto-remédiation) est généralement limitée aux zones occupées par les racines des plantes (Newman et Reynolds, 2004; Jouanneau *et al.*, 2005).

II.2. Bioremédiation

Certaines bactéries sont capables d'utiliser les hydrocarbures (aromatiques ou halogénés) comme unique source de carbone et d'énergie pour la synthèse cellulaire. Ces dernières

convertissent une substance métabolisable en un composé plus simple, et moins toxique que le composé d'origine (biotransformation). Il en résulte la formation du dioxyde de carbone (minéralisation) (Churchill *et al.*, 1999; Demanèche *et al.*, 2004). Selon que la bioremédiation se fait en présence ou en absence d'oxygène, nous pouvons distinguer le traitement aérobie ou anaérobie.

De nombreuses souches ont été identifiées pour leur capacité à croître sur du biphényle comme seule source de carbone en condition aérobie ou anaérobie. Parmi elles, on peut citer de manière générale: *Pseudomonas* (Catelani *et al.*, 1971; Smith et Ratledge, 1989), *Micrococcus* (Bevinakatti et Ninnekar, 1992), *Burkholderia xenovorans* LB400 (Rehmann et Daugulis, 2006), *Rhodococcus erythropolis* TA421 (Kosono *et al.*, 1997) et *Citrobacter freundii* BS2211 (Grishchenkov *et al.*, 2002). Cette dernière souche dégrade le biphényle en condition anaérobique. Les produits résultant sont un biogaz et une faible quantité de biomasse. Par rapport au traitement dans les conditions aérobies, le traitement anaérobie présente un avantage sur la possibilité de récupération de l'énergie sous forme de biogaz. En effet, le traitement anaérobie peut être divisé en deux étapes: (i) l'hydrolyse des hydrocarbures aromatiques par l'action de bactéries fermentatives et acidogènes en acides gras à chaînes courtes, éthanol, CO₂ et H₂ et (ii) la gazéification (ou méthanogénèse) des produits intermédiaires en CH₄ et CO₂ par l'action de bactéries méthanogènes (Abbasi et Abbasi, 2010; Demirbas, 2009; Rittmann, 2008).

La bioremédiation des hydrocarbures aromatiques dans les conditions aérobies est réalisée par les microorganismes (procaryotes ou eucaryotes) possédant des systèmes enzymatiques différents, tels que les dioxygénases, les monooxygénases et les lactases (Kuony, 2005).

Dans le cadre de cette recherche, le biphényle a été choisi comme représentant de la famille de faible poids moléculaire. L'équipement enzymatique pour la dégradation du biphényle se retrouve dans le chromosome ou au niveau du plasmide (Mhiri *et al.*, 1997). Mhiri et ses collaborateurs ont démontré que les souches *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Burkholderia xenovorans* LB400 possédant au moins les 4 gènes *bph* (biphényle) nommés *bphABCD*, regroupés sous le même opéron, pouvaient dégrader le biphényle. L'action de dégradation débute (Figure I.3) par l'attaque du noyau aromatique du biphényle (introduction de deux atomes d'oxygène). Celui-ci va subir une première dioxygénation avec l'enzyme 2,3-dioxygénase (*BphA*) au niveau des carbonés 2 et 3 ou 5 et 6 car la molécule de biphényle est symétrique. Ceci lui donne un composé de

type *cis*- dihydrodiol (Cerniglia, 1992). En effet, la dioxygénase est un complexe enzymatique constitué d'une sous unité réductase (RED), d'une sous unité ferrédoxine (FER) et d'une protéine fer- soufre (ISP pour Iron Sulfur Protein) (Figure I.4) (Haigler et Gibson, 1990a; Haigler et Gibson, 1990b ; Furusawa *et al.*, 2004; Senda *et al.*, 2007).

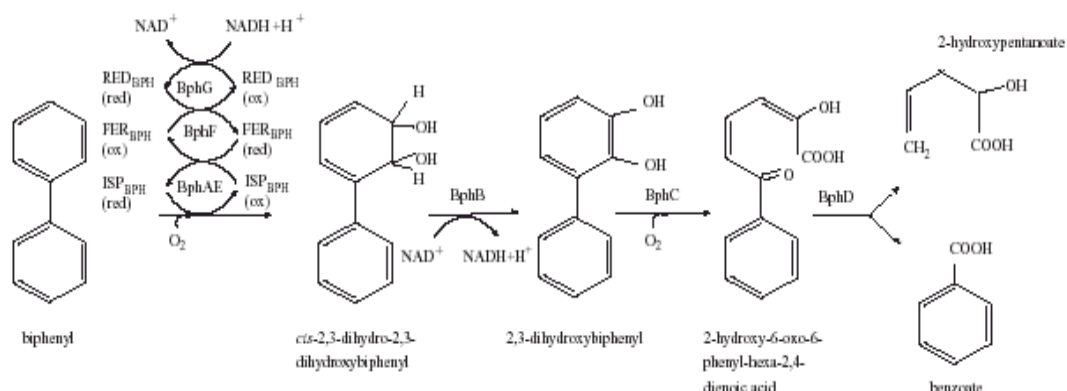


Figure I.3: schéma catabolique du biphenyle en benzoate de *C. testosteroni* B-356 et de *Burkholderia* sp. LB400. Les enzymes des étapes (1) BPDO sont encodés par *bphAEFG* ; (2) *Cis*-2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényl 2,3-dehydrogenase sont encodés par *bphB*; (3) 2,3-dihydroxybiphényl 1,2-dioxygénase sont encodé par *bphC* ; (4) HOPDA hydrolase sont encodés par *bphD*. (Sylvestre, 2004).

Ensuite, une déshydrogénase (*BphB*) prépare le terrain pour la seconde dioxygénation réalisée par la 1,2-dioxygénase (*BphC*). Cette enzyme provoque le clivage entre les carbones 1 et 2 (le clivage extradiol en *mé*ta) du noyau dihydroxylé pour donner le «*mé*ta ring-fission product». Ce produit est hydrolysé par une hydratase (*BphD*) pour donner un hydrocarbure à 5 carbones ainsi qu'une molécule d'acide benzoïque. Par contre, la minéralisation est assurée par les gènes *bphEFG* quand ils sont présents dans la bactérie. Dans le cas contraire, c'est l'environnement bactérien qui s'en charge (Mhiri *et al.*, 1997). L'acide benzoïque pourrait être plus ou moins biodégradé ou s'accumuler dans la bactérie selon les souches. Il subit d'abord l'action de la 1,2-dioxygénase ensuite celle de la déshydrogénase pour donner du catéchol. Suivant que le clivage du cathécol se fait en *ortho* (clivage intradiol) ou en *mé*ta (clivate extradiol), on peut avoir la minéralisation.

II.2.1. Les dioxygénases

Chez les bactéries, la bioremédiation des hydrocarbures aromatiques est réalisée par deux étapes qui consistent en une réaction d'incorporation des deux atomes d'oxygène sur le noyau aromatique. Ceci permet, en premier lieu, la dihydroxylation, et en deuxième lieu, l'ouverture finale du noyau aromatique. Ces deux opérations sont catalysées par des enzymes de type dioxygénase. Selon le type de la réaction qu'elles catalysent, il existe deux types de dioxygénases (Bertini *et al.*, 1996; Butler et Mason, 1997) qui ces deux types constituent deux familles d'enzymes différentes sur le plan de la séquence en acides aminés (Harayama *et al.*, 1992).

II.2.1.1. Enzymes de type I

C'est par le travail de Gibson et ses collaborateurs que l'oxydation du benzène a été décrite pour la première fois (Gibson *et al.*, 1968). Ce type d'enzyme est également nommé dioxygénases hydroxylantes. Ces dernières ont besoin du cofacteur enzymatique NAD(P) H comme donneur d'électrons pour incorporer deux groupements hydroxyle en position *ortho* l'un par rapport à l'autre dans le noyau aromatique du substrat. En effet, la réductase (RED) obtient deux électrons de son cofacteur NAD(P)H qu'elle transmet un par un à la ferrédoxine (FER), qui les transporte à la dioxygénase (ISP $\alpha\beta$) pour activer l'oxygène et réaliser la réaction de dihydroxylation du substrat (Figure I.4).

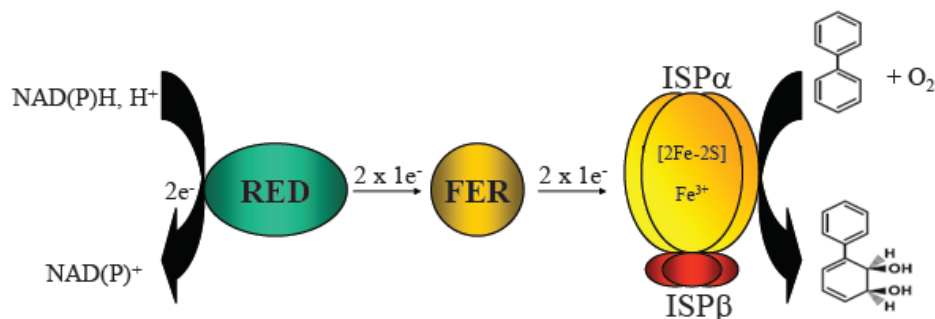


Figure I.4: La dihydroxylation du substrat par dioxygénases hydroxylantes (Kuony, 2005)

Les dioxygénases hydroxylantes sont réparties en trois grands groupes:

- Le premier groupe contient deux sous-unités ; une réductase à flavine contenant un groupe [2Fe-2S] et une oxygénase terminale ou ISP (iron sulfur protéine).

- Le deuxième groupe comporte trois sous-unités; une réductase à flavine, une ferrédoxine qui possède un centre [2Fe-2S] et une oxygénase terminale.
- Le troisième groupe comprend 4 sous-unités; une flavoprotéine réductase et une ferrédoxine [2Fe-2S] qui assurent le transfert d'électrons et deux sous-unités α et β .

II.2.1.2. Enzymes de type II

Les dioxygénases qui ouvrent le noyau aromatique dihydroxylé suite à une dihydroxylation sont classées selon le mode de clivage du noyau aromatique qu'elles catalysent. Nous avons deux types:

- L'intradiol dioxygénase lorsque la fission se fait en *ortho* (coupure intradiol) par exemple les catéchol 1,2-dioxygénases; ces enzymes contiennent un ion ferrique Fe^{3+} (Pascaly *et al.*, 2001).
- L'extradiol dioxygénase pour une fission en *méta* (coupure extradiol) par exemple les catéchol 2,3-dioxygénases; ces enzymes contiennent un ion ferreux Fe^{2+} (Vetting et Ohlendorf, 2000).

Dans le cas de la plupart des bactéries le substrat aromatique est converti en catéchol. Celui-ci peut alors être clivé selon deux voies sont possibles: la voie *méta* où le catéchol est clivé en acide semi-aldéhyde 2-hydroxymuconique et ou la voie *ortho* où le catéchol est clivé en acide cis, cis-muconique.

II.2.2. Mécanisme réactionnel de catéchol 1,2-dioxygénase

Les catéchol 1,2-dioxygénases sont des protéines (isozymes) constituées de sous-unités ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$) homodimériques /ou ($\alpha\beta$) hétérodimériques de masse moléculaire de 30,5 à 34 kDa, contenant un ion ferrique Fe^{3+} (Furusawa *et al.*, 2004) (Figure I.5).

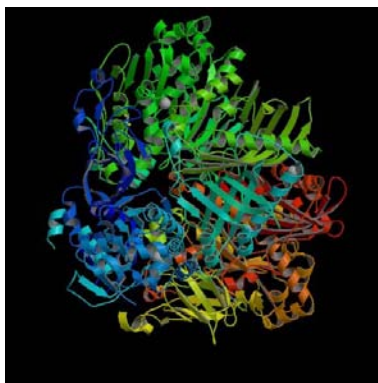


Figure I.5 : Structure 3D d'une cathécol 1,2-dioxygénase de *Rhodococcus sp.* RHA1 contient un cluster [2Fe-2S] et les ions de Fe^{3+} (Furusawa *et al.*, 2004)

Le catéchol 1,2-dioxygénase catalyse l'oxydation du catéchol par deux étapes (Pelmont, 1993): En premier lieu, l'oxygène se lie avec le fer pour former un peroxyde. En deuxième lieu, la cétonisation du substrat forme une structure qui le rend très oxydable. L'action de l'oxygène entraîne le clivage du cycle aromatique (acide cis, cis-muconique) (Figure I.6).

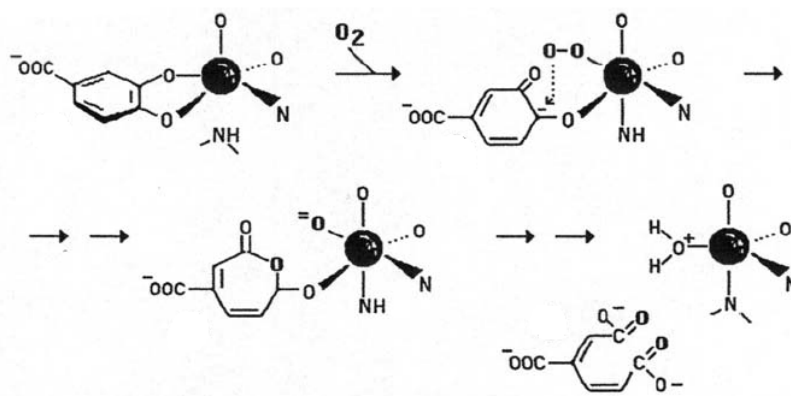


Figure I.6: Mécanisme du clivage de cycle aromatique par une cathécol 1,2-dioxygénase (Pelmont, 1993)

II. 3. Optimisation de la bioremédiation réductive

II.3.1. Source de carbone complémentaire

En général, les polluants sont des substrats toxiques pour les microorganismes surtout si la concentration des polluants est élevée (Wang et Low, 1999). Cependant, l'addition des composés non toxiques peut stimuler la viabilité des cellules et améliorer la bioremédiation des composés toxiques (Sridevi *et al.*, 2011; Aldric, 2009; Kotresha et Vidyasagar, 2008; Borja *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2002; Stampfer *et al.*, 2003; Lob et Tar, 2000; Topp et Hanson, 1990). On peut

citer comme source de carbone, facilement assimilable, le glucose, le xylose, le pyruvate, l'éthanol ou l'acétate.

L'impact de l'éthanol et du glucose sur la bioremédiation des polluants est controversé dans la littérature (Papanastasiou et Maiwer ,1982; Satsangee et Ghosh ,1990; Kar *et al.*, 1996; Corseuil *et al.*, 1998; Lovanh *et al.*, 2002; Kotresha et Vidyasagar, 2008). En effet, l'impact de l'éthanol et du glucose sur la bioremédiation des polluants dépend de leurs concentrations dans le milieu de la culture. Dans ce cadre, Corseuil *et al.* (1998) ont montré que des concentrations élevées en éthanol peuvent entraîner une limitation en oxygène. Etant préférentiellement dégradé par rapport aux composés aromatiques, l'éthanol conduit à une dégradation diauxique.

Lovanh *et al.* (2002) ont trouvé que cet effet négatif peut être contrecarré par une augmentation de la charge bactérienne conduisant à des mécanismes de bioremédiation plus rapides. De même, Papanastasiou (1982) a signalé que la répression catabolique du glucose pourrait induire l'inhibition d'autres substrats. Aldric (2009) a également trouvé que la quantité de biomasse de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 augmente avec l'augmentation de concentration en glucose quant au pourcentage de bioremédiation d'isopropylbenzène, celui-ci augmente avec l'augmentation de la concentration en glucose jusqu'à 1g puis diminue. Ceci pourrait être expliqué par le fait que *Rhodococcus erythropolis* T902.1 préfère utiliser le glucose quand celui-ci se trouve à des concentration supérieure à 1g et dès lors la bioremédiation d'isopropylbenzène devient très faible. Kotresha et Vidyasagar (2008) ont également montré que la présence de 0.5g/L en glucose comme co-substrat diminue le taux de la biodégradation de phénol par *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996.

II.3.2. Impact des métaux

II.3.2.1. Définition des métaux lourds

Les définitions des métaux lourds sont multiples. D'un point de vue physique, on appelle en général métaux lourds les éléments métalliques naturels, ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 grammes par cm³ (Nies, 1999). Les métaux lourds appartiennent à la quatrième ligne de la classification périodique (Tableau

I. 2). En partant du titane et du vanadium, il sera facile de repérer leur position dans la classification périodique.

Tableau I. 2: Tableau périodique des éléments

1																	18	
1	H																	He
2	Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
3	Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
6	Cs	Ba	La-Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
7	Fr	Ra	Ac-Lr	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Uut	Fl	Uup	Lr	Uus	Uuo
Copyright © 2014 by Eni Generale																		
Lanthanides			57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	
			La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	
Actinides			89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	
			Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	Lr		
			Point triple de l'eau (273.16 K, 0.01 °C)															

D'un point de vue biologique, on distingue deux groupes de métal en fonction de leurs impacts physiologiques et toxiques: métaux essentiels et métaux toxiques. En effet, les métaux essentiels se trouvent en proportion très faible dans les cellules vivantes. Leur importance biologique réside dans leur pouvoir d'oxydoréduction. Les métaux les plus importants sont le manganèse, le fer, le cobalt, le nickel et le cuivre. Le vanadium, le molybdène et le tungstène interviennent dans le monde vivant essentiellement sous forme de cations, malgré quelques exceptions par association avec l'oxygène comme dans les anions molybdate et vanadate (Pelmont, 2005). Divers métaux sont indispensables aux organismes vivants comme cofacteurs (catalyseurs enzymatique). Par exemple, le couple $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ est utilisé dans divers réactions d'oxydo-réduction par de nombreuses enzymes (Linder *et al.*, 1999), le nickel est un cofacteur des uréases (Dosanjh *et al.*, 2007) et le zinc intervient dans les grandes voies métaboliques, soit comme cofacteur, soit comme constituant de la structure des enzymes (phosphatase alcaline, glutamate deshydrogénase, protéinase, peptidase) (Vallee et Auld, 1990; Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Le cobalt est un cofacteur chez certaines enzymes du métabolisme de la vitamine B12 (Wang *et al.*, 2003) et le fer

est un cofacteur chez les dioxygénases et monooxygénases (Binda *et al.*, 1998; Stratchan *et al.*, 1998; Gibson et Parales, 2000; Furusawa *et al.*, 2004; Jakoncic *et al.*, 2007).

II.3.2.2. Potentiel de toxicité

Certains métaux peuvent être toxiques lorsqu'ils dépassent une certaine limite. Par exemple, Walther *et al.* (1999) ont prouvé qu'une concentration 10^{-4} M en Zn est toxique pour des cellules pulmonaires en culture. En effet, ces doses toxiques provoquent une diminution de la synthèse protéique et du glutathion total de 20% et d'une augmentation du glutathion oxyde. Afin d'avoir un impact sur les cellules vivantes, le métal doit être sous une forme soluble et à une faible concentration. Cependant de nombreux métaux lourds, utilisés même à de faibles concentrations, ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd), ainsi que l'arsenic (As) et l'antimoine (Sb). La toxicité de ces métaux dépend de leurs caractéristiques physico-chimiques (solubilité, valence, taille, potentiel rédox). Ces caractéristiques sont liées aux pH, à la salinité, au potentiel rédox... du milieu.

Le problème principal avec ces métaux est qu'ils ne peuvent pas être biodégradés et persistent donc pendant de longues périodes dans l'environnement. Leur présence peut être naturelle (Bourrelier et Berthelin, 1998) ou anthropogénique (Singh *et al.*, 2003). Les mécanismes de la toxicité des ions métalliques lourds ont été largement étudiés dans l'inhibition des activités enzymatiques, dans l'altération de la structure des acides nucléiques, dans le stress oxydant et dans l'interaction directe avec les composants cellulaires (formation de radicaux libres) (Splittgerber et Tappel, 1979; Aust *et al.*, 1985; Sagripanti *et al.*, 1991; Stohs et Bagchi, 1995; Walther *et al.*, 1999; Waisberg *et al.*, 2003; Hengstler *et al.*, 2003; Guiraud, 2003; Sensi et Jeng, 2004; Krumschnabel *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Filipic *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2007). Par exemple, les ions métaux de transition Cu^{2+} se fixent sur les groupements phosphates d'ADN empêchant la transcription ou la traduction des gènes (Sagripanti *et al.*, 1991). Les métaux de transition, notamment le cuivre, jouent un rôle primordial dans la génération des espèces actives de l'oxygène lors de la catalyse de la réaction de Haber-Weiss (Halliwell et Gutteridge, 1984; Fridovich, 1986), selon l'équation I.1.



Cette équation, appelée réaction de Fenton, est une des sources majeures de la production des radicaux hydroxyles *in vivo* et *in vitro*.

Le zinc peut s'accumuler et devenir toxique pour la cellule. En effet, le Zn en excès inhibe les glutathion réductase et peroxydase (enzymes responsables des défenses antioxydantes). Cette inhibition est réalisée par interaction du Zn avec les groupements thiols localisés dans les sites actifs (Splittgerber et Tappel, 1979). Les études de Predki et Sarkar (1994) ont prouvé que le mécanisme de toxicité du cadmium (Cd) est lié au déplacement du cuivre et du fer moléculaire. Ces cations déplacés vont ensuite catalyser la production des espèces réactives de l'oxygène.

II.3.2.3. Mécanismes de résistance

Le fer, cuivre, nickel, cobalt et le zinc, sont des éléments mineurs, essentiels à la plupart des organismes; bactéries, plantes, animaux, et également pour l'homme. Ces éléments jouent un rôle vital dans de nombreux processus biologiques. Cependant, ils ont un potentiel de toxicité non négligeable. Toute fois, il existe deux voies générales, empruntées par les micro-organismes, pour s'adapter à des concentrations toxiques en métaux lourds (Mergeay, 1997). Premièrement, certains micro-organismes peuvent survivre (i) grâce à l'utilisation des propriétés intrinsèques de la cellule ou plus précisément à la structure de la paroi cellulaire, (ii) à la production de polysaccharides extracellulaires et (iii) grâce à leur capacité à lier ou à précipiter des métaux à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. La seconde possibilité est liée au fait que les micro-organismes ont développé de nombreux mécanismes de régulation afin de contrôler leur concentration intracellulaire (Nies, 1999), via notamment la biominéralisation (séquestration, biosorption, immobilisation), les efflux actifs ou la conversion enzymatique (Silver *et al.*, 1993; Silver et Phung, 1996; Touati, 2000; Podda *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Blindauer *et al.*, 2002; McHugh *et al.*, 2003; Kraemer, 2004). La conversion enzymatique reste parmi les mécanismes les plus efficaces pour transformer rapidement les métaux et éviter leurs effets toxiques. Elle consiste à convertir le métal en une forme moins toxique ou en une autre forme qui peut être plus facilement et plus rapidement évacuée de la cellule. Par exemple, les ions mercuriques Hg^{2+} , qui sont extrêmement toxiques pour les bactéries à cause de leurs interactions avec les groupes thiol (-SH) des protéines, seront réduits par la réductase MerA en Hg^0 non toxique et qui se volatilise hors de la

cellule. MerA est une métalloenzyme très spécifique qui fonctionne seulement avec Hg^{2+} et les composés organomercuriques (Silver and Phung, 1996; Belzile *et al.*, 2006).

Un des mécanismes qui règle les besoins en fer est la synthèse de sidérophores par des bactéries. En effet, les sidérophores sont des ligands organiques, de faible poids moléculaire et à hautes affinités pour les ions métalliques de fer (Kraemer, 2004). Cependant, l'utilisation des sidérophores nécessite beaucoup d'énergie (Monchy, 2007).

Les biocapteurs également sont des systèmes ou mécanismes basés sur l'utilisation d'organismes vivants ou de réactions, telles que la biocatalyse (enzymes) et la bioaffinité (anticorps et acides nucléiques), issues de ces organismes afin de détecter, de transmettre et d'enregistrer les informations relatives à un changement physiologique ou biochimique en relation avec les conditions du milieu (Elad *et al.*, 2008; van der *et al.*, 2010; Brognaux, 2014). Ces biocapteurs sont formés par un composant biologique, qui permet de reconnaître spécifiquement ou non le changement, et d'un transporteur qui fournit le signal (Geiselhart *et al.*, 1991).

En effet, Les familles de transporteurs sont formées, eux même, par deux sous types:

- Les transporteurs primaires: ATPases de type P (ou P-ATPases) appelées ainsi à cause de la formation d'une Phosphoenzyme (P) intermédiaire dans le cycle de réaction. Elles consomment l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour transférer des ions métalliques contre le gradient du cytoplasme au périplasma (Hynninen, 2010). Ce type de protéine se retrouve chez tous les organismes vivants, Elles sont également connues car, chez l'homme, des mutations de P-type ATPases transportant le cuivre sont responsables des maladies de Wilson (surcharge en cuivre) et Menkes (déficit en cuivre) (Okkeri *et al.*, 2002).
- Les transporteurs secondaires: les « *Cation Diffusion Facilitator* » ou (CDF) et les « *Resistance-Nodulation-Cell Division* » ou (RND) sont des transporteurs chémosmotiques (Nies, 2003; Eswaran *et al.*, 2004; Silver et Phungle., 2005; Hynninen, 2010). Par exemple, les protéines CDF utilisent le gradient d'ions potassium (Monchy, 2007; Naidu *et al.*, 2008). Les protons et les ions potassium

rentrent dans la cellule là où le pH est le plus élevé. L'énergie récupérée permet de faire sortir les ions métalliques de la cellule contre leur gradient, l'échange étant probablement électro-négativement neutre.

II.3.2.4. Effet des métaux sur la bioremédiation des polluants

Plusieurs études ont montré que la cinétique de la réaction de bioremédiation pourrait être améliorée en présence de faibles concentrations en métaux (Sterritt et Lester, 1980; Hughes *et al.*, 1989; Zhang, 2003; De Windt *et al.*, 2005; Rehwann et Dauglis, 2006; Olle *et al.*, 2006; Bunesco *et al.*, 2008, Chora, 2008; Kotresha et Vidyasagar, 2008; Ansari *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008; Aldric, 2009; Forrez *et al.*, 2011; Murugesan *et al.*, 2011; Sridevi *et al.*, 2011). En particulier plusieurs articles ont montré l'effet positif du palladium lié à d'autres éléments métalliques ou non (Kuriyama *et al.*, 2003; De Windt *et al.*, 2005; Murugesan *et al.*, 2011). Windt et ses collaborateurs (2005) ont démontré que la bactérie *Shewanella oneidensis* était capable de déchlorer de PCB produisant, dans les conditions anaérobies, des nanoparticules de palladium qui recouvrent sa surface (figure I.7). Le palladium est retenu à la surface par les polysaccharides produit par la bactérie. Ces polymères à proximité pourraient aussi jouer le rôle de piège et favoriser l'adhésion des PCB à la surface de la bactérie comme dans le cas des nanoparticules. Les PCB pourraient ainsi être directement en contact avec les nanocatalyseurs de Pd pour la déchloration totale. Le palladium joue le rôle de catalyseur chimique dans la réaction de déchloration des molécules organiques en présence d'hydrogène (De Windt *et al.*, 2005).

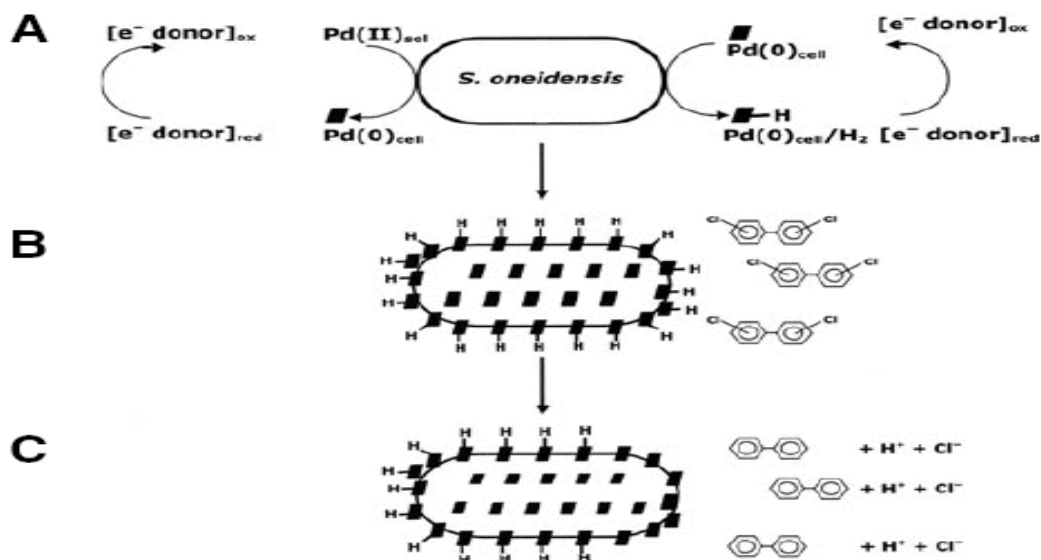


Figure I.7: Réaction de déchloration par les nanoparticules de Palladium (Pd(0)) à la surface des cellules de *Shewanella oneidensis*. (A) Réaction d'oxydoréduction couplant la réduction de Pd(II) soluble avec l'oxydation de donneurs d'électrons comme le lactate. Les Pd(0) précipitent et se lient à la surface de cellules. La réactivité de ces particules nanocatalyseurs est obtenue en les chargeant d'hydrogène. Les radicaux d'hydrogène proviennent d'un donneur d'électron comme H₂. (B) Les PCB entrent en contact avec les nanoparticules de palladium chargées d'hydrogène. (C) La réaction catalytique entre les PCB et les radicaux d'hydrogène du palladium a comme conséquence la déchloration du composé chloré (De Windt *et al.*, 2005)

Une étude récente a prouvé que l'utilisation de bionanocatalyseurs de palladium en présence d'hydrogène pur permettait une déchloration rapide de 1 ppm de PCB en 24 à 48h (Kuriyama *et al.*, 2003). De plus, Murugesan *et al.* (2011) ont trouvé que la présence 0.1 g/L de nanoparticules (nFe-Pd) bimétalliques palladium-fer active la bioremédiation de triclosan (2, 4, 40-trichloro-20-hydroxydiphényl éther) (TCS) par *Sphingomonas*.

De nombreuses études utilisant différentes formes de fer (sel, complexe de fer, nanoparticules de fer être publiées) (Andrews et Novak, 2001; Dinkla *et al.*, 2001; Diez *et al.*, 2005; Bunescu *et al.*, 2008, Choroa, 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 Fe₃O₄ sur la cinétique de la désulfuration de dibenzothiophene (DBT) par *Rhodococcus erythropolis* IGST8 en augmentant la perméabilité de la membrane vis-à-vis du polluant. Comme la perméabilité est accrue, les réactifs à désulfurer et les produits de la réaction diffusent plus rapidement à travers la

membrane bactérienne. De même, Henneble *et al.* (2008) ont mentionné, pour une souche de *Geobacter* une vitesse de déchloration du tétrachlorure (CCl_4) 260 fois plus rapide en présence de nanoparticules d'oxyde de fer. Andrews et Novak (2001) ont montré que, dans les conditions anaérobies, le tétrachlorure (CCl_4) disparaît très rapidement en présence des ions ferreux (Fe^{2+}) en utilisant la bactérie *Methanosarcina thermophila*. D'autres recherches ont montré que le contact entre des micro-organismes et les nanoparticules de fer permet d'augmenter l'activité de la bioremédiation des solvants organiques chlorés (Zhang, 2003). Choroa dans sa thèse (2008), a étudié la comparaison de la bioremédiation de l'ABT (2-aminobenzothiazole) par *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 en présence d'une concentration de 10^{-3} M des différents complexes organiques de fer: aminopolycarboxylique de fer ou (FeNTA), éthylène diamine dissuccinique de fer ou (FeEDDS) et citrate de fer (figure I.8). D'après Choroa (2008), les deux complexes de fer FeNTA et FeEDDS conduisent à une augmentation importante de la vitesse de bioremédiation de l'ABT grâce à des constantes de complexation ($\log K$) élevées et égales respectivement à 15.9 et 22.0 par rapport à celle de citrate de fer (5.4). Ces complexes sont stables et solubles dans une gamme de pH où les bactéries sont actives. En revanche, les résultats obtenus avec le citrate de fer sont proches de ceux obtenus chez le témoin en absence des complexes de fer (NTA et EDSS) parce que le citrate de fer est un complexe qui n'est pas stable à un pH basique. Après décomplexation, le fer précipite rapidement sous forme de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ce qui empêche son utilisation par les cellules. Les résultats obtenus par Choroa confirment ceux obtenus par Bunescu (2006). Ce dernier a montré, d'une part, que les cinétiques de la bioremédiation de BT (benzothiazole) par *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 sont accélérées à un pH de 6.2 par rapport au pH 7.5 en présence de 3×10^{-3} M en $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. D'après Bunescu (2006), le pH joue un rôle important dans la bioremédiation en présence de sels de fer ce qui peut expliquer le mécanisme impliqué dans les interactions fer/bactéries. Les microorganismes sont capables d'utiliser le fer sous forme soluble uniquement. En fait à $\text{pH} > 7$ le fer commence à précipiter sous forme d'hydroxyde $\text{Fe}(\text{OH})_3$ et devient indisponible pour la bactérie. Par contre les sels de Fe^{3+} sont plus solubles à un pH acide.

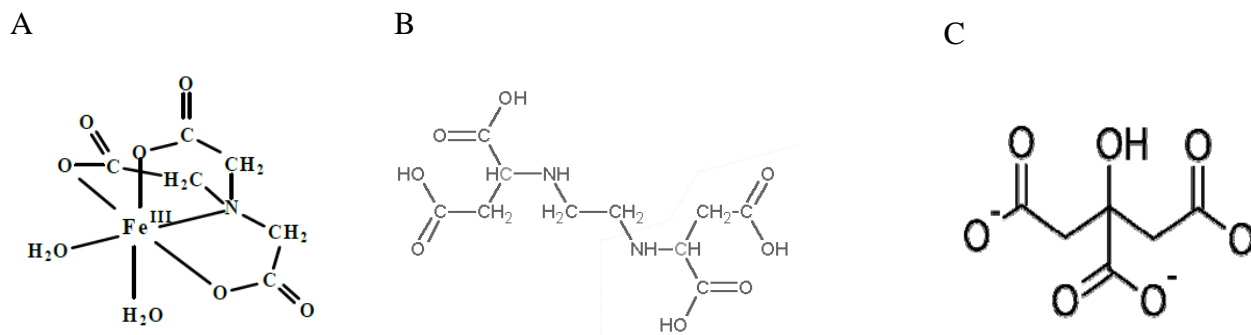


Figure I.8: Structure de différents complexes organiques: A. aminopolycarboxylique de fer (ou FeNTA), B. éthylène diamine dissuccinique (EDDS), C. Structure du citrate (Chorao, 2008)

D' autre part, Bunescu *et al.* (2008 a) ont étudié l'influence de la concentration en FeNTA sur la cinétique de bioremédiation de l'ABT (2-aminobenzothiazole) (Figure I.11). Ils ont montré que le taux de la bioremédiation d'ABT augmente avec l'augmentation de la concentration de FeNTA. De plus, ils ont remarqué que l'addition d'une concentration 10^{-4} M de FeNTA permet de multiplier d'un facteur supérieur à 3 l'efficacité de transformation d'ABT. Un excès de fer n'a pas d'impact important pour l'accélération de la transformation d'ABT (quand la concentration en complexe de fer passe de 5×10^{-4} M à 10^{-3} M) (Figure I.9).

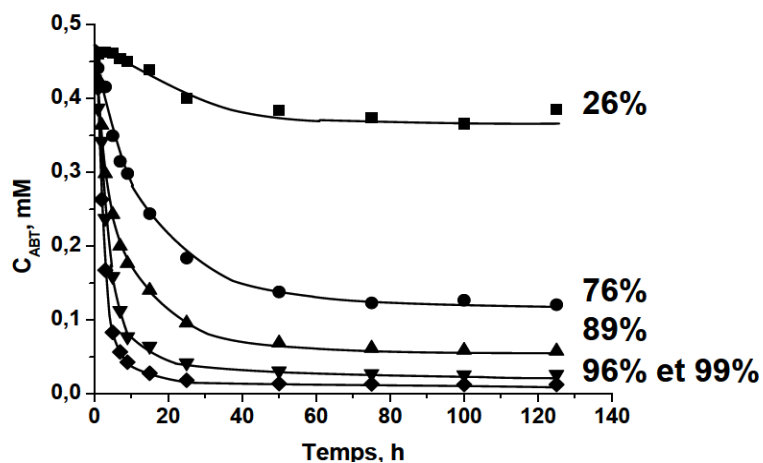


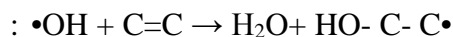
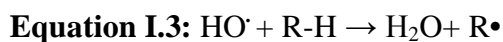
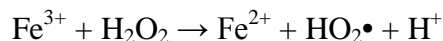
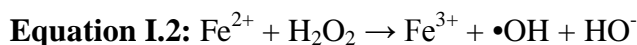
Figure I.9: Evolution de la concentration d'ABT en présence *Rhodococcus rhodochrous* avec différentes concentrations de FeNTA (■ 0, ● 0.1, ▲ 0.2, ▼ 0.5, ◆ 1.0 mM)

Plusieurs études sont rapportées dans la littérature quant à l'effet des métaux sur des enzymes purifiées (Wackett *et al.*, 1988; Candidus *et al.*, 1994; Schach *et al.*, 1995; Haroune *et al.*, 2002;

Mastumura *et al.*, 2004; Nadaf et Ghosh, 2011). Par exemple, Candidus *et al.* (1994) ont trouvé que l'activité de la catéchol 2,3-dioxygénase isolée de *Rhodococcus rhodochrous* CTM augmente d'un facteur allant jusqu'à 7 fois en présence de fer (Fe^{2+}). Cependant, l'activité de la catéchol 1,2-dioxygénase est inhibée complètement en présence de 10^{-3} M et 10^{-2} M des cations (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^+) (Nadaf et Ghosh, 2011). En effet, *in vitro*, les enzymes dioxygénases purifiées perdent leurs activités, parce que le fer (Fe^{2+}) complexé à la protéine s'oxyde en Fe^{3+} lors de la purification (Wackett *et al.*, 1988). Cette observation confirme les résultats de Schach *et al.* (1995). Ces derniers ont trouvé qu'en présence de Fe^{2+} ou d'un agent réducteur, l'activité de l'enzyme est rétablie.

L'utilisation d'autres métaux a montré une amélioration de la bioremédiation des polluants par les bactéries (Chun-Wei et Barbara, 1996; Yoo *et al.*, 2004; Kotresha et Vidyasagar, 2008; Sridevi *et al.*, 2011). Kotresha et Vidyasagar (2008) ont déclaré que la bioremédiation du phénol par *P.aeruginosa* MTCC 4996 a atteint une valeur maximum en présence d'une concentration de 2×10^{-3} M en zinc. Chun-Wei et Barbara (1996) ont montré que l'utilisation de 0.01 ppm en Cd^{2+} , Cu^{2+} et Cr^{6+} active la bioremédiation de 3-chlorobenzoate et 2-chlorophenol par les consortiums anaérobies. Sridevi *et al.* (2011) ont montré l'influence de différents paramètres sur la bioremédiation du phénol. Par exemple, le glucose, fructose, galactose, D-xylose et le sucrose comme source de carbone supplémentaire, le NaNO_3 et le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ comme source d'azote inorganique et enfin l'addition de faible concentration des métaux (Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}). Leurs résultats ont montré que l'utilisation d'une concentration de 0.0195g/L en Mn^{2+} , de 0.8229g en glucose et de 1.5183g/L en sulfate d'ammonium a amélioré la bioremédiation du phénol par *Pseudomonas putida* (NCIM 2102). En effet, 98.24 % du phénol a été dégradé.

Par ailleurs, différents exemples de la littérature ont montré l'intérêt de l'utilisation des métaux (Fe, Cu, Ti, Ni, Mn, Co, Al, Zn, Zr, Ce et Ru) dans des traitements chimiques des eaux usées (Système Fenton, Ozonation et Photocatalyse) (Andreozzi *et al.*, 1996; Delanoë *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2004; Daniele *et al.*, 2006; Karunakaran *et al.*, 2005; Zhai *et al.*, 2007; Siedlecka *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2008; Zhang, 2008). Le mécanisme de la dégradation abiotique des polluants est un mécanisme radicalaire utilisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme agent oxydant en présence du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ selon la réaction de Fenton (Sève et Antonini, 2000).



Où R désigne un groupement organique.

Les radicaux hydroxyles $\text{HO}\bullet$ et $\text{HO}_2\bullet$ sont ensuite capables de réagir avec des polluants (Canizares *et al.*, 2007; Leon *et al.*, 2008). Ces radicaux formés, notamment les $\bullet\text{OH}$ (Equation I.3) possèdent un potentiel d'oxydoréduction élevé qui induit la décomposition des composés organiques suivant un mécanisme radicalaire (Pignatello *et al.*, 2006).

II.4. Nanoparticules

II.4.1. Définition

Le préfixe nano vient du grec qui signifie nain, et un milliardième (10^{-9}) de particule. Le terme nanoparticules (NP) était utilisé pour décrire des particules, qui ont une taille comprise entre 1 et 100 nm (Dombu et Youta, 2012).

Les nanoparticules sont groupées en deux classes en fonction de leur origine:

- les nanoparticules naturelles, sont fabriquées dans la nature, les cendres volcaniques, la fraction fine du sable de désert, les poussières ultrafines, les grains de pollen, les virus (10 à 60 nm) et l'ADN avec un diamètre de l'ordre de 2.5 nm.
- les nanoparticules anthropiques, produites par l'homme, sont divisées en deux catégories: les nanoparticules anthropiques non-intentionnelles, telles que les fumées de diesel, les fumées de soudage et les nanoparticules anthropiques intentionnelles (synthétiques) par exemple, les nanoparticules d'argent (antibactérienne) (Pal *et al.*, 2007), les nanoparticules de silice, d'oxyde de titane et d'oxyde de zinc. Elles sont principalement utilisées pour le traitement d'eau (TiO_2), dans les crèmes solaires, comme pigments pour la peinture (TiO_2 , ZnO), dans les plastiques et le caoutchouc en tant qu'additif et agents actifs (SiO_2) (Wagner *et al.*, 2009).

Les nanoparticules entrent dans un large champ de recherche (biologique, électronique, magnétique, optique, mécanique et structurale) en raison de leurs propriétés physicochimiques, leurs tailles, leurs charges de surfaces et leurs réactivités (Zhai *et al.*, 2006). De plus, chacune de ces propriétés leur confère des propriétés uniques et particulières qui permettent leurs applications dans plusieurs domaines, par exemple les nanoparticules dans le domaine environnemental sont utilisées pour la purification de l'eau, le recyclage, les pesticides, les fertilisants et la dépollution (Zhang, 2003; DeWindt *et al.*, 2005; Zhai *et al.*, 2006; Pal *et al.*, 2007, Murugesan *et al.*, 2011; Beckers *et al.*, 2013).

II.4.2. Toxicité des nanoparticules

L'utilisation fréquente des nanoparticules dans différentes applications et domaines met l'accent sur la question de la toxicité des nanoparticules et les méthodes sécuritaires de travail qu'il faut mettre en œuvre. Dans une revue de littérature, de nombreuses études ont mis en évidence la toxicité des nanoparticules sur les organismes et en particulier l'être humain (Knaapen *et al.*, 2004; Oberdörster *et al.*, 2005a,b; Kagan *et al.*, 2006; Hanai *et al.*, 2009). Oberdörster *et al.* (2005b) ont montré que la toxicité des nanoparticules dépend de deux facteurs. D'une part, de la concentration et de la durée de l'exposition aux nanoparticules et d'autre part, de leur structure, parce que chaque organisme montre un comportement spécifique vis-à-vis de chaque structure différente de ces matériaux.

En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont démontré un lien important entre l'exposition aux particules de dimensions nanométriques et le développement de maladies professionnelles. Ostiguy *et al.* (1998), Hart *et al.* (2006) et Garshick *et al.* (2004) ont trouvé une relation entre l'exposition aux émissions de diesel et différentes maladies cardiovasculaires, neuropsychologiques, génétiques en plus des cancers de la vessie et des poumons chez les travailleurs exposés. Pekkamén *et al.* (2002) et Mills *et al.* (2009) ont aussi montré une relation directe entre les dimensions nanométriques et les problèmes respiratoires et cardiovasculaires chez l'Homme. Des études sur des mineurs du charbon exposés quotidiennement à des nanoparticules, ont démontré l'accumulation de poussières au niveau du foie et de la rate (Donaldson, 2005).

II.4.3. Procédés de synthèse

Les nanoparticules peuvent être synthétisées par différents procédés: les procédés chimiques, procédés physiques et les procédés mécaniques (BSI, 2005; Busnaina, 2007; Regalbuto, 2007; ICON, 2008).

* Procédés mécaniques:

- La consolidation et la densification;
- La forte déformation par torsion, laminage ou friction (oxydes métalliques).

* Procédés physiques:

- La synthèse au plasma ou des méthodes à arc électrique (oxydes métalliques);
- Le recuit à basse température (alliages métalliques et intermétalliques complexes avec trois à cinq éléments à base d'Al, de Zr et de Fe.);
- Le dépôt physique en phase vapeur (des dépôts de TiN, CrN, (Ti, Al)N).

* Procédés chimiques:

- Les réactions par coprécipitation chimique ou hydrolyse (métaux et oxydes métalliques);
- Les réactions de précipitation en milieu liquide (la plupart des métaux et oxydes);
- Les réactions en milieu solide (la plupart des métaux et oxydes);
- Les techniques sol-gel (la plupart des oxydes).

Dans ce travail, la méthode utilisée pour la synthèse des nanoparticules de métaux encapsulées dans une matrice de silice est la méthode de cogélification, qui est une variante du procédé sol-gel. En effet, dans les systèmes nanocapsulaires, les métaux sont généralement incorporés dans le réservoir, mais elles peuvent aussi être associées de façon covalente ou non à la paroi polymérique. Dans notre étude la matrice de silice (SiO_2) joue le rôle d'une cage où sont emprisonnées les particules métalliques (Figure I.10).



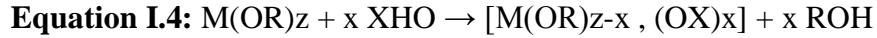
Figure I.10: Les nanoparticules de métal complexé avec Si (OC₂H₅)₄ (Regalbuto J, 2007)

L'encapsulation (Li *et al.*, 2010) des nanoparticules métalliques dans une matrice diminue leur effet toxique. D'après Li *et al.* 2010, l'enrobage de nanoparticules de fer (nanoparticules Zero-valent Iron ou nZVI) avec le polystyrène sulfonate (PSS) permet de diminuer la toxicité des nanoparticules sur la croissance cellulaire des bactéries *E.Coli*. C'est pour cette raison que dans le cadre de notre travail, les nanoparticules métalliques sont encapsulées dans une matrice de silice synthétisées par procédé sol-gel.

II.4.4. Procédé sol-gel

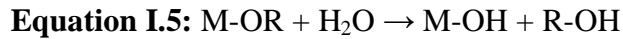
Dans les années 1930, le procédé de polymérisation sol-gel a été créé industriellement par Schott Glaswerke. Il a utilisé ce procédé pour la fabrication de récipients en verre puis de rétroviseurs. Mais le premier brevet sol-gel a été déposé en 1939.

Le principe du procédé sol-gel est appelé « chimie douce », car la réaction d'hydrolyse-condensation, se réalise à température et pression modérée, proche des conditions ambiantes. En effet, le terme sol-gel est l'abréviation des termes « solution-gélification ». Ce procédé implique la formation d'un sol suivi de la formation d'un gel. Le sol est une dispersion de particules colloïdales ou (suspension de particules solides) au sein d'un liquide (Brinker *et al.*, 1990). Généralement, le sol se réalise en deux étapes: hydrolyse et condensation d'alcoxydes de silicium, zirconium, aluminium ou titane, dans un solvant alcoolique. L'hydrolyse consiste à remplacer un groupement alcoxyde par un groupement hydroxyl (OH) selon la réaction suivante:



Avec $M(\text{OR})_z$: alcoxydes métalliques, M = métal de degré d'oxydation z (*e.i.* Si, Ti, Al) et OR: un groupement alcoxyde correspondant à un alcool déprotonné.

Réaction d'hydrolyse: X= H



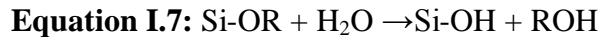
La condensation représente la réaction soit entre un groupement alcoxyde et un groupement hydroxyl, ou soit entre deux groupements hydroxyls conduisant à la formation de la liaison entre atomes. Ceci est assuré par un pont oxo (-O-).



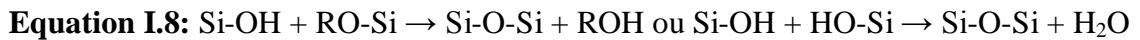
(Où Y correspond à H ou à un groupement alkyl)

Dans le cas du silicium $\text{Si}(\text{OR})_4$ par exemple (Brinker *et al.*, 1990), on trouve les réactions suivantes:

- Hydrolyse :



- Condensation :

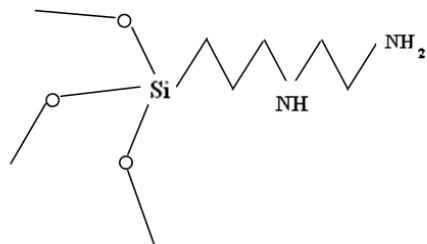


Les alcoxydes de silicium, insolubles dans l'eau, réagissent plus facilement avec l'alcool. C'est pour cette raison que l'on utilise l'alcool pour la réaction d'hydrolyse. En plus, pour accélérer cette réaction (hydrolyse), on ajoute toujours un catalyseur (généralement un acide ou une base). Ces deux types de catalyseurs conduisent à deux types de gels très différents. Par exemple, un pH acide accélère l'hydrolyse et ralentit la condensation, il favorise donc la croissance du réseau et forme une solution polymérique. Le gel résultant est appelé « gel polymérique »: on obtient après gélification une structure ouverte (couches minces). En revanche, un pH basique défavorise l'hydrolyse et conduit à la formation d'une solution colloïdale. Le gel, ainsi obtenu, est appelé « gel colloïdal » possède une structure à larges pores (couches poreux) après gélification.

D'autres paramètres jouent un rôle sur les vitesses des réactions d'hydrolyse et de condensation ce qui influence les propriétés du gel résultant (Brinker *et al.*, 1990). Ces paramètres sont la température, le solvant, le vieillissement du gel, le taux d'hydrolyse et le taux de dilution.

Lambert *et al.* (2004 a.b.c), Heinrichs *et al.* (2007) et Heinrichs *et al.* (2008) ont étudié la méthode de cogélification afin d'obtenir des nanoparticules mono- ou bimétalliques dispersées dans une matrice de silice où ils sont encapsulés. Cette méthode de synthèse permet un dopage en une seule étape via l'introduction de précurseurs à l'échelle moléculaire. Dans le cas de la silice, la cogélification est basée sur l'hydrolyse et la condensation conjointe du tétraéthoxysilane (TEOS ou $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) avec un alcoxyde sous une formule spéciale $(\text{RO})_3\text{Si-XL}$, où le groupement L, capable de former un complexe LMm^+ avec un cation métallique Mm^+ (Pd^{2+} , Ag^+ , Pt^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} ...), est relié à un fragment hydrolysable silylé $(\text{RO})_3\text{Si-}$ via un groupement organique (X) stable et inerte aux réactions d'hydrolyse. On obtient, par cette méthode, des matériaux dans lesquels le cation métallique est ancré dans la matrice. Heinrichs *et al.* (2008) ont montré qu'on peut synthétiser des nanoparticules de fer encapsulées dans la matrice de silice Fe/SiO_2 . Dans ce cas, l'alcoxyde substitué est le 3-(2-aminoéthyl) aminopropyltriméthoxysilane (EDAS) (Figure I. 11), tandis que, l'alcoxyde de silicium est le tétraéthoxysilane (TEOS). Après ajout de l'eau, les réactions d'hydrolyse et de condensation du TEOS permettront de former le réseau de silice (liaisons Si-O-Si).

A



B

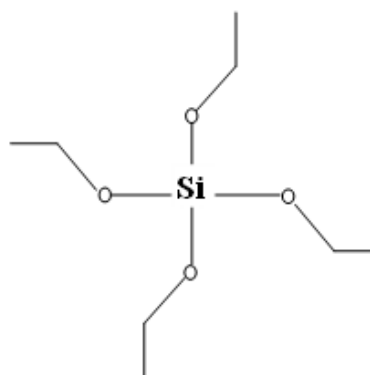


Figure I.11: Structure chimique de l'EDAS (A). Structure chimique du TEOS (B) (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

La réaction de cogélification entre le TEOS et l'EDAS permet d'ancrer les ions Fe^{3+} au sein de la matrice de silice. L'acétylacétonate de fer(ou $\text{Fe}(\text{acac})_3$) est la source de fer. Sa structure chimique est la suivante (Figure I.12).

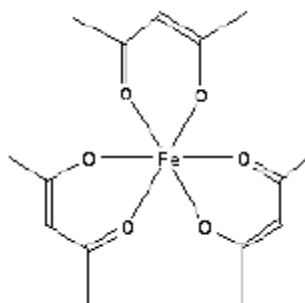


Figure I.12: Structure chimique du $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Après l'étape de synthèse, les échantillons sous forme liquide sont placés dans une étuve chauffée à $80\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 72 h (Heinrichs *et al.*, 2008). Après cette étape de séchage, on procède à la calcination des échantillons. En effet, ces derniers sont chauffés sous air (flux de 9 L h^{-1}) à une vitesse de chauffage de $120\text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$ jusqu'à $450\text{ }^\circ\text{C}$ où ils sont maintenus pendant 8 h. Ensuite, la température est augmentée jusqu'à $550\text{ }^\circ\text{C}$ avec une vitesse de chauffage de $120\text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$ (ce palier de température est maintenu pendant 4 h). Cette étape permet d'éliminer les fractions organiques et ainsi libérer la porosité de la matrice de silice. La Figure I.13 représente des photos prises au TEM des nanoparticules de fer calcinées où les particules les plus grandes correspondent à la silice (SiO_2) tandis que les plus petites et les plus foncées sont celles de fer qui présente sous la forme d'oxyde de fer (Fe_2O_3).

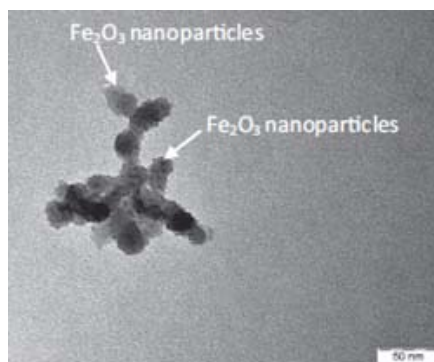


Figure I.13: Photo de nanoparticules de fer calcinées prise au microscope électronique à transmission (Mahy *et al.*, 2014)

II.5. Objectifs de la thèse

Notre thèse s'articule autour des axes suivants :

- 1) L'étude de l'efficacité de la bioremédiation du biphényle à l'aide de nanoparticules Ag/SiO₂, Cu/SiO₂, Pd/SiO₂, Co/SiO₂. Cette étude également porte sur l'effet de la concentration des nanoparticules (Ag/SiO₂, Cu/SiO₂, Co/SiO₂) et des sels de métaux (Ag⁺, Cu²⁺, Co²⁺) sur la cinétique de la réaction de la bioremédiation du biphényle et sur l'activité d'une catéchol 1,2-dioxygénase. L'ajout de différentes formes des nanoparticules de cobalt (séchées, calcinées, réduites) sera également réalisée afin d'étudier l'impact de ces différentes formes sur l'amélioration de la bioremédiation du biphényle.
- 2) L'étude des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂), (séchées, calcinées) sera également testée. Dans un premier temps, on va étudier l'impact de l'ajout de différentes concentrations des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) sur l'accélération de la bioremédiation du biphényle. Le suivi par HPLC permettra de modéliser les voies de la bioremédiation du biphényle. Ensuite, l'étude se dirigera vers le recyclage des nanoparticules de fer calcinées (Fe/SiO₂) qui permettra de savoir si le fer diffuse à l'extérieur des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂) ou non. Le suivi de la concentration de fer dans les différents compartiments cellulaires (extracellulaire, intracellulaire, adsorbé sur les cellules) et le dosage de l'activité du biphényle dioxygénase et du catéchol 1,2-dioxygénase permettra de savoir s'il y a une interaction entre *Rhodococcus erythropolis* T902.1 et les nanoparticules de fer (Fe/SiO₂).
- 3) L'étude de l'impact du pH sur la stabilité du fer à l'intérieur des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂), sur la cinétique de la réaction de la bioremédiation du biphényle en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) et de sel de fer (FeCl₃) et en fin sur la concentration de fer libéré des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂).
Par la suite, on s'intéressera à l'effet de l'ajout d'une source de carbone supplémentaire notamment le glucose et l'éthanol sur la bioremédiation du biphényle et sur la stimulation de la viabilité cellulaire. D'autres questions seront également abordées concernant la

forme du fer biodisponible pour *Rhodococcus erythropolis* T902.1 et son mode d'action sur la bioremédiation du biphényle.

- 4) L'étude de l'impact de l'ajout des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) sur la production des surfactants (tréhalose) produits par *Rhodococcus erythropolis* T902.1. La relation dose-effet entre la production des sidérophores par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 et la concentration de fer libéré des capsules dioxyde de silicium (SiO₂) sera étudiée. L'étude de l'effet de l'autoclave sur les nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) et le sel de fer (Fe₂O₃) sera également réalisée pour vérifier le phénomène de la bioremédiation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1.

Ces résultats, qui vont être développés et discutés dans les prochains chapitres, seront ensuite synthétisés et comparés aux développements proposés dans la littérature scientifique. Plusieurs propositions d'intégration du bioprocédé seront réalisées afin de suggérer des perspectives de recherches futures qui permettront à l'aboutissement d'une bioremédiation des hydrocarbures en présence de nanoparticules de fer à grande échelle.

Deuxième section: Effets des ions des métaux et des nanoparticules métalliques encapsulées dans une matrice de silice poreuse sur la biodégradation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1

Présentation de l'article

L'oxydation aérobie des hydrocarbures aromatiques (HAP) et des dérivés par les microorganismes du genre *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ou *Rhodococcus* représente la voie la plus performante en vue d'applications pour le traitement d'effluents liquides ou de matrices (semi)-solides excavées (Rehwann et Daugulis, 2006; Bunescu *et al.*, 2008; Mroziak *et al.*, 2010). Les processus de bioremédiation sont similaires pour les différentes souches aérobies connues et pour les différents HAP, ainsi que pour le biphényle. Cependant, la bioremédiation est un procédé assez lent. Du point de vue chimique, l'utilisation de catalyseur permet d'augmenter considérablement la vitesse de réaction chimique. Ce principe pourrait s'appliquer également dans le domaine biologique (Zhang, 2003; Murugesan *et al.*, 2011). Dans ce cadre, l'utilisation des catalyseurs sous différentes formes (sel de métal, complexe et / ou nanoparticules) et en faible concentration accélère la réaction de bioremédiation des polluants. La présente étude a utilisé deux formes de catalyseurs (sel de métal et /ou xérogel métalliques) de différentes natures (Ag/SiO_2 , Cu/SiO_2 , Pd/SiO_2 , Co/SiO_2), et /ou (Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+}), en différentes concentrations (10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M). Différents types des nanoparticules de cobalt (séchées, calcinées et réduites) ont été également testés en cultures avec *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence du biphényle comme source de carbone et d'énergie. Ensuite notre étude a montré que l'interaction entre les microorganismes et les nanoparticules encapsulées ou les ions métalliques a un impact positif ou négatif sur les enzymes responsables de la bioremédiation du biphényle. Cet impact pourrait être dû à la nature des métaux. De ce fait, la concentration du biphényle s'en retrouve modifiée. L'influence de ces catalyseurs sur la bioremédiation du biphényle sera étudiée.

Effect of metal ions and metal nanoparticles encapsulated in porous silica on biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1

Wissal Wannoussa ^{1*†}, Serge Hiligsmann ^{1†}, Ludivine Tasseroul ^{1,3}, Thibaut Masy ¹, Stéphanie D. Lambert ³, Benoît Heinrichs ³, Alaa Edinn Al-Ahmad ¹, Frédéric Weekers ², and Philippe Thonart ¹

Article publié dans le Journal of Sol-Gel Science and Technology.2015. doi: 10.1007/s10971-015-3694-4

¹ Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Département des Sciences de la Vie, B40, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgium

² Artechno S.A., rue Herman Meganck 21 à B-5032 Gembloux-Les Isnes, Belgium

³ Laboratoire de Génie Chimique, B6a, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgium

Abstract

Biodegradation of biphenyl was carried out by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in presence of nanometer-sized metallic (Co, Pd, Ag and Cu) nanoparticles (NPs) synthesized by the sol-gel process. In order to prevent their agglomeration, the metallic NPs (1-2 nm diameter) were anchored inside microporous silica crystallites and named Co/SiO₂, Pd/SiO₂, Ag/SiO₂ and Cu/SiO₂ samples respectively. They were added at low concentrations of 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M and 10⁻⁴ M of metal in the culture medium and their impact was compared with that of the simple metal ions added as cobalt, palladium, silver or copper salts. The cultures containing Pd/SiO₂ or Co/SiO₂ samples at 10⁻⁴ M of metal achieved a 50% higher biphenyl degradation yield after 18 days of incubation and improved *Rhodococcus erythropolis* T902.1 growth compared with those without (positive control) or with silica particles only. The highest biodegradation performance, *i.e.* 107 ±3 ppm/day, which was about 85% higher than in control conditions without NPs, was recorded in 250 ml baffled flasks stirred at 150 rpm with Co/SiO₂ sample at 10⁻⁴ M Co²⁺. Furthermore, the stimulating effect of NPs on biphenyl biodegradation seems to also depend on the thermal treatment conditions applied to NPs since the experimental results indicated that, after calcination, the cobalt oxide NPs at a concentration of 10⁻⁴ M were more effective than the reduced cobalt NPs with a degradation yield of 81 ±1% and 77 ±2% respectively after 18 days. On the other hand, the results showed that the addition of 10⁻⁴ M of Cu²⁺ or Ag⁺ ions or the addition of Cu/SiO₂ or Ag/SiO₂ samples at 10⁻⁴ M of metal have an inhibitory effect on biphenyl biodegradation. However, Cu²⁺ and Ag⁺ ions were more toxic to the *Rhodococcus erythropolis* T902.1 bacteria than the respective Cu or Ag NPs anchored inside silica particles. Moreover, this work showed that in these conditions, the activity of catechol 1,2-dioxygenase (a critical enzyme in aromatic biodegradation pathway) was severely inhibited, whereas the presence of 10⁻⁴ M of Co²⁺ ions or Co/SiO₂ sample stimulated the enzyme activity compared to the conditions without NPs.

Keywords: Biodegradation. Biphenyl. *Rhodococcus erythropolis*. Sol-gel process. Encapsulated nanoparticles.

I. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) such as biphenyl, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene are worldwide manufactured and used in a variety of industrial processes and products such as fungicides and pesticides (DPD: Drug Product Database. 2013; Borja *et al.*, 2005). Therefore, large amounts of these compounds or derivatives are diffused in ground waters and soils (Wei *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2006). Due to their carcinogenic, genotoxic and mutagenic properties, PAH were widely studied regarding their environmental effects (Esen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Alkurdi *et al.*, 2014).

For some decades, different physico-chemical techniques were used for the treatment of wastewater and soil contaminated with PAH *i.e.* ozonation, adsorption, solvent extraction, Fenton effects and photodegradation in presence of iron (Bunescu *et al.*, 2008; Tsormpatsidis *et al.*, 2010; Mahy *et al.*, 2014). Biological methods are also available for the reduction of aromatic pollutants though they need a longer process time. These methods are based on the potential of some microorganisms to use the pollutants for growth and source of energy (Aldric and Thonart, 2008; Choraó, 2009). Compared with physico-chemical methods, the PAH biodegradation methods are preferred because of lower costs and their potential to degrade almost completely the pollutants without release of toxic end-products in the environment. Indeed, the physico-chemical techniques are relatively expensive and they frequently produce toxic and undesirable products that require further treatment steps (Watanabe, 2001; Nair *et al.*, 2008).

Numerous studies have demonstrated that many PAH can be biodegraded under aerobic or anaerobic conditions by different microorganisms such as *Pseudomonas* species (Kumara *et al.*, 2006; Arun *et al.*, 2008; Tandlich *et al.*, 2011), *Mycobacterium* (Dandie *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010), *Nocardioide*s (Saito *et al.*, 2000), *Citrobacter freundii* BS2211 (Grishchenkov *et al.*, 2002) and *Rhodococcus* (Takeda *et al.*, 2004; Bunescu *et al.*, 2008; Takeo *et al.*, 2008; Davoodi-Dehaghani *et al.*, 2010). However, most of the PAH are stable and highly hydrophobic, thus having a low availability for microorganisms since they need an aqueous environment for their growth. As a consequence, bioremediation processes are very limited. Long time periods of a few weeks to a few months are required for microbial degradation of highly hydrophobic substances (Díaz, 2004).

Several strategies have been proposed to accelerate bioremediation processes using mixed cultures of suspended bacteria (Iwanade *et al.*, 2005), cell immobilization (Loh *et al.*, 2000; Chora, 2009) or genetically engineered microorganisms (Aldric and Thonart, 2008). Furthermore, the addition in the microbial environment of a conventional carbon source such as ethanol or glucose as co-substrate (Kotresha and Vidyasagar, 2008; Chora, 2009) and of nitrogen sources (Wei *et al.*, 2008; Kotresha and Vidyasagar, 2008) were often reported to promote growth and biodegradation performances. Moreover, numerous studies have demonstrated that bioremediation can be accelerated with some metals at low concentrations (Aldric *et al.*, 2003; Bunescu *et al.*, 2008; Sridevi *et al.*, 2011). Aldric *et al.* (2003) showed that the presence of iron at concentrations up to 10^{-3} M increased the degradation of isopropyl-benzene by *Rhodococcus erythropolis* T 902.1. Sridevi *et al.* (2011) also reported that the presence of 0.01 g/L of Co^{2+} , 0.02 g/L of Mn^{2+} or Cu^{2+} ions (*i.e.* 1.7×10^{-4} , 3.6×10^{-4} and 3.1×10^{-4} M respectively) enhanced the phenol biodegradation yield by *Pseudomonas putida* NCIM 2102. On the other hand, Bunescu *et al.* (2008) studied the degradation of 2-aminobenzothiazole (ABT) under various conditions: (i) a photodegradation process with UV light in presence of Fe(III)-nitrilotriacetic acid (FeNTA) only, (ii) a biodegradation process using *Rhodococcus rhodochromus* OBT18 with FeNTA at concentrations ranging from 10^{-4} to 10^{-3} M and (iii) the combined processes (FeNTA plus *Rhodococcus rhodochromus* in presence or absence of UV light). The degradation of ABT in the combined system, with or without UV light, was more efficient (99% degradation after 25 h) than in the separated systems (respectively 37% photodegradation and 26% biodegradation after 125 h). It is also reported that the presence of FeNTA increased the biodegradation of ABT without any inhibition up to 5×10^{-4} M FeNTA.

Metallic or metallic oxide nanoparticles (NPs) represent a new generation of compounds to improve environmental remediation and biological processes (Zhang, 2003; Beckers *et al.*, 2013; Mahy *et al.*, 2014). They could provide solutions to some of the most challenging environmental clean-up problems. The use of iron and/or palladium NPs is very effective for the biodegradation of a wide variety of common environmental contaminants, such as chlorinated organic solvents and polychlorinated biphenyls or PCBs (Zhang, 2003; Murugesan *et al.*, 2011). However some environmental issues still need to be addressed, for instance in relation with the potential internalization and bioaccumulation of NPs in organisms cells, particularly increased due to their very small size (Eduok *et al.*, 2013). In order to prevent these mechanisms and also to avoid NPs

agglomeration reducing their specific area, different methods have been developed such as the sol-gel process. It is based on the encapsulation of metallic or metallic oxide NPs inside a porous matrix like silica by the cogelation method (Kaiser *et al.*, 1997; Heinrichs *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2008; Heinrichs *et al.*, 2008; Pirard *et al.*, 2014). Using this process, Mahy *et al.* (2014) showed that the presence of 10^{-4} M of iron NPs anchored inside porous silica matrix, with UV light/H₂O₂ system was able to degrade 10^{-4} M of p-nitrophenol after 24 h incubation in aqueous medium. This sol-gel chemical synthesis method is based on the concomitant hydrolysis and condensation of tetraethoxysilane (TEOS, Si(OC₂H₅)₄) with a modified alkoxide of formula (RO)₃Si-XL, in which the ligand L is able to form a complex, with a metallic cation M^{m+} (such as Pd²⁺, Ag⁺, Pt²⁺, ...) and that is connected to the alkoxide (RO)₃Si- moiety through an inert and hydrolytically stable organic group, X. After heat treatments of texture of xerogel (drying, calcination and reduction), metallic nanoparticles (2-3 nm) are homogeneously dispersed through the silica matrix (Kaiser *et al.*, 1997; Heinrichs *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2008; Heinrichs *et al.*, 2008; Pirard *et al.*, 2014). The experiments reported in this paper were carried out with different metallic NPs anchored inside porous silica synthesized using TEOS as silica precursor and 3-(2-aminoethylamino) propyltrimethoxysilane (EDAS, (CH₃O)₃Si(CH₂)₃NH(CH₂)₂NH₂) as the modified alkoxide. According Alié *et al.* (Alié *et al.*, 2003ab), the ligand EDAS initiated a nucleation process as its hydrolysis and condensation reactions are faster than that of TEOS. So hydrolyzed EDAS molecules can act as a nucleation agent leading to silica particles with hydrolyzed EDAS core and principally made of hydrolyzed TEOS. The proof of anchored metallic particles into the silica matrix was obtained by electron tomography and rotating transmission electron microscopy (Lambert *et al.*, 2004a, Gommès *et al.*, 2005; Heinrichs *et al.*, 2006ab). These methods applied on Pd/SiO₂ samples demonstrate that the palladium particles are localized deep inside the silica skeleton. The metallic particles are regularly spaced in the middle of the silica skeleton, with a distance between them comparable to the diameter of the struts of silica.

Therefore, the goal of this work was to investigate the inhibitory or stimulating effect of metal NPs anchored in silica matrix (Cu/SiO₂, Ag/SiO₂, Pd/SiO₂ or Co/SiO₂) or metal ions (Co²⁺, Cu²⁺ or Ag⁺) at concentrations ranging from 0 (positive control) to 10^{-4} M of metal element on the rate of biphenyl degradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1.

II. Material and methods

II.1. Preparation concentrated suspensions of metal nanoparticles and concentrated solutions of metal ions

The samples Co/SiO₂, Pd/SiO₂, Cu/SiO₂, and Ag/SiO₂ are prepared by the sol-gel method, as described by Lambert *et al.* (Lambert *et al.*, 2004b). This method consists of (i) the preparation in one step (the cogelation method) of the porous silica from TEOS, in which metallic complexes Mn⁺[NH₂-CH₂-CH₂-NH-($-(CH_2)_3-Si(OCH_3)_3$)_n] are homogeneously dispersed at molecular level; (ii) the drying under vacuum to remove solvent and (iii) the thermal treatments like calcination to remove organic moieties and reduction to reduce metallic ions into the corresponding metals. After the different steps of preparation, the samples are characterized by using the methods described by Lambert *et al.* (2004bd, 2008) and Heinrichs *et al.* (2006ab). For the clarity of this study, Co/SiO₂, Pd/SiO₂, Cu/SiO₂, and Ag/SiO₂ samples are used as notations and are defined as corresponding metallic NP_s anchored inside porous silica after vacuum drying, calcination and reduction steps. For all metallic NP_s, a 10⁻³ M concentrated suspension in ultrapure water was prepared in 50 ml bottles by finely pounding (at micrometre-size) and weighting some Cu/SiO₂, Ag/SiO₂, Pd/SiO₂, and Co/SiO₂ sample *i.e.* 0.079 g, 0.316 g, 0.160 g or 0.147 g respectively. According to the experimental conditions, a defined volume of homogenized suspension was transferred in the culture medium prior to sterilization in order to reach a final concentration of Cu, Ag, Pd or Co equal to 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M or 10⁻⁶ M. An equivalent SiO₂ suspension without metal was also prepared in 50 mL ultrapure water using 0.12 g of SiO₂ sample synthesized by the sol-gel process (Gommes *et al.*, 2005) in order to check if silica plays a significant role in the biodegradation of biphenyl. In the same time, 0,012 g of CoCl₂.6H₂O, 0,009 g of CuCl₂.2H₂O or 0,008 g of AgNO₃ were added under stirring in 50 mL ultrapure water in order to obtain concentrated solutions of 10⁻³ M of metal ions (Co²⁺, Cu²⁺ or Ag⁺).

II.2. Culture

A preculture was prepared in 250 mL baffled flasks containing 50 mL of M284 minimal medium (Weekers *et al.*, 1999) [complemented by 5 g/L of glucose. The medium was sterilized for 20 min

at 121 °C and cooled down to room temperature before inoculation at an initial cell density of about 10^9 cell/mL by transfer of colonies of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 developed on M284 + agar medium. The microbial suspension was incubated for 3 days at 30 °C and 150 rpm orbital agitation. The glucose was totally consumed after 3 days of incubation (assayed by the Kit RTU glucose BioMérieux, F). For the biphenyl biodegradation experiments, the culture medium was prepared similarly in 100 mL flasks or 250 mL (in triplicates) baffled flasks with 20 mL of M284 supplemented with dried, calcined or reduced Ag/SiO₂, Cu/SiO₂, Pd/SiO₂, Co/SiO₂ and SiO₂ samples or Ag⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Pd²⁺ ions at concentrations ranging from 0 (positive control) to 10⁻⁴ M of metal element. After sterilization, 1 mL of a 10 g/L biphenyl solution in n-hexane was added on the culture medium to achieve a biphenyl initial concentration of 500 ppm as source of carbon and energy. The evaporation of n-hexane was allowed overnight under a ventilated hood leaving biphenyl crystals suspended in the M284 minimal medium. A relatively homogenous suspension of biphenyl crystals in aqueous phase was achieved by vigorous mixing for 2 min using a mixer (POLYTRON® PT 1200 E, KINEMATICA AG, CH) sterilized by immersion in three successive solutions: SDS 5%, sodium hypochlorite 4% and norvanol 9%. The resulting suspension was inoculated with 3 mL of preculture and incubated at 30 °C (150 rpm orbital agitation). Test controls were also prepared in the same conditions (i) without added NPs nor SiO₂ (positive control), (ii) with the sole SiO₂ matrix (positive control + SiO₂), (iii) without inoculum (negative control with or without NPs anchored in SiO₂). The negative controls were carried out in triplicates to examine the abiotic removal/evaporation of biphenyl. The optical density was measured at 600 nm (Ultrospec III, Pharmacia LKB) at different time points of incubation (after 3, 8 and 18 days). The interference of nanoparticles on absorbance was corrected with the control samples that contained only nanoparticles to confirm the bacterial growth.

II.3. Biphenyl analysis

Biphenyl residual concentration in the culture medium was measured by HPLC at different time points of incubation (after 3, 8 and 18 days) after liquid-liquid extraction in organic solvent. Glass tubes of a total volume of 10 mL (culture Tube 16x100 SVL SCRE, Pyrex®, UK) with Teflon seal and containing 2 mL sample and 4 mL n-hexane were mixed for 24h at 30 °C. After centrifugation at 7000 rpm (SLA-1500 rotor in Sorvall® RC5B+ centrifuge) for 15 min the organic phase was

transferred in glass tubes for overnight evaporation of solvent under a constant ventilated hood. Crystals of biphenyl were resuspended in 10 mL methanol before analysis by HPLC.

II.4. HPLC analyses

HPLC analyses were performed using an Agilent 1100 Series equipment and a C18 column (LiChroCART® 250-4.6HPLC-cartridge Purospher® STAR RP -18 endcapped 5µm Merck, D) at 30 °C. The mobile phase contained acetonitrile and Milli-Qwater (resistivity = 18.2 MΩ cm) in the ratio 70/30 in order to determine the biphenyl concentration. Its pH was adjusted to 2.75 with 1.5 M phosphoric acid. The flow rate was 0.8 mL/min and 10 µL of the sample were injected. Biphenyl was detected at 254 nm and the concentration in samples was calculated from a standard graph determined using pure compound.

II.5. Enzyme assays

For the enzyme assays needing larger biomass material, the cultures were carried out in 500 mL flasks (in triplicates) with 100 mL of M284 minimal medium complemented by Ag/SiO₂, Cu/SiO₂, Pd/SiO₂ and Co/SiO₂ samples or Ag⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Pd²⁺ ions at concentrations of 0 (positive control) or 10⁻⁴ M of metal element. The cultures were sterilized for 20 min at 121°C. After sterilization, 5 mL of 10 g/L biphenyl solution in n hexane were added as the sole carbon and energy source. The other steps were as described above (Section “Cultures. II.2”). After 18 days of incubation, the cells were centrifuged for 20 min at 13.000 rpm at 4 °C and washed twice with a potassium phosphate buffer 0.05 M (K₂HPO₄, KH₂PO₄, pH 7.5). The pellets were resuspended in a sufficient volume of the same buffer to obtain a cellular concentration of 0.05 g of wet cells per mL. The cell suspension was then sonicated at a frequency of 10 kHz for 2 min and centrifuged at 13.000 rpm for 40 min. The supernatant containing crude cell free extracts was used to determine the biphenyl dioxygenase activity and catechol 1,2-dioxygenase activity. During all these operations, the extracts were maintained at 4 °C.

For the determination of catechol 1,2-dioxygenase specific activity, a 100 μL volume of concentrated cell-free extracts was added to 900 μL of 0.05 M phosphate buffer (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 7.5) and 20 μL of 10 mM catechol. The specific activity was monitored at 260 nm ($\epsilon = 16.8$ mM) (Nadaf and Ghosh, 2011). The amount of cis, cis-muconic acid formed in the samples was calculated from a standard graph determined using pure compound of cis, cis-muconic acid. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme catalyzing the production of 1 μmol cis, cis- muconic acid per min at 30 $^\circ\text{C}$.

II.6. Protein concentration

Protein concentration was measured by the Bradford (Bradford, 1976). Bovine Serum Albumin (Sigma, USA) was used as a standard (Bradford, 1976).

II.7. Statistical analysis

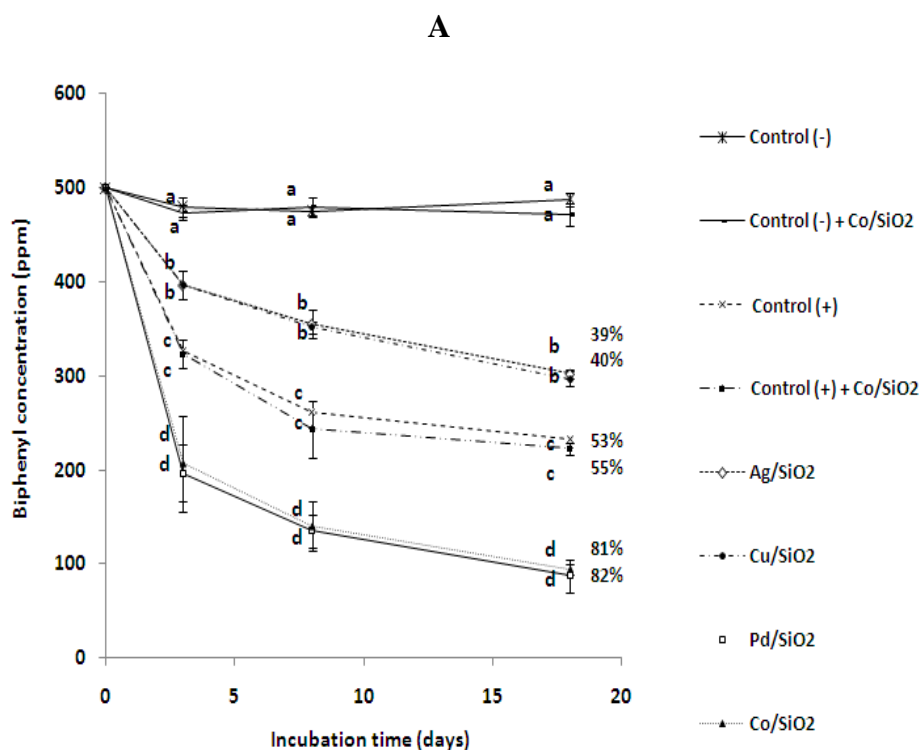
The SAS software (SAS Institute 2001) was used for all statistical analyses. The general linear model (GLM) was used to determine whether the effect of metal nanoparticles or metal ions was significant on the biodegradation potential of *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Least square means and standard errors were calculated. A p -value of < 0.05 was chosen as the threshold for significance of all statistical comparisons.

III. Results and Discussion

III.1. Effects of metal nanoparticles (Ag, Cu, Pd and Co) on biphenyl biodegradation.

The present study investigates the effect of NP_s of about 2–3 nm in diameter of four metals (cobalt, palladium, silver and copper) at a concentration of 10^{-4} M on biphenyl degradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1. These NP_s were encapsulated in a porous silica (SiO_2) matrix (Kaiser *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 2004abc; Heinrichs *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2008; Heinrichs *et al.*, 2008). Fig. II.1 shows that the presence of 10^{-4} M of cobalt NP_s , added as Co/ SiO_2 sample in the culture medium without inoculum, did not exhibit any effect on degradation of biphenyl when compared to the negative control without Co/ SiO_2 at all time points ($p > 0.05$). Similar results were recorded

with Cu/SiO₂, Pd/SiO₂ and Ag/SiO₂ samples (not shown). Moreover, the presence of the sole SiO₂ with inoculum in the culture medium (positive control + SiO₂) has no significant inhibitory or stimulating effect on the biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 compared to the positive control without SiO₂ ($p > 0.05$) (Fig. II.1). Biphenyl was degraded up to $53 \pm 1\%$ and at $55 \pm 1\%$ respectively after 18 days of incubation. These results are in accordance with Mu *et al.* (Mu *et al.*, 2011) who reported that SiO₂ NPs with sizes of 10-20 nm up to 150 mg/g total suspended solids (estimated at 3.75×10^{-3} M) showed no inhibitory effect on methane generation by anaerobic digestion. Fig. II.1 indicates also that Ag/SiO₂ and Cu/SiO₂ samples containing the metallic NPs at 10^{-4} M effectively reduced the rate of biphenyl degradation as compared to the positive control ($p < 0.05$). Indeed, silver and copper are widely used as antibacterial agents since they destruct the cell membrane by close contact between the bacteria and these agents (silver and copper) (Lin *et al.*, 2006; Shahverdi *et al.*, 2007; Kasemets *et al.*, 2009; Gao, 2011; Luna-del Risco *et al.*, 2011; Bagchi *et al.*, 2012).



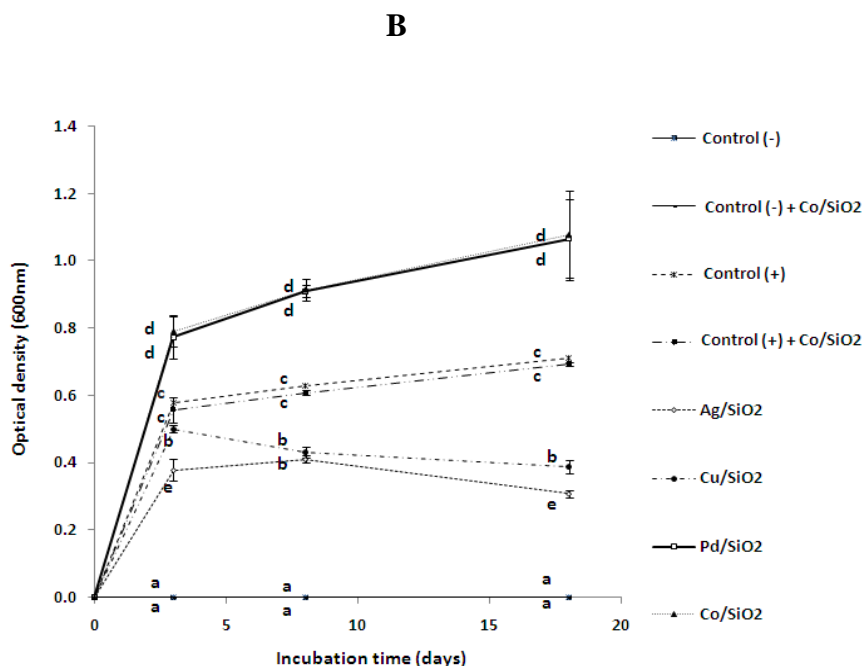


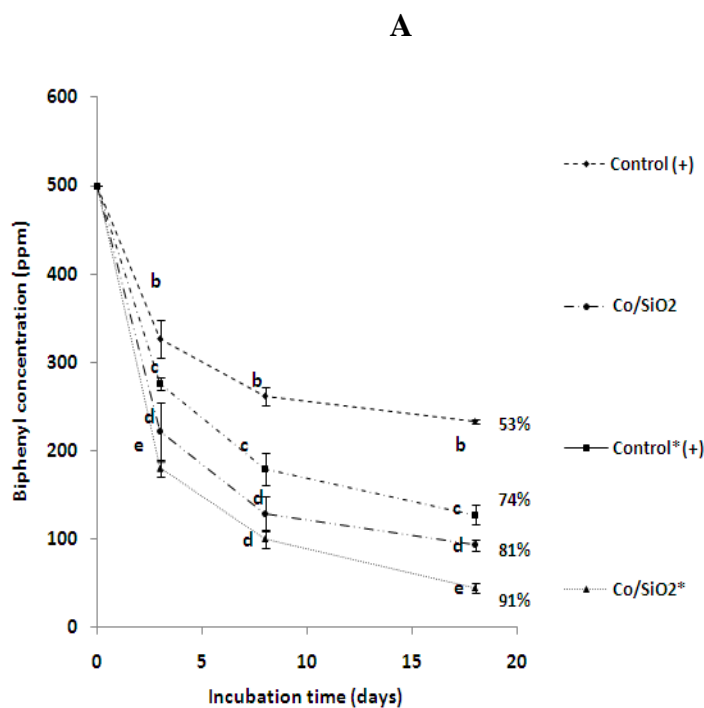
Figure II. 1: Evolution of (A) biphenyl concentration and (B) growth measured by optical density of *Rhodococcus erythropolis*T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 culture medium with 500 ppm initial biphenyl concentration and 10^{-4} M of calcined (cobalt, palladium, copper or silver) nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix by sol-gel method: control (-) and control (-) + Co/SiO₂ without microorganisms, control (+) without NP_s nor SiO₂, control (+) + SiO₂ without NP_s (the % indicated on the figure refer to % of biphenyl degraded). The similar letters (aa, bb, cc and dd) indicate that in the presence of nanoparticles, no significant statistical differences were observed (p -value > 0.05) at different time points of biphenyl biodegradation. The error bars means standard deviation on triplicates.

Shahverdi *et al.* (Shahverdi *et al.*, 2007) reported that silver and copper bound to cell membranes leading to an increase of permeability and cell death. Other studies (Carrano *et al.*, 2001; Gao, 2011) indicated that toxicity depends on the particle size. Luna-del Risco *et al.* (Luna-del Risco *et al.*, 2011) tested the influence of particle size of ZnO and CuO on methane production during anaerobic digestion of cattle manure, and reported that the inhibitory effects of ZnO and CuO NP_s (about 60 and 30 nm size respectively) were much greater than the bulk ZnO and CuO (1 and 5 μ m size respectively). The highest inhibition was recorded for methanogenic microorganisms in presence of NP_s with half effective concentration EC50 of about 0.9×10^{-4} M and 1.7×10^{-4} M for Zn and Cu NP_s respectively. By comparison, the EC50 were about 2-fold and 10-fold higher for bulk ZnO and CuO particles respectively and additionally 2-fold higher for the other microorganisms involved in the anaerobic digestion process regarding ZnO. Their colleagues (Kasemets *et al.*, 2009) confirmed the effect on the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae*. Mu *et al.* (2011) studied

the influence of dissolved Zn^{2+} from ZnO NP_s on methane production during waste activated sludge anaerobic digestion and found that the release of Zn^{2+} from ZnO NP_s was an important cause of inhibition of methane production. In the present study, the metallic Pd, Ag, Cu and Co nanoparticles, with sizes of around 2–3 nm are embedded in inorganic microporous silica particles of around 10 to 20 nm diameter with pores not exceeding 0.8 nm diameter (Lambert *et al.*, 2004ab; Lambert *et al.*, 2008). Therefore, *Rhodococcus erythropolis* cells cannot enter into the SiO_2 matrix nor have a direct contact with the metallic NP_s anchored inside the SiO_2 network. Furthermore, the metallic nanoparticles could not release spontaneously outside the SiO_2 crystallites as suggested by ICP-AES measurements (Mahy *et al.*, 2014) with $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ samples synthesized by the cogelation method. Indeed, in this study (Mahy *et al.*, 2014), it appears that the amount of Fe^{3+} ions in an aqueous medium stabilize at around 8×10^{-7} M after 28 days. However, while there is not a full inhibitory effect, the results indicate that Ag/SiO_2 and Cu/SiO_2 samples with metallic NP_s at 10^{-4} M slow down the biodegradation of biphenyl and the growth of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 compared to the positive control ($p < 0.05$) (Fig. II.1). However this bacteria strain is known to produce siderophores compounds in order to complex the metal ions that are essential for its metabolism (Carrano *et al.*, 2001; Bosello *et al.*, 2013). Our results suggest that these siderophores would not be selective enough and therefore would be able to progressively attract metal ions from the inside of the microporous SiO_2 structure. These results should also be related with those reported by Kasemets *et al.* (Kasemets *et al.*, 2009) about copper NP_s toxicity on *Saccharomyces cerevisiae*, the NP_s being directly in suspension in the culture medium and not anchored in silica matrix as in our experiments. They mentioned a 60-fold higher toxicity for CuO nanoparticles (30 nm), *i.e.* EC_{50} of about 2×10^{-4} M, than for the bulk copper oxide powder, assuming a cumulative effect of copper solubility and oxidative stress mediated by NP_s , since in the normal conditions of viable cells, NP_s cannot enter the yeast cells. By contrast these siderophores would be favorable in the other experiments reported here since the addition of Co/SiO_2 or Pd/SiO_2 samples at a metal concentration of 10^{-4} M induced a significant increase of the biphenyl biodegradation and growth of *Rhodococcus* strain compared to the positive control ($p > 0.05$) (Fig. II.1). Biphenyl was respectively degraded up to $81 \pm 1\%$ and $82 \pm 4\%$ after 18 days of incubation. This is in agreement with the results of Sridevi *et al.* (Sridevi *et al.*, 2011) and Kasemets *et al.* (2009) who described the bioavailability of cobalt or palladium as an important factor for enhancement of organic pollutant biodegradation *e.g.* Sridevi *et al.* (2011) reported that the presence of cobalt up to 1.7×10^{-4} M

improves the degradation of phenol. Murugesan *et al.* (2011) showed that the presence of palladium–iron bimetallic NPs up to 0.1 g/L (estimated at 2×10^{-3} M – 2×10^{-6} M respectively) in minimal salt medium is effective on the complete dechlorination of triclosan (2, 4, 40-trichloro-20-hydroxydiphenyl ether; up to 27 ppm initial concentration) and biodegradation of the intermediates metabolites by a strain of *Sphingomonas* genus.

Moreover, our study showed (Fig. II.2) that the presence of Co/SiO₂ sample at a metal concentration of 10^{-4} M has a cumulative effect with the improvement of oxygen transfer from ambient air to the liquid culture medium. This is confirmed by the degradation rate achieved during the first 3 days of culture in 250 mL baffled flasks (*i.e.* 107 ± 3 ppm/d) that was around 15 and 85% higher than the 93 ± 11 and 58 ± 7 ppm/d achieved in classical culture conditions (100 mL flasks) with or without NPs ($p < 0.05$). Similar trends were recorded for the biodegradation yields achieved after 18 days of incubation (*i.e.* 91 ± 1 , 81 ± 1 and 53 ± 1 % of biphenyl conversion). However, the biodegradation rate decreased after three days. This decrease in the kinetic pattern coincides with the release of soluble metabolites, which gives a yellow color to the medium, indicating that the biphenyl is partially metabolized by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 (Hong *et al.*, 2009).



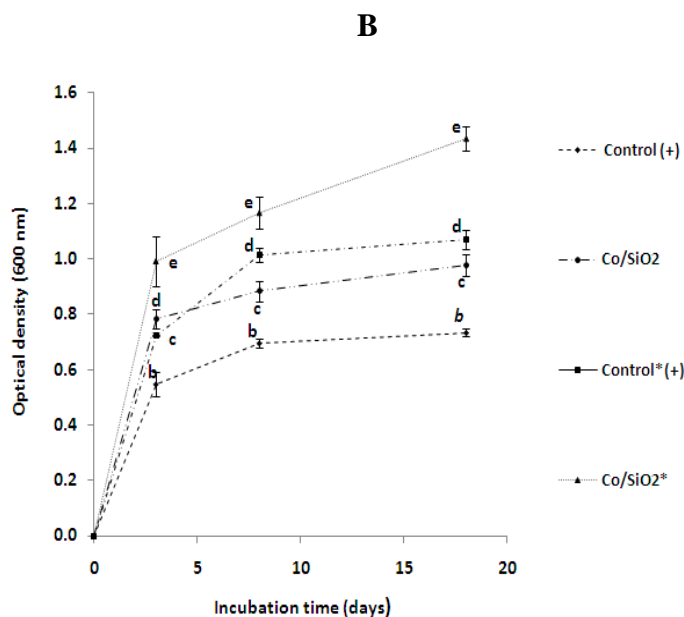


Figure II.2: Evolution (A) of biphenyl concentration and (B) growth measured by optical density of *Rhodococcus erythropolis*T902.1 in 100 mL flasks or 250 mL baffled flasks* containing 20 mL of M284 culture medium with 500 ppm initial biphenyl and a concentration of 10^{-4} M calcined cobalt nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix by sol-gel method. The similar letters (aa, bb, cc and dd) indicate that in the presence of nanoparticles, no significant statistical differences were observed (p -value > 0.05) at different time points of biphenyl biodegradation. The error bars means standard deviation on triplicates.

The physico-chemical properties, such as the specific surface area, S_{BET} , the size of silica particles, d_{SiO_2} , the size of metallic nanoparticles, d_{MX^+} , (Table II.1) of Cu/SiO₂, Co/SiO₂, Ag/SiO₂ and Pd/SiO₂ samples could have an important impact on the biphenyl degradation by *Rhodococcus*. Pd/SiO₂ sample has these mallets d_{SiO_2} but the greatest S_{BET} (*i.e.* 13 nm and 495 m²/g respectively). By comparison, Co/SiO₂ sample presents the smallest S_{BET} (*i.e.* 75 m²/g) while d_{SiO_2} is equal to 25 nm. These significant differences and the similar d_{MX^+} of all the tested NPs suggest that no real impact of d_{MX^+} , d_{SiO_2} or the S_{BET} might be related to the biphenyl degradation rate by *Rhodococcus* in presence of Co/SiO₂ and Pd/SiO₂ samples. Moreover, these properties could not explain the lower biphenyl degradation rate recorded in presence of Ag/SiO₂ and Cu/SiO₂ samples since they are of the same order than those of Pd/SiO₂ sample.

Table II. 3: Physico-chemical properties of the used (Cu, Co, Ag, Pd) nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix by sol-gel method: diameters of metallic (d_{MX+}) and SiO₂ (d_{SiO_2}) particles measured by TEM and specific surface area obtained by BET method.

Sample	Reference sample	d_{MX+} (nm)	d_{SiO_2} (nm)	S_{BET} (m ² /g) ± 5
Co/SiO ₂ calcined	-	3	25	350
Co/SiO ₂ dried	-	3	25	75
Co/SiO ₂ reduced	-	3	25	350
Ag/SiO ₂	Ag0.1 [47]	3	20	280
Cu/SiO ₂	Cu1.5 [47]	3	35	395
Pd/SiO ₂	Pd3.1 [47]	2.5	13	495

III.2. Effect of metal ions Co²⁺ and nanoparticles Co/SiO₂ concentration on biphenyl biodegradation

The improvement effect of different forms of Co/SiO₂ sample (*i.e.* dried, calcined and reduced) and Co²⁺ ions at different cobalt concentrations *i.e.* 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M or 10⁻⁴ M was studied. The results show that the biphenyl biodegradation yields increased with the concentration of Co/SiO₂ sample present in the vessels, whatever Co/SiO₂ sample is dried, calcined and/or reduced (Table II.2). Significantly different yields were observed when the cobalt concentration is decreased from 10⁻⁵ M to 10⁻⁶ M. However, the yields were similar in the presence of Co/SiO₂ sample at 10⁻⁵ M and 10⁻⁴ M of cobalt, biphenyl being degraded up to about 80% after 18 days of incubation. This suggests that an excess of cobalt up to 10⁻⁴ M has no real impact on the efficiency of biphenyl bioconversion except with the reduced cobalt NP_s yielding at 77 ±2% instead of about 82% with both the other calcined or dried forms (Table II.2). Indeed, in dried Co/SiO₂ sample, the oxidation state of cobalt is 2+ and in calcined Co/SiO₂ sample, the oxidation states can be 2+ or 3+ because these nanoparticles are present as metallic oxide in the form Co₃O₄ (Vasconcelos *et al.*, 2013). In contrast, the oxidation state of cobalt is zero in reduced Co/SiO₂ sample. The effect of these differences in cobalt oxidation state on biphenyl biodegradation should be further investigated and

also in relation with the availability of the cobalt-containing compounds as highlighted by Santos *et al.* (2008) demonstrated that the presence of different forms of solubles iron at the concentrations of 10^{-4} M $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, FeSO_4 , Fe_2O_3 , Fe^0 had a positive impact on biodegradation of anthracene by *Pseudomonas* sp with up to 25 % higher biodegradation yield than in the iron nitrate.

Table II.4: Biphenyl biodegradation yields (and standard deviation on triplicates) after 18 days of incubation with *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm biphenyl and different concentrations 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M of (dried, calcined or reduced) cobalt nanoparticles encapsulated in SiO_2 matrix by sol-gel method or cobalt ions.

Conditions		Biphenyl biodegradation yield		
Control (+)		53±1%		
	Metal concentration	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M
Co/SiO ₂ dried		68±2%	81±1%	83±1%
Co/SiO ₂ calcined		66±4%	78±2%	81±1%
Co/SiO ₂ reduced		62±3%	74±5%	77±2%
Co ²⁺		75±2%	85±1%	90±1%

The effect of CoCl_2 was also studied using the same concentrations tested for Co/SiO₂ sample. The results show that CoCl_2 has a strong positive effect on the efficiency of biphenyl biodegradation at different concentrations ranging from 10^{-6} M to 10^{-4} M (Table II.2) compared to the cultures with Co/SiO₂ sample. This is consistent with an improvement effect due to a higher solubility of the benefic metallic element as reported by Santos *et al.* (2008). By contrast, Yeom and Yoo (1997) achieved a complete inhibition of benzene and toluene biodegradation by *Alcaligenes xylosoxipans* Y234 in presence of cobalt at a concentration of 2.5×10^{-4} M. Kotresha and Vidyasagar (2008) also reported a 2-fold decrease of phenol degradation rate by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996 in the presence of 2×10^{-4} M of cobalt compared to 2.5×10^{-5} M.

III.3. Effect of metal ions (Ag^+ or Cu^{2+}) and nanoparticles (Ag/SiO_2 or Cu/SiO_2) concentration on biphenyl biodegradation

Table II.3 shows that the presence of Cu/SiO_2 or Ag/SiO_2 sample in the culture medium at a metal concentration from 10^{-5} M to 10^{-4} M leads to about 20% lower biphenyl degradation yields compared to the positive control ($p < 0.05$), while no significant effect was recorded at a concentration of 10^{-6} M. In addition, Table II.3 shows significantly higher negative impact in presence of silver and copper ions at the same concentrations. Furthermore, the effect was already measurable at 10^{-6} M of Ag^+ ions. Therefore, it can be assumed that, since the metallic NPs were anchored in silica, the Ag/SiO_2 and Cu/SiO_2 samples were less toxic towards bacteria at similar concentrations than the tested copper chloride or the silver nitrate.

Table II.3: Biphenyl biodegradation yields (and standard deviation on triplicates) after 18 days of incubation with *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm biphenyl and different concentrations 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M of calcined (copper or silver) nanoparticles encapsulated in SiO_2 matrix by sol-gel method or (copper or silver) ions.

Conditions		Biphenyl biodegradation yield		
Control (+)		53±1%		
	Metal concentration	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M
Cu/SiO₂ calcined		53±1%	43±2%	40±1%
Cu²⁺		51±1%	38±2%	35±1%
Ag/SiO₂ calcined		50±1%	43±1%	39±1%
Ag⁺		33±1%	29±1%	20±3%

These results are consistent with those of the literature attributing metal toxicity to the dissolved ions (Wong *et al.*, 2010) and reporting inhibition of different bacterial metabolisms at concentrations of about 2×10^{-5} M of soluble copper (Kuo and Sharak-Genthner, 1996; Kraemer, 2004). Additionally, the encapsulation of the metal NPs inside the porous silica matrix would limit

the metal availability in the bacterial environment even when influenced by the suggested siderophore mechanism (Section III.1).

On the other hand, Table II.3 shows that the Ag^+ ions effectively reduced the biphenyl degradation yields at all tested concentrations (10^{-6} M, 10^{-5} M or 10^{-4} M) as compared to the Cu^{2+} ions whereas, at a same concentration, similar yields were recorded for both anchored NPs in silica. Moreover, the lowest degradation yield recorded in presence of Ag/SiO_2 ($40 \pm 1\%$ at 10^{-4} M Ag) was still higher than the $33 \pm 1\%$ measured at 10^{-6} M Ag^+ . These results highlight the tremendous toxicity of Ag^+ ions on the potential of the *Rhodococcus erythropolis* T902.1 for biphenyl degradation compared to the Cu^{2+} ions and the encapsulated NPs. Furthermore, it is to mention that Kuo and Sharak Genthner (1996) reported a positive effect of Cu^{2+} ions at 0.01 ppm (*i.e.* about 10^{-7} M) on the degradation of benzoate, 2-chlorophenol and both phenol and benzoate by anaerobic bacterial consortia.

Despite low concentrations of Cu^{2+} ions are essential for bacteria since they provide vital cofactors for metallo-proteins and enzymes (Chua *et al.*, 1999), these ions have an inhibitory action on bacteria by blocking essential functional groups, replacing other essential metal ions, or modifying the active conformation of biological molecules (Rajapaksha and Tobor-Kaplon, 2004). However, the bacteria have different strategies to deal with toxic metal concentration in the environment (Nies, 2003). These strategies can be divided into two classes: (i) prevent entry of the metal into the cell, (ii) actively pump the toxic metal out of the cell (Roanne and Pepper IL, 2000).

III.4. Effect of metal ions (Co^{2+} , Ag^+ or Cu^{2+}) and nanoparticles (Co/SiO_2 , Ag/SiO_2 or Cu/SiO_2) on catechol 1,2-dioxygenase activity

Various aerobic bacteria catabolism of PAH involve two key steps that are (i) the activation of the aromatic ring and (ii) its subsequent cleavage (Ohmori *et al.*, 2011). Dioxygenase enzymes are responsible for the conversion of these compounds by adding molecular oxygen to the ring. In the case of biphenyl metabolism, these enzymes are called biphenyl dioxygenases (Suenaga *et al.*, 2002). In the second step, catechol dioxygenases are responsible to open the ring through ortho or meta oxidation *e.i.* the catechol 1,2-dioxygenase plays a central role in the cleavage of the aromatic

ring of catechol to cis,cis muconic acid in presence of 1 mol of oxygen (Nadaf and Ghosh 2011; Zaki, 2006). The biodegradation mechanism of biphenyl is well characterized in several bacterial strains such as *Burkholderia xenovorans* LB400 (Rehmann and Daugulis, 2006), *Achromobacter* sp. BP3 (Hong *et al.*, 2009) and *Rhodococcus* sp. (Takeda *et al.*, 2004; Chua *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2003). Takeda *et al.* (2004) proposed the major pathway for the *Rhodococcus* sp. strain RHA1 as follows: biphenyl oxidation to 2,3-dihydroxybiphenyl followed by 1,2-dioxygenative ring cleavage to form 2-hydroxy-6-oxo-6- phenylhexa-2,4-dienoate, which is then cleaved to benzoate and 2-hydroxypenta-2,4-dienoate.

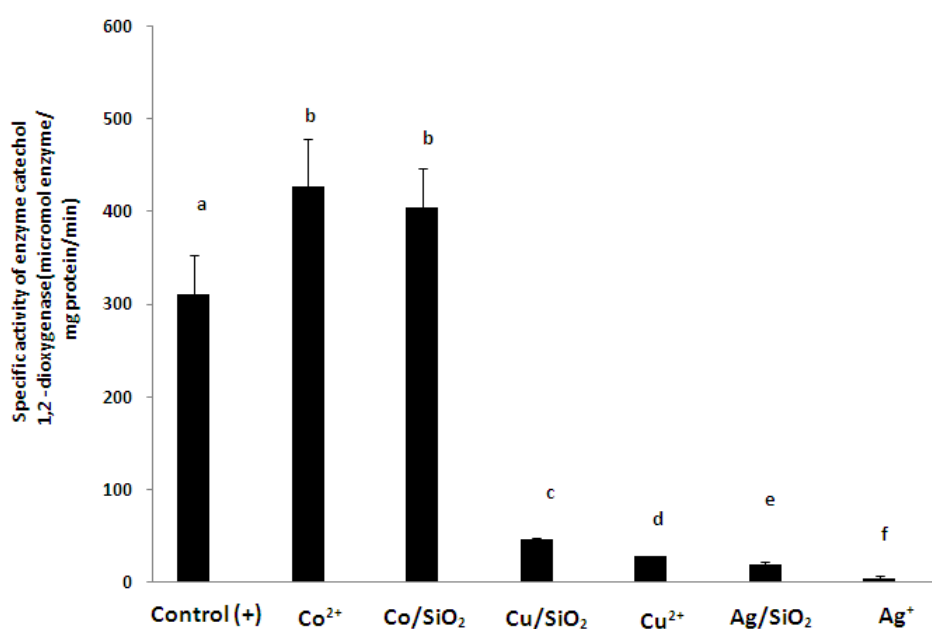


Figure II.3: Effect of 10^{-4} M of (cobalt, copper or silver) nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix by sol-gel method or (cobalt, copper or silver) ions on catechol 1,2-dioxygenase activity. Different letters above histograms means that the results are significantly different from the control ($p < 0.05$). The error bars means standard deviation on triplicates.

The effects of dissolved metallic ions or metal NP_s encapsulated in porous silica matrix were investigated on the activity of catechol 1,2-dioxygenase. The results are shown in Figure II.3. The Co²⁺ ions or Co/SiO₂ sample at 10^{-4} M of metal have a slight positive effect on the efficiency of enzyme activity ($p < 0.05$). By contrast, the results indicated that the addition of 10^{-4} M of Ag⁺ or Cu²⁺ ions or Ag/SiO₂ or Cu/SiO₂ samples inhibited the enzymatic reaction as compared to the positive control ($p < 0.05$).

These trends are in accordance with the results discussed in the former sections regarding the biphenyl biodegradation yields. They confirm some experimental data reported in the literature. Nadaf and Ghosh (2011) showed that the activity of catechol 1,2-dioxygenase was minimally affected by Co^{2+} ions for concentrations lower than 10^{-3} M, whereas the enzymatic reaction was completely inhibited by the addition of 10^{-3} M and 10^{-2} M of Co^{2+} ions. Similarly, Yeom and Yoo (1997) reported that silver ions at low concentrations have a strong inhibitory effect on the catechol 1,2-dioxygenase.

IV. Conclusions

The present study investigates the potential of the *Rhodococcus erythropolis* T902.1 to biodegrade biphenyl in the presence of encapsulated metals (Co/SiO_2 , Pd/SiO_2 , Ag/SiO_2 or Cu/SiO_2) inside a porous silica matrix and metallic ions (Co^{2+} , Cu^{2+} or Ag^+) at different concentrations 10^{-6} M, 10^{-5} M or 10^{-4} M. Biodegradation experiments found that silver ions are the most toxic to the *Rhodococcus erythropolis* T902.1, already at a concentration of 10^{-6} M. The presence of 10^{-5} M or 10^{-4} M of Cu^{2+} ions has also an inhibitory effect on the microbial metabolism and particularly on the activity of catechol 1,2-dioxygenase, a major enzyme involved in the biodegradative pathways of biphenyl. By contrast, the results show a strong positive effect of Co^{2+} ions on biphenyl biodegradation at different concentrations with a 70% higher degradation yield recorded at 10^{-4} M of Co^{2+} compared with the control conditions without metal ions of cobalt. On the other hand, the results indicate that the addition of Co/SiO_2 or Pd/SiO_2 samples at the same 10^{-4} M of metal concentration also stimulates biphenyl biodegradation with around 50% higher degradation yield than in control conditions. The highest biphenyl biodegradation rate and yield, *i.e.* 107 ± 3 ppm/d and $91 \pm 1\%$ respectively, were recorded in 250 mL baffled flasks stirred at 150 rpm with 10^{-4} M of Co/SiO_2 sample. They are about 85% and 70% higher than in control conditions without NPs. As a consequence, two advantages are suggested for the use of metallic NPs encapsulated inside silica matrix in order to improve *Rhodococcus erythropolis* activity: the encapsulation by sol-gel method (i) prevents agglomeration of the active sites and (ii) limits the availability of the anchored elements to the microorganisms able to produce siderophore-like molecules for catching them.

**Troisième section: Effets des nanoparticules de fer
encapsulées dans une matrice de silice poreuse sur
la biodégradation du biphényle par *Rhodococcus*
erythropolis T902.1**

Présentation de l'article

Dans le chapitre précédent, il a été démontré que la présence des nanoparticules de cobalt ou de palladium stimule la bioremédiation du biphényle. Néanmoins, ces nanoparticules, plus particulièrement les nanoparticules de palladium engendrent des problèmes de pollution de l'environnement. Ceci limite donc leur utilisation en tant que catalyseurs dans les sédiments. C'est dans cette optique, que d'autres types de nanoparticules moins nocives comme par exemple les nanoparticules de fer seront expérimentées dans le cadre de cette étude

Dans les conditions optimales de la bioremédiation du biphényle, l'influence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) en différentes concentrations (10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M) sur les performances de bioremédiation a été testée. La relation dose-effet entre la concentration des nanoparticules de fer et la bioremédiation du biphényle a été constatée.

Afin d'envisager une bioremédiation optimale du biphényle une interaction entre les nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) et *Rhodococcus erythropolis* T902.1. devrait être prise en compte. Dans ce cadre, ce chapitre se penchera, d'abord, sur l'étude du recyclage des nanoparticules métalliques de fer en présence de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 pendant trois cycles, ensuite sur le dosage de fer (dans le première cycle) dans les différents compartiments cellulaires (extracellulaires, intracellulaires, adsorbé sur les cellules) pour savoir si le fer est adsorbé et/ou internalisé par les cellules (ces deux expériences vérifieront si le fer s'échappe progressivement de la capsule de dioxyde de silicium (SiO_2) et finalement, sur le dosage de l'activité enzymatique, des principales enzymes impliquées dans la réaction de bioremédiation du biphényle sont: le biphényle dioxygénase et le catéchol 1,2-dioxygénase.

Effect of iron nanoparticles synthesized by a sol-gel process on *Rhodococcus erythropolis* T902.1 for biphenyl degradation

Wissal Wannoussa ^{1*†}, Thibaut Masy ^{1†}, Serge Hiligsmann ¹, Stéphanie D. Lambert ³, Benoît Heinrichs ³, Ludivine Tasseroul ³, Frédéric Weekers ², and Philippe Thonart ¹

Article publié dans le Journal dans le journal Water Resource and Protection. 2015, 7: 264-277.

¹ Walloon Centre of Industrial Biology, Departement of Chemistry and Bio-industries, University of Liège, B-5030 Gembloux, Belgium

² Laboratory of Nanomaterials, Catalysis and electrochemistry. B6A, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

³ Artechno S.A., Rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les Isnes, Belgium

Abstract

Nanoparticles (NP_S) are considered as a new generation of compounds to improve environmental remediation and biological processes. The aim of this study is to investigate the effect of iron NP_S encapsulated in porous silica (SiO₂) on the biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 (RT902.1). The iron NP_S (major iron oxide Fe_xO_y form) were dispersed in the porosity of a SiO₂ support synthesized by sol-gel process. These Fe/SiO₂ NP_S offer a stimulating effect on the biodegradation rate of biphenyl, an organic pollutant that is very stable and water-insoluble. This positive impact of NP_S on the microbial biodegradation was found to be dependent on the NP_S concentration ranging from 10⁻⁶ M to 10⁻⁴ M. After 18 days of incubation the cultures containing NP_S at a concentration of 10⁻⁴ M of iron improved RT902.1 growth and degraded 35% more biphenyl than those without NP_S (positive control) or with the sole SiO₂ particles. Though the microorganism could not interact directly with the insoluble iron NP_S, the results show that about 10% and 35% of the initial 10⁻⁴ M iron NP_S encapsulated in the SiO₂ matrix would be incorporated inside or adsorbed on the cell surface respectively and 35% would be released in the supernatant. These results suggest that RT902.1 would produce siderophore-like molecules to attract iron from the porous silica matrix.

Keywords: Biodegradation. Biphenyl. *Rhodococcus erythropolis*. Encapsulated nanoparticles. Sol-gel. Iron.

I. Introduction

Bioremediation of polluted soils is considered as a more effective and sustainable method to remove pollutants than physico-chemical technologies. It is also preferred to direct disposal of toxic and hazardous wastes (Watanabe, 2001; Indu Nair *et al.*, 2008). However, the bioremediation kinetics are very limited. Indeed, long time periods of a few months are needed for microbial degradation of highly complex or hydrophobic substances such as polyaromatic and polycyclic hydrocarbons.

Some studies showed that using certain metal ions at low concentrations accelerates the biodegradation rate (Sterritt and Lester, 1980; Mergeay *et al.*, 1985; Yeom and Yoo, 1997; De Windt *et al.*, 2005; Bunescu *et al.*, 2008). Similarly, Chun-Wei and Barbara (Chun-Wei and Barbara, 1996) demonstrated that the addition of cadmium, copper and chrome at low concentration of 0.01 ppm (*i.e.* about 10^{-7} M) enabled to achieve a 2-fold higher biodegradation rate of phenol, benzoate or 2-chlorophenol. By contrast, when comparing to the kinetics achieved at 2.5×10^{-5} M of metal. Kotresha and Vidyasagar (Kotresha and Vidyasagar, 2008) reported a 2-fold decrease of phenol biodegradation rate by *P. aeruginosa* MTCC 4996 in presence of 2×10^{-4} M of cobalt or nickel and up to 1.5×10^{-3} M of copper, cadmium or zinc. Furthermore these elements are heavy metals not suitable for environmental applications.

On the contrary, metallic iron may be accepted for environmental applications since it is less expensive and has a lower toxicity compared with the other metals (Nies, 1999; Lin *et al.*, 2006; Bunescu *et al.*, 2008; Kotresha and Vidyasagar, 2008). Bunescu *et al.* (2008) reported that the presence of iron up to 10^{-3} M did not inhibit the biodegradation of 2-aminobenzothiazol by *Rhodococcus rhodochrous*. In contrast, Lin *et al.* (2006) reported that the presence of copper at 1 mg/L and 10 mg/L (*i.e.* 7×10^{-6} M - 7×10^{-5} M) significantly reduced the degradation rate of methyl tert-butyl ether by *P. aeruginosa*.

Iron addition in the culture medium was shown to be effective for reductive degradation of a variety of toxic substances such as aromatic compounds (Santos *et al.*, 2008, Choro, 2008). Santos *et al.* (2008) showed that the presence of different forms of soluble iron at the concentrations of 10^{-4} M

(FeCl₃, Fe(NO₃)₃, Fe₂O₃, FeSO₄) had a positive impact on cell growth and biodegradation of anthracene by *Pseudomonas* sp with up to 25% higher biodegradation yield than in the control test with iron nitrate, the most soluble iron form. By contrast, concentrations higher than 2×10^{-4} M of this salt showed to inhibit the microorganisms. Choraó (2008) emphasized that the use of a Fe (III) - nitrilotriacetic acid complex (FeNTA) up to 10^{-3} M stimulated the biodegradation of 2-aminobenzothiazol by *Rhodococcus rhodochrous*.

These recent studies used different forms of iron: iron salts and iron complexes for the optimization of pollutant biodegradation. By comparison, the iron NP_S are preferred as they have a large surface area and high reactivity (Zhang, 2003). Moreover, when compared to many other metallic NP_S, the iron NP_S are stable, less expensive and less toxic for use with the microorganisms. They are therefore suitable for large scale industrial applications such as bioreactors for water treatment (Ansari *et al.*, 2008).

Previous studies demonstrated that using iron NP_S (individual or joint with other metal) accelerates the biodegradation of pollutants (Zhang, 2003; Murugesan *et al.*, 2011). Murugesan *et al.* (2011) reported that the presence of palladium–iron bimetallic NP_S (nFe–Pd) up to 0.1 g/L (estimated at 2×10^{-3} M Fe and 2×10^{-6} M Pd) in minimal salt medium is effective on the complete dechlorination of triclosan (2, 4, 40-trichloro 20-hydroxydiphenyl ether; up to 27 ppm initial concentration) and biodegradation of the intermediates metabolites by a strain of *Sphingomonas*. Zhang (2003) showed that using iron NP_S are very effective for the transformation of a wide variety of common environmental contaminants such as chlorinated organic solvents.

Currently, the nanomaterials open up a window for a range of applications in numerous fields as well as usual products and processes (Choi *et al.*, 2003). For example, the NP_S of titanium dioxide (TiO₂) are used for self-cleaning surfaces, for treatment of polluted water and in sun creams (Wagner *et al.*, 2009). SiO₂ NP_S are used as an anti-clumping-agent in common salt (Wagner *et al.*, 2009). In the biological field, the NP_S have a wide range of applications. On the one hand, the nanomaterials are used as antibacterial agents (*i.e.* NP_S of silver) (Pal *et al.*, 2007; Panyala *et al.*, 2008). On the other hand, some microorganisms may take advantages of nanoparticles to improve their potential in biological processes (Beckers *et al.*, 2013). These applications have attracted much

attention of researchers to develop new methods for the synthesis of the nanomaterials with specific properties such as thermal stability, high porosity and large surface area (Lambert *et al.*, 2004abc; Tilagam *et al.*, 2014).

The objective of this work was to improve biphenyl biodegradation by RT902.1 using iron NP_s encapsulated in porous silica SiO₂ synthesized by sol-gel methods. Indeed, several authors used the sol-gel method to obtain monometallic catalyst particles finely dispersed on a mineral support (Kaiser *et al.*, 1997). The process is based on the simultaneous hydrolysis and condensation of two alkoxy silanes: an SiO₂ network-forming reagent such as tetraethoxysilane (TEOS or Si (OC₂H₅)₄) and an alkoxy silane-functionalized ligand of the type (RO)₃Si-X-A, in which a functional organic group A, able to form a chelate with a cation of a metal such as iron, palladium or copper is linked to the hydrolyzable silyl group (RO)₃Si- via an inert and hydrolytically stable spacer X (Lambert *et al.*, 2004abc). The iron NP_s are encapsulated in the form of metal oxide (Fe_xO_y) in an inert matrix of silica. There is no chemical bond between SiO₂ and (Fe_xO_y). This is a physical blocking of metal oxides NP_s of 2 to 3 nm size in microporous SiO₂ crystallite (10 to 20 nm diameter) whose internal porosity is less than 1 nm. The mechanism involved in the improvement of biphenyl biodegradation by RT902.1 and mediated by NP_s was investigated via the mass balance of iron liberated from the capsule of SiO₂ and the enzymes involved in the two stages of biphenyl biodegradation (hydroxylation and cleavage of aromatic ring).

II. Material and Methods

II.1. Preparation concentrated suspensions of iron nanoparticles and SiO₂

The Fe/SiO₂ NP_s were prepared by the sol-gel method, as described by Heinrichs *et al.* (2008). This method consists of dissolving the iron (III) acetyl acetonate (Fe[CH₃COCHCOCH₃]₃) in the initial homogenous solution of silica gel precursor tetraethoxysilane (Si(OC₂H₅)₄ or TEOS). This complex dried at 80 °C after the gelation (Fe/SiO₂ dried). It is further calcined at high temperature (450 °C to 550 °C) to remove organic waste material and achieve the SiO₂ porous matrix encapsulating the iron oxide crystallites of Fe_xO_y (Fe/SiO₂ calcined). Moreover, the porous silica matrix without NP_s,

denoted SiO₂, was also synthesized by the sol-gel process to study the effect of the sole matrix of SiO₂ on biphenyl biodegradation (Lambert *et al.*, 2004c). The samples were characterized (textural analysis, electron microscopy, X-ray diffraction) by using the methods described by Lambert *et al.* (2004c) and Heinrichs *et al.* (2008). They showed that the catalyst Fe/SiO₂ calcined contained 1.53% (w/w) of active metal iron encapsulated in porous silica (Heinrichs *et al.*, 2008). A 10⁻² M Fe/SiO₂ suspension was prepared using 1.86 g of Fe/SiO₂ catalyst (agglomerates of microporous silica particles encapsulating iron NP_S produced by sol-gel process and finely pounded at micrometer size for accurate weighing) in 50 mL ultrapure water (Milli-Q water, 182 MΩ cm). According to the experimental conditions, a defined volume of the homogenized 10⁻² M Fe/SiO₂ suspension was transferred rapidly, due to fast settlement, in the culture medium prior to sterilization in order to reach a final iron concentration ranging from 10⁻⁴ to 10⁻⁶ M.

II.2. Culture

Precultures were prepared in 250 mL baffled flasks containing 50 mL of M284 minimal medium (Weekers *et al.*, 1999), complemented by 5 g/L of glucose. The medium was sterilized for 20 minutes at 121 °C and cooled down to room temperature before inoculation at an initial cell density of about 10⁹ cell/mL by transfer of colonies of RT902.1 developed on M284 + agar medium. The microbial suspension was incubated for 3 days at 30 °C and 150 rpm orbital agitation. The glucose was totally consumed after 3 days of incubation (assayed by the Kit RTU glucose BioMerieux, F). For the biphenyl biodegradation experiments, the culture medium was prepared similarly in 100 mL flasks (in triplicates) with 20 mL M284 minimal medium supplemented with calcined or dried iron NP_S at concentrations ranging from 0 (positive control) to 10⁻⁴ M of metal element. After sterilization, 1 mL of a 10 g/L biphenyl solution in n-hexane was added on the culture medium to achieve a biphenyl initial concentration of 500 ppm as source of carbon and energy. The evaporation of n-hexane was allowed overnight under a ventilated hood leaving biphenyl crystals suspended in the M284 minimal medium. A relatively homogenous suspension of biphenyl crystals in aqueous phase was achieved by vigorous mixing for 2 minutes using a mixer (POLYTRON® PT 1200 E, KINEMATICA AG, CH) sterilized by immersion in three successive solutions: SDS 5%, sodium hypochlorite 4% and norvanol 9%. The resulting suspension was inoculated with 3 mL of

preculture and incubated at 30 °C (150 rpm orbital agitation). Test controls were also prepared in the same conditions but without added NP_S nor SiO₂ (positive control), with the sole SiO₂ matrix (positive control + SiO₂) or without inoculum (negative control with or without Fe/SiO₂ NP_S). The negative controls were carried out in triplicates to examine the abiotic removal/evaporation of biphenyl. The optical density was measured at 600 nm (Ultrospec III, Pharmacia LKB) at different time points of incubation (after 3, 8 and 18 days). The interference of NP_S on absorbance was corrected with the control samples that contained only NP_S to confirm the bacterial growth.

II.3. Biphenyl and major metabolites analysis

Biphenyl residual concentration in the culture medium was measured by HPLC at different time points of incubation (after 3, 8 and 18 days) after liquid-liquid extraction in organic solvent. Glass tubes of a total volume of 10 mL (culture tube 16 x100 SVL SCRE, PyrexR, UK) with Teflon seal and containing 2 mL sample and 4 mL n-hexane were mixed for 24 h at 30 °C. After centrifugation at 7000 rpm (SAL-1500 rotor in SorvallR RC5B+ centrifuge) for 15 min the organic phase was transferred in glass tubes for overnight evaporation of solvent under a constant ventilated hood. Crystals of biphenyl were resuspended in 10 mL methanol before analysis by HPLC. The major metabolites from biphenyl biodegradation *i.e.* catechol and benzoic acid were analyzed in the aqueous phase recovered after liquid-liquid extraction. It was centrifuged at 13.000 rpm for 2 min and the supernatant was filtered through a 0.2 µm cellulose acetate filter before HPLC analysis. HPLC analyses were performed using an Agilent 1100 Series equipment and a C18 column (LiChroCART® 250-4.6 HPLC-cartridge Purospher® STAR RP -18 endcapped 5µm, Merck, D) maintained at 30 °C. The mobile phase contained acetonitrile and Milli-Q water in the ratio 70/30 or 35/65 in order to determine the biphenyl concentration or the metabolites respectively. Its pH was adjusted to 2.75 with 1.5 M phosphoric acid. The flow rate was 0.8 mL/min and 10 µL of the sample were injected. Biphenyl, benzoic acid and catechol were detected at 254 nm and their concentration in samples was calculated from a standard graph determined using pure compounds.

II.4. Recycling of calcined iron NP_s

After 18 days of incubation, the culture was centrifuged at 7000 rpm for 15 min. The pellet was calcined for 4 hours in porcelain crucible directly on the flame in order to completely oxidize the organic compounds. After calcination, the inorganic matrix was added for a first cycle in 100 mL flasks, with 20 mL of M284 minimal medium and 3 mL of fresh inoculum. The supernatant volume of the culture (about 14 mL after 3 samples collection of 2 mL) was transferred in another 100 mL flask supplemented to 20 mL with M284 minimal medium before inoculation with 3 mL of fresh inoculum. A second and a third cycles were carried out using the same procedure applied to the flasks containing the NP_s and also for the control culture (without NP_s).

II.5. Iron titration

The total iron concentration was determined using the method slightly modified from Bunesco, (2006). The total iron concentration was determined after the reduction of Fe³⁺ with a solution of ascorbic acid (3%) and reaction with orthophenanthroline forming a strong-colored complex with Fe²⁺. In a 10 mL flask, 300 μL of sample were mixed with 4200 μL of ascorbic acid (3% w/v in ultrapure water) and stirred. After, 2 min wait and addition of 500 μL of a 1% orthophenanthroline solution (w/v in ethanol for analysis), the optical density was measured at 510 nm. This procedure was used to determine the iron concentration in the different compartments of the RT902.1 biomass (extracellular, intracellular, and at the cell surface) at the end of the experiment (after 18 days of incubation) with calcined 10⁻⁴ M Fe/SiO₂ and 500 ppm biphenyl. According to Bezkorovainy *et al.* (1986) 4 mL of the culture medium (in triplicates) was sampled after rapid settlement of Fe/SiO₂ catalyst and separated into two fractions. The first 2 mL fraction (way A₀) was centrifuged at 13.000 rpm for 20 min before measurement of the soluble iron in the supernatant (A₀). The pellet was washed with 2 mL of ultrapure water (Milli-Q water, 18.2 MΩ cm). After centrifugation, the iron concentration in the supernatant (A₁) was determined. This step with ultrapure water was repeated three times more. The sum (A₁+A₂+A₃+A₄) gave the concentration of the iron absorbed at the surface of the cells. The pellet was then resuspended with 2 mL of ultrapure water, and the cells were disrupted by sonication at a frequency of 10 kHz for 3 min. After centrifugation at 13.000 rpm

for 20 min, iron concentration was measured in the supernatant A_5 and in the pellet after resuspension in 2 mL of ultrapure water A_6 . The sum (A_5+A_6) corresponds to the intracellular iron concentration. All the steps described previously were carried out at 4 °C. The second 2 mL fraction (way B) was disrupted by sonication at a frequency of 10 kHz for 3min and centrifuged at 13.000 rpm for 20 min. The total iron concentration (B_1+B_2) was determined as the sum of the soluble iron concentration in the supernatant (B_1) and the iron adsorbed on the cell membrane determined after analysis of the pellet resuspended in 2 mL ultrapure water (B_2). The concentration of the total iron measured in both fractions A and B (*i.e.* $9.8 \times 10^{-5} \text{ M} \pm 0.01$ and $11 \times 10^{-5} \text{ M} \pm 0.01$ respectively) were similar to the theoretical value of 10^{-4} M confirming the suitability and accuracy of the procedure. The procedure applied to the positive control (10^{-5} M theoretical iron concentration due to the presence $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NH}_4$ citrate added in the culture medium at a higher level than in the first experiment of Figure 1 for better reproducibility) lead to a total iron concentration measured in the first fraction A (*i.e.* $2 \times 10^{-5} \text{ M} \pm 0.01$) that was close to that of the second fraction B (*i.e.* $9 \times 10^{-6} \text{ M} \pm 0.01$).

II.6. Enzyme assays

For the enzyme assays needing larger biomass material, the cultures were carried out in 500 mL flasks (in triplicates) with 100 mL of M284 minimal medium complemented by iron NP_5 at concentrations of 0 (positive control) or 10^{-4} M of metal element. The cultures were sterilized for 20 minute at 121 °C. After sterilization, 5 mL of 10 g/L biphenyl solution in n-hexane were added as the sole carbon and energy source. The other steps were as described above (Section “Cultures”). After 18 days of incubation, the cells were centrifuged at 13.000 rpm for 20 min and washed twice with a potassium phosphate buffer 0.05 M (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 7.5. The pellets were resuspended in a sufficient volume of the same buffer to obtain a cellular concentration of 0.05 g of wet cells per mL. The cell suspension was then sonicated at a frequency of 10 kHz for 2 min and centrifugated at 13.000 rpm for 40 min. The supernatant containing crude cell free extracts was used to determine the biphenyl dioxygenase activity and catechol1,2- dioxygenase activity. During all these operations, the extracts were maintained at 4 °C.

The biphenyl dioxygenase activity was determined as the initial rate of indigo formation monitored spectrophotometrically at 610 nm. The molar extinction coefficient for indigo at 610 nm was calculated at $15.900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (O'Connor *et al.*, 1997). For the determination of specific rates of

indigo formation, a 100 μL volume of concentrated cell free extracts was added in a 1.5 mL tube preincubated for 5 min at 30 $^{\circ}\text{C}$ to 390 μL of 0.05 M phosphate buffer (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 7.5) and 10 μL of a 10 M indole solution in N, N dimethylformamide. The amount of indigo formed in the samples was calculated from a standard graph determined using pure compound of indigo. One unit of enzyme activity was expressed in mg of indigo liberated/minute/mg protein. For the determination of catechol 1,2-dioxygenase specific activity, a 100 μL volume of concentrated cell-free extracts was added to 900 μL of 0.05 M phosphate buffer (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 7.5) and 20 μL of 10 mM catechol. The specific activity was monitored at 260 nm ($\epsilon = 16.8 \text{ mM}^{-1}$) (Nadaf and Ghosh, 2011). The amount of cis, cis-muconic acid formed in the samples was calculated from a standard graph determined using pure compound of cis, cis-muconic acid. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme catalyzing the production of 1 μmol cis, cismuconic acid per minute at 30 $^{\circ}\text{C}$.

II.7. Protein concentration

Protein concentration in culture samples was measured by the Bradford method using Bovine Serum Albumin as a standard (Bradford, 1976).

II.8. Statistical analysis

The SAS software (SAS Institute 2001) was used for all statistical analyses. The general linear model (GLM) was used to determine whether the effect of metallic NP_5 was significant on the biodegradation potential of RT902.1. Least square means and standard errors were calculated. A p -value of < 0.05 was chosen as the threshold for significance of all statistical comparisons.

III. Results and Discussion

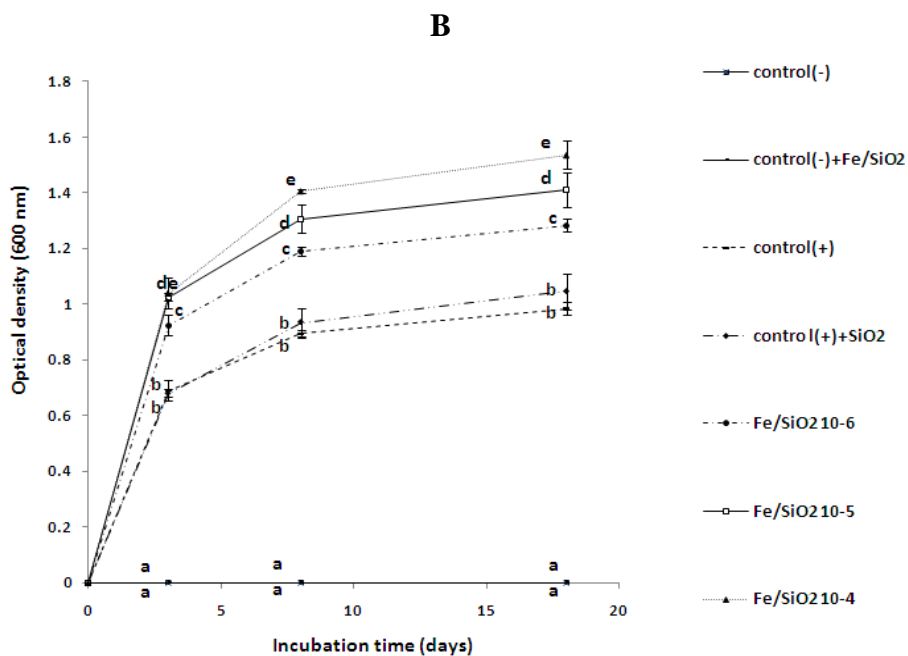
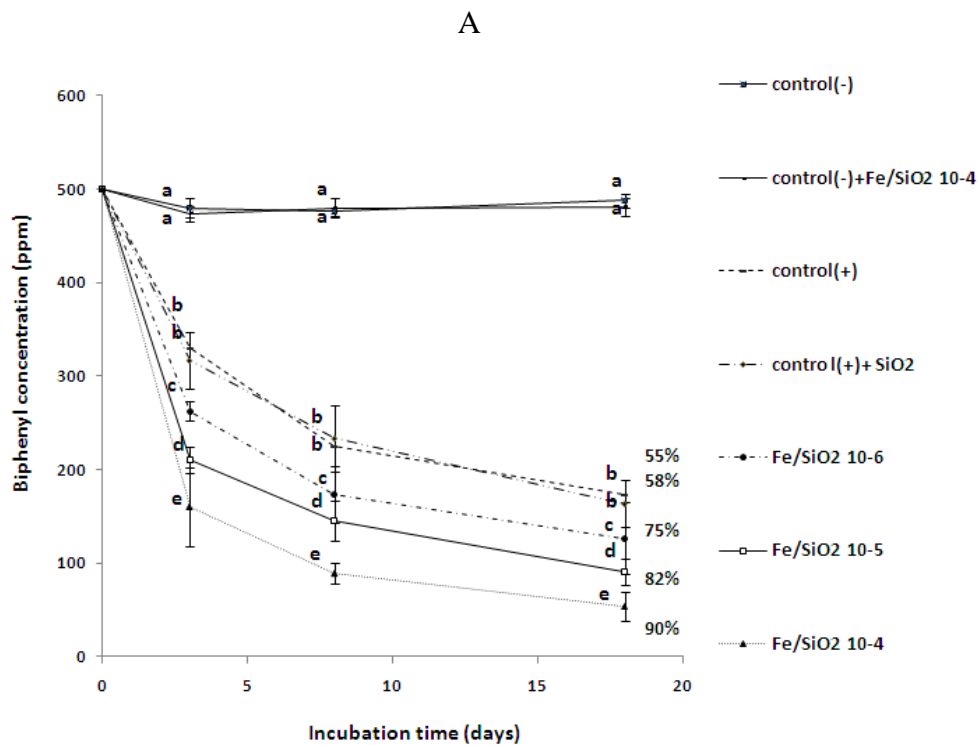
III.1. Biodegradation of biphenyl in the presence of iron NP_S Fe/SiO₂ synthesized by sol- gel process.

Three biodegradation experiments were carried out successively in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 culture medium with 500 ppm biphenyl and inoculated by 3 mL of preculture. First we investigated the effect of calcined iron NP_S added in the culture medium at concentrations ranging from 10⁻⁶ to 10⁻⁴ M the comparison of the impact of 10⁻⁴ M of calcined iron NP_S and dried iron NP_S was assessed. In the third experiment, the recycling of calcined iron NP_S was carried out for 2 further cultures in order to test their effect on the long term.

III.2. Effect of NP_S concentration

Figure III.1 A–B shows that the presence of iron NP_S without inoculum did not exhibit any effect on the degradation of biphenyl when compared to the negative control without Fe/SiO₂ NP_S at all time points ($p > 0.05$). It suggests that the presence of different iron NP_S concentrations in the absence of bacteria did not contribute to an abiotic mechanism of biphenyl degradation. By comparison, Lipczynska-Kochany *et al.* (1994) reported that the addition of iron (Fe⁰) without inoculum exhibits abiotic effect on the degradation of carbon tetrachloride. This effect was increased in the presence of sulphur compounds such as sodium sulphate, sodium sulphide, and ferrous sulphide. However, such abiotic effect on partial degradation and/or bioavailability improvement of complex molecules for further biodegradation was mainly reported for halogenated compounds (Lipczynska-Kochany *et al.*, 1994; Murugesan *et al.*, 2011). Moreover the abiotic effect would not be effective in our experimentations because the biphenyl is insoluble in the culture medium and iron NP_S are encapsulated inside the porous silica matrix (Heinrichs *et al.*, 2008) preventing a direct contact with each other. By contrast, the present study shows that biphenyl concentration decreases with RT902.1 growth (measured by OD at 610 nm) and that the biodegradation rate increases with increasing the Fe/SiO₂ concentration (Figure III.1). Iron NP_S at the concentration of 10⁻⁴ M significantly influenced the biphenyl biodegradation efficiency when

compared to the concentration of 10^{-5} M and 10^{-6} M ($P < 0.05$) since biphenyl biodegradation yields up to 90%, 82% and 75% respectively after 18 days of incubation (Figure III.1-A).



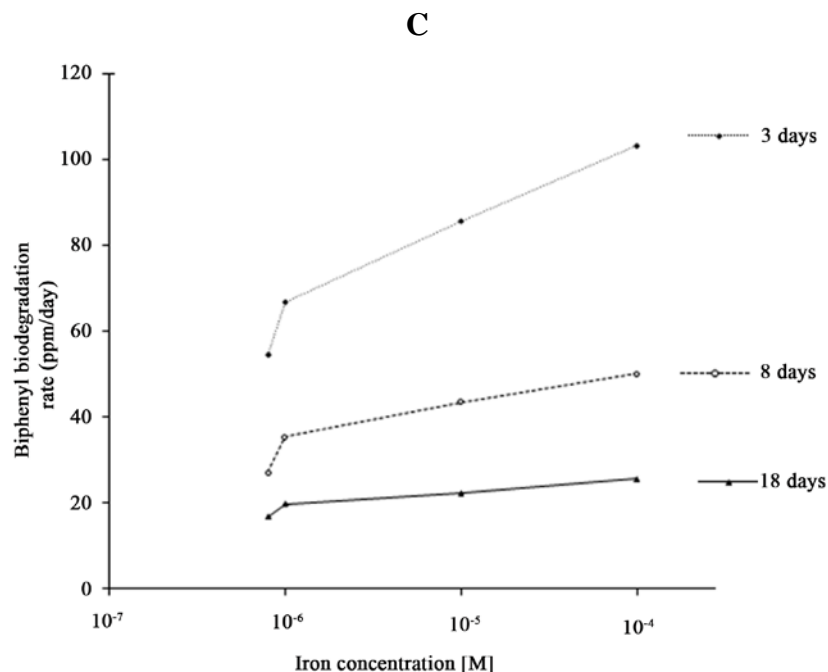


Figure III.1: Evolution of biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1(RT902.1) in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium, 500 ppm biphenyl and different concentrations of calcined iron nanoparticles from 10^{-6} to 10^{-4} M: (A) biphenyl concentration, (B) growth measured by optical density at 600 nm, (C) biphenyl biodegradation rate after 3, 8 and 18 days of culture. Control (-) and control (-) + Fe/SiO₂ were carried out without microorganisms, control (+) without NP_s nor SiO₂, control (+) +SiO₂ without NP_s. The similar letters (aa, bb, cc, dd and ee) indicate that no significant statistical differences were observed (p -value > 0.05) at different time points of biphenyl biodegradation by RT902.1.

Figure III.1-C also shows that the biphenyl degradation rate increases significantly (*i.e.* by about 30%) at day 3 when adding 10^{-6} M of iron NP_s to the culture medium already containing 7×10^{-7} M iron ammonium citrate and, during the exponential growth phase (*i.e.* results recorded at 3 days of incubation), this rate increases logarithmically with increasing NP_s concentration. As a consequence, since the presence of 10^{-4} M Fe/SiO₂ lead to biphenyl degradation rate about 2 fold higher than in the positive control it was therefore unfavorable for further industrial application to test higher NP_s concentrations. Rapid tests up to 2×10^{-3} M Fe/SiO₂ did not achieved higher biodegradation yields after 18 days of incubation (results not shown).

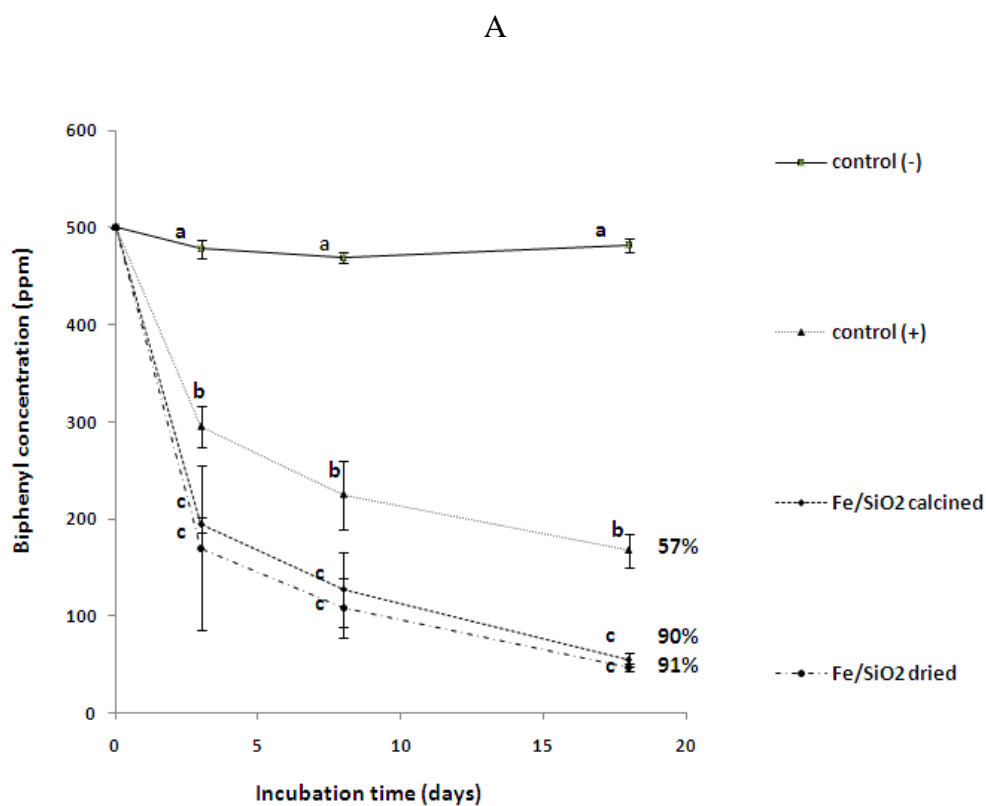
Tableau III.1: Evolution of benzoic acid and catechol production from biphenyl biodegradation (500 ppm initial concentration) by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 cultured for 18 days in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with or without 10^{-4} M of calcined iron NP_s

Incubation time	Metabolites concentration (ppm)		
	3 days	8 days	18 days
Catechol			
Positive control	66.14 ±0.09	33.00 ±0.07	19.40 ±0.08
Culture with Fe/SiO ₂ 10 ⁻⁴ M	74.38 ±0.06	43.36 ±0.09	24.50 ±0.03
Benzoic acid			
Positive control	1.19 ±0.10	3.09 ±0.35	13.39 ±0.96
Culture with Fe/SiO ₂ 10 ⁻⁴ M	4.36 ±0.14	10.30 ±0.21	25.39 ±0.92

The decrease of biphenyl biodegradation rate after three days of culture, regardless of the concentration of NP_s (Figure III.1-C) should be related with the release of soluble metabolites, which gives a yellow color to the medium (Kuony, 2005). HPLC analysis of the aqueous phase of the culture medium revealed the presence of two compounds identified as catechol and benzoic acid (Table III.1) (retention time of 4.3 min and 7.9 min respectively). Benzoic acid concentration increased regularly whereas catechol appeared in the culture during the growth phase and disappeared during the stationary phase. These compounds were already identified with the *Micrococcus* species and *Rhodococcus* species in the presence of biphenyl as the sole source of carbon (Bevinakatti and Ninnekar, 1992; Takeda *et al.*, 2004). Since the yellow color appeared with RT902.1 growth on biphenyl and disappeared after about 12 days of incubation, the analysis of the carbon mass balance considering this substrate and the major metabolites (Table III.1) indicates that biphenyl is partially metabolized by RT902.1. This result is in agreement with Bevinakatti and Ninnekar (1992) who showed that the culture medium became yellow colored during growth of *Micrococcus*, indicating that the biphenyl was metabolized by this strain. Additionally, Kuony (2005) also reported the production of yellow compounds without increasing the bacterial density, indicating that the aromatic hydrocarbons (fluorene and fluoranthene) were partially metabolized by *Mycobacterium* sp. 6py1.

III.3. Effect of dried or calcined NP_s

The impact of 10^{-4} M Fe/SiO₂ calcined NP_s on biphenyl biodegradation was compared with similar NP_s that did not undergo the calcination step. Therefore the iron NP_s were still complexed between the acetyl acetate and tetraethoxysilane molecules (Heinrichs *et al.*, 2008) whereas the calcined iron NP_s are in the form of metallic oxide (Fe_xO_y) (Mahy *et al.*, 2014). Figure III.2A–B shows that dried or calcined iron NPS achieved similar improvement effect on biphenyl biodegradation (90% or 91%). These results confirm that iron NPS, whatever reduced, complexed or oxidized have a positive impact on the potential of RT902.1. They are consistent with those reported by Ansari *et al.* (2008) about dibenzothiophene biodesulfurization carried out by *Rhodococcus erythropolis* IGST8 decorated with 4×10^{-4} M of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles.



B

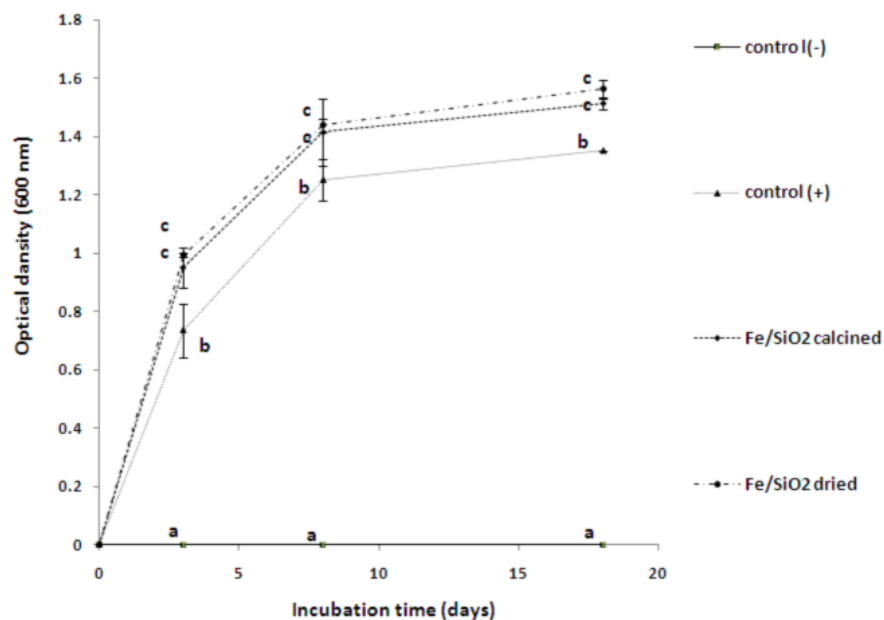


Figure III.2: Evolution of biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902(RT902.1) in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium, 500 ppm biphenyl and 10^{-4} M of calcined or dried iron nanoparticles : (A) biphenyl concentration and (B) growth measured by optical density at 600 nm. The similar letters (aa, bb, and cc) indicate that no significant statistical differences were observed (p -value > 0.05) in the presence of 10^{-4} M of calcined or dried iron nanoparticles.

They achieved a 56% higher desulfurization activity in basic salt medium than with the nondecorated cells. Olle *et al.* (2006) also reported that the presence of 1 M of colloidal dispersions of magnetite (Fe_3O_4) improves cell density in bacterial cultures. Regarding the presence of iron complexed by potentially inhibiting-organic molecules such as acetyl acetate and tetraethoxysilane in dried Fe/SiO₂, Bunescu *et al.* (2008) reported that the presence of Fe(III)-nitrilotriacetic acid complex (FeNTA) increased the degradation of 2-aminobenzothiazol by *Rhodococcus rhodochrous* without any inhibition up to 5×10^{-4} M FeNTA.

III.4. Effect of NP_S recycling

Following the experiment with 10^{-4} M calcined Fe/SiO₂ NP_S, two cycles of culture (fresh inoculum) were carried out with the initial 10^{-4} M NP_S recovered at the end of each culture by centrifugation and calcination to remove biomass. In parallel a similar procedure was applied to the supernatant of the cultures (without NP_S) but considering a potential additional concentration of soluble iron transferred from the NP_S. As seen in Table III.2, the biphenyl degradation yield in presence of Fe/SiO₂ NP_S (pellet) decreased progressively with time (3 cycles during 64 days) from 90% to 84% and 82% respectively. Compared with Figure III.1-A this trend did not overtake the results with 10^{-5} M NP_S (82%). By contrast, the biphenyl degradation yield increased progressively in the different supernatants from the successive cultures with increase of available iron released from the capsule of SiO₂. Indeed the concentration of iron in the supernatants increased from 2×10^{-5} M ± 0.01 to 6×10^{-5} M ± 0.01 respectively.

Table III.2: Evolution of total iron concentration, biphenyl biodegradation yield in % and growth measured by optical density of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 (RT902.1) after three successive cycles of 18 days of incubation in 100 mL flasks containing 20 mL of minimal medium and 500 ppm biphenyl with or without 10^{-4} M of calcined iron NP_S.

First cycle				
Experience condition	Culture with Fe/SiO ₂		Positive control	
	pellet	supernatant	pellet	supernatant
Biphenyl biodegradation yield (%)	90	64	55	56
Optical density	1.60 \pm 0.07	0.85 \pm 0.04	0.75 \pm 0.06	0.73 \pm 0.07
Total iron (M)	$9.2 \times 10^{-5} \pm 0.01$	$2.0 \times 10^{-5} \pm 0.01$	$6 \times 10^{-6} \pm 0.01$	$2 \times 10^{-6} \pm 0.01$
Second cycle				
Experience condition	Culture with Fe/SiO ₂		Positive control	
	pellet	supernatant	pellet	supernatant
Biphenyl biodegradation yield (%)	84	65	58	57
Optical density	1.54 \pm 0.09	1 \pm 0.08	0.76 \pm 0.06	0.74 \pm 0.09
Total iron (M)	$8.6 \times 10^{-5} \pm 0.01$	$3.0 \times 10^{-5} \pm 0.03$	$4 \times 10^{-6} \pm 0.02$	$3 \times 10^{-6} \pm 0.01$
Third cycle				
Experience condition	Culture with Fe/SiO ₂		Positive control	
	pellet	supernatant	pellet	supernatant
Biphenyl biodegradation yield (%)	82	69	57	56
Optical density	1.52 \pm 0.06	1.00 \pm 0.09	0.76 \pm 0.06	0.75 \pm 0.07
Total iron (M)	$8.1 \times 10^{-5} \pm 0.01$	$6.0 \times 10^{-5} \pm 0.01$	$5 \times 10^{-6} \pm 0.00$	$3 \times 10^{-6} \pm 0.02$

The positive control (flasks with pellet and flasks with supernatant) showed similar biphenyl degradation yields and iron concentrations during the three cycles. Since, as measured by ICP-AES method (Mahy *et al.*, 2014), only 0.02 % of the iron releases naturally from NP_S in culture medium without microorganisms (probably due to some unstable Fe/SiO₂ capsules in autoclave), these results indicate that interactions should exist between the bacteria and the metallic encapsulated elements. Therefore iron would be attracted progressively from the capsule of SiO₂. One can imagine that this mechanism is initiated for consumption of iron by the bacteria cells.

III.5. Iron distribution in the different compartments of RT902.1

Iron concentration was measured in the different compartments of the biomass (extracellular, intracellular and at the cell surface) after 18 days of incubation (first cycle of the experiment of section “Effect of NP_S recycling”). Table III.3 shows that while the biomass was not totally similar in the cultures with NP_S and the positive control, about 35% of the iron initially present in the 10⁻⁴ M Fe/SiO₂ NP_S was found in solution (3.5×10^{-5} M ± 0.01) a similar content was adsorbed at the cell surface (3.4×10^{-5} M ± 0.01) and about 10% was considered intracellular (9×10^{-6} M ± 0.01). This distribution also enables to calculate that about 25% of the initial 10⁻⁴ M iron NP_S was still encapsulated after the first cycle and, assuming a similar distribution at each of the 3 cycles experimented in the section “Effect of NP_S recycling”, it can be estimated that about 35% of the iron was lost in each supernatant. Therefore the total iron content in the third cycle would reach 10⁻⁵ M with a low residual iron amount in the Fe/SiO₂ catalyst. This is in accordance with the decreasing trend of biphenyl degradation yields in the successive cycles.

Tableau III.3: Iron concentration in the different compartments of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 (RT902.1) cells (extracellular, intracellular and at the cell surface) after 18 days of incubation in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium, 500 ppm biphenyl and 10^{-4} M of calcined iron NP_S (first cycle).

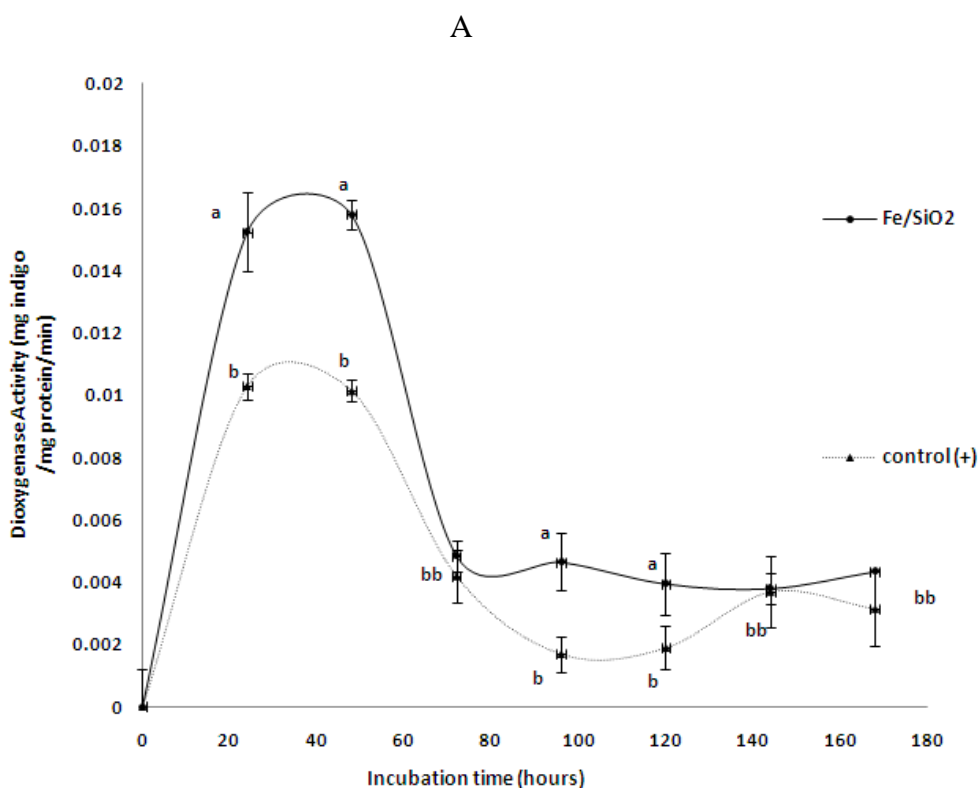
Experience condition	Iron concentration (M)		
	Soluble extracellular	Absorbed at cell surface	Intracellular
Positive control	$8.1 \cdot 10^{-6} \pm 0.01$	$5.4 \cdot 10^{-6} \pm 0.01$	$6.7 \cdot 10^{-6} \pm 0.01$
Culture with Fe/SiO ₂ 10 ⁻⁴ M	$4.3 \cdot 10^{-5} \pm 0.01$	$3.9 \cdot 10^{-5} \pm 0.01$	$1.6 \cdot 10^{-5} \pm 0.01$
Iron released from the SiO ₂ capsule			
Molar unit	$3.5 \cdot 10^{-5} \pm 0.01$	$3.4 \cdot 10^{-5} \pm 0.01$	$9.1 \cdot 10^{-6} \pm 0.01$
%	35.6	34.6	9.5

To our knowledge, the literature does not report any precise answer about the metabolism of iron NP_S during biphenyl biodegradation by *Rhodococcus* strains. These bacteria are not able to degrade SiO₂ and the iron NP_S, with sizes of about 2-3 nm, are embedded in inorganic microporous silica particles of around 10 to 20 nm diameter with pores not exceeding 1 nm diameter (Lambert *et al.*, 2004). Therefore, *Rhodococcus erythropolis* cells cannot enter into the silicon dioxide matrix to directly catch the iron. As a consequence RT902.1 would produce specific microbial sensors such as siderophores in order to attract iron from the inside of the silicon dioxide microporous structure as suggested by some authors (Carrano *et al.*, 2001; Kraemer, 2004). This result is in agreement with Kasemets *et al.* (2009) who proposed that since in the normal conditions NP_S cannot enter the yeast cells, these cells would produce specific microbial sensors, for the internalization of nanoparticles. Kraemer (2004) also showed that siderophore stimulated the solubility and dissolution kinetics of iron oxides in environments.

III.6. Effect of NP_S on major enzymes activity

Regarding the reduction of iron, there are two main ways reported in the literature. First extracellularly, the flavin reductase reduces Fe³⁺ to Fe²⁺, then Fe²⁺ is transported by a specific membrane transporter into the cell (Bunescu, 2006). In the second way, the Fe³⁺ is chelated by a siderophore that is integrated into the cell, where Fe³⁺ is reduced (Pierre *et al.*, 2002). Intracellularly, an enzyme complex simultaneously reduces Fe³⁺ to Fe²⁺ and activates the enzymes which are responsible of the main steps of biphenyl biodegradation. Indeed, the structure of purified dioxygenase confirms the presence of Rieske cluster [2Fe-2S] and Fe²⁺ on different sites. It could

be inhibited when Fe^{2+} is oxidized in Fe^{3+} and reactivated by the addition of Fe^{2+} (Furusawa *et al.*, 2004; Zaki, 2006). Nadaf *et al.* (2011) found that the enzymatic activity of catechol 1,2-dioxygenase was completely inhibited with addition of 10^{-3} M of Fe^{3+} . This study also confirms the Fe^{2+} form of the iron inside the cells. The dioxygenase activity assayed by indigo production from indole added to culture samples (Zaki, 2006). Figure III.3-A showed that the presence of 10^{-4} M Fe/SiO_2 NPs has a positive impact on the enzyme.



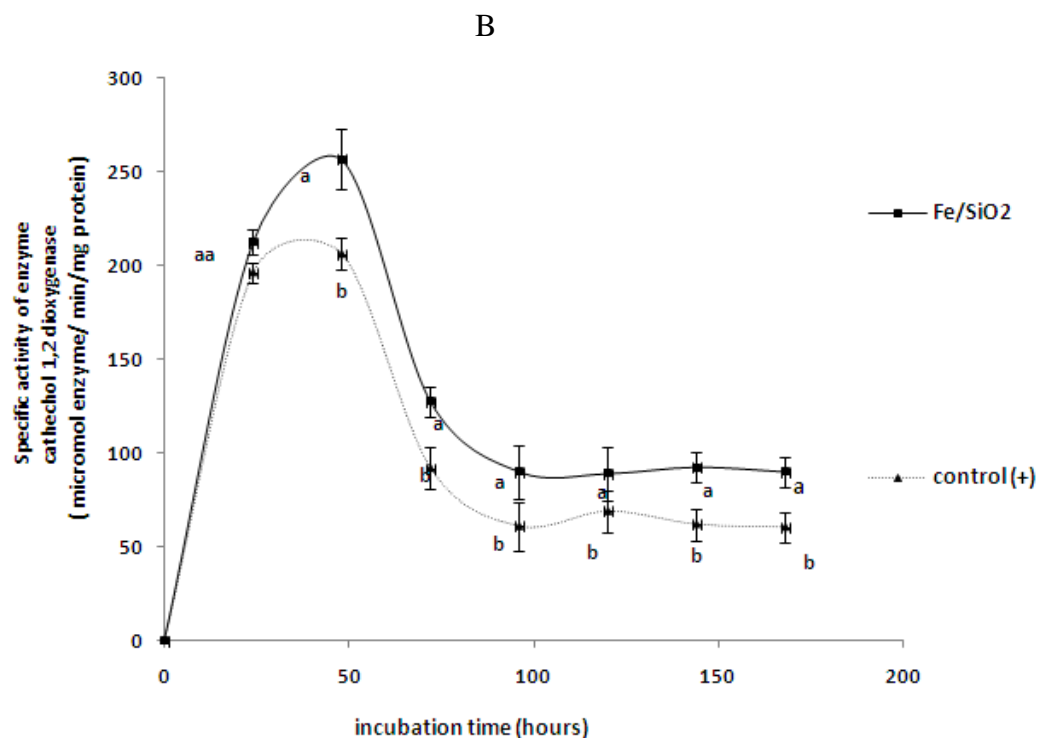


Figure III.3: In 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium, 500 ppm biphenyl and 10^{-4} M of calcined iron nanoparticles: (A) Biphenyl dioxygenase activity defined as the rate of indigo formation per mg protein and (B) 1,2-catechol dioxygenase specific activity versus time. The similar letters indicate that no significant statistical differences were observed between the two curves (p -value > 0.05).

Indeed, the enzyme activity achieved a specific rate of 0.016 mg indigo/mg protein/min after 48 hours of incubation compared to the 0.01 mg indigo/mg protein/min in the positive control, then it decreased dramatically until the end of the experiments (75 hours of incubation). Similarly Figure III.3-B suggests that Fe/SiO₂ stimulates the catechol 1,2-dioxygenase activity ($p < 0.05$). These results are consistent with those of Yeom and Yoo (1997) and Dinkla *et al.* (2001) who showed that the activity of the enzymes responsible of the biodegradation of pollutants increased after the addition of iron in the culture medium. It should also be mentioned that the higher cell density achieved in presence of iron NPs or the higher iron availability for the microorganisms could lead to higher biphenyl bioavailability through an improved production of biosurfactants that are often mentioned in the literature regarding hydrocarbons biodegradation by *Rhodococcus* strains (Zheng *et al.*, 2012).

IV. Conclusions

The results of this study have shown that the biphenyl biodegradation by RT902.1 is improved in the presence of the iron NP_S encapsulated in porous silica. This improvement was found to be dependent on the Fe/SiO₂ concentration but not on the iron form whatever calcined as iron oxide or simply dried as iron complex with organic compounds. The highest biodegradation performance with a 35% higher biphenyl degradation yield was recorded with 10⁻⁴ M of iron NP_S than in the control conditions without NP_S. The performance increase is mainly recorded in exponential growth phase with a logarithmic increase of biphenyl degradation rate with increase of iron NP_S concentration from 10⁻⁶ to 10⁻⁴ M. It was also showed that the positive effect of 10⁻⁴ M Fe/SiO₂ NP_S was related to a higher enzyme activity since the biphenyl dioxygenase and catechol 1,2-dioxygenase reached an about 50% and 25% higher maximum activity respectively. In addition, the analysis of the iron distribution showed that about 10% and 35% of the initial 10⁻⁴ M iron NP_S encapsulated in the SiO₂ matrix would be incorporated inside or adsorbed on the cell surface and 35% would be released in the supernatant. These results suggest that RT902.1 would produce siderophore-like molecules to attract iron from the porous silica matrix.

**Quatrième section: Stimulation de la biodégradation du
Biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en
présence de FeCl₃ et de nanoparticules de fer
encapsulées dans une matrice de silice poreuse**

Présentation de l'article

Les nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) interagissent grandement avec la souche de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 lui permettant à la fois d'avoir une bonne productivité et d'atteindre une bonne bioremédiation du biphényle dans les gammes de pH (6.4; 7 et 7.6). Ce travail sera focalisé sur l'étude de l'impact de pH sur la stabilité de fer à l'intérieure de la capsule de dioxyde de silicium (SiO_2), sur la cinétique de la réaction de la bioremédiation du biphényle en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) et du sel de fer (FeCl_3) et sur la concentration de fer à l'intérieur des cellules de *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Par la suite, cette étude a permis de mettre en évidence l'impact de l'ajout de source de carbone supplémentaire (glucose ou éthanol) sur l'optimisation de la bioremédiation du biphényle et la stimulation de la viabilité cellulaire. Finalement, la question était de savoir sous quelle forme le fer était biodisponible pour *Rhodococcus erythropolis* T902.1.

Biphenyl biodegradation enhancement by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 with FeCl₃ and iron nanoparticles encapsulated in porous silica Fe/SiO₂

Wissal Wannoussa ^{1*}, Serge Hiligsmann ¹, Stéphanie D. Lambert ², Benoît Heinrichs ², Frank Delvigne ³, Philippe Jacques ³ and Philippe Thonart ¹

L'article a été soumis au journal Environmental Science Pollution Research.

¹ Walloon Centre of Industrial Biology, Departement of Chemistry and Bio-industries, University of Liège, B-5030 Gembloux, Belgium

² Laboratory of Nanomaterials, Catalysis and electrochemistry. B6A, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

³ Unité de Bio-industries, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgique

Abstract

The effect of two iron compounds: iron nanoparticles encapsulated in porous silica or Fe/SiO₂ and iron chloride FeCl₃ on the kinetics of the biphenyl degradation was examined under aerobic conditions at various pH values (6.4, 7 and 7.6). This paper shows that the impact of iron on the biphenyl degradation by *Rhodococcus erythropolis* 902T.1 depends on the pH of the culture medium. The iron concentration inside the cells decreases when pH increases. On the other hand, pH, time and the autoclaving have a significant role in the release of iron from the capsules of SiO₂. The iron concentration released was 5- fold higher at pH 4 with autoclaving after 18 days than that resulting from the use of pH 7.8 without autoclaving after 18 days. 97 ±1.2% and 93 ±0.6% biphenyl degradation after 18 days of incubation in presence of 0.1 g/L of glucose and/or 0.75 g/L of ethanol respectively with 10⁻⁴ M of Fe/SiO₂ and the cellular viability in the presence of these substrats was stimulated in presence these substrats. Strong positive impact of Fe/SiO₂ and ethanol was observed on the concentration of NADH/NAD⁺ compared to the positive control. The concentration of NADH was higher than the concentration of NAD⁺ in presence of 0.75 g/L ethanol (104.6 ±7.7 nmol and 86.9 ±1.9 nmol) respectively. In contrast, in the presence of 10⁻⁴ M Fe/SiO₂ the concentration of NAD⁺ was higher than the concentration of NADH (122 ±1.7 nmol and 95 ±5.3 nmol respectively). Finally, the cell size of *Rhodococcus erythropolis* 902T.1 was higher with 10⁻⁴ M of Fe/SiO₂.

Keywords: Biodegradation. Biphenyl. *Rhodococcus erythropolis*. Nanoparticles. Iron. pH

I. Introduction

Numerous polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) such as naphthalene, phenanthrene, biphenyl, are released by human activities. The major source of PAH pollution is industrial production, transportation, residential heating, home cooking and plastic waste incineration (Li *et al.*, 2003). These organic compounds were identified as toxic and/or carcinogenic to humans (IARC, 2003; Wang *et al.*, 2009). In addition, several PAH compounds can sorbs to organic-rich soils and sediments, accumulate in aquatic organisms, and may be transferred to humans by the consumption these organisms (Nácher -Mester *et al.*, 2009).

Some microorganisms are able of degrading many PAH species under aerobic or anaerobic conditions (Ma *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013). These abilities may be useful in removal of PAHs from the environment. However, PAH are stable and highly hydrophobic, thus having a low availability for degrading microorganisms, which need an aqueous environment for their growth. As a consequence, bioremediation processes are very limited. Numerous studies have proposed solutions to enhance the rate of biodegradation such as the use of different nitrogen sources (Leys *et al.*, 2005; Kotresha and Vidyasagar, 2008), phosphorus sources (Leys *et al.*, 2005), oxygen source (Shim *et al.*, 2002) and the use a low metal concentration (Zhang, 2003; Bunescu, 2006; Santos *et al.*, 2008; Wannoussa *et al.*, 2015abc). Wannoussa *et al.* (2015a) showed that the addition of calcined iron nanoparticles or Fe/SiO₂ at different concentrations (10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M and 10⁻⁴ M) enhances the degradation rate of biphenyl by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 with up to 35% higher biodegradation yield than in the control test with 10⁻⁴ M of Fe/SiO₂.

Similarly, Santos *et al.* (2008) demonstrated that the presence of different forms of soluble iron at the concentrations of 10⁻⁴ M (FeCl₃, Fe(NO₃)₃, Fe₂O₃, FeSO₄) had a positive impact on cell growth and biodegradation of anthracene by *Pseudomonas* sp with up to 25% higher biodegradation yield than in the control test with iron nitrate, the most soluble iron form. Similar results were reported by Wannoussa *et al.* (2015c), which found any significant difference between the result in presence 10⁻⁵ M of Fe₂O₃ (not autoclaved) and the control; the percentages of biphenyl biodegradation after 18 days were 62 ±5.9% and 53 ±0.4% respectively.

Numerous studies have proposed other solutions to enhance the rate of biodegradation. Aldric and Thonart (2008) showed that the use of a low ethanol concentration in the culture medium improved the biodegradation of isopropyl benzene. The results of Cornelissen and Sijm (1996) reported that the presence of ethanol in the medium has two advantages: (1) increasing the solubility of hydrophobic organic compounds in aqueous phase and (2) enabling the growth of microorganisms in a medium supplemented with additional substrates.

On the other hand, Kotresha and Vidyasagar (2008) observed that the phenol biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996 was complete (100%) by addition of 0.3 g/L of glucose and 1.0 g/L of peptone. Other studies demonstrated that the use of 0.8 g/L glucose and 1.5 g/L ammonium sulphate supplemented with 0.02 g/L of ion Mn^{2+} is very effective for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* NCIM 2102 *i.e.* the percentages of phenol biodegradation was 98.24% (Sridevi *et al.*, 2011).

The bioremediation processes are preferred comparing with the physico-chemical methods, as they have the potential to almost completely degrade aromatic hydrocarbons, with innocuous end products and minimum secondary metabolites (Watanabe, 2001). Microbial aromatic hydrocarbons degradation occurs by successive oxidations catalyzed by mono and dioxygenases enzymes that add molecular oxygen to the ring (Haddock *et al.*, 1993; Suenaga *et al.*, 2002). Biphenyl is an aromatic hydrocarbon that supports the growth of a large number of microorganisms such as *Pseudomonas* species (Smith *et al.*, 1989; Haddock *et al.*, 1993), *Micrococcus* species (Bevinakatti and Ninnekar 1993), and *Rhodococcus erythropolis* species (Kosono *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 2004). The initial reaction in the degradation of biphenyl by a *Rhodococcus* sp is catalyzed by biphenyl dioxygenase, the oxidation of biphenyl to the corresponding *cis*-dihydrodiols (Suenaga *et al.*, 2002, Takeda *et al.*, 2004). In this step NADH is an electron donor for the conversion of biphenyl to *cis*-2,3-dihydroxy-2,3-dihydrobiphenyl. In the second step, catechol dioxygenases are responsible to open the ring and for the conversion of *cis*-2, 3-dihydroxy-2,3-dihydrobiphenyl to benzoate and 2-hydroxypenta-2,4-dienoate (Takeda *et al.*, 2004).

These enzymes require iron (Fe^{2+}) as cofactor for oxygen activation. Ferredoxin and ferredoxin reductase act as an electron transfer system from NADH to reduce the terminal dioxygenase (Mason *et al.*, 1992; Candidus *et al.*, 1994; Schach *et al.*, 1995; Dinkla *et al.*, 2003). Candidus *et al.*

(1994) showed that the activity of catechol 2,3-dioxygenase isolated from *Rhodococcus rhodochromus* CTM in the presence of 2×10^{-3} M of ferrous ammonium sulphate (Fe^{2+}) with reducing agent (Cysteine, 2×10^{-3} M) was 7-fold higher than that resulting from the use of catechol 2,3-dioxygenase alone.

Indeed, the physico - chemical conditions of the culture medium, notably the pH, play a significant role on the bioavailability of metal elements (Monchy, 2007). The concentration of soluble metals decreases with increasing pH. This phenomenon has strong impact on the interaction between microorganisms and metals (Bunescu, 2006). Hence the insoluble metals cannot be internalized by the microbial cells.

In the present study we investigated (i) the effect of pH, time and temperature of sterilization on the release without *Rhodococcus erythropolis* T902.1 of iron from the capsule of SiO_2 synthesized by sol-gel method (ii) the effect of pH on the rate of biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in presence of FeCl_3 and iron nanoparticle Fe/SiO_2 and (iii) the effect of carbon sources (glucose or ethanol) with Fe/SiO_2 on biphenyl degradation and cellular viability. Finally, we measured the concentration of NADH/NAD when ethanol was added with or without Fe/SiO_2 at two pH 6.4 and 7.

II. Material and methods

II.1. Preparation of suspension of iron oxide nanoparticles Fe/SiO_2 , Fe(OH)_3 and concentrated solution FeCl_3

The Fe/SiO_2 (≤ 2 nm) was prepared by the sol-gel method, as described by Mahy *et al.* (2014). The stock suspension of Fe/SiO_2 (10^{-3} M) was prepared by adding 0.1866 g of Fe/SiO_2 (1.5%) to 50 mL ultrapure water (Milli-Q water, 18.2 M Ω cm). In order to enhance the stability of the nano-suspension, it was found by 15 min by using a mixer (POLYTRON® PT 1200 E, KINEMATICA AG, CH). The analyses of these nanoparticles indicated that the average particle size of Fe/SiO_2 was 1.4 ± 0.2 nm. The specific surface (S_{BET}) of Fe/SiO_2 was determined by the BET method at 430 ± 5 (Mahy *et al.*, 2014). According to the experimental conditions, a defined volume of the homogenized 10^{-3} M Fe/SiO_2 suspension was transferred rapidly, due to fast settlement, in the

culture medium prior to sterilization in order to reach a final iron concentration 10^{-4} M. Concentrated solutions of $\text{Fe}(\text{OH})_3$ or $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (10^{-3} M) were also prepared by addition of 0.0035g of $\text{Fe}(\text{OH})_3$ or 0.0135g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ respectively in 50 mL ultrapure water.

II.2. Effect of pH, time and temperature of sterilization on the release of iron from the capsule of SiO_2 without *Rhodococcus erythropolis* T902.1

The suspensions were prepared in 100 mL flasks, with 20 mL ultrapure water supplemented with calcined iron nanoparticles at concentrations of 10^{-4} M of metal element. The pH was adjusted to 4, 6.4, 7.0 or 7.6 with 1 N NaOH or 1N HCl. The solutions were sampled and separated into two serials. The first serial was sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min. The second serial was not autoclaved. Subsequently, both serials were incubated at 30 °C and 150 rpm. After centrifugation at 13.000 rpm for 1 min, iron titration was carried out in the supernatant at 3, 8 and 18 days of incubation.

II.3. Effect of pH on the rate of biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in presence of Fe/SiO_2 , FeCl_3 or $\text{Fe}(\text{OH})_3$

Precultures were prepared as described by Wannoussa *et al.* (2015a). For the biphenyl biodegradation experiments, the culture medium was prepared similarly in 100 mL flasks (in triplicates) with 20 mL M284 minimal medium supplemented with Fe/SiO_2 , $\text{Fe}(\text{OH})_3$ or FeCl_3 at concentrations ranging from 0 (positive control) to 10^{-4} M of metal element. The pH of the culture medium was adjusted to 6.4, 7 or 7.6 with 1 N NaOH or 1 N HCl. After sterilization, 1 mL of a 10 g/L biphenyl solution in n-hexane was added on the culture medium to achieve a biphenyl initial concentration of 500 ppm as source of carbon and energy. The evaporation of n-hexane was allowed overnight under a ventilated hood leaving biphenyl crystals suspended in the M284 minimal medium. A relatively homogenous suspension of biphenyl crystals in aqueous phase was achieved by vigorous mixing for 2 minutes using a mixer (POLYTRON® PT 1200 E, KINEMATICA AG, CH) sterilized by immersion in three successive solutions: SDS 5%, sodium

hypochlorite 4% and norvanol 9%. Calcined iron nanoparticles Fe/SiO₂ non autoclaved were also prepared in the same conditions. However, they were sterilized by immersion in three successive solutions: SDS 5% (5-fold), sodium hypochlorite 4% (2-fold) and norvanol 9% (5-fold). After centrifugation at 13.000 rpm for 10 min, the pellet of Fe/SiO₂ was washed by ultrapure water (Milli-Q water, 18.2 MΩ cm) (5-fold). Then, the pellet of Fe/SiO₂ was added at a concentration of 10⁻³ M in 50 mL sterile ultrapure water, before use for preparation of suspensions in sterile culture medium concentration at 10⁻⁴ M. The resulting suspension was inoculated with 3 mL of preculture and incubated at 30 °C (150 rpm orbital agitation). Test controls were also prepared in the same conditions but without added Fe/SiO₂ nor SiO₂ (positive control). The optical density was measured at 600 nm (Ultrospec III, Pharmacia LKB) at different time points of incubation (after 3, 8 and 18 days). The effect on biphenyl biodegradation of two carbon sources (glucose and ethanol) at concentration of 0.1 g/L and 0.75 respectively was studied. Ethanol was filtered through a 0.2 filter μm (Sartorius Minisart[®]) and was added after sterilisation of the culture medium. The interference of NP_s on absorbance was corrected with the control samples that contained only Fe/SiO₂. Biphenyl residual concentration in the culture medium was measured by HPLC at different time points of incubation (after 3, 8 and 18 days) as described by Wannoussa *et al.* (2015a).

II.4. Iron titration

The intracellular iron concentration was determined using the method slightly modified from Bunescu (Bunescu, 2006). The total iron concentration was determined after the reduction of Fe³⁺ with a solution of ascorbic acid (3%) and reaction with orthophenanthroline forming a strong-colored complex with Fe²⁺. In a 10 mL flask, 300 μL of sample were mixed with 4200 μL of ascorbic acid (3% w/v in ultrapure water) and stirred. After, 2 min wait and addition of 500 μL of a 1% orthophenanthroline solution (w/v in ethanol for analysis), the optical density was measured at 510 nm. This procedure was used to determine the iron concentration inside *Rhodococcus erythropolis* T902.1 cells at the end of the experiment (after 18 days of incubation) with 500 ppm biphenyl and 10⁻⁴ M of Fe/SiO₂ or of FeCl₃ at different pH values: 6.4, 7, or 7.6. 2 mL of the culture medium were sampled and centrifuged at 13.000 rpm for 20 min; the pellet was washed with 2 mL of ultrapure water. This washing step was repeated three more times. After centrifugation, the pellet was then resuspended with 2 mL of ultrapure water, and the cells were disrupted by sonication at a frequency of 10 kHz for 3 min. After centrifugation at 13.000 rpm for 20 min, iron concentration

was measured in the supernatant (A_1) and in the pellet after resuspension in 2 mL of ultrapure water (A_2). The sum (A_1+A_2) corresponds to the intracellular iron concentration. All the steps described previously were carried out at 4 °C.

II.5. Cellular viability

After 36 h of incubation and at the end of the experiment at pH 7 with 10^{-4} M Fe/SiO₂ in the presence of glucose (0.1 g/L) or ethanol (0.75 g/L) with biphenyl. 2 mL of the culture medium were sampled and centrifuged at 13.000 rpm for 20 min at 4 °C. The pellet was washed twice with sterile saline water (NaCl, 9 g/L), doubly stained with 5 µL of 1.25 mM rhodamine 123, 5 µL of 1.25 mM propidium iodide and 250 µL of saline water (NaCl, 9 g/L), homogenised and incubated for 5 min at ambient temperature in the dark. Subsequently, the sample was centrifuged and washed four times with 250 µL of sterile saline water. Cellular viability was evaluated by fluorescence microscopy: viable cells appeared green and non-viable cells appeared red. The proportion of viable cells versus dead cells was estimated by cell counting (in triplicates) in microscopic vision field.

II.6. Determination of NAD(H) concentration

After 18 days of incubation, the cells were centrifuged for 20 min at 13.000 rpm, and 4 °C. and washed twice with a 0.2 M sodium phosphate buffer (Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH 6.5). After centrifugation at 13.000 rpm, 10 min at 4 °C, they were resuspended in a sufficient volume of the same buffer to obtain a cellular concentration of 0.05 g of wet cells per mL. The oxidized and reduced forms were measured using the method of Monéger *et al.* (1977) with a slight modification. Briefly, 500 µL of 0.1M [N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2- ethanesulfonic acid / 2 mM EDTA] buffer, pH 7.5 were added with 100 µL of 1.2 mM DCPIP or 2.6-dichlorophénol-indophénol, 50 µL of 10 mM PMC or phenazine methosulfate, alcohol dehydrogenase or (ADH) (25 units/mL), 300 µL of double distilled water and 100 µL of sample. After stirring the mixture, the reaction was initiated by adding 75 µL absolute ethanol. Then, the absorbance was determined at 600 nm. The amount of NADH or NAD⁺ was determined using a standard graph of NADH or NAD⁺. One unit of concentration was expressed as nanomoles.

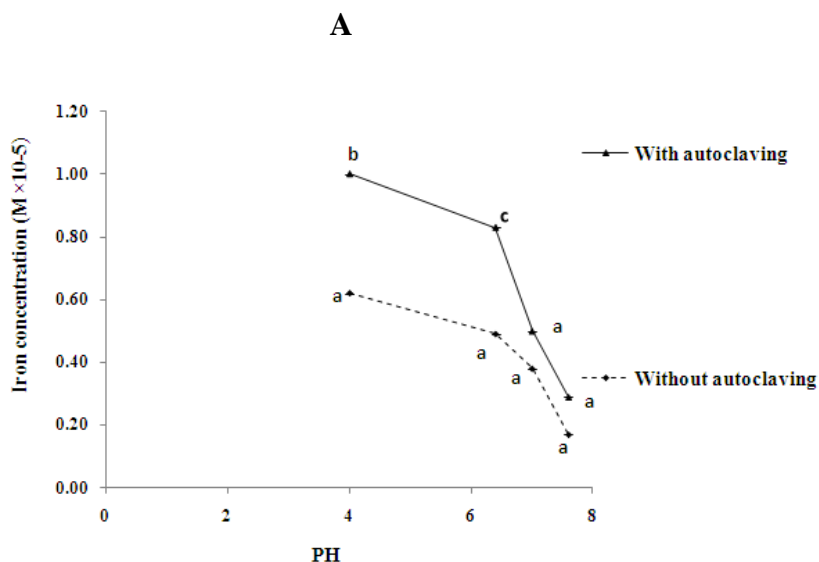
II.7. Statistical analysis

The SAS software (SAS Institute 2001) was used for all statistical analyses. The general linear model (GLM) was used to determine whether the effect of iron NP_s or Fe³⁺ was significant on the biodegradation potential of RT902.1. Least square means and standard errors were calculated. A *p*-value of < 0.05 was chosen as the threshold for significance of all statistical comparisons.

III. Results and discussion

III.1. Effect of pH, time and temperature of sterilization on the release of iron from the capsule of SiO₂ without *Rhodococcus erythropolis* T902.1

Figure IV.1 shows the evolution of the iron amount released of the SiO₂ capsules in MilliQ water. There is a significant increase of the iron concentration in solution after autoclaving *i.e.* to 5 fold higher after 18 days of incubation at 30 °C and pH 4 (Figure IV.1-C). This suggests that this treatment strongly modifies the structure of the SiO₂ capsules (Mahy, 2013). Mahy (2013) who demonstrated that the textural properties of iron nanoparticles Fe/SiO₂ (2.5%) with autoclaving changed. Indeed, the specific surface (*S*_{BET}) with autoclaving decreases from 479 ± 5 m²g⁻¹ to 218 ± 5 m²g⁻¹ respectively.



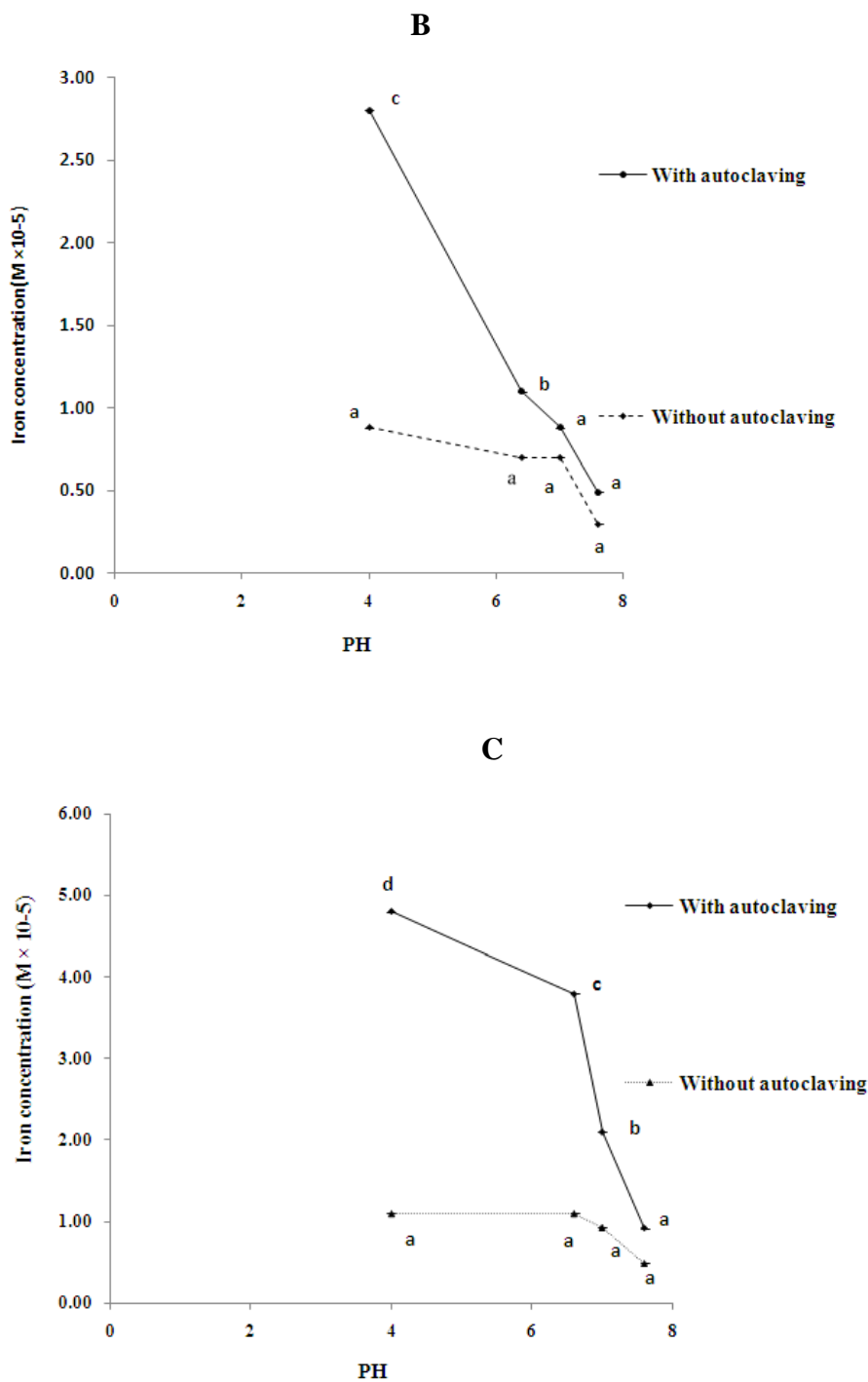


Figure IV.6: Evolution of liberated iron from the capsule of SiO₂ measured by complexometry. In 100 mL flasks containing 20 mL of ultrapure water with 10⁻⁴ M of iron nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix at pH 6.4, 7, 7.6 before or after sterilization at different time points of incubation at 30 °C and 150 rpm. (A) After 3 days. (B) After 8 days and (C) After 18 days. The similar letters (aa, bb and cc) indicate that in, the effect of pH on the on the release of iron from the capsule of SiO₂ in the presence of 10⁻⁴ M iron nanoparticles before or after sterilization no significant statistical differences were observed (*p*-value > 0.05) at different time points.

Figure IV.1 also shows that the pH has a significant effect on the release of iron. At pH 7.6, the iron amount released from the SiO₂ capsules is 3.5 fold higher at pH 4 since after 3 days with or without autoclaving than at pH 7.6 and a 5-fold higher after 18 days with autoclaving at pH 4 comparing with pH 7.6. Figure IV.1 suggests that autoclaving, pH and incubation time have a strong impact on the release of iron ions from SiO₂ capsules. Mahy *et al.* (2014) also reported that the released iron concentration increases from sample Fe2.5 (1.8×10^{-4} M) in water at pH 7 after 3 days and 28 days of incubation from 3.0×10^{-7} M to 8.1×10^{-7} M.

III.2. Effect of pH on the rate of biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in the presence FeCl₃ or Fe/SiO₂

In the present experiment, we studied the biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* 902T.1 in presence of 10^{-4} M of Fe/SiO₂ or FeCl₃ at different pH values (6.4, 7.0 and 7.6) and 10^{-4} M of Fe(OH)₃ at pH 7.6.

Table IV.1 shows that the presence of 10^{-4} M of Fe/SiO₂ or iron salt FeCl₃ influenced significantly the biphenyl biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 compared to the positive control. Indeed, the cultures containing Fe/SiO₂ or FeCl₃ iron salt samples at pH 7 achieved a 40% higher biphenyl degradation yield after 18 days of incubation compared with those without iron. Moreover this positive impact of iron on the rate of biphenyl biodegradation depends on the pH of the culture medium (Table IV.1).

Indeed, as mentioned in Figure IV.1, the solubility of iron depends on pH. Bunescu (2006) reported that the iron cations begin to precipitate under the insoluble form Fe (OH)₃ ($K_{SP} = 2 \times 10^{-39}$ at 25 °C) with increasing pH the salt Fe(OH)₃, is more insoluble in water. Therefore, the species Fe (OH)₃ cannot enter into the cells of *Rhodococcus* to improve the biodegradation of pollutants (Bunescu, 2006). This can explain why no real difference in the rates of biphenyl degradation is found when 10^{-4} M of Fe(OH)₃ and FeCl₃ at pH 7.6 are presented (Table.1). The cells of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 cultivated at pH 7.6 in the presence of 10^{-4} M of Fe/SiO₂ exhibit a lower activity as compared to the cells cultivated at pH 7 and 6.4.

Table IV.1: Percentages of biphenyl biodegradation after 18 days of incubation. In 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm biphenyl and 10^{-4} M of iron nanoparticles, 10^{-4} M of FeCl_3 or $\text{Fe}(\text{OH})_3$ at pH 6.4, 7 or 7.6

Experience condition	Biphenyl biodegradation yield (%)		
	pH : 6.4	pH : 7.0	pH : 7.6
Positive control	60 \pm 0.4	53 \pm 0.7	50 \pm 0.9
Culture with 10^{-4} M of Fe/SiO_2	92 \pm 1.4	90 \pm 1.3	82 \pm 2.0
Culture with 10^{-4} M of FeCl_3	97 \pm 1.7	93 \pm 1.7	69 \pm 3.7
Culture with 10^{-4} M of $\text{Fe}(\text{OH})_3$			62 \pm 1.1

As a result, the percentages of biphenyl biodegradation after 18 days with FeCl_3 at pH 6.4 or 7.6 were different: 69 \pm 3.7% and 97 \pm 1.7% respectively. Whereas, with Fe/SiO_2 they were not significantly different 82 \pm 2.0% and 92 \pm 1.4% respectively. These results suggest that the iron nanoparticles encapsulated in a stable complex such as porous silica, have the capacity to resist to the evolution of pH.

They are in agreement with Bunescu, (2006) who showed that the potential of the *Rhodococcus rhodochrous* on benzothiazole (BT) degradation increases in the presence of 3×10^{-3} M of $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ at pH 6.2 compared to the pH 7.5 respectively. Bunescu (2006) in its work also found that the kinetics of degradation metabolisms of benzothiazole by *Rhodococcus rhodochrous* (2,6-dihydroxybenzothiazole and 2-Hydroxybenzothiazole) accelerated at pH 6.2 compared to the pH 7.5 in the presence of this salt. Similarly, Aldric, (2009) revealed that FeCl_3 presents a positive effect on the biodegradation rate isopropylbenzene by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 when its concentration is increased until 10^{-3} M at pH 7.

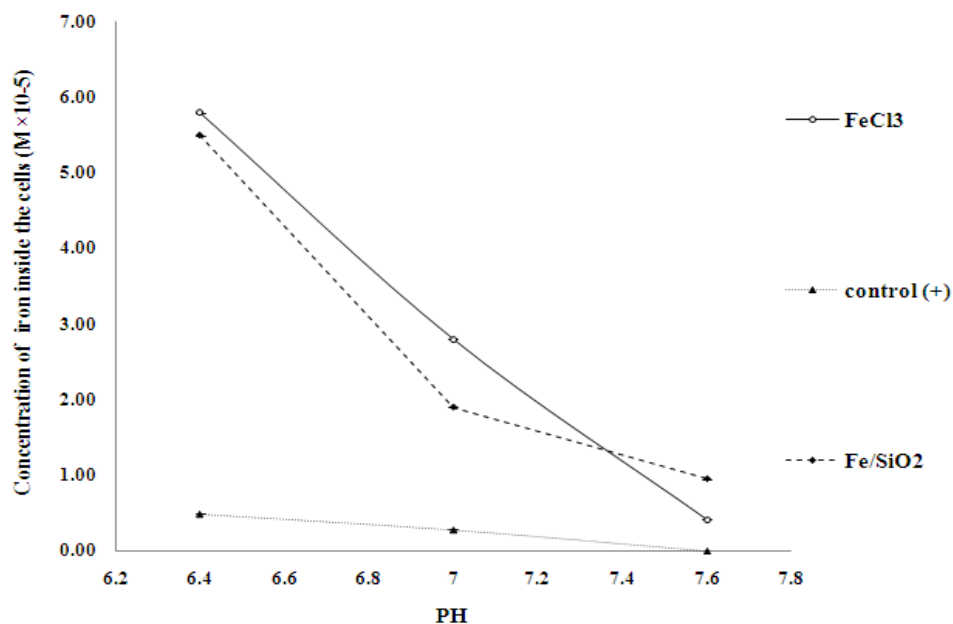


Figure IV.7: Evolution of iron inside the cells measured by complexometry after 18 days of incubation. In 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm biphenyl and 10^{-4} M of iron nanoparticles, 10^{-4} M of FeCl_3 or 10^{-4} M of $\text{Fe}(\text{OH})_3$ at pH 6.4, 7 or 7.6.

Figure IV.2 shows that the intracellular iron concentration increases with decreasing pH of the culture medium. This decrease in pH coincides with the higher release of iron in the culture medium (soluble iron), which can be assimilated by the cells of *Rhodococcus erythropolis* T902.1. The intracellular iron concentrations were $5.8 \times 10^{-5} \pm 0.00 \text{ M}$ and $0.4 \times 10^{-5} \pm 0.00 \text{ M}$ respectively in presence of 10^{-4} M of FeCl_3 at pH 6.4 and 7.6. This result explains why the percentages of biphenyl biodegradation in the presence 10^{-4} M of FeCl_3 at pH 6.4 and 7.6 were different: $97 \pm 1.7\%$ and $69 \pm 3.7\%$ respectively (Table IV.1). This result is consistent with Bunescu *et al.* (2008) which showed that the rate of biodegradation of aminobenzothiazol was dependent on the intracellular iron concentration.

Based on the results of Table IV.1 and Figure IV.2 the impact of pH on the rate of biphenyl degradation in the presence of iron could be related to the mechanisms involved in the interaction between iron and *Rhodococcus erythropolis* T902.1 (*e.i.* enzymes, transport) as suggested in our previous study (Wannoussa *et al.*, 2015a). The addition of 10^{-4} M of Fe/SiO_2 increased the activity of the biphenyl dioxygenase and catechol 1,2-dioxygenase enzymes that are responsible for the degradation of biphenyl (Wannoussa *et al.*, 2015a).

III.3. Effect of carbon sources on the rate biphenyl biodegradation and cellular viability

In general, microbial grow is improved in media supplemented with additional substrates (Harder et al. 1982). In the present study two cosubstrates were tested, independently: glucose (0.1 g/L) and ethanol (0.75 g/L). Former results showed that the rate of biphenyl degradation was improved when glucose was supplemented at 0.05 up to 1.0 g/L, with an optimum of 0.1 g/L (results not shown). Moreover, further increase in glucose concentration had a detrimental effect on biphenyl degradation caused by the decrease of pH (results not shown). The enhanced rate of biphenyl degradation at less than 1.0 g/L glucose can be attributed to the attenuation of biphenyl toxicity by glucose, and the increase in cell mass formed as a result of the additional carbon source.

Indeed, evolution of pH was also followed for each concentration of glucose, the use of glucose as a cosubstrate at 0.1 g/L doesn't generate significant acidification of the buffered medium M 284 (Tris-HCL 6.4 g/L). By contrast, the use of glucose at 1 g/L concentrations generates a strong acidification of the medium due to the fatty acids production by oxidation of glucose *e.i* pH 6.9 and 5.2 after 3 days of incubation. On the other hand, the use of ethanol at 0.75 g/L as cosubstrate generates a low acidification of the medium due to the acetic acid production by oxidation of ethanol *e.i* pH 6.8 after 3 days of incubation.

Tableau IV.2: Effect of carbon sources (glucose or ethanol) with 10^{-4} M of iron nanoparticles on the rate biphenyl biodegradation.

Experience condition	Without supplementary carbon source	with 0.75 g/L ethanol	with 0.1 g/L glucose
Culture without addition of Fe/SiO₂			
Biphenyl biodegradation yield (%)	53 ±0.7	67 ±1.5	78 ±0.6
viable cells/ non-viable cells	1.1 ±0.4	3.4 ±2.3	4.9 ±3.1
Culture with Fe/SiO₂			
Biphenyl biodegradation yield (%)	90 ±0.6	93 ±0.6	97 ±1.2
viable cells/ non-viable cells	3.5 ±4.5	6.2 ±1.5	9.4 ±2.7

Table IV.2 shows that, the presence of 0.1 g/L of glucose and 0.75 g/L of ethanol enhanced the rate of biphenyl degradation compared to the positive control. Since 25% and 14% edited biphenyl was degraded in 18 days of incubation compared to the 53 ±0.7% obtained without substrate addition. Moreover, biodegradation was further improved in presence of 10⁻⁴ M of Fe/SiO₂ up to 97 ±1.2% and 93 ±0.6% respectively.

Form Table IV.2, it can be observed that glucose is a better carbon source compared to ethanol, 11 % edited biphenyl was degraded in 18 days of incubation in presence of 0.1 g/L of glucose compared to the presence of 0.75 g/L of ethanol.

Various studies indicating that glucose or ethanol at low concentrations influences the rate of pollutant biodegradation (Lovanh *et al.*, 2002; Kotresha and Vidyasagar 2008; Sridevi *et al.*, 2011). Regarding ethanol, Lovanh *et al.* (2002) reported that the presence of ethanol at low concentration enhanced the degradation of toluene by *Pseudomonas putida* mt-2 *e.i.* the specific degradation rate was 7.1-fold higher in presence of 1.5×10⁻³ g/L of ethanol. It has also been noted that a high ethanol concentration plays an ambivalent role: it improves the regeneration of the coenzymes NADH/NAD and it promotes bacterial growth. At some cont, it induces oxygen limitation, because ethanol is preferentially degraded then aromatic compounds, leading to diauxic degradation (Corseuil *et al.*, 1998; Lovanh *et al.*, 2002).

Kotresha and Vidyasagar (2008) found that phenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa* MTC C 4996 was completely degraded in when glucose concentration was equal to 0.3 g/L. Similarly, Sridevi *et al.* (Sridevi *et al.*, 2011) showed that the addition of 0.8 g/L of glucose enhanced the phenol degradation by *Pseudomonas putidai*. NCIM 2102 *i.e.* 73.43% was obtained at this parameter. However, the rate of phenol degradation decreases with increase of glucose concentration up to 1.6 g/L. It is confirmed by Papanastasiou, (1982) who reported that the presence of glucose could inhibit the utilization of the target substrate.

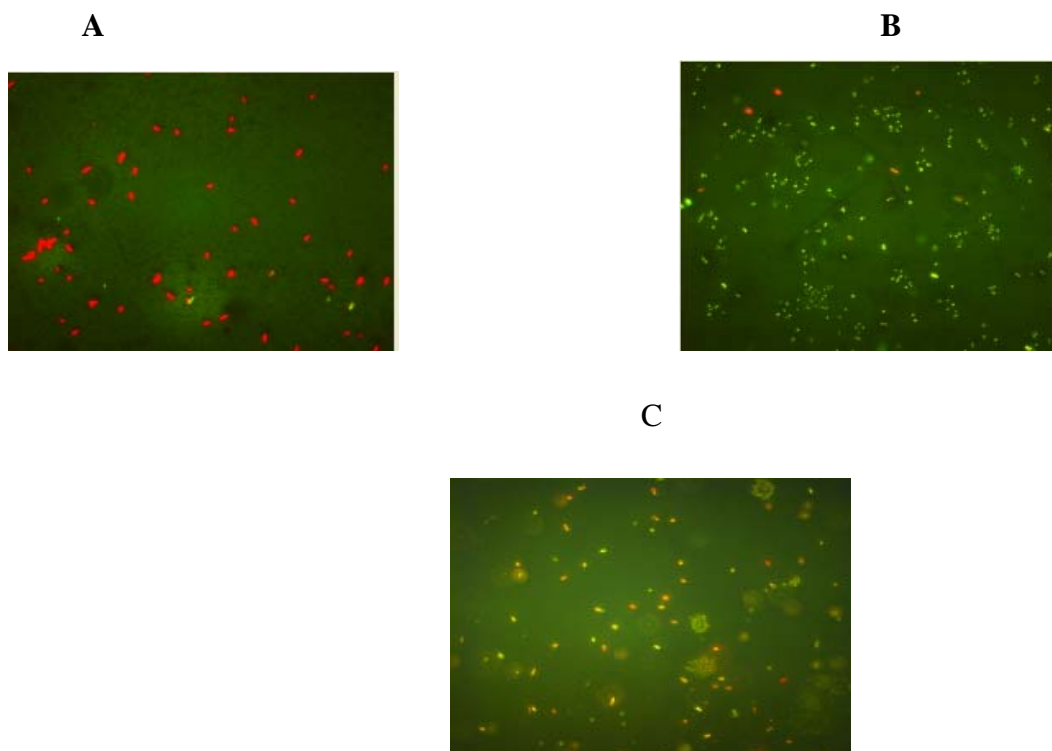


Figure IV.8: Evolution of cell viability *Rhodococcus erythropolis*T902.1 in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm of biphenyl without /with 10^{-4} M of iron nanoparticles encapsulated in SiO_2 matrix (NPs) at pH 7 and without /with 0.1g/L glucose or 0.75 g/L ethanol after 36 hours. Viable cells appeared green and non-viable cells appeared red. as observed under fluorescence microscopy. A: *Rhodococcus erythropolis*T902.1 with 500 ppm of biphenyl, B: A + 0.1g/L glucose, C: A+ 0.75g/L ethanol.

On other hand, Topp and Hanson (1990) and Aldric and Thonart (2008) showed that the addition of non-toxic compounds might stimulate the viability of cells and enhance degradation. Figure IV.3 shows that the use of a co substrate (glucose or ethanol) increased the proportion of viable cells of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 compared to the samples without cosubstrate (measured by double staining; rhodamine and propidium iodide).The cellular viability concentration is also stimulated in presence of 10^{-4} M Fe/ SiO_2 compared to the cellular viability concentration without the presence of co substrate and Fe/ SiO_2 (TableIV. 2).

Indeed, a higher a ratio viable cells/ non-viable cells up to 9.4 was observed in presence glucose and iron nanoparticles than without both of Positive control. These results suggest that there are a period of adaptation of the cells of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 to use biphenyl as a source of carbon leading to a proportion of dead cells (red) high (Figure IV.3-A). By contrast, the use of a cosubstrate such as glucose or ethanol would maintain the viability of cells in this phase (Figure IV.3-B, C).

III.4. Determination of concentration NADH/NAD

The impact of ethanol on NADH and NAD⁺ concentrations in presence or absence of iron nanoparticles is studied.

Figure IV.4 indicate that the NADH and NAD⁺ of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 is sensitive to Fe/SiO₂ and ethanol. The NADH and NAD⁺ concentrations increase in the presence of 0.75 g/L of ethanol at pH 7 compared to the positive control (Figure IV.4). It is also significant to note that the NADH concentration is higher than the NAD⁺ concentration (104.6 ±7.7 nmol and 86.9 ±1.9 nmol) respectively. In order to explain these observations, it can be suggested that ethanol might contribute to cofactor regeneration via the biochemical reaction of NAD⁺ with ethanol catalysed by alcohol dehydrogenase (Aldric. 2009)

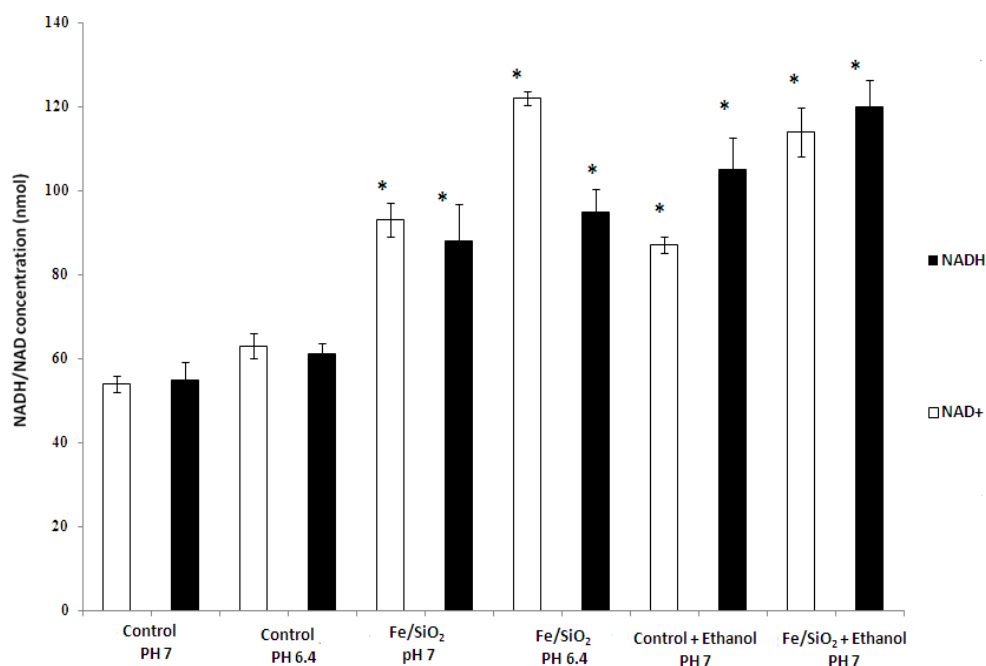
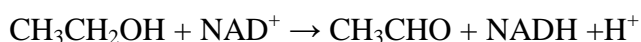
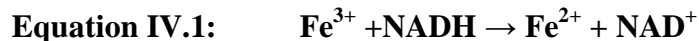


Figure IV.9: Evolution of NAD(H) in 100 mL flasks containing 20 mL of M284 minimal medium with 500 ppm biphenyl, 10⁻⁴ M of Fe/SiO₂ and *Rhodococcus erythropolis*T902.1 at pH 6.4 or 7. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) from the control. Error bars represent standard deviations of triplicate tests.

Similar results were reported by Stampfer *et al.* (2003) who used *Rhodococcus ruber* as an efficient biocatalytic redox system for cofactor regeneration of the NADH/NAD⁺ using ethanol as substrate.

It could be observed from Figure IV. 4 that the concentration of NADH/NAD⁺ increased by addition of 10⁻⁴ M of Fe/SiO₂ compared to the control positive. This observation is clearer at pH 6.4 than at pH 7. Also, the NADH/NAD concentrations with Fe/SiO₂ at pH 6.4 were different (93 ±5.3 nmol/ 122 ±1.7 nmol). By contrast, the NADH/NAD concentrations without Fe/SiO₂ at pH 6.4 were similar (60.5 ±2.6 nmol/62.1 ±2.9 nmol) respectively, indicating that the iron nanoparticles can convert NADH conversion to NAD⁺. Suggested by the equation:



III.5. Microscopic observation

Figure IV.5 indicate that the presence of 10⁻⁴ M of Fe/SiO₂ had an effect on the increase of the size of the *Rhodococcus erythropolis* T902.1 cells. The bacterial cell size under the influence of iron nanoparticles is large (12.5 μm) when compared to that of normal conditions 3 μm (Fig. IV5A-B). Similar results were reported by Chatterjee *et al.* (2011) who demonstrated that the presence of Fe₃O₄ nanoparticles increased the cell length of *E. coli* for two reasons: (i) the magnetic property of the nanoparticle had an effect on the decrease of the repulsion between the cells; (ii) Fe₃O₄ had an effect on the cell division which has an important role in the increase of bacterial cell length. Moreover increase bacterial cell length would also be affected by the incubation time of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 with 10⁻⁴ M of iron nanoparticles. Indeed two different cell sizes were observed: round form after 36 hours and fine elongated cells as filaments after 18 days (Figure IV.5B-D) and (Figure IV.5-C).

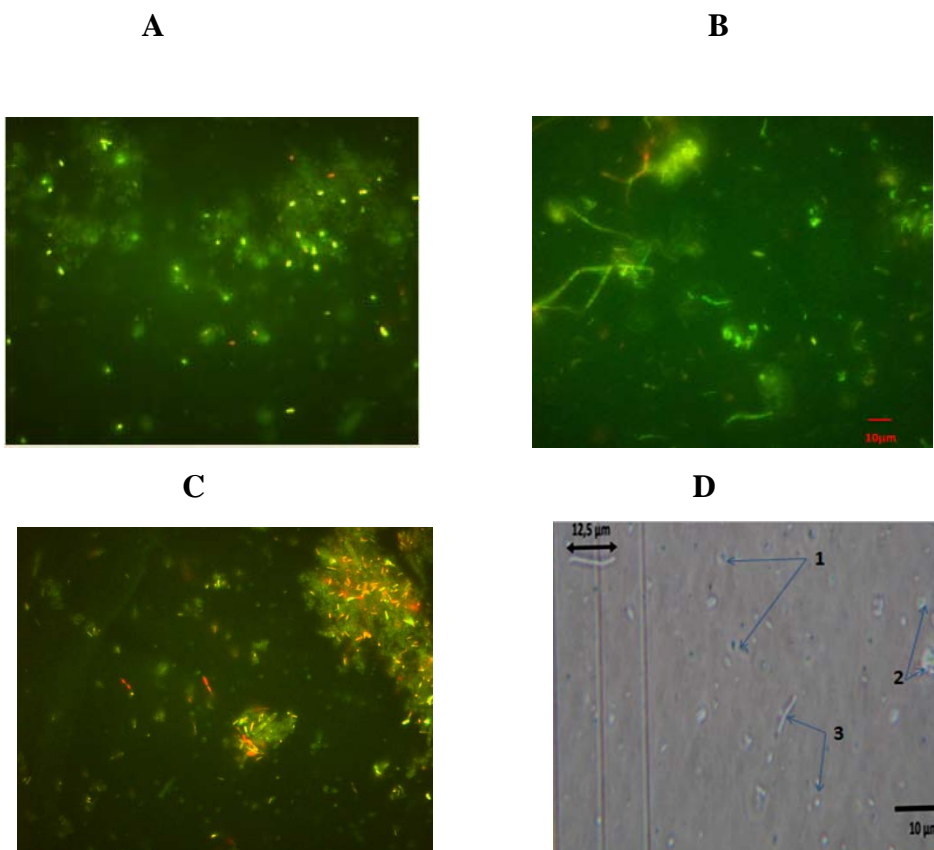


Figure IV. 10: *Rhodococcus erythropolis*T902.1 grown under normal condition after 18 days of incubation (A). Increase in *Rhodococcus erythropolis*T902.1 cell length under the influence of 10^{-4} M of iron nanoparticles, as observed under fluorescence microscopy after 18 days of incubation (B). *Rhodococcus erythropolis*T902.1 grown after 36 hours of incubation with 10^{-4} M of iron nanoparticles (C). 1: iron nanoparticles encapsulated in SiO₂ matrix. 2: biphenyl crystals. 3: *Rhodococcus erythropolis*T902.1 as observed under optical microscopy 400X after 18 days of incubation (D).

IV. Conclusions

Numerous parameters (pH, incubation time and autoclaving) play an important role to the release of iron from the capsule of SiO₂. These studies showed that the released iron concentration depend significantly on the pH of culture medium. A maximum % biphenyl degradation by *Rhodococcus erythropolis* 902T.1 was obtained in presence of 10^{-4} M of Fe/SiO₂ or 10^{-4} M FeCl₃ at pH 6.4 *i.e.* $92 \pm 1.4\%$ and $97 \pm 1.7\%$ respectively. This result is associated with the increasing iron concentration inside of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 cells, and this concentration was increasing when pH decreases. The presence of 0.1 g/L of glucose and I 10^{-4} M of Fe/SiO₂ enhanced the rate of biphenyl

degradation and stimulated la cellular viability. The positive effect of Fe/SiO₂ at pH 7 or 6.4 with or without of ethanol on increase the NADH/NAD⁺ is also observed. The present study demonstrates that the incubation time of *Rhodococcus erythropolis* T902.1 in presence of 10⁻⁴ M of Fe/SiO₂ have an important role to increase bacterial cell length. The bacterial cell size after 18 days of incubation was large 12.5μm. Nanoparticles offer a number of advantages for industrial applications compared to metal salts. They are stable at various pH values; they represent inexpensive and nontoxic adjunct materials for use with the microbial cells and are therefore suitable for large scale industrial applications (*e.i.* bioreactor of water treatment).

**Cinquième section: Amélioration de la biodégradation
du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en
présence de Fe₂O₃ et nanoparticules de fer encapsulées
dans un xérogel de silice**

Présentation de l'article

Dans ce travail, l'effet de particules d'oxyde de fer Fe_2O_3 et de nanoparticules de fer encapsulées dans des particules poreuses de silice (xérogel Fe/SiO_2) a été étudié sur la biodégradation du biphenyle par la souche *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Les pourcentages de biodégradation après 18 jours d'incubation en présence du xérogel Fe/SiO_2 à 10^{-5} 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_2 . 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_2 . 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.

NB: La partie III.1. Mesure de la quantité de fer restant à l'intérieur ou relarguée des capsules de dioxyde de silicium (SiO_2) a été intégré dans ce chapitre par rapport à article publié dans le journal Déchets Sciences et Techniques.

Amélioration de la biodégradation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de Fe₂O₃ et nanoparticules de fer encapsulées dans un xérogel de silice

Wissal Wannoussa^{1*}, Serge Hiligsmann¹, Ludivine Tasseroul^{1,2}, Stéphanie D. Lambert², Benoît Heinrichs², Thibaut Masy¹, Frédéric Weekers³, Benoît Lavigne⁴, Frank Delvigne⁵, Philippe Jacques⁵ and Philippe Thonart^{1,5}

Article publié dans le Journal dans le journal Déchets Sciences et Techniques

2015, 7: 264-277.

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

² Laboratoire de Génie Chimique, B6a, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique

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

⁴ Sanifox SPRL, rue Enhet-Centre 47, B-5590 Cheve togne, Belgique

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

Abstract

In this work, the effect of iron oxide particles Fe_2O_3 and iron nanoparticles encapsulated in a porous silica matrix (xerogel Fe/SiO_2) 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_2 at 10^{-5} 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_2 . 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.

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 biphenyle, 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 biphenyle et le pyrène dans l'eau à 25°C (Bouchez *et al.*, 1995).

Le biphenyle 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 biphenyle 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 biphenyle. En outre, le biphenyle 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; Bunescu *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 (Bunescu *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 Fe₃O₄ sur la cinétique de désulfurisation de dibenzothiophène par *Rhodococcus*

erythropolis IGST8 en augmentant la perméabilité de la membrane vis-à-vis du polluant et des produits de la réaction. Choroa (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 FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, Fe_2O_3 ou 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 Al_2O_3 , SiO_2 , 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 Fe/SiO₂ ou du xérogel seul (SiO₂). En outre, celui-ci n'apporte aucune toxicité: 55 ±0.4 % de biodégradation du biphenyle contre 53±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 ±6.3 % en présence de 10⁻⁶ M en fer à 90 ±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 biphenyle dioxygénase et 1,2-catéchol dioxygénase qui sont susceptibles d'être impliquées dans la biodégradation du biphenyle.

La compréhension des mécanismes améliorant la biodégradation du biphényle en présence de xérogel Fe/SiO₂ 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.

II. Matériels et Methods

II.1. Préparation des suspensions concentrée en fer

La synthèse par le procédé sol-gel des nanoparticules de SiO₂ (xérogel) ou de xérogel Fe/SiO₂ 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/SiO₂ étant présentes sous la forme d'oxyde Fe₂O₃, certains essais comparatifs ont également été réalisés avec le sel de fer Fe₂O₃. Des suspensions de xérogel Fe/SiO₂ (xérogel fer-silice contenant 1.5% de Fe) ou Fe₂O₃, concentrées à 10⁻³ M en fer, ont été préparées par dispersion de 0.187 g et 0.008 g respectivement dans 50 mL d'eau milliQ.

II.2. Mesure de la quantité de fer restant à l'intérieur ou relarguée des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂)

Afin de déterminer la quantité de fer restant à l'intérieur ou relargué des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂) après autoclavage ou non, nous avons procédé au dosage spectrophotométrique (510 nm) du fer selon la méthode de Rodier *et al.*, (1996). Pour cela, nous avons préparé une suspension en nanoparticules de fer (xérogel Fe/SiO₂) à 10⁻³ M. Cette dernière a été incubée à 30°C et soumise à une agitation orbitale de 140 rpm. Des prélèvements de 2 mL ont été effectués après 3 j, 8 j, 12 j, 16 j et 20 j d'incubation. Le vingtième jour d'incubation, la suspension restante de nanoparticules de fer (xérogel Fe/SiO₂) a été centrifugée à 13.000 rpm pendant 15 min et le fer a été dosé dans le

surnageant. Le culot a été ensuite remis en suspension dans 2 mL d'eau milliQ pour une nouvelle période d'incubation à 24 j, 28 j, 32 J et à 36 j dans les mêmes conditions décrites précédemment. Nous avons nommé ce dosage du fer dans le surnageant «dosage selon la voie (A)».

De la même façon, nous avons, cette fois-ci, dosé le fer dans le culot obtenu après 36 jours d'incubation. Ce culot a été remis en suspension dans 2 mL de HCl (1N) afin de faciliter la dissolution du fer. La suspension a été ensuite incubée pendant 2h au bain marie agité à 100 °C afin de déstructurer la matrice d'oxyde de silice et permettre le dosage du fer résiduel. Ce dosage a été nommé «dosage selon la voie B».

Quant à la préparation de la suspension concentrée du xérogel de Fe/SiO₂*, le culot, obtenu après une période totale de 36 jours d'incubation, a été remis en suspension dans de l'eau milliQ.

Lors des expériences sans traitement par autoclavage le xérogel Fe/SiO₂ ou particules de Fe₂O₃ 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).

II.3. Cultures.

La préparation des cultures en fioles de 100 mL contenant 20 mL de milieu 284 stérile à pH neutre est décrite ailleurs (Wannoussa *et al.*, 2015a). Le sel Fe₂O₃ ou le xérogel Fe/SiO₂ est ajouté au milieu à partir de la suspension concentrée à 10⁻³ M en fer (décrite dans la section 2.1.) pour obtenir la concentration finale en fer de 10⁻⁵ M.

La production de sidérophores par les microorganismes a été mise en évidence sur milieu gélosé contenant 30 mg de chrome azurool S (CAS) et 36 mg de HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide) selon la méthode de Verma *et al.* (2012). Les boîtes de Pétri sontensemencées par le dépôt de 100 µL de culture (DO_{600 nm} 0.5) dans un puits central réalisé dans la gélose et incubées à 30°C pendant 7 jours.

II.4. Techniques analytiques

Le méthode de dosage des hydrocarbures par HPLC après extraction dans l'hexane est décrite ailleurs (Wannoussa *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). La visualisation de zone d'émulsification à l'interface eau/ solvant organique donne une indication sur la production de biosurfactants par *Rhodococcus erythropolis* T902.1.

III. Résultats et Discussion

III.I. Mesurer de la quantité de fer (restant à l'intérieur) ou (relarguée à l'extérieur) des capsules dioxyde de silicium (SiO₂)

Les résultats de la figure V.1 montre qu'à partir d'une concentration initiale en fer dosé de $97 \times 10^{-4} \pm 0.00$ M, le relargage du fer augmente progressivement jusqu'au 20^{ème} jour d'incubation pour atteindre un maximum de $4.68 \times 10^{-5} \pm 0.00$ M ou $3.36 \times 10^{-5} \pm 0.00$ M selon que la suspension a subi un traitement par autoclavage ou non.

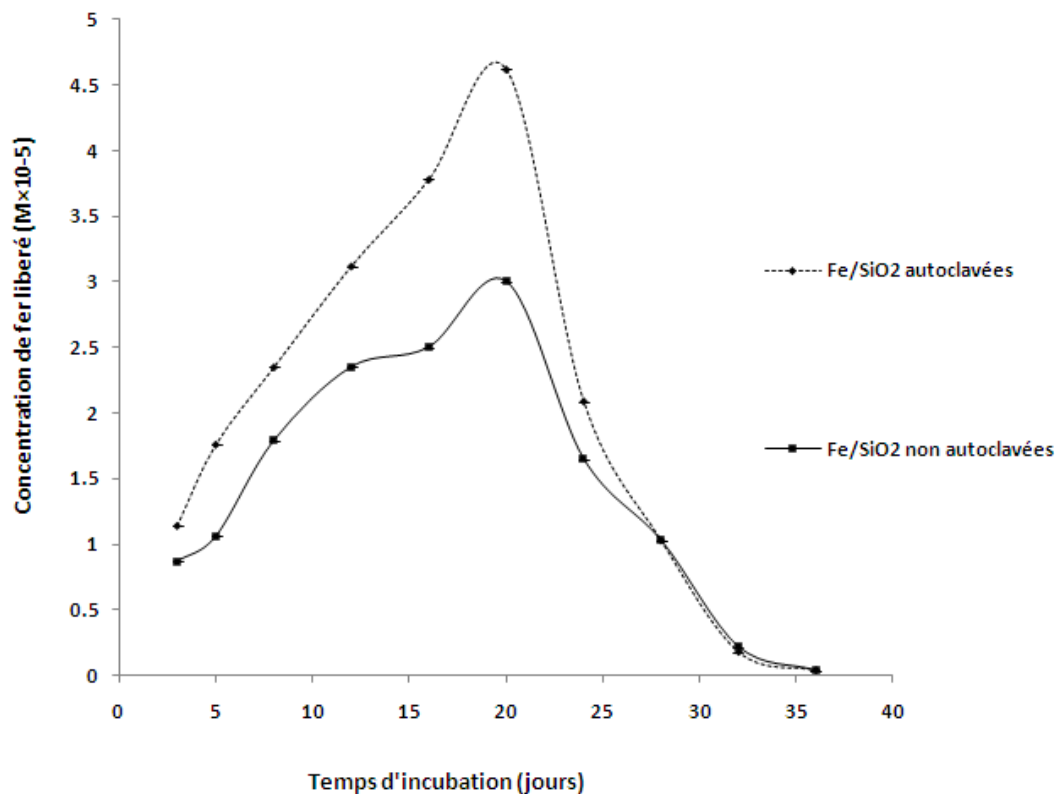


Figure V.1: Quantité de fer relarguée en phase aqueuse (eau milli Q) en présence de 10^{-3} M en nanoparticules calcinées de fer (Fe/SiO₂) autoclavées ou non.

Ensuite, la concentration du fer relargué dans le surnageant diminue rapidement jusqu' aux 36^{ème} jours d'incubation. D'après ces résultats, on peut supposer que le fer pourrait se trouver à la surface de la capsule dioxyde de silicium (SiO₂) ou il est moins bien ancré dans la matrice de silice. Ces résultats corroborent ceux de Mahy *et al.* (2014). Ces derniers ont testé le relargage du fer dans l'eau milli Q en présence de 1.8×10^{-4} M en nanoparticules calcinées de fer (xérogel fer-silice contenant 2.5% de Fe). Mahy *et al.* (2014) ont montré que la quantité de fer relarguée dans l'eau milli Q, sans autoclavage, augmente progressivement dès le premier prélèvement, après 1 jour d'incubation jusqu' aux 14 jours. En effet, celle-ci passe de 1.3×10^{-7} M à 8.6×10^{-7} M pour ensuite se stabiliser après 28 jours à 8.1×10^{-7} M.

La Figure V.1 montre également que l'autoclavage a un effet déterminant sur le relargage du fer. En effet, ce dernier s'échappe facilement de la capsule de dioxyde de silicium (SiO₂) dont la structure a été modifiée à cause de l'utilisation de l'autoclavage (Mahy, 2013). Ce dernier a trouvé que la

structure des nanoparticules calcinées (xérogel Fe/SiO₂) a été fortement modifiée après autoclavage. Par exemple, la surface spécifique des nanoparticules calcinées autoclavées (SiE0.2Fe2.5-B_ CA) diminue presque de moitié, de $479 \pm 5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ à $218 \pm 5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$.

Le cumul de résultats de dosage du fer par voie (A) montre que la concentration totale de fer libéré après les 9 étapes de retrait du surnageant s'élève à $15 \times 10^{-5} \pm 0.01 \text{ M}$ et $20 \times 10^{-5} \pm 0.01 \text{ M}$ respectivement avant et après autoclavage. On en déduit les quantités de fer restant à l'intérieur de la matrice de silice (SiO₂): $82 \times 10^{-5} \pm 0.00 \text{ M}$ et $77 \times 10^{-5} \pm 0.00 \text{ M}$ respectivement. On peut enfin les comparer aux $82 \times 10^{-5} \pm 0.00 \text{ M}$ et $76 \times 10^{-5} \pm 0.00 \text{ M}$ obtenus par dosage sur les culots résiduels (dosage selon la voie B).

III.2. Biodégradation du biphenyle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de xérogel Fe/SiO₂ et Fe₂O₃.

En vue de tester l'impact potentiel sur la microbiologie du fer libéré lors de l'autoclavage du xérogel Fe/SiO₂, des cultures de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 sur substrat biphenyle ont été mises en œuvre en présence de xérogel Fe/SiO₂ (10^{-5} M en fer) autoclavé et non-autoclavé. Ce dernier a été préparé à partir de la suspension concentrée de xérogel Fe/SiO₂ 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 Fe₂O₃ et (ii) au xérogel Fe/SiO₂ non-autoclavé et autoclavé (xérogel Fe/SiO₂*) préparés à partir des culots récupérés après 36 j d'incubation du xérogel Fe/SiO₂ dans l'eau milliQ (Section 2.2). Dans ces conditions, la quantité de fer soluble initiale de $1.1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ou $9.7 \times 10^{-6} \text{ M}$ respectivement après autoclavage ou non a été réduite à moins de 10^{-6} M . Les résultats (Tableau V.1) montrent que le taux de biodégradation du biphenyle est plus important en présence de xérogel Fe/SiO₂ 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/SiO₂* appauvris en fer et encore moindres en présence de particules de Fe₂O₃ 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/SiO₂) 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'anthracène comme seule source de carbone et d'énergie augmente avec l'augmentation de la solubilité du fer dans le milieu de culture: augmentation de 2 unités Log du nombre de cellules par mL en présence de 10^{-4} M de Fe_2O_3 ou $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$.

Tableau V.1: Pourcentages de biodégradation du biphényle après 18 jours d'incubation de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de xérogel Fe/SiO_2 (10^{-5} M en fer), xérogel Fe/SiO_2 * (10^{-5} M en fer initial et appauvri par 36 jours d'incubation abiotique préalable) et Fe_2O_3 autoclavés ou non (trois désinfectants successifs)

Conditions	% biphényle
Témoin	53% \pm 0.4
Fe1.5 autoclavé	85% \pm 5.2
Fe1.5 non-autoclavé	75% \pm 0.8
Fe1.5* autoclavé	70% \pm 0.8
Fe1.5* non-autoclavé	65% \pm 1.6
Fe_2O_3 autoclavé	67% \pm 0.9
Fe_2O_3 non-autoclavé	62% \pm 5.9

Ces résultats ne permettent cependant pas d'expliquer les mécanismes par lesquels la souche *Rhodococcus* a pu améliorer ses performances en présence de xérogel Fe/SiO_2 par rapport aux conditions standards. En effet, on peut imaginer que, vu ses caractéristiques morphologiques, la matrice de SiO_2 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.

III.3. 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 azurole 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 V.1). Les zones circulaires ou halos formés à partir du dépôt de la culture ($\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0.5) incubée en présence de xérogel Fe/SiO_2 à 10^{-4} 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/SiO₂ 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 biphenyle et de croissance de la population microbienne de *Rhodococcus erythropolis* T902.1. La présence de nanoparticules au sein du xérogel Fe/SiO₂ activerait ainsi la surproduction de sidérophores utiles à la mobilisation du fer.

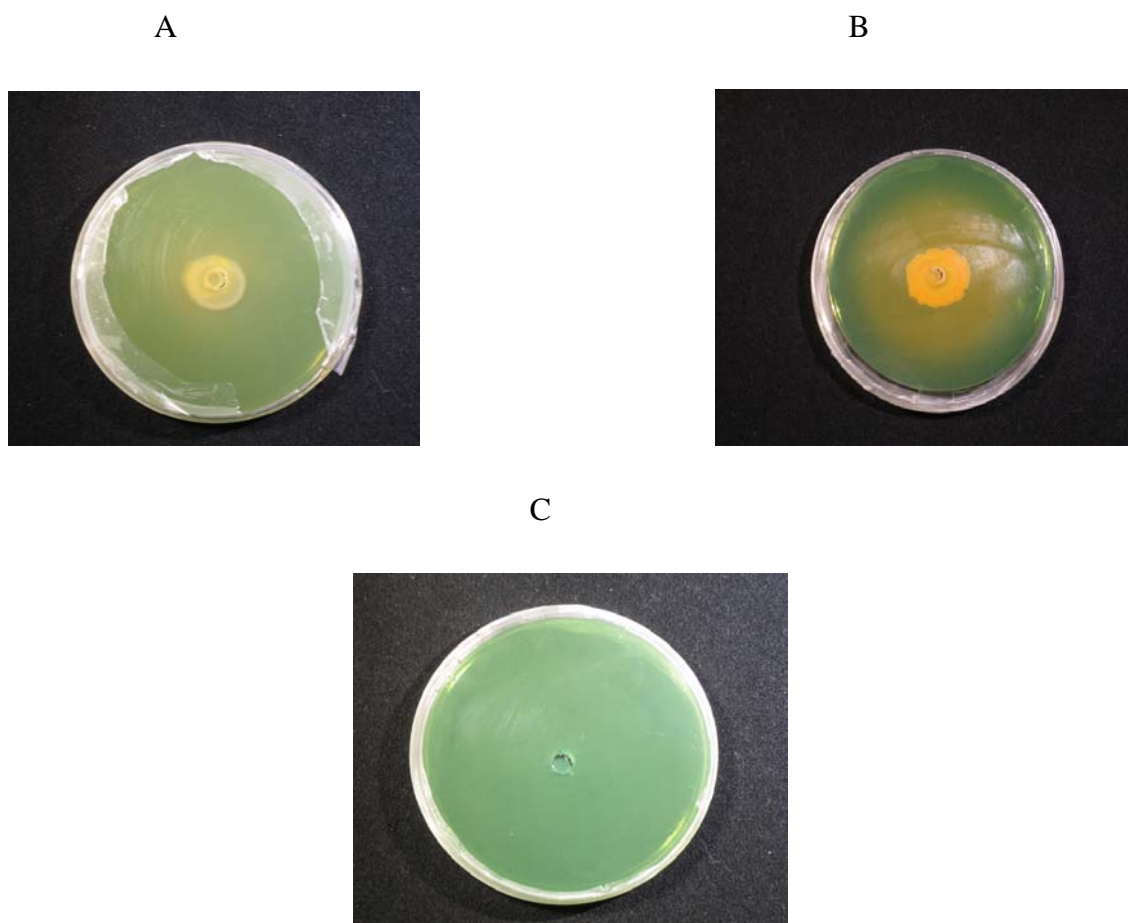


Figure V.2: Mise en évidence sur milieu gélosé (CAS) de la sécrétion de sidérophores par *Rhodococcus erythropolis* T902.1: inoculum issu d'une culture de 3 jours d'incubation à 30 °C sans (A) ou en présence (B) de xérogel Fe/SiO₂ à 10⁻⁴ M en fer ou absence d'inoculum (C).

III.4. 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 tréhaloses montrent une teneur en hexoses 85 % plus élevée dans la biomasse cellulaire produite en présence de xérogel Fe/SiO₂ par rapport aux conditions sans xérogel Fe/SiO₂. En outre, ils ne sont pas présents dans les surnageants de culture. Ceci est en accord avec les résultats de la deuxième 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 V.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 Choraio (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.

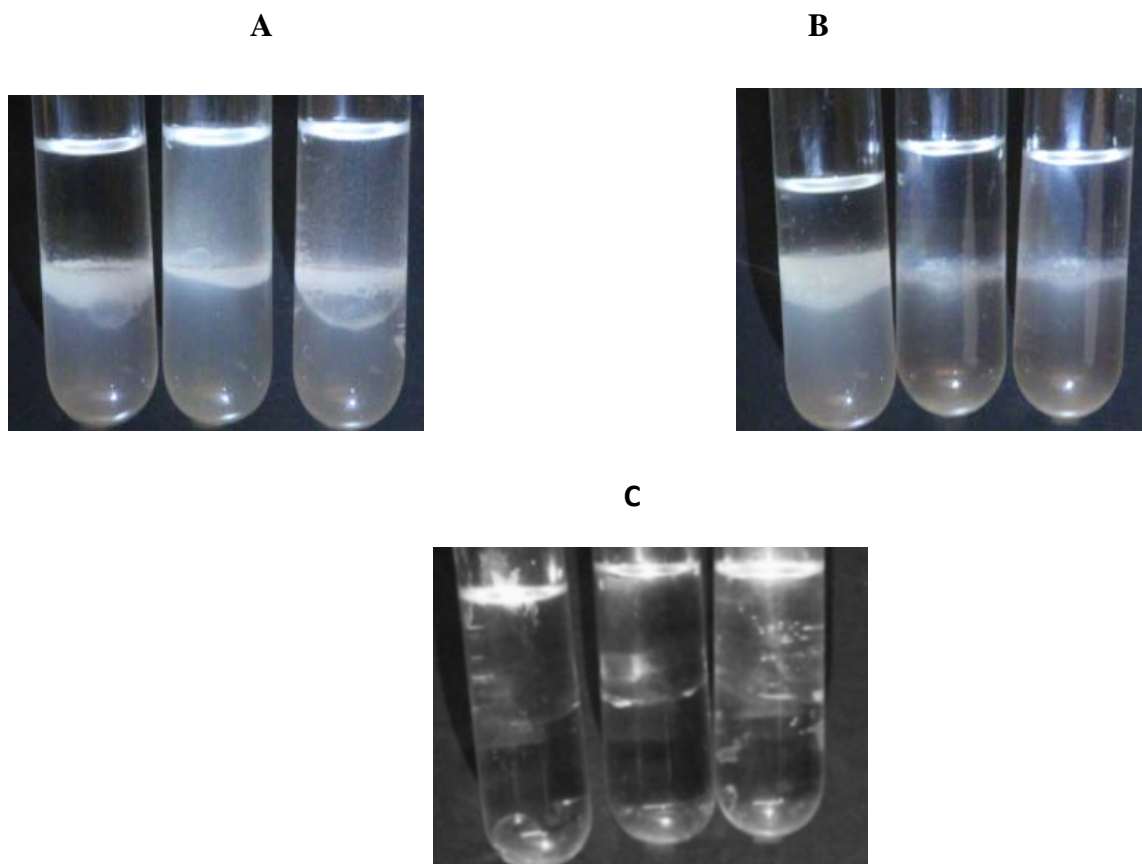


Figure V.3: Tests d'émulsion à l'interface eau/hydrocarbure en présence du culot de bactéries incubées sans (A) ou en présence de xérogel Fe/SiO₂ à 10⁻⁴ M en fer (B) ou du surnageant (C) de culture (hydrocarbure de gauche à droite : paraffine; hexane; pentane).

IV. Conclusion

Notre étude a montré l'impact important que pouvait avoir le fer sous forme de nanoparticules sur l'activation de la biodégradation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Les pourcentages de biodégradation après 18 jours d'incubation en présence du xérogel Fe/SiO₂ à 10⁻⁵ 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/SiO₂. Ces résultats confirment l'intérêt des nanoparticules de fer encapsulées dans une matrice de silice pour améliorer la biodégradation des HAP.

Sixième section: Discussion générale et Conclusions

Discussion générale

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés toxiques pour les êtres vivants et pour l'homme en particulier. Du fait de leur caractéristique et de leur présence en fortes concentrations dans certains sites pollués, différents procédés ont été proposés pour éliminer les HAP des milieux contaminés: procédés physiques, chimiques et biologiques. Dans ces derniers appelés procédés de bioremédiation, la biodégradation repose sur l'utilisation d'organismes (champignons, plantes) ou microorganismes (aérobies, anaérobies) afin de dégrader ou d'extraire les polluants (Smith and Ratledge, 1989; Cerniglia, 1992; Boonchan *et al.*, 2000; Grishchenkov *et al.*, 2002; Rentz *et al.*, 2005; Jouanneau *et al.*, 2005; Rehmann and Daugulis, 2006; Bunescu *et al.*, 2008). La rentabilité économique est certainement un des critères qui orientent vers l'emploi des microorganismes dans les procédés environnementaux (épuration des eaux, des sols, bio méthanisation, compostage etc...). A titre de comparaison, il est admis que le traitement de 1kg de matière sèche polluante coûte environ 0.5 euros tandis que la voie biologique s'opère à un coût dix fois moindre (Grommen et Verstraete, 2002).

Le grand souci avec ces procédés est qu'ils sont lents pour dégrader les polluants, d'autant plus lorsque ceux-ci sont faiblement solubles en phase aqueuse. Plusieurs études récentes ont montré que la cinétique de la réaction de la bioremédiation peut être améliorée en présence de faibles concentrations de certains éléments métalliques sous forme de sel ou nanoparticules (De Windt, 2005; Kotresha et Vidyasagar, 2008; Bunescu *et al.*, 2008; Sridevi *et al.*, 2011). Bien que l'utilisation des catalyseurs (sous forme de sel ou nanoparticules) accélère la bioremédiation des polluants, d'autres problèmes sont rencontrés à cause de la séparation des catalyseurs des produits de la réaction finale (Moisan, 2006). Par exemple, la séparation d'oxyde de titane (TiO_2) de l'eau traitée. De plus, il est souvent difficile de recycler le catalyseur car la technique de séparation implique des conditions expérimentales qui peuvent le détruire. D'un autre côté, le prix requis pour la séparation rend le procédé difficilement rentable à grande échelle. Toutefois, il est possible de contrer ce problème en fixant le catalyseur sur un support approprié tels que gel de silice, fibre de verre, bille de verre, bille de céramiques, etc. (Corriu et Anh, 2009).

Dans ce contexte, nous avons utilisé les nanoparticules métalliques (de taille de 2 à 3 nm), Celles-ci sont encapsulées au sein d'une matrice inerte de silice synthétisée par un procédé sol-gel.

D'une part, ce procédé assure la stabilité de la réactivité du catalyseur (absence d'agglomération) et d'autre part, la présence des nanoparticules métalliques, au sein du dioxyde de silicium (SiO_2), assure une bonne dispersion de celles-ci grâce à la surface spécifique du dioxyde de silicium (Lambert *et al.*, 2004c) et limite le relargage de ces particules à l'extérieur de la capsule de dioxyde de silicium (ou xérogel de silice) (Mahy *et al.*, 2014; Wannoussa *et al.*, 2015cd). De plus, il évite la précipitation des nanoparticules métalliques en milieu réactionnel à pH basique (Wannoussa *et al.*, 2015d). En plus de tous ces avantages, le dioxyde de silicium (SiO_2) n'est pas toxique pour les microorganismes (Mu *et al.*, 2011).

Dans ce travail, on a utilisé les nanoparticules métalliques encapsulées au sein d'une matrice inerte de silice synthétisées par procédé sol-gel afin d'optimiser les performances de la bioremédiation du biphényle comme source de carbone et d'énergie pour *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Cette souche a présenté le meilleur potentiel de bioremédiation du biphényle. La souche *Rhodococcus erythropolis* T902.1 a été obtenue par conjugaison entre la souche *Rhodococcus erythropolis* BD2, contenant un plasmide linéaire responsable de la bioremédiation de l'isopropylbenzène et pouvant résister à des concentrations supérieures à 20 μM en mercure (Dabrock *et al.*, 1994) et *Rhodococcus erythropolis* T902 qui est une souche dégradant le mazout et tolérant la dessiccation (Weekers *et al.*, 1999).

Notre discussion générale permettra de rassembler les résultats des chapitres précédents visant une meilleure compréhension et une optimisation du procédé de bioremédiation du biphényle par des bactéries aérobies. La première partie de cette discussion fera l'objet d'une synthèse des résultats présentés précédemment, et ensuite, d'une comparaison critique de ceux-ci par rapport aux recherches récemment menées par d'autres équipes à travers le monde. La deuxième partie rassemblera les perspectives de recherches et d'applications industrielles qui pourraient apporter des précisions supplémentaires sur l'utilisation des microorganismes dans le traitement des sols pollués par les hydrocarbures aromatiques et/ ou les hydrocarbures aromatiques liés à différents groupements comme les hydrocarbures chlorés et polychlorobiphényles (PCB).

I. Synthèse des résultats de la thèse

I.1. Amélioration du procédé de bioremédiation

Dans les 2^e, 3^e, 4^e, et 5^e sections de la thèse, les résultats des expériences réalisées ont permis d'améliorer les connaissances sur l'interaction entre les cellules bactériennes (*Rhodococcus erythropolis* T902.1) et les nanoparticules. Cette interaction montre, d'une part, que la bactérie est capable d'utiliser les nanoparticules ajoutées en très faible concentration (10^{-6} M, 10^{-5} M ou 10^{-4} M) pour accélérer la bioremédiation du biphenyle et d'autre part, que l'importance de cette accélération dépend de la concentration des nanoparticules, de la nature du métal utilisé (Ag^+ , Cu^{2+} , Pd^{2+} , Co^{2+} ou Fe^{3+}) et des post-traitements appliqués sur les nanoparticules, soit séchées (M^{x+}); calcinées (M_xO_y) ou réduites (M^0). Dans la 2^e section et selon la nature du métal utilisé nous avons pu identifier deux types de nanoparticules: les nanoparticules d'argent (Ag/SiO_2) et de cuivre (Cu/SiO_2) qui ont un impact négatif sur la croissance de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence du biphenyle et les nanoparticules de palladium (Pd/SiO_2) et de cobalt (Co/SiO_2) qui ont un impact positif sur le potentiel de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 pour dégrader le biphenyle. De plus, leur configuration dans le milieu liquide, sous forme de nanoparticules (Co/SiO_2 , Ag/SiO_2 , Cu/SiO_2) ou sous forme de sel (CoCl_2 , AgNO_3 , CuCl_2) joue un rôle important dans le procédé de bioremédiation notamment sur la diminution de la concentration du biphenyle, la croissance de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 et sur l'activité des enzymes responsables de la bioremédiation du biphenyle.

L'application des nanoparticules de palladium dans les sédiments ou dans le traitement de l'eau n'est pas envisageable aisément car le palladium métal lourd utilisé à de fortes concentrations, risque de polluer davantage l'environnement (Nies, 1999; Todd *et al.*, 2003). Pour cette raison, dans les 3^e et 4^e sections les travaux sont dirigés vers l'utilisation des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) qui sont moins nocives et qui possèdent également un pouvoir stimulant de la dégradation des hydrocarbures polycycliques (PAH) (Zhang, 2003; Jason *et al.*, 2005; Ansari *et al.*, 2008; Aldric, 2009). Dans ces sections, les résultats montrent l'effet positif de la concentration des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) sur la bioremédiation du biphenyle.

I.2. Impact des nanoparticules de fer sur les métabolites de *Rhodococcus erythropolis* T902.1

Nous avons remarqué que l'addition de 10^{-4} M en nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) permet de dégrader 35% de biphényle supplémentaire par rapport aux échantillons témoins (non additionnés des nanoparticules de fer). Nous remarquons que la présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) a également un rôle positif sur la vitesse initiale de bioremédiation du biphényle. Cette accélération est également plus marquée quand la concentration en nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) passe de 10^{-6} M à 10^{-4} M. La vitesse initiale de bioremédiation du biphényle passe de 67 ppm/jour à 103 ppm/jour en trois jours respectivement comme le montre la figure III.1.C (3^e section).

De plus, on a également remarqué que la vitesse initiale de bioremédiation du biphényle devient moins importante après trois jours. En effet, les vitesses initiales de bioremédiation du biphényle après 3 jours, 8 jours et 18 jours d'incubation sont de (54 ppm/jour, 27 ppm/jour et 17 ppm/jour) et (103 ppm/jour, 50 ppm/jour et 26 ppm/jour), respectivement pour les échantillons témoins et pour les échantillons contiennent les nanoparticules de fer (Fe/SiO₂).

Au niveau macroscopique, on remarque qu'après 48 heures d'incubation le milieu de culture est devenu fortement coloré en jaune avec une augmentation de la densité bactérienne, indiquant que le biphényle est partiellement métabolisé par la souche *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Cette accumulation de métabolites pourrait avoir un impact inhibiteur sur la vitesse de bioremédiation du biphényle. Deux métabolites ont été identifiés. Un métabolite, le catéchol, apparaît dans la culture pendant la phase de croissance et disparaît pendant la phase stationnaire. Le second métabolite, l'acide benzoïque, apparaît lors de la disparation du catéchol.

Par ailleurs, si on regarde l'évolution des métabolites présentés dans le tableau III.1 (3^e section) on constate que la présence de nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) a un impact important sur la transformation du biphényle en acide benzoïque, avec, à la fin de la cinétique, une accumulation de cette substance égale à 25 ± 1 et 13 ± 1 ppm respectivement en présence et absence de nanoparticules de fer (Fe/SiO₂). Ce résultat laisse à penser que la quantité de fer, pour une concentration égale à 10^{-4} M, est suffisante pour continuer à accélérer le processus de bioremédiation du biphényle. Cependant l'accumulation d'acide benzoïque dans le milieu de

culture semble avoir un effet négatif ou inhibiteur sur le potentiel de *Rhodococcus erythropolis* T902.1.

En effet, l'acide benzoïque avait déjà été identifié dans des cultures de bactéries de genres *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Rhodococcus* en présence du biphenyle comme source de carbone et d'énergie (Bevinakatti *et al.*, 1992; Kikuchi *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 2004, Iwanade *et al.*, 2005). Kikuchi *et al.* (1995) ont rapporté que la souche *Pseudomonas* KKS102. KKS102 produit de l'acide benzoïque comme métabolite intermédiaire de la bioremédiation du biphenyle (à une concentration de 400ppm). Cependant, cette souche n'est pas capable de dégrader complètement l'acide benzoïque jusqu'à l'obtention du CO₂ et de l'H₂O. Kikuchi *et al.* (1995) ont proposé d'utiliser une culture mixte contenant deux souches, *Pseudomonas* KKS102.KKS102 et *Pseudomonas fluorescens* KKL101 pour éliminer complètement l'acide benzoïque dans le milieu de culture. La souche *Pseudomonas fluorescens* KKL101 est capable de croître dans un milieu de culture contenant 1% d'acide benzoïque et de dégrader ce dernier complètement après 24 h d'incubation.

1.3. Recyclage des nanoparticules de fer

Par la suite, nous avons montré que l'efficacité des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) diminue en fonction du temps. Ceci suggère que le fer est relargué progressivement des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂) en milieu de culture liquide. Le tableau III. 2 (3^e section) présente les cinétiques de bioremédiation du biphenyle lors de 3 cycles successifs en présence de biphenyle et de 10⁻⁴ M en nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) introduits initialement et transformés de cycle en cycle.

Les pourcentages de bioremédiation du biphenyle (56%, 57% et 56%) et (55%, 58% et 57 %) obtenus, respectivement pour le surnageant et le culot, dans le cas des témoins après 18 jours d'incubation lors de trois cycles, sont identiques. Par contre, en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂), les pourcentages de bioremédiation du biphenyle, dans le cas du culot, diminuent progressivement de cycle en cycle de 90%, 84% à 82% alors que ceux obtenus dans le cas du surnageant augmentent de 64%, 65% à 69% en fonction du nombre de cycles. Afin de trouver une explication à ceci, nous avons étudié l'évolution de la concentration en fer dans le culot (c'est-à-dire les nanoparticules de fer et la biomasse cellulaire) et le fer libéré dans le surnageant. La concentration du fer dans le culot ($9.2 \times 10^{-5} \pm 0.01$ M, $8.6 \times 10^{-5} \pm 0.01$ M et $8.1 \times 10^{-5} \pm 0.01$ M)

diminue au cours du temps alors qu'elle augmente dans le surnageant ($2.0 \times 10^{-5} \pm 0.01$ M, $3.0 \times 10^{-5} \pm 0.01$ M et $6.0 \times 10^{-5} \pm 0.01$ M) comme le montre le tableau III. 2 (3^e section).

I.4. Dosage du fer dans différents compartiments cellulaires et influence sur l'activité enzymatique

Le devenir du fer après sa libération a été étudié. Le suivi du fer dans les différents compartiments cellulaires (milieux intra- et extra-cellulaires et adsorbé à la surface de la cellule) a montré que seulement 9.5% de la quantité de fer libérée des capsules de dioxyde de silicium (SiO_2) se retrouve à l'intérieur de la cellule et que 34.6% de cette même quantité est adsorbée à la surface des cellules (Tableau III. 3, 3^e).

Le fer présent à l'intérieur des cellules pourrait activer les enzymes intervenant dans la bioremédiation du biphenyle. Ceci est cohérent avec les expériences réalisées directement sur la mesure de l'activité enzymatique (biphenyle dioxygénase et catéchol 1,2-dioxygénase) où l'on retrouve une importante augmentation de sa transformation en présence de nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) et de biphenyle comme source de carbone (Fig III.3, 3^e section). Par exemple, l'activité spécifique d'enzyme de biphenyle dioxygénase après 48 heures d'incubation de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 avec le biphenyle comme source de carbone est 50% supérieure en présence de 10^{-4} M en nanoparticules de fer par rapport au témoin (milieu sans les nanoparticules de fer).

Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus par Dinkla *et al.* (2001) qui ont rapporté que l'activité d'une monooxygénase et de deux dioxygénases augmentait ainsi que le taux de la bioremédiation du toluène avec l'addition de FeCl_3 dans le milieu de culture de *Pseudomonas putida* initialement carencée en fer. De même, les travaux de Bunescu (2006) sur la bioremédiation d'ABT (2- aminobenzothiazol) par *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 en présence de 10^{-3} M en complexe de fer (FeNTA) (ou acide nitrilotriacétate de fer) ont montré que le complexe de fer (FeNTA) stimule la bioremédiation d'ABT par les bactéries, et que cette activation dépend de l'internalisation du fer à l'intérieur de la cellule. Ceci nous permet de déduire que le fer joue un rôle important dans l'activation des enzymes intervenant dans la bioremédiation des hydrocarbures aromatiques.

I.5. Relargage du fer par les capsules de dioxyde de silicium (SiO₂)

Dans les 4^e et 5^e sections, nous avons étudié en fonction du temps le relargage du fer par les capsules de dioxyde de silicium (SiO₂) avant ou après autoclavage et dans une gamme de pH 4, 6.4, 7 et 7.6

L'influence de l'autoclavage (120 °C et 1.2 bar) ne serait pas négligeable. En effet, selon Mahy (2013) la surface spécifique diminuerait assez fortement dans le cas des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂) et des nanoparticules fer (Fe/SiO₂). Mahy (2013) a montré que la masse des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂) et des nanoparticules de fer calcinées (SiE0.2 Fe2.5-B_CA) a augmenté de 8.2% et de 6.4% respectivement après autoclavage à cause de la précipitation de sels issus du milieu de culture 284 sur les capsules de dioxyde de silicium (SiO₂). De plus, il est possible que ce dépôt de sels se forme dans les micropores des nanoparticules expliquant ainsi la réduction mesurée du volume microporeux et de la surface spécifique. En effet, celle-ci diminue presque de moitié de $479 \pm 5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ à $218 \pm 5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. Tandis que la surface spécifique de l'échantillon de dioxyde de silicium (matrice de silice pure) diminue énormément avec l'autoclavage, elle passe de $313 \pm 5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ à $46 \pm 5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$.

Abordés dans la 5^e section, ces travaux ont permis de déterminer la quantité de fer relarguée dans l'eau milliQ sans ou avec l'autoclavage et la quantité de fer se trouvant effectivement à l'intérieur des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂).

Nos résultats montrent que la quantité de fer relarguée des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂) (partant d'une concentration initiale de $9.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ dans la phase aqueuse) augmente progressivement jusqu'à 20 jours d'incubation avec ou sans autoclavage respectivement égal à $4.7 \times 10^{-5} \pm 0.0 \text{ M}$ et $3.4 \times 10^{-5} \pm 0.0 \text{ M}$ (soit de l'ordre de 4.8% et 3.5% de la quantité initialement). Puis la quantité de fer relarguée dans la phase aqueuse diminue rapidement jusqu'à la fin de l'expérience après 36 jours d'incubation. Cette diminution est expliquée par le lavage du culot après le vingtième jour d'incubation, c'est-à-dire le culot est remis en suspension dans l'eau milliQ pour chaque nouvelle période d'incubation (24 j, 28 j, 32 j et 36 j) (Figure V.1, 5^e section).

Cette expérience a permis également de déterminer le pourcentage de fer restant à l'intérieur des capsules de dioxyde de silicium autoclavées et non autoclavées (SiO_2). En effet, celle-ci respectivement est 79.4% et 84.5% de la de la quantité initialement.

D'après ces résultats, une hypothèse peut être émise sur l'état des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) en solution. En effet, le fer a été encapsulé dans la matrice de silice, il ne devrait donc pas s'en échapper. Cependant la présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) dans une phase aqueuse, pendant une longue durée induit une libération du fer. Cet impact était plus clair après autoclavage, parce que le fer s'échappe plus facilement de la matrice de silice dont la structure aurait été modifiée à cause de l'autoclavage (Mahy, 2013).

Mahy et ses collaborateurs (2014) ont testé le relargage du fer en présence de 1.8×10^{-4} M de nanoparticules de fer calcinées Fe2.5 (2.5 de fer dans la matrice de silice). Ils ont trouvé que le relargage du fer dans l'eau milliQ sans autoclavage ni retraits successifs du surnageant, augmente rapidement en fonction du temps. En effet, la quantité de fer passe de 1.3×10^{-7} M à 8.6×10^{-7} M respectivement après un jour et 14 jours, puis ce relargage se stabilise progressivement aux environs de 8.1×10^{-7} M durant les 28 jours suivants. Ces résultats supposent qu'un certain nombre d'atomes de fer (jusqu'à quelques pourcents) soient moins bien ancrés et probablement les plus en périphérie de la matrice de silice (SiO_2) que les autres. De plus, l'autoclavage a un effet amplificateur du relargage. En effet, la détermination du fer relargué des capsules de dioxyde de silicium (SiO_2) dans l'eau milliQ à pH 7 après autoclavage a été testée également par (Mahy, 2013). Ce dernier a montré que la quantité de fer relarguée dans les suspensions (l'eau milliQ) des nanoparticules de fer séchées (SiFe1-SA) et des nanoparticules de fer calcinées (SiE0.2 Fe2.5_B-CA) augmente après autoclavage. En effet, le pourcentage de fer relargué directement après autoclavage ($T = 0$) dans les suspensions des nanoparticules de fer séchées (SiFe1-SA) et des nanoparticules de fer calcinées (SiE0.2 Fe2.5-B_CA) était respectivement de l'ordre de 0.01% et 0.03%.

La variation du pH a également un effet important sur le relargage du fer. En effet, à pH 7.6 le fer précipite sous la forme de $\text{Fe}(\text{OH})_3$, ceci expliquerait la faible concentration de fer (92×10^{-7} M) dans le surnageant. En revanche, à pH 4 la quantité de fer relarguée des capsules de dioxyde de silicium (SiO_2) est seulement égale à 48×10^{-6} M après autoclavage et après 18 jours d'incubation.

Ceci montre l'effet du pH, après autoclavage et le temps d'incubation, sur la modification de la structure des capsules de dioxyde de silicium (SiO_2).

I.6. Impact des propriétés texturales des nanoparticules (surface spécifique) sur la bioremédiation du biphényle

Dans les 2^e, 3^e, et 5^e sections, nous avons étudié la relation entre la modification structurale des nanoparticules obtenue après le traitement thermique (séchage, calcination, réduction) ou l'utilisation d'autoclavage et la bioremédiation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1.

Les tableaux II.1 et II.2 (2^e section) montrent que les propriétés texturales ne jouent pas un rôle important sur la bioremédiation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1. En effet, bien que la surface spécifique S_{BET} augmente lors du traitement de calcination (Mahy, 2013) et que les S_{BET} des nanoparticules séchées ou calcinées de cobalt (Co/SiO_2) soient différentes (respectivement $75 \pm 5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ et $350 \pm 5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), nous avons trouvé que les pourcentages de bioremédiation du biphényle en présence de 10^{-4} M en nanoparticules séchées ou calcinées de cobalt (Co/SiO_2), sont similaires respectivement égales à $83 \pm 1\%$ et $81 \pm 1\%$. Par contre, nous avons observé (tableau II.1) que les nanoparticules calcinées ou réduites de cobalt (Co/SiO_2) ont la même surface spécifique cependant les pourcentages de bioremédiation du biphényle, respectivement égales à $81 \pm 1\%$ et $77 \pm 2\%$, sont différents. Nous avons constaté également que les pourcentages de bioremédiation du biphényle, en présence de 10^{-4} M en nanoparticules séchées ou calcinées de fer (Fe/SiO_2), respectivement égales à $91 \pm 2\%$, $90 \pm 1\%$, sont similaires (Figure III.2 (2^e section)), alors que la surface spécifique S_{BET} de ces nanoparticules est différente; celle-ci passe de $72 \pm 5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ à $430 \pm 5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$.

Pour expliquer ce phénomène, nous avons supposé que la forme du métal ($M = \text{cobalt}$ ou fer) change au cours du traitement thermique (Vasconcelos *et al.*, 2013; Mahy *et al.*, 2014). En effet, celle-ci passe de la forme ionique (M^{x+}), à la forme d'oxyde métallique (M_yO_z) pour finir sous forme métallique neutre (M^0). Cependant, dans le cas du fer, nous avons constaté seulement l'existence de deux formes (M^{x+} et M_yO_z).

Dans le cas des nanoparticules de cobalt calcinées et réduites, Vasconcelos *et al.*, 2013, ont trouvé respectivement les formes Co_3O_4 et CO^0 . Quant aux nanoparticules calcinées de fer, Mahy *et*

al. (2014), ont montré, après calcination, l'existence de la forme Fe_2O_3 à l'intérieur de SiO_2 . De ce fait, on pourrait suggérer que la présence de différentes formes de nanoparticules influence potentiellement la capacité de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 à la bioremédiation du biphenyle. Santos *et al.*, (2008) ont trouvé que la croissance de *Pseudomonas* 222A sur l'anthracène, comme source de carbone et d'énergie, était différente en présence de différents sels de fer utilisés à la concentration de 10^{-4} M (FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{NO}_3)_3$, Fe-EDTA, Fe_2O_3 , Fe^0 , FeSO_4). En effet, Log CFU mL^{-1} est respectivement égale à 6.58; 7.4; 6.4; 5.38; 6.72 et 6.78.

Dans la deuxième partie de la 5^e section, nous avons comparé la bioremédiation du biphenyle en présence de 10^{-5} M en nanoparticules de fer (Fe/SiO_2), en sel d'oxyde de fer (Fe_2O_3) et en nanoparticules de fer (Fe/SiO_2^* , préparées à partir du culot des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) autoclavées ou non après 36 jours). Ceci confirme bien, une deuxième fois, que la concentration de fer relargué de la capsule de dioxyde de silicium (SiO_2) joue un rôle déterminant dans l'amélioration de la bioremédiation du biphenyle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Les résultats (TableauV.1) montrent que le taux de bioremédiation du biphenyle est plus important en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) autoclavées ou non ($85 \pm 5.2\%$ et $75 \pm 0.8\%$) par rapport aux témoins ($53 \pm 0.4\%$). Les résultats sont intermédiaires pour les cultures en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2^*) appauvris en fer et encore moindres en présence de sel de Fe_2O_3 autoclavés ou non. D'après ces résultats, on peut imaginer que, vu les caractéristiques morphologiques, la matrice de SiO_2 a un rôle de cage où le fer ne peut sortir facilement dans des conditions environnementales habituelles et où les bactéries ne peuvent pas accéder. Signalons également que l'oxyde de fer (Fe_2O_3) résultant de la calcination des nanoparticules et celui contenu dans le milieu de cultures n'ont pas le même pouvoir stimulant de la bioremédiation du biphenyle (TableauV.1). Ceci pourrait être lié à une mobilisation du fer qui est moins aisée à partir des particules d'oxyde de fer qu'à partir des nanoparticules. En effet, dans le cas des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2), les nanoparticules de fer sous forme Fe_2O_3 sont dispersées de manière homogène dans la silice et ont une surface spécifique significativement plus élevée que dans le cas de sel d'oxyde de fer (Fe_2O_3).

I.7. Impact du pH sur la bioremédiation du biphenyle en présence de sel de fer et des nanoparticules de fer

Comme les sels de Fe^{3+} sont plus solubles à un pH acide, dans la deuxième partie de la 4^e section, nous avons testé l'influence du pH sur la bioremédiation du biphenyle en présence de 10^{-4} M en nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) et de 10^{-4} M en sel de fer (FeCl_3). Il faut cependant respecter la physiologie microbienne qui nécessite des pH proches de la neutralité. Trois pH ont ainsi été choisis: pH 6.4, 7 et 7.6. Le Tableau IV.1 reprend les pourcentages de bioremédiation du biphenyle dans chacun des milieux après 18 jours d'incubation.

D'un point de vue général, nous remarquons que le biphenyle est dégradé dans les différents pH mais le résultat le plus important était en présence de 10^{-4} M en nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) ou de 10^{-4} M en sel de fer (FeCl_3) à pH 6.4. Leurs pourcentages ont augmenté respectivement de 12% et 41% à pH 6.4 par rapport au pH 7.6. Par contre, nous pouvons voir sur le Tableau IV.1 que la bioremédiation du biphenyle est légèrement favorisée en présence de 10^{-4} en hydroxyde de fer ($\text{Fe}(\text{OH})_3$). En effet, le pourcentage de bioremédiation du biphenyle, après 18 jours d'incubation en présence de ce sel, était de 62 ± 1.1 % contre 53 ± 0.7 % seulement dans le cas du témoin à pH 7. De plus, nous observons qu'avec la présence de sel de fer (FeCl_3) à pH 7.6, le pourcentage de bioremédiation du biphenyle était similaire à ceux de l'hydroxyde de fer respectivement à pH 7 égale à $69 \pm 3.7\%$ et $62 \pm 1.1\%$. Ce qui nous amène à conclure que dans ce cas, le fer n'a pas été utilisé par les bactéries.



À 25 °C, la constante de solubilité est $K_{\text{SP}} = 2 \times 10^{-39}$. La valeur de la constante de solubilité est très faible donc la solubilité (S) de l'hydroxyde de fer dans un milieu aqueux sera aussi très faible $S = 9.2 \times 10^{-11}$ M. Cette concentration n'améliore donc pas la croissance de *Rhodococcus erythropolis* T902.1.

Nous pouvons conclure, d'après cette expérience, que pour être utilisé par *Rhodococcus erythropolis* T902.1, le fer doit être disponible, c'est-à-dire qu'il doit être soluble. Si le fer est sous forme d'hydroxyde non soluble (précipité), celui-ci ne peut pas être internalisé par les cellules (Chorao, 2008). Ce dernier a trouvé que la bioremédiation du 2-aminobenzothiazole (ABT) par *Rhodococcus rhodochrous* n'est pas favorisée par la présence de 10^{-3} M en magnétite (Fe_3O_4),

goethite (α -FeO(OH)) et Fe(OH)₃ formé lorsque du FeCl₃ est placé dans l'eau à pH >7. Les pourcentages de bioremédiation sont respectivement de 24 %, 30 % et 38 % en présence de ces sels et de 36 % dans le témoin. Bunescu (2006) a étudié également l'influence du pH (6.2 et 7.5) sur la bioremédiation de benzothiazole (BT) par *Rhodococcus rhodochrous* en présence de 3×10^{-3} M en Fe(ClO₄)₃, 9H₂O. Il a observé une augmentation du taux de bioremédiation du (BT) à pH 6.2 par rapport à pH 7.5. De plus, le métabolisme de BT par *Rhodococcus rhodochrous* est tout à fait identique aux deux pH en absence de sels de fer. Par contre, les cinétiques de formation et de biphenyle du 2-Hydroxybenzothiazole (OBT) et 2,6-dihydroxybenzothiazole (diOBT) ont été accélérées à pH 6.2 par rapport au pH 7.5 et en présence de fer.

L'effet du pH sur la bioremédiation en présence du fer pourrait être lié aux mécanismes impliqués dans les interactions fer/bactéries. On peut donc supposer que l'internalisation du fer par la bactérie dépend du pH. Nous avons alors cherché à connaître la concentration du fer intracellulaire en fonction des conditions du pH. Nos résultats ont montré que quelque soit le pH utilisé, le fer peut pénétrer dans la cellule. En fait, en diminuant le pH la concentration de fer intracellulaire augmente. A pH égale à 7.6, nous constatons que la concentration de fer intracellulaire dans le cas des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) est égale à 94×10^{-7} M alors que celle du sel de fer (FeCl₃) est seulement égale à 41×10^{-7} M. Dans ce cas particulier, on peut dire que les nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) ont la capacité de résister aux variations du pH plus que le sel de fer (FeCl₃). Ceci confirme les résultats précédents et explique que la quantité du biphenyle dégradé dépend du pH, et elle est plus importante à pH acide.

I.8. Utilisation du glucose et de l'éthanol comme source supplémentaire de carbone

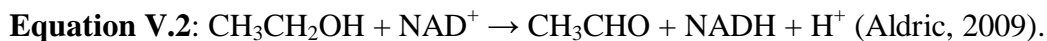
Dans la troisième partie de la 4^e section, le tableau IV.2 montre que la présence de 0.1 g/L de glucose ou de 0.75 g/L d'éthanol améliore la bioremédiation du biphenyle ($78 \pm 0.6\%$ et $67 \pm 1.5\%$) que dans le cas des témoins ($53 \pm 0.7\%$).

En effet, le biphenyle est un substrat toxique pour les microorganismes en particulier si sa concentration est importante. L'addition d'une source de carbone complémentaire en faible concentration peut stimuler la viabilité des cellules et améliorer la bioremédiation des composés toxiques (Topp et Hanson, 1990; Speitel et Maclay, 1993; Loh et Wang, 1998; Lovanh *et al.*, 2002; Kotresha et Vidyasagar, 2008; Aldric et Thonart, 2008; Sridevi *et al.*, 2011). Kotresha et

Vidyasagar (2008) ont trouvé que la bioremédiation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996 est stimulée en présence de 0.25 g/L de glucose, mais si la concentration de glucose augmente de 0.25g/L, le taux de la bioremédiation de phénol commence à diminuer. En effet, le pourcentage de bioremédiation du phénol diminue de 99% à 34% respectivement en présence de 0.25g/L et/ou 4g/L de glucose. Paradoxalement, Papanastasiou (1982) a signalé que la présence de glucose pourrait inhiber l'utilisation d'autre substrat à cause de l'impact de la répression catabolique par le glucose. De plus, la littérature a montré que l'impact négatif ou positif de l'éthanol sur la bioremédiation des composés aromatiques dépend de sa concentration dans le milieu. La présence de forte concentration en éthanol induit une dégradation diauxique (composés aromatiques / éthanol) et une limitation potentielle en oxygène (Corseuil *et al.*, 1998). Par contre, la présence de faible concentration en éthanol favorise la croissance bactérienne, stimule la viabilité des cellules et la régénération des cofacteurs ($\text{NAD}^+ / \text{NADH}$) (Lovanh *et al.*, 2002; Stampfer *et al.*, 2003; Aldric et Thonart, 2008). Lovanh *et al.* (2000) rapportent que Le taux de bioremédiation du toluène spécifique est augmenté par un facteur 7.1 si on rajoute de 1.5×10^{-3} g/L d'éthanol dans le milieu de culture de *Pseudomonas putida*.

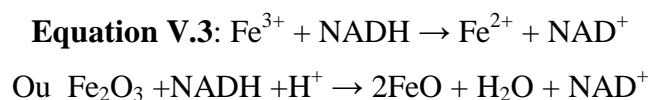
La figure IV.4 montre l'élévation de la concentration de $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) et d'éthanol. Nous observons que les concentrations NAD^+ et NADH diffèrent significativement en présence d'éthanol (104.6 ± 7.7 nmol et 86.9 ± 1.9 nmol) ou non (55 ± 3.1 nmol et 54 ± 1.5 nmol). Nous avons également observé qu'en présence d'éthanol la concentration de NADH (104.6 ± 7.7 nmol) est plus importante que la concentration de NAD^+ (86.9 ± 1.9 nmol). Nos résultats corroborent ceux de Stampfer et ses collaborateurs (2003). En effet, ces derniers ont utilisé les cellules de *Rhodococcus rubber* comme système biocatalytique pour la régénération des cofacteurs NADH/NAD^+ en présence de l'éthanol comme substrat. Dans le même ordre d'idée, Yoshikawa *et al.* (2002) ont montré que la présence de ce couple ($\text{NAD}^+ / \text{NADH}$) favorise la biorémediation des composés aromatiques.

En effet, le NAD^+/NADH intervient comme cofacteur (coenzyme) oxydoréducteur impliqué dans le métabolisme d'oxydo-réduction d'une multitude de substrats. Toutes les enzymes de la classe des oxydoréductases nécessitent ce cofacteur (réductase, oxygénase) (Haddock et Gibson, 1995; Kuony, 2005). L'alcool déshydrogénase permet, en présence d'éthanol, de régénérer le NADH selon la réaction suivante:



La figure IV. 4 a également montré que les concentrations de NADH et NAD^+ sont plus importantes en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) à pH 6.4 (93 ± 5.3 nmol et 122 ± 1.7 nmol) ou non (60.5 ± 2.6 nmol et 62.1 ± 2.9). De plus à pH 7, nous observons qu'en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2), les concentrations de NADH et NAD^+ , respectivement égales à 88 ± 3.4 nmol et 93 ± 2.3 nmol, sont inférieures à celles enregistrées à pH 6.4 et sont respectivement de l'ordre de 93 ± 5.3 nmol et 122 ± 1.7 nmol.

Nous avons observé également qu'en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2), les concentrations de NADH étaient plus faibles que les concentrations de NAD^+ . On peut supposer que la présence des nanoparticules de fer induit une oxydation de NADH ce qui favorise une augmentation de la concentration de NAD^+ selon la réaction suivante :



Cette observation nous laisse penser que les niveaux de NAD^+ jouent un rôle critique dans la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} à l'intérieur de la bactérie. Cette théorie mérite néanmoins d'être approfondie et validée dans l'avenir. En effet, le NAD peut accepter ou donner des électrons au cours des réactions rédox. Ce transfert d'électrons est réalisé au niveau de la partie nicotinamide du NAD. Grâce à un apport de deux électrons et d'un proton ($2e^- + \text{H}^+$) au niveau du noyau C4 du nicotinamide, le NAD^+ est alors réduit en NADH (Figure VI.1) (Metzler, 2001; Pollak *et al.*, 2007).

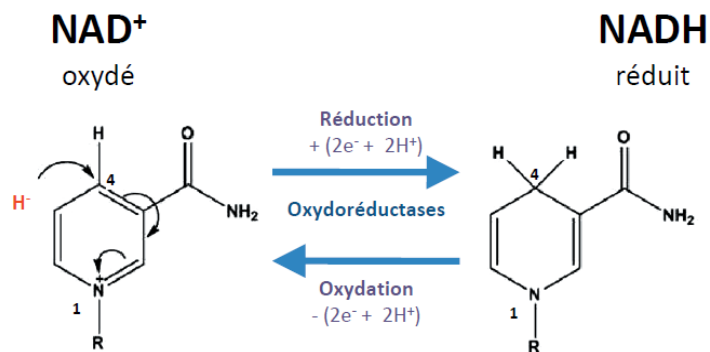


Figure VI.1: Réactions d'oxydoréduction du NAD (Thèse de Pétriacq, 2011)

Potentiellement, la présence de forte concentration du couple NAD^+/NADH stimule l'activité des cellules, soit par assimilation de l'éthanol qui se transforme en acide aldéhyde, soit par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . On peut donc imaginer que dans notre système cellulaire de *Rhodococcus erythropolis* T902.1, le Fe^{2+} , activant les dioxygénases impliquées dans la biorémediation du biphényle, provient de l'oxydoréduction des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) par une oxydoréductase (Egli, 2001).

La figure IV.3 et le tableau IV.2 montrent que la présence du glucose ou d'éthanol stimule la viabilité des cellules pendant la période d'adaptation. On peut remarquer également que la combinaison des systèmes (nanoparticules de fer avec du glucose) améliore la bioremediation du biphényle ($97 \pm 1.2\%$) et stimule le rapport des cellules viables par rapport aux cellules non-viables (9.4 ± 2.7) par rapport aux témoins ($53 \pm 1.2\%$, 1.1 ± 0.4 respectivement). Ces résultats sont également en accord avec la littérature (Yamashita *et al.*, 2007; Aldric, 2009). Aldric (2009) a trouvé que l'utilisation de 1g/L d'éthanol est très utile, puisqu'il optimise la bioremediation d'isopropylbenzène par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 et augmente la viabilité de cette dernière. En effet, Le taux de bioremediation d'isopropylbenzène spécifique (T_{sp}) le plus élevé est obtenu avec l'éthanol ($4.3 \times 10^{-7} \text{ cell}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$) comme source de carbone complémentaire par rapport aux témoins ($2 \times 10^{-7} \text{ cell}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$).

Notre étude a montré également que, le temps d'incubation de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 avec les nanoparticules fer (Fe/SiO_2) joue un rôle important dans l'augmentation de la taille de la cellule (figure IV.5). Après 18 jours d'incubation de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de 500 ppm de biphényle et de 10^{-4} M en nanoparticules de fer (Fe/SiO_2), la taille de la cellule bactérienne a augmenté ($12.5 \mu\text{m}$) par rapport à la cellule de *Rhodococcus* cultivé avec des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) après 3 jours d'incubation ($3 \mu\text{m}$). Cette observation est également en accord avec Chatterjee et ses collaborateurs (2011) qui ont trouvé que la présence de nanoparticules de Fe_3O_4 a un effet sur la longueur de la cellule *E. coli*. Ces chercheurs ont expliqué ceci, d'une part par la propriété magnétique des nanoparticules de Fe_3O_4 qui pourrait jouer un rôle important dans l'augmentation de la taille de la cellule *E. coli* et d'autres parts par la présence des nanoparticules de Fe_3O_4 qui pourrait également affecter la division cellulaire.

I.9. Améliorations globales apportées par les travaux de la thèse sur la bioremédiation du biphenyle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1

Finalement, on peut conclure les principaux résultats présentés dans notre travail par la figure VI.2. L'analyse des performances présentées dans la figure VI.2 révèle que l'utilisation de différents types de nanoparticules calcinées à savoir les nanoparticules de cobalt (Co/SiO_2), de Palladium (Pd/SiO_2) et de fer (Fe/SiO_2), a permis d'obtenir des performances nettement plus élevées par rapport au milieu sans addition de nanoparticules. Il apparaît également qu'à une concentration de 10^{-4}M , les nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) sont plus efficaces que les nanoparticules de cobalt (Co/SiO_2) et de Palladium (Pd/SiO_2) dans la bioremédiation du biphenyle.

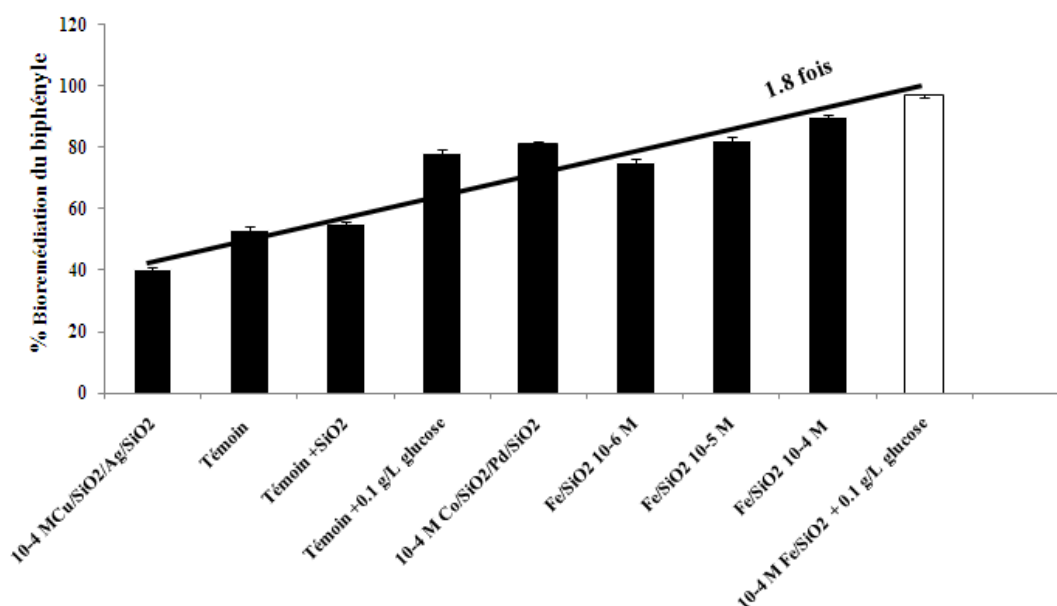


Figure VI.2: Synthèses des performances de bioremédiation du biphenyle après 18 jours d'incubation obtenues pour les cultures de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 à pH initial 7.

La figure VI.2 a montré également que le système combinant les nanoparticules de fer et *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de 0.1 g/L de glucose permet de multiplier d'un facteur supérieur à 1.8 l'efficacité de bioremédiation du biphenyle.

I.10. Impact des nanoparticules de fer sur la production des surfactants

Dans la 5^e section, nous avons montré que *Rhodococcus erythropolis* T902.1 possède des composés de réserve notamment le tréhalose et les glycolipides (surfactants). Nous avons également étudié l'impact des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) sur ces composés.

Pour confirmer la présence de ces surfactants chez *Rhodococcus erythropolis* T902.1 et en particulier à la surface des cellules et sa relation en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂), deux expériences complémentaires ont été réalisées: il s'agit du dosage des hexoses (tréhalose) et du test de la propriété émulsifiante.

En présence de 10⁻⁴ M en nanoparticules de fer (Fe/SiO₂), la teneur en hexoses a augmenté de 85% dans la biomasse cellulaire en comparaison avec les témoins (sans nanoparticules de fer (Fe/SiO₂)). Une très faible teneur, voire absence des hexoses dans les surnageants a été également observée. Ceci est en accord avec les résultats de la deuxième expérience dans laquelle le culot de la culture, remis en suspension dans un même volume d'eau après centrifugation où le surnageant a été mélangé avec différents solvants organiques (paraffine; hexane; pentane). La visualisation de la zone d'émulsification à l'interface eau/solvant organique donne une indication sur la production de biosurfactants par la bactérie. La propriété émulsifiante a été clairement visualisée avec le culot de la culture (Figure V.3 A-B) mais pas avec le milieu de culture centrifugé qui ne contenait pas de bactéries (Figure V.3 C). Ce résultat signifie que les surfactants produits sont intimement liés à la surface de la bactérie et qu'ils ne sont pas relargués dans le milieu. Ces résultats sont cohérents avec les études de Lang et Philip (1998) et Choraó (2008). Selon Lang et Philip (1998), la majorité des glycolipides produits par les *Rhodococci* sont localisés à la surface de la cellule et ne sont pas excrétés dans le milieu de culture. Choraó (2008) a également trouvé dans son étude, que les surfactants produits par les *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 sont liés à la surface de la cellule.

On peut finalement dire que la souche *Rhodococcus erythropolis* T902.1 s'adapte bien aux variations environnementales par exemple en absence de substrats carbonés, la souche utilise sa propre réserve en sucre (tréhalose). De même, son utilisation des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) lui a permis d'activer la production du métabolisme du tréhalose. Ceci a pour conséquence d'augmenter la solubilisation des polluants hydrophobes et par la suite d'optimiser leur bioremédiation (Zheng et Obbard, 2002). Santos *et al.* (2008) ont montré que l'augmentation de la

production de surfactants par *Pseudomonas* sp et la stimulation de la biomasse, en présence de 250 ppm d'anthracène comme seule source de carbone et d'énergie, augmente avec l'augmentation de la solubilité du fer dans le milieu de culture (augmentation de 2 unités logarithmiques du nombre de cellules par mL en présence de 10^{-4} M en $\text{Fe}_2(\text{NO}_3)_3$).

En effet, les surfactants sont des molécules amphiphiles c'est-à-dire qu'ils ont des affinités avec deux milieux différents, une partie est soluble dans l'eau (hydrophile) et l'autre partie est soluble dans l'huile (hydrophobe ou lipophile). En effet, s'il existe une interaction entre la partie hydrophobe du surfactant et la paroi bactérienne, l'hydrophobicité apparente de la paroi du microorganisme va diminuer. Par contre, si c'est la partie hydrophile du surfactant qui interagit avec la paroi, l'hydrophobicité de la paroi bactérienne aura tendance à augmenter. De ce fait, un biosurfactant pourrait changer l'hydrophobicité dans le milieu.

I.11. Impact des nanoparticules de fer sur la sécrétion des sidérophores par *Rhodococcus erythropolis* T902.1

Dans la troisième partie de la 5^e section nous avons montré que *Rhodococcus erythropolis* T902.1 a la capacité d'augmenter la biodisponibilité de fer par la production de sidérophores afin de le rendre accessible à la cellule bactérienne en présence de 10^{-4} M en nanoparticules de fer (Fe/SiO_2). En effet, la modification de la couleur du milieu gélosé (SAS), du vert au jaune-orangé, témoigne du déplacement du fer par les sidérophores produits par la souche (apparition d'un halo jaune/orangé autour de chaque colonie) (Figure V.2).

Les diamètres moyens des halos formés à partir du culot remis en suspension après 3 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 (Fe/SiO_2). Par contre, les diamètres des halos relatifs aux cultures incubées pendant 3 et 20 jours en présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO_2) sont significativement différents (47 ± 4 et 32 ± 3 mm respectivement).

Ces résultats suggèrent que la sécrétion des sidérophores est liée à la concentration du fer dans le milieu de culture, et que la relation entre les deux est inverse. Les diamètres des halos formés par les sidérophores sur le milieu gélosé CAS diminuent avec le temps. Cette expérience suppose à nouveau que le fer est relargué progressivement des capsules de SiO_2 en présence de

Rhodococcus erythropolis T902.1. Ces résultats sont cohérents avec les études de (Snow *et al.*, 1970; Monzyk et Crumbliss, 1982; Vergne *et al.*, 2000; Kosman, 2003; Bertrand, 2009). Ils ont démontré que la production de sidérophores est fortement affectée par la présence de fer dans le milieu de culture. Bertrand (2009) a trouvé qu'avec l'augmentation de la concentration de chlorure ferrique dans le milieu de culture, la sécrétion de sidérophores par *Scedosporium apiospermum* diminue. En outre, il a également étudié l'influence du pH du milieu de culture en fonction du temps sur la sécrétion de sidérophores. A pH 4 et à pH 7, les maxima sont atteints respectivement à 5 et 3 jours pour des activités spécifiques des sidérophores relativement basses entre 0.5 et 1 $\mu\text{mol/mg}$. Par contre, à pH 8 l'activité est beaucoup plus élevée avec un maximum de 3.2 $\mu\text{mol/mg}$ atteint à 3 jours d'incubation. En effet, le milieu basique, rend le fer moins soluble, donc moins disponible pour les microorganismes, ce qui stimule la sécrétion de sidérophores (Neilands, 1984; Winkelmann, 2007). Différents facteurs peuvent donc stimuler la production de sidérophores par les microorganismes. Parmi ces facteurs, la source de carbone utilisée par le microorganisme (Warner *et al.*, 1981; Neilands, 1984). Warner *et al.* (1981) ont montré que l'utilisation de succinate à la place du glucose permet d'avoir une production plus importante de sidérophores. L'addition d'ions métalliques (Al^{3+} et Cr^{3+}) peut exercer également une influence notable sur la production de sidérophores. Ces ions métalliques se substituent au fer pour former des complexes avec les sidérophores inutilisables par les microorganismes (Neilands, 1984). Dans ce cas, les microorganismes augmenteront la production de sidérophores. L'ajout d'une molécule chélatrice de fer dans le milieu de culture, tels que: l'EDDA, 2,2-dipyridyl peut avoir également un important effet sur la production de sidérophores (Hantke *et al.*, 2003; Hissen *et al.*, 2004).

II. Perspectives de recherches et d'applications industrielles

Nos résultats très prometteurs à l'échelle du laboratoire, laissent entre voir de bonnes perspectives de mise en œuvre du procédé à l'échelle industrielle est nécessaire. Dans ce cadre, nous proposons quelques pistes d'intérêts pratiques concernant les sols pollués.

II.1. Traitement des sols pollués par hydrocarbures aromatiques (HAP)

La qualité des sols est devenue un problème mondial avec des conséquences sur la santé humaine et des conséquences économiques. Ce problème touche de nombreux secteurs d'activités tels que les sites de l'industrie chimique, du transport ferroviaire, de l'énergie, de la sidérurgie, de l'industrie automobile ou pétrolière, mais également des pollutions ponctuelles dans des sites privés, notamment suite à des fuites de citernes à mazout. En effet, ces pollutions concernent généralement des écosystèmes de grande étendue et génèrent des pollutions répétitives et des effets massifs à long terme.

Bien que les technologies d'abattement de particules soient éprouvées, il n'existe pas toujours de méthodes satisfaisantes. Parmi celles-ci, le venting ou le steam flushing, sont deux technologies utilisant l'air comprimé ou la vapeur pour faire l'extraction des composés volatils ou semi-volatils (*e.i.* le benzène, le toluène, le xylène, le naphtalène et le biphényle). Ces techniques sont souvent complétées par l'adsorption des composés volatils sur des cartouches de charbon actif. Ce traitement par cartouches de charbon actif peut constituer une part importante des coûts de décontamination. Par ailleurs, l'utilisation du procédé de type biologique présente des avantages non négligeables aux niveaux:

- de la diversité des molécules dégradables,
- de l'efficacité du traitement sans accroissement important des coûts.

Elles sont moins onéreuses, n'émettent pas de sous produits toxiques et nécessitent moins d'énergie fossile.

Afin de contrecarrer les problèmes rencontrés lors du traitement des sols pollués par hydrocarbures aromatiques (HAP) nous proposons d'utiliser des microorganismes notamment notre souche, *Rhodococcus erythropolis* T902.1, en présence des nanoparticules de fer comme le montre le schéma ci-dessous (Figure VI.3). Notre proposition ne nécessite pas l'excavation du sol pollué ni son transport vers l'unité de traitement car on peut procéder par injection directe et sur place de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 (traitement *in situ*). En effet, le bioréacteur contient le glucose comme source de carbone et d'énergie en présence de nanoparticules de fer, pour favoriser la quantité de biomasse de *Rhodococcus erythropolis* T902.1.

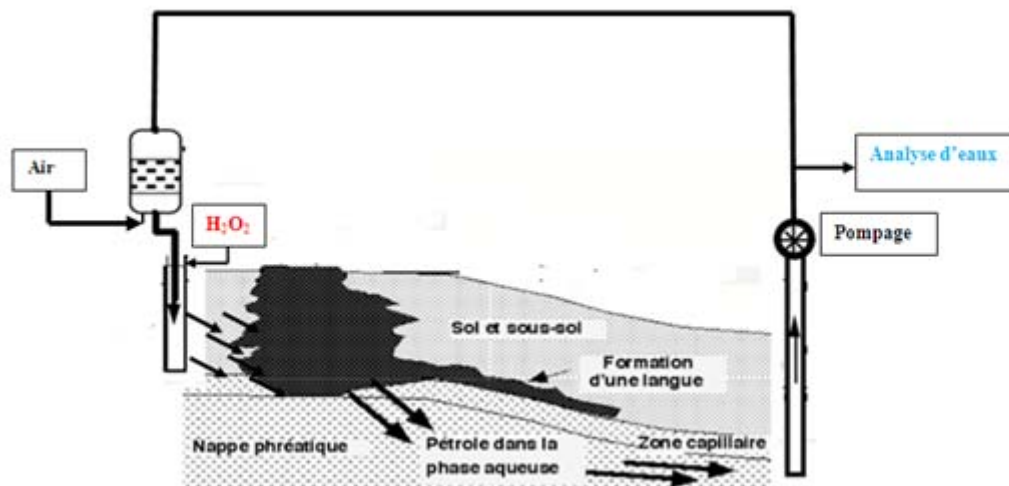


Figure VI.3: Représentation schématique du bioréacteur montrant le traitement des sols pollués par hydrocarbures aromatiques (HAP) en condition aérobies. Bioréacteur contenant *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de glucose et des nanoparticules de fer.

Ceci pourrait être associé à une injection d'eau afin de séparer les polluants du sol. Ce système pourrait être réutilisé plusieurs fois (recyclage d'eau).

Dans le cas de la bioremédiation aérobie des hydrocarbures aromatiques (HAP) par activité catalytique, notamment en présence des nanoparticules de fer, il serait intéressant de substituer les bactéries par l'eau oxygénée, d'une part comme source d'oxygène supplémentaire, d'autre part, on pourrait impliquer les nanoparticules de fer dans la réaction de Fenton qui consiste en un mécanisme de formation de radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) capables ensuite de réagir avec les polluants (Regalbuto, 2006). Dans ce cas, les nanoparticules de fer représentent non seulement une source de fer utilisable par les bactéries mais pourraient avoir également un effet sur la dégradation abiotique des polluants.

L'utilisation du bioréacteur biologique biphasique (eau/ huile de silicone) pourrait être également envisagée pour limiter l'utilisation des cartouches de charbon actifs dans le cas où tous les composés ne sont pas biodégradables (Aldric, 2009). Ce dernier a trouvé que le potentiel de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 sur la bioremédiation d'isopropylbenzène (IPB) augmente par utilisation du bioréacteur biphasique. Ceci est dû à l'existence d'une proportion optimale en huile (10%) de silicone de faible viscosité (10 cSt) qui permet à la fois d'accroître sensiblement le

transfert de masse de l'oxygène tout en maximisant le taux théorique de transfert de masse d'un polluant hydrophobe (IPB).

Notre travail jette la lumière sur des nouvelles pistes pour améliorer la bioremédiation des composés hydrophobes par l'injection des nanoparticules dans le bioréacteur biphasique (eau/ huile de silicone) (Figure VI.4).

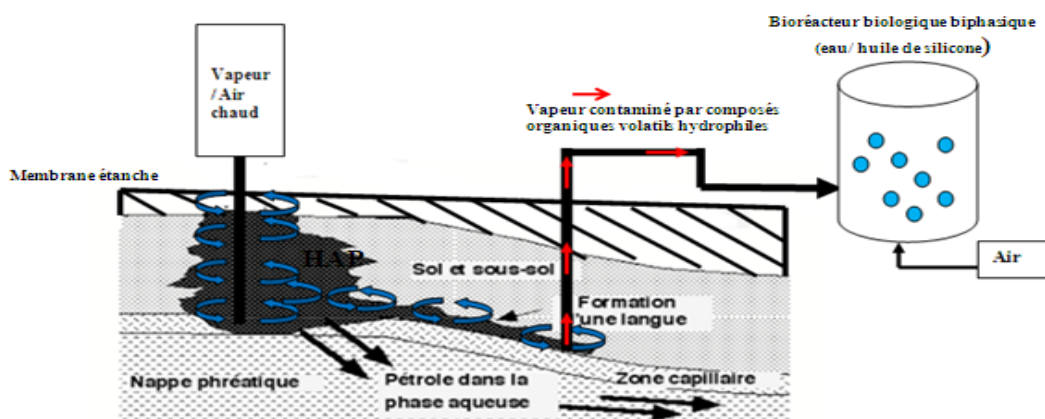


Figure VI.4: L'utilisation complémentaire du venting et bioréacteur biphasique pour traitement des sols par hydrocarbures volatils hydrophiles ou hydrophobes.

II.2. Traitement des sols pollués par hydrocarbures chlorés et polychlorobiphényles (PCB)

Les PCB sont des molécules constituées d'un noyau biphenyle, sur laquelle sont greffés 1 à 10 atomes de chlore. Les PCB de même nombre d'atomes de chlore sont appelés homologues. Les homologues différents par la position de leur atome de chlore s'appellent isomères. L'ensemble des configurations des PCB possibles est réparti en 209 congénères. Leur stabilité est tellement grande (résistance chimique acide-base et oxydation, résistance thermique,...) qu'ils présentent maintenant un gros problème écologique (Waid, 1986; Mhiri *et al.*, 1997; Borja *et al.*, 2005; EFSA, 2005).

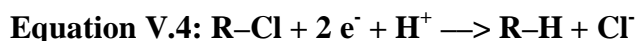
En effet, La bioremédiation des PCB par les bactéries se déroule en 2 étapes. La première est celle de la déchloration des PCB fortement chlorés (à partir de 5 chlores) réalisée en condition anaérobie. La seconde étape est la biodégradation des PCB faiblement chlorés (en dessous de 5

chlores) se déroulant en aérobie. En fin de traitement, les PCB seront transformés en substances moins toxiques ou minéralisées.

II.2.1. La déchloration anaérobie

La déchloration des PCB fortement chlorés (perchloroéthylène (PCE) ou le trichloréthylène (TCE) se réalise en condition anaérobie. Cette étape a pour objectif de réduire le nombre d'atomes de chlore sur le noyau biphényle et d'améliorer la bioremédiation aérobie de la molécule.

La littérature a soulevé que la déchloration des PCB découlerait de la halorespiration de certaines bactéries. La halorespiration est une respiration microbiologique qui utilise des molécules organiques halogénées, chlorées dans ce cas, comme accepteur d'électrons provoquant ainsi leur déchloration (Fish et Principe, 1994; Mhiri et de Marsac, 1997; Wiedemeier *et al.*, 1999; Wiegel et Wu, 2000; Grishchenkov *et al.*, 2002; Furukawa, 2003; van Doesburg *et al.*, 2005; Regard *et al.*, 2005). Elle peut être schématisée par la réaction suivante :



Dans cette réaction, les hydrocarbures chlorés sont réduits et un atome de chlore est remplacé par un atome d'hydrogène. Les radicaux d'hydrogène proviennent d'un donneur d'électron comme H₂ (De Windt *et al.*, 2005). En effet, l'hydrogène est un élément clé dans le mécanisme de la déchloration. Celui-ci peut être utilisé soit directement sous forme dissoute dans le milieu, ou suite à la fermentation de matière organique par les bactéries (Meessen, 2007; Beckers *et al.*, 2013). En effet, la déchloration des PCB est liée à l'indice de solubilisation de l'hydrogène (1.6 ml/L) dans l'eau. Cette solubilisation est faible et ne permet pas un contact important avec le catalyseur produit par d'autres bactéries tel que *Shewanella oneidensis*. Ceci conduit à une déchloration plus lente dans ce cas là, c'est-à-dire quand l'hydrogène est sous forme dissoute dans le milieu (Meessen, 2007). Par contre, la présence de bactéries possédant un potentiel de production d'hydrogène, notamment *Citrobacter freundii*, dans le milieu de culture à proximité du catalyseur, optimise la réaction de déchloration (De Windt *et al.*, 2005; Meessen, 2007). Cependant, la déchloration par les microorganismes dans les sédiments est parfois un phénomène très lent à cause d'une part, de la minorité des bactéries déchlorantes ou de l'inefficacité des PCB en tant qu'accepteurs d'électrons. D'autre part, beaucoup de micro-organismes (bactéries dénitrifiantes, méthanogènes et

sulfatoréductrices) utilisent l'hydrogène comme source d'énergie (Chang *et al.*, 2001). De ce fait, leur vitesse de consommation d'hydrogène est plus rapide que la vitesse nécessaire à la réaction de déchloration. Les bactéries qui utilisent plus efficacement l'hydrogène sont les bactéries dénitrifiantes (Chang *et al.*, 2001).

En effet, la déchloration du noyau aromatique peut être exécutée en position *para*, *méta* et *ortho*. La voie métabolique choisie dans les sédiments dépend de plusieurs facteurs comme le type de bactéries, la source de carbone, la température, le type de donneurs d'électrons, le pH, la présence d'accepteurs d'électrons autres que le PCB,... (Wiegel et Wu, 2000; Borja *et al.*, 2005).

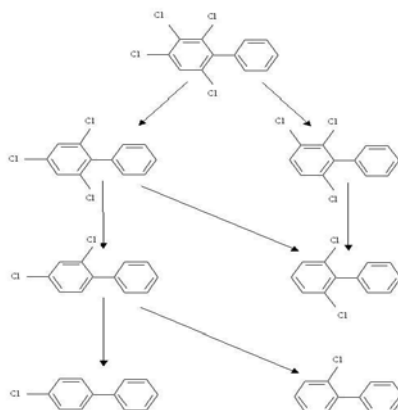


Figure VI.5: Schéma du chemin de la déchloration réductive du 2, 3, 4,6-tétrachlorobiphényle (Wiegel et Wu, 2000)

Wiegel et Wu (2000) ont observé qu'il y a une accumulation de PCB *ortho* et une disparition de PCB type *méta* et *para* dans le milieu de culture des bactéries anaérobies. Suite à ces résultats, ils ont déduit que les bactéries préfèrent attaquer les positions *méta* et *para* du noyau biphényle pour faire la déchloration (Figure VI. 5).

II.2.2. La bioremédiation aérobie

La seconde étape est la bioremédiation des PCB faiblement chlorés qui se déroule en aérobose. En fin de traitement, les PCB seront transformés en substances moins toxiques ou minéralisés. Plusieurs bactéries sont connues pour dégrader les PCB ou les hydrocarbures chlorés parmi elles, *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp*, (Mhiri *et al.*, 1997), *Rhodococcus* (Finnerty, 1992) et *Burkholderia xenovorans* LB400 (Borja *et al.*, 2005). En effet, la dégradation ces substances se fait

le plus souvent par une double oxygénation sur la partie la moins chlorée du noyau biphényle, celui-ci va subir une première dioxygénation avec l'enzyme 2,3-dioxygénase, ensuite, la 2,3-dihydroxybiphényle dioxygénase va provoquer le clivage du noyau dihydroxylé. On observe alors la formation d'acide chlorobenzoïque et d'un acide 2-cetopenta-4-énoïque (Mhiri *et al.*, 1997).

La réhabilitation des sites pollués par bioremédiation est une technique complexe qui dépend de beaucoup de facteurs environnementaux. La bioremédiation de PCB faiblement chlorés par les souches aérobies nécessite la présence d'oxygène. En milieu naturel, seul les premiers centimètres du sol présentent les conditions adéquates d'oxygénation. Les températures en conditions réelles, sont loin d'être optimales (20 à 30 °C) pour la croissance bactérienne et son activité biologique. La température peut également influencer la solubilité des PCB. Le pH et la salinité du sol sont des éléments clés pour le développement microbien. La présence de substrats carbonés adaptés aux microorganismes va permettre une bonne croissance des souches sans entrer en compétition avec le polluant comme source de carbone et ainsi empêcher son élimination. De plus, Les PCB ont une tendance à s'adsorber fortement sur la matière organique, ce qui les rend moins accessibles aux micro-organismes.

Dans le même ordre d'idée, nous proposons d'ajouter un nouveau bioréacteur (A) au schéma (Figure VI.3), qui travaille en condition anaérobie. En effet, les bioréacteurs (A ou B) sont réalisés avec le même milieu de culture contenant le glucose comme source de carbone et d'énergie en présence de nanoparticules de fer, pour favoriser la quantité de biomasse des micro-organismes. Le seul facteur divergeant entre les bioréacteurs est le type de micro-organismes utilisés pour l'inoculation (Figure VI.6). Le premier bioréacteur est inoculée avec deux souches *Clostridium butyricum* (comme productrice d'hydrogène) et *Pseudomonas fluorescens* (comme biocatalyseur) (condition anaérobie) pour activer la déchloration de PCB. Cette dernière possède un potentiel de réduction des métaux tels que le sélénium (Ike *et al.*, 2000) et le chrome (Wang *et al.*, 1997) c'est-à-dire ces métaux précipitent et se lient à la surface de cellules de *Pseudomonas fluorescens* (comme biocatalyseur). De plus, cette souche est également capable de dégrader les PCB (Villacieros *et al.*, 2005).

Le deuxième bioréacteur est inoculé avec *Rhodococcus erythropolis* T902.1 (condition aérobie) pour activer la transformation des composés moins chlorés en substances moins toxiques ou minérales.

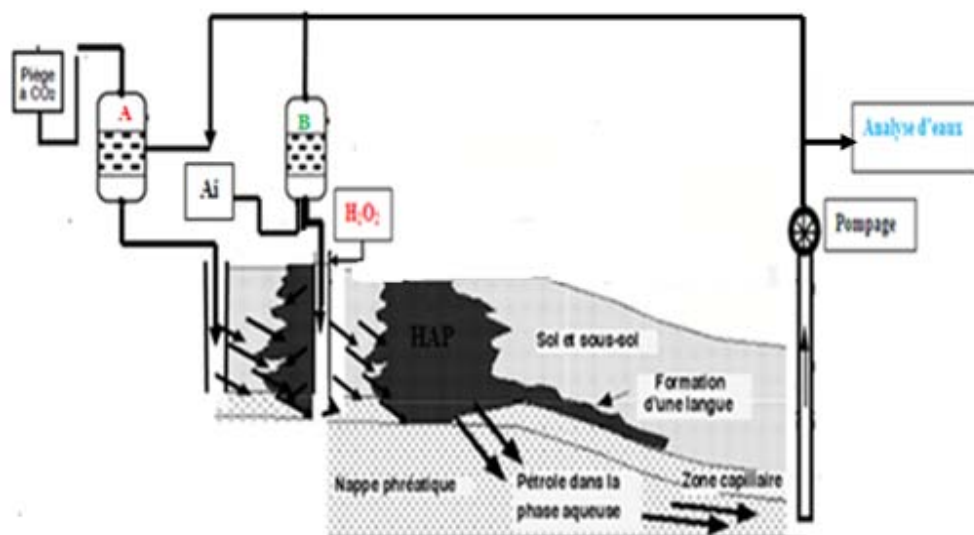


Figure VI.6: Représentation schématique du bioréacteur montrant le traitement des sols pollués par ou hydrocarbures aromatiques (HAP) polychlorobiphényles (PCB) en conditions anaérobies et aérobie combinées. (A) bioréacteur contenant *Clostridium butyricum* (comme productrice d'hydrogène) et *Pseudomonas fluorescens* (comme biocatalyseur) additionnées de nanoparticules de fer. (B) bioréacteur contenant *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence des nanoparticules de fer.

Conclusions

Le but principal de cette thèse était d'apporter des précisions supplémentaires quant au processus de bioremédiation. Bien que cette dernière soit très attractive et avantageuse, les réactions de bioremédiation restent assez lentes.

D'un point de vue fondamental, les résultats obtenus au cours de cette thèse montrent que la présence des nanoparticules encapsulées dans une matrice de silice accélère la réaction de bioremédiation du biphényle.

1) Dans une première partie, plusieurs nanoparticules de différentes natures (Ag, Cu, Pd, Co, Fe), de différentes formes (séchée, calcinée, réduite) et en différentes concentrations (10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M), ont été testées en cultures avec *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence du biphényle comme unique source de carbone et d'énergie. Nos expériences ont permis de classer les nanoparticules en deux catégories opposées:

- Les nanoparticules notamment celles du Cu/SiO₂ et Ag/SiO₂ ayant un impact inhibiteur sur la croissance de *Rhodococcus erythropolis* T902.1. Cet impact négatif augmente avec la concentration des nanoparticules.

- Les nanoparticules notamment celles du Fe/SiO₂, Co/SiO₂ et Pd/SiO₂ activant la bioremédiation du biphényle. Cette activation augmente avec la concentration des nanoparticules testées.

2) La deuxième partie du travail de cette thèse a étudié l'effet du traitement thermique des nanoparticules de cobalt Co/SiO₂ (séchées, calcinées et réduites) et celui de l'utilisation de l'autoclavage de nanoparticules de fer (Fe/SiO₂).

Nous avons montré que la calcination des nanoparticules de cobalt (Co/SiO₂) induit une augmentation de leur surface spécifique. Nos expériences ont prouvé également que l'utilisation d'un traitement par autoclavage joue un rôle très important, d'une part dans la modification de la structure des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) et d'autre part dans le relargage de fer des capsules de dioxyde de silicium (SiO₂).

Conclusions

Dans nos expériences, la forme des nanoparticules joue un rôle important dans l'amélioration de la bioremédiation du biphenyle. Le pourcentage de bioremédiation du biphenyle en présence de 10^{-4} M en nanoparticules de cobalt (Co/SiO₂) séchées et réduites était respectivement égal à 83 ± 0.9 % et 77 ± 2 %. Il est intéressant de souligner que l'état d'oxydation des nanoparticules est lié au type de traitement utilisé (séchage, calcination, réduction) c'est-à-dire que l'état d'oxydation des nanoparticules de cobalt, séchées et réduites, est sous la forme de Co²⁺ et Co⁰.

3) En terme d'efficacité de bioremédiation, nos résultats montrent que les systèmes combinés [*Rhodococcus erythropolis* T902.1 + nanoparticules de fer (Fe/SiO₂)] sont en général beaucoup plus efficaces que les systèmes simples [*Rhodococcus erythropolis* T902.1 sans nanoparticules]. Ceci est d'autant plus marquant que le composé de départ est peu dégradable. En effet, le biphenyle est peu transformé par la souche de *Rhodococcus erythropolis* T902.1. La présence des nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) dans le milieu de culture accélère donc fortement les réactions de bioremédiation. Ceci se fait par activation de certaines enzymes de *Rhodococcus erythropolis* T902.1 favorisant ainsi la bioremédiation du biphenyle (biphenyle dioxygénase, cathécol 1,2-dioxygénase).

Il ressort également de nos résultats que ce système combiné [*Rhodococcus erythropolis* T902.1 + nanoparticules de fer (Fe/SiO₂)] est fortement modifié lors d'une variation de pH. En effet, à pH >7 le fer se précipite sous forme d'hydroxyde (Fe(OH)₃) et devient indisponible pour la bactérie. On peut donc déduire que les nanoparticules de fer (Fe/SiO₂) sont en général résistantes par rapport au sel de fer dans une gamme de pH compatible avec les pH où les bactéries sont actives.

4) Notre étude montre que la souche *Rhodococcus erythropolis* T902.1 est capable de synthétiser le tréhalose. Ce dernier augmente en présence de nanoparticules de fer (Fe/SiO₂). En effet, le tréhalose est important car il peut, d'une part, servir comme produit de réserve en tant que source de carbone et d'autre part comme base pour la synthèse de surfactants. Ces surfactants présents à la surface des bactéries permettent de solubiliser le biphenyle afin de faciliter sa bioremédiation. La souche peut synthétiser également les sidérophores qui ont une grande affinité pour les ions ferriques. Cette synthèse est sous l'influence de la concentration de fer dans le milieu.

Références bibliographiques

A

- Abbasi. T, Abbasi. SA** (2010) Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization. *Ren. Sus. Ene. Rev.* 14: 919–937.
- Aldric, JM** (2009) Thèse de l'Universitaire de Liège, Belgique. Mise au point d'un réacteur biphasique eau/huile de silicone destiné au traitement des composés organiques volatils hydrophobes au sein des effluents gazeux. <http://hdl.handle.net/2268/22494>.
- Aldric. JM and Thonart. P** (2008) Performance evaluation of a water/silicone oil two-phase partitioning bioreactor using *Rhodococcus erythropolis* T902.1 to remove volatile organic compounds from gaseous effluents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83:1401–1408.
- Aldric. JM, Destain. J, Thonart. P** (2003) Environment 2010: Situation and Perspectives for the European Union. Study of some factors influencing biodegradation of isopropylbenzene by *Rhodococcus erythropolis*. <http://hdl.handle.net/2268/22717>
- Alié. C and Pirard. J-P** (2003) Preparation of Low-Density Xerogels from Mixtures of TEOS with substituted alkoxysilanes. I. ^{17}O NMR Study of the Hydrolysis-Condensation Process. *Non-Crys solids.* 320: 21–30.
- Alié. C, Pirard. R, Pirard J-P** (2003) Preparation of low- density xerogels from mixtures of TEOS with substituted alkoxysilanes.II viscosity study of the sol- gel transition. *Non-Crys solids* 320: 31–39.
- Alkurdi. F, Karabet. F, Dimashki. M** (2014) Characterization and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in emissions from different heating systems in Damascus, Syria. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21: 57475–759.
- Ambrose. AM, Booth. AN, Deeds. F, Cox Jr. AJ** (1960) A toxicological study of biphenyl, a citrus fungistat. *J. Food. Sci.* 25: 328–336.
- Andreozzi. R, Insola. A, Caprio.V, Marotta. R, Tufano.V** (1996) The use of manganese dioxide as a heterogeneous catalyst for oxalic acid ozonation in aqueous solution. *Appl. Catal. A: Gene.* 138: 758–1.
- Andrews. EJ and Novak. PJ** (2001) Influence of ferrous iron and pH on carbon tetrachloride degradation by *Methanosarcina thermophila*. *J. Wat. Res.* 35: 2307–2313.
- Aust. SD, Morehouse. LA, Thomas. CE** (1985) Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free. Radical. biol. med.* 1: 3–25.

Ansari. F, Grigoriev. P, Libor. S, Tothill. IE, Ramsden. JJ (2008) DBT degradation enhancement by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGST8 with magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *Biotechnol. Bioengin.* 102: 1505–1512.

Arun. A, Raja. PP, Arthi. R, Ananthi. M, Kumar. KS, Eyini. M (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes fungi, *Pseudomonas* isolate, and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151: 132–142.

Auffan. M, Chouak. W, Rose. J, Roncato. M-A, Chanéac. C, Waite. DT, Masion. A, Woicik. JC, Wiesner. MR, Bottero. A J-Y (2008) Relation between the Redox State of Iron-Based Nanoparticles and Their Cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* 42: 6730–6735.

B

Bagchi. B, Dey. S, Bhandary. S, Das. S, Bhattacharya. A, Basu. R, Nandy. P (2012) Antimicrobial efficacy and biocompatibility study of copper nanoparticle adsorbed. *Mater.J. Sci.Engine.* 32: 1897–1905.

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. Technol.* 133: 109–117.

Belzile. B, Wu. GJ, Chen. YW, Appanna. VD (2006) Detoxification of selenite and mercury by reduction and mutual protection in the assimilation of both elements by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Sci. Total. Environ.* 367: 704–14.

Bertini. I, Cremonini. MA, Ferreti. S, Lozzi. I, Luchinat. C, Viezzoli. MS (1996) Arene Hydroxylases: metalloenzymes catalysing dioxygenation of aromatic compounds. *J.Coord. Chem. Rev.*151: 145–160.

Bertrand, S (2009) Thèse de l'Université d'Angers, France. Les sidérophores de *Scedosporium apiospermum*: identification, synthèse et applications. <http://www.sudoc.fr/142800279>

Bevinakatti. BG and Ninnekar. HZ (1992) Degradation of biphenyl by a *Micrococcus* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 273–275.

Bezkorovainy. A, Miller-Catchpole. R, Poch. M, Solberg. L (1986) The mechanism of iron binding by suspensions of *Bifidobacterium bifidum* var. pennsylvanicus. *J. Biochim. Biophys. Acta-General Subjects.*884: 60–66.

Binda. C, Coda. A, Aliverti. A, Zanetti. G, Mattevi. A (1998) Structure of the mutant E92K of [2Fe-2S] ferredoxin I from *Spinacia oleracea* at 1.7 Å resolution. *J. Acta. Cryst.* 54: 1353–1358.

- Blindauer. CA, Harrison. MD, Robinson. AK, Parkinson. JA, Bowness. PW, Sadler.PJ, Robinson. NJ** (2002) Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zincfingers. *J. Mol. Microbiol.* 45: 1421–1432.
- Boehncke A, Koennecker G, Mangelsdorf I, Wibbertmann A** (2005) Biphenyl. In Concise International Chemical Assessment Document no. 6. Geneva, World Health Organization, Pp. 1–31.
- Bonnard.N, Brondeau.MT, Jargot.D, Miraval.S, Schnider.O** (2011) Fiche établie par les services techniques des médicaux de l'INRS.
- Boonchan. S, Britz. ML, Stanley. GA** (2000) Degradation and mineralization of highmolecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1007–1019.
- Boonchan.S, Britz. ML, Stanley, GA** (1998) Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Biotechnol. Bioeng.* 59: 482–494.
- Boopathy, R** (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.* 75: 63–67.
- Borja.J, Tameon. DM, J. Aureseania. J, Gallardo.S** (2005) Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *J. Proce. Biochemistry.* 40: 1999–2013.
- Bosello. M, Robbel. L, Linne. U, Xie X, Marahiel. MA** (2011) Biosynthesis of the Siderophore Rhodochelin Requires the Coordinated Expression of Three Independent Gene Clusters in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Am. Chem. Soc.* 133: 4587–4595.
- Bosello. M, Zeyadi. M, Kraas. FI, Linne. U, Xie. X, Marahiel. MA** (2013) Structural Characterization of the Heterobactin Siderophores from *Rhodococcus erythropolis* PR4 and Elucidation of Their Biosynthetic Machinery. *J. Nat. Prod.* 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 156–164.
- Boukhalfa. H and Crumbliss. AL** (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *J. Biometal.* 15: 325–339.
- Bourelrier. PH and Berthelin. J** (1998) Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. CR. Acc Sci, 42. Ed. Lavoisier, Paris.

- Bradford, MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J. Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Brinker, CJ and Scherer, GW** (1990) Sol-Gel Science: The physics and chemistry of sol-gel processing, Academic Press, San Diego.
- Brognaux, A** (2014) Thèse de l'Université de Liège, Belgique. Utilisation de biocapteurs microbiens GFP pour la caractérisation des performances des bioréacteurs.
<http://hdl.handle.net/2268/164267>
- BSI.** (2005) Vocabulary nanoparticles, British Standards, PAS 71: 2005, 26 p.
- Bunescu, A** (2006) Thèse de l'Université Blaise Pascal, France. Photo- et bio-dégradation de dérivés du benzothiazole: étude en système combiné. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00713567>.
- Bunescu, A, Besse-Hoggan, P, Sancelme, M, Mailhot, G, Delort, AM** (2008a) Comparison of microbial and photochemical processes and their combination for degradation of 2-aminobenzothiazole. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2976–2984.
- Bunescu, A, Besse-Hoggan, P, Sancelme, M, Mailhot, G, Delort, AM** (2008b) Fate of the nitrilotriacetic acid-Fe(III) complex (FeNTA) during photodegradation and biodegradation by *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 63206–326.
- Busnaina, A** (2007) Nonmanufacturing Handbook, CRC Press, 400 p.
- Butler, CS and Mason, JR** (1997) Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *J. Adv. Microb. Physiol.* 38: 47–84.
- C**
- Cameotra, SS and Bollag, J-M** (2003) Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Crit. Rev. Environ. Scie. Technol.* 30: 111–126.
- Candidus, S, Van Pée, K-H, Ligens, F** (1994) The catechol 2,3-dioxygenase gene of *Rhodococcus rhodochrous* CTM: nucleotide sequence, comparison with isofunctional dioxygenases and evidences for an active-site histidine. *J. Microbiol.* 140: 321–330.
- Canizares, P, Paz, R, Saez, C, Rodrigo, MA** (2009) Costs of the electrochemical oxidation of wastewaters: a comparison with ozonation and Fenton oxidation processes. *J. Environ. Manage.* 90:410–420.

- Carrano. CJ, Jordan. M, Drechsel. H, Schmid. DG, Winkelmann. G (2001) Heterobactins: A new class of siderophores from *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 containing both hydroxamate and catecholate donor groups. *Biometal*. 14: 119–125.
- Carvalho. CCR and da Fonseca. MR (2005) The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 67:715–726.
- Catelani. D, Sorlini. C, Treccani. V (1971) The metabolism of biphenyl by *Pseudomonas putid*. *J. Experientia*. 27: 1173–1174.
- Cerniglia, C (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegrad* 3: 351–368.
- Chang. BV, Liu. WG, Yuan. SY (2001) Microbial dechlorination of three PCB congeners in river sediment. *Chemosphere*. 45: 849–856.
- Chang. MK, Voice. TC, Criddle. CS (1993) Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by two *Pseudomonas* isolate. *J. Biotechnol. Bioeng*. 41: 1057–1065.
- Chatterjee. S, Bandyopadhyay. A, Sarkar. K (2011) Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *J. Nanobiotechnol*. 9: 34.
- Chertok. B, Moffat. BA, David. AE, Yu. F, Bergemann. C, Ross. BD, Yang. VC (2008). Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *J. Biomaterials*: 29: 487–496.
- Choi. M, Biswas. P, Fissan. H, Pui. DYH (2003) Special issue on nanoparticles: technology and sustainable development. *J. Nano. Rese*. 5: 2–3.
- Chorao, C (2008) Thèse de l'Université Blaise Pascal, France. Etude du métabolisme de *Rhodococcus Rhodochrous* lors de la photoet biodégradation 2-aminobenzothiazol: Effet de l'immobilisation des cellules et rôle du fer. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00731145>. 2012.
- Chua. H, Sin. SN, Yu. PH, Cheung. MW (1999) Sub-lethal effects of heavy metals on activated sludge microorganisms. *Chemosphere*, 39: 2681–2692.
- Chun-Wei K and Barbara RSG (1996) Effect of added heavy metal ions on biotransformation and biodegradation of 2-chlorophenol and 3-chlorobenzoate in anaerobic bacterial consortia. *Appl. Environ. Microbiol*. 62: 2317–2323.
- Churchill. SA, Harper.JP, Churchill. PF (1999) Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol*. 65: 549–552.

Cohen, SM (2002) Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder. *J. Toxicol.Pathol.* 30: 663–671.

Collins. LD and Daugulis. AJ (1999) Simultaneous biodegradation of benzene, toluene and p-xylene in a two-phase partitioning bioreactor: concept demonstration and practical application. *J. Biotechnol. Prog.* 15: 74–80.

Cornelissen. G and Sijm, DT (1996) An energy budget model for the biodegradation and co-metabolism of organic substances. *J. Chemosphere.* 33: 817–830.

Corseuil HX, Hunt. CS, Dos Santos.RCF, Alvarez PJJ (1998) The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *J. Water. Res.* 32: 2065–2072.

Costa. RCC, Moura.FCC, Ardisson. JD, Fabris. JD, Lago RM (2008) Highly active heterogeneous Fenton-like systems based on $\text{Fe}^0/\text{Fe}_3\text{O}_4$. *Appl. Catal. B: Environ.* 83: 131–139.

D

Dabrock. B, Kebeler. M, Averhoff. B, Gottshalk. G (1994) Identification and characterisation of a transmissible linear plasmid from *Rhodococcus erythropolis* BD2 that encodes isopropylbenzene and trichlorethene catabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 853–860.

Dandie. CE, Thomas. SM, Bentham. RH, McClure. NC (2004) Physiological characterization of *Mycobacterium* sp. strain 1B isolated from a bacterial culture able to degrade high- molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Microbiol.* 97: 246–255.

Daniele.S, Ghazzal.MN, Hubert-Pfalzgraf.LG, Duchamp.C, Guillard.C, Ledoux.G (2006) Preparations of nano-particles, nano-composites and fibers of ZnO from an amide precursor: Photocatalytic decomposition of $(\text{CH}_3)_2\text{S}_2$ in a continuous flow reactor. *Mate. Rese. Bulle.* 41: 2210–2218.

Davoodi-Dehaghani. F, Vosoughi. M, Ziaee. AA (2010) Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. *Bioresour. Technol.* 101: 1102–1105.

Delanoë. F, Acedo. B, Karpel Vel Leitner. N, Legube.B (2001) Relationship between the structure of Ru/CeO₂ catalysts and their activity in the catalytic ozonation of succinic acid aqueous solutions. *Appl. Catal. B: Environ.* 29: 315–325.

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

- Demirbas.** A (2009) Biohydrogen: For Future Engine Fuel Demands. Springer.
- De Windt.** W, Aelterman. P, Verstraete. W (2005) Bioreductive deposition of palladium (0) nanoparticles on *Shewanella oneidensis* with catalytic activity towards reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 314–325.
- Diab.** A, Knapp. JS, Baumberg. S, Delort. AM (2002) Benzothiazole degradation by *Rhodococcus pyridinovorans* strain PA: evidence of a catechol 1,2-dioxygenase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6114–6120.
- Díaz,** E (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *J. Int. Microbiol.* 7, 173.
- Diez.** MC, Pouleurs. D, Navia. R, Vidal. G (2005) Effect of EDTA and FeEDTA complex concentration on TCF Kraft mill effluent degradability. Batch and continuous treatments. *J. Wat. Res.* 39: 3239–3246.
- Dinkla.** IJT, Gabor. EM, Janssen. DB (2001) Effects of iron limitation on degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3406–3412.
- Dombu,** YCL (2012) Thèse de l'Université du Droit et de la Santé–Lille 2, France. Utilisation de nanoparticules pour délivrer des protéines dans les épithéliums respiratoires. Caractérisation des mécanismes impliqués. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00787621>
- Donaldson.** K, Tran. L, Jimenez. LA, Duffin. R, Newby. DE, Mills. N, MacNee. W, Stone. V (2005) Combustion-derived Nanoparticles: a Review of Their Toxicology Following Inhalation Exposure. *Part. Fibre. Toxicol.* 2: 10.
- Dosanjh.** NS, Hammerbacher. NA, Michel. SL (2007) Characterization of the Helicobacter pylori NikR-P(ureA) DNA Interaction: Metal Ion Requirements and Sequence Specificity. *J. Biochem.* 141: 2520–2529.
- Doyle.** E, Muckian. L, Hickey. AM, Clipson. N (2008) Microbial PAH degradation. *Appl. Microbiol.* 65: 27–66.
- Dubois.** M, Gilles. KA, Hamilton. JK, Rebers. PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *J. Anal. Chem.* 28: 350–356.

E

EFSA (2005) Avis du groupe scientifique CONTAM relatif à la présence de polychlorobiphényles (PCB) autres que ceux de type dioxine dans l'alimentation humaine et les aliments pour animaux. *The EFSA. J.* 284: 1–6.

Elad. T, Lee. JH, Belkin.S, Gu.BM (2008) Microbial whole-cell arrays. *J. Microb. Biotechnol.* 1: 137–148.

Esen F, Tasdemir Y, Vardar N (2008) Atmospheric concentrations of PAHs, their possible sources and gas-to-particle partitioning at a residential site of Bursa, Turkey. *Atmos. Res.* 88: 243–255.

F

Farrell. J, Kason. M, Melitas. N, Li. T (2000). Investigation of the long-term performance of zero-valent iron for reductive dechlorination of trichloroethylene. *Environ. Sci. Technol.* 34: 514–521.

Filipic. M, Fatur. T, Vudrag. M (2006) Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *J. Hum. Exp. Toxicol.* 25: 67–77.

Fish. KM and Principe. JM (1994) Biotransformations of Arochlor 1242 in Hudson River test tube microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4289–4296.

Forrez .I, Carballa .M, Fink. G, Wick .A, Hennebel. T, Vanhaecke. L, Ternes. T, Boon. N, Verstraete. W (2011) Biogenic metals for the oxidative and reductive removal of pharmaceuticals, biocides and iodinated contrast media in a polishing membrane bioreactor. *J. Water. Res.* 45: 1763–73.

Forster-Fromme.K, Chattopadhyay.A, Jendrossek.D (2008) Biochemical characterization of AtuD from *Pseudomonas aeruginosa*, the first member of a new subgroup of acyl-CoA dehydrogenases with specificity for citronellyl-CoA. *J. Microbiol.* 154: 789–796.

Fridovich, I (1986) Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 58: 62–97.

Furukawa. K and Fujihara. H (2008) Microbial degradation of polychlorinated biphenyls Biochemical and molecular features. *J. Biosci.Bioeng.*105: 433–449.

Furukawa.K (2003) Super bugs for bioremediation. *J.Trends. biortechnol.* 5: 187–190.

Furusawa. Y, Nagarajan. V, Tanokura. M, Masai. E, Fukuda. M, Senda. T (2004) Crystal Structure of the Terminal Oxygenase Component of Biphenyl Dioxygenase Derived from *Rhodococcus sp.* Strain RHA1. *J. Mol. Biol.* 342: 1041–1052.

G

Gan. S, Lau.EV, Ng.HK (2009) Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. Hazard. Mater.* 172: 532–549.

Gao, QH (2011) Thesis of University of Texas at Austin. The Tolerance of a *Rhodococcus* Drinking Water Isolate and *Zoogloea ramigera* to Silver Nanoparticles in Biofilm and Planktonic Cultures. <http://hdl.handle.net/2152/ETD-UT-2011-08-4262>

Garshick. E, Laden. F, Hart. JE, Rosner. B, Smith. TJ, Dockery. DW, Speizer. FE (2004) Lung cancer in railroad workers exposed to diesel exhaust. *J. Environ. Health. Perspect.* 112: 1539–1543.

Geiselhart. L, Osgook. M, Holmes. DS (1991) Construction and evaluation of a self-luminescent biosensor. *J. Ann. N. Y. Acad. Sci.* 646: 53–60.

Gibson. D, Mahadevan. TV, Jerina. DM, Yogi. H, Yeh. HJ (1975) Oxidation of the carcinogens benzo [a] pyrene and benzo [a] anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *J. Science.* 189: 295–297.

Gibson. DT, Koch. JR, Kallio. RE (1968) Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. *J. Biochem.* 7: 2653–2662.

Gibson. TD and Parales. RE (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenase in environmental biotechnology. *J. Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 236–243.

Gogoi. SK, Gopinath. P, Paul. A, Ramesh. A, Ghosh. SS, Chattopadhyay. A (2006) Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir.* 22: 9322–9328.

Gommes. CJ, de Jong. K, Pirard. J-P, Blacher. S (2005) Assessment of the 3D localization of metallic nanoparticles in Pd/SiO₂ cogelled catalysts by electron tomography *Langmuir.* 21: 12378–1238.

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). *VertigO*, Revue électronique en sciences de l'environnement Vol, 14, N 2

Grishchenkov. VG, Slepén'kin. AV, Boronin. AM (2002) Anaerobic degradation biphenyl by the facultative anaerobic strain *Citrobacter freundii* BS2211. *Appl. Biochem. Microbiol.* 38:125–128.

Grommen, R and Verstraete, W (2002) Environmental biotechnology: the ongoing quest. *J. Biotechnol.* 98: 113–123.

Grund. E, Schmitz. A, Fiedler. J, Gartemann. KH (1995) Aerobic biodegradation of polycyclic and halogenated aromatic compounds. *J. Progres. Indust. Microbiol.* 32: 103–123.

Gupta. AK and Gupta. M (2008) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 26: 3995–4021.

H

Haddock. JD and Gibson DT (1995) Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3 -dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain LB400. *J. Bacteriol.* 177: 5834–5839.

Halliwell.B and Gutteridge. JMC (1985) The importance of radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* 8: 89–193.

Hansen. BH, Romma. S, Garmo. OA, Pedersen. SA, Olsvik. PA, Andersen. RA (2007). Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *J. Chemosph.* 67: 2241–2249.

Haigler. BE and Gibson. DT (1990a) Purification and properties of ferredoxinNAP, a component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J. Bacteriol.* 172: 465–468.

Haigler. BE and Gibson. DT (1990b) Purification and properties of NADH ferredoxinNAP reductase, a component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J. Bacteriol.* 172: 457–464.

1. **Hansen, SF (2009)** Thèse de l'Université technique du Danemark: Regulation and Risk Assessment of Nanomaterials–Too Little, Too Late?. www2.er.dtu.dk/publications/fulltext/2009/ENV2009-069.pdf

Hantke. K, Nicholson. G, Rabsch. W, Winkelmann. G (2003) siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proceed. Natio. Acad. Sci.* 100: 3677–3682.

Harayama. S, Kok. M, Neidle. EL (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 565–601.

Harder. W, Dijkhuizen. L, Postgate. JR (1982) Strategies of Mixed Substrate Utilization in Microorganisms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 297: 459–80.

Hart.JE, Laden.F, Schenker. MB, Garshick, E (2006) Chronic obstructive pulmonary disease mortality in diesel-exposed railroad workers. *J. Environ. Health. Perspect.* 114: 1013–1017.

- Heinrichs. B, Beketov. G, Lambert. SD, Geus. JW, Kruse. N, Pirard. J-P** (2006) Immobilizing metal nanoparticles in porous silica through sol-gel process. *Stud. Surf. Sci. Catal.* 162: 521–528.
- Heinrichs. B, Lambert. S, Job. N, Pirard. J-P** (2007) in "Catalyst Preparation: Science and Engineering, J. R. Regalbuto (Ed.)" CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton. 163–208.
- 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. *J. Non-Cryst. Solids.* 354: 665–672.
- Heinrichs. B, Geus. JW, Lambert. SD, Pirard. J-P** (2006) A TEM study on the localization of metal particles in cogelled xerogel catalysts. *J. Catal.* 241: 229–231.
- Hengstler. JG, Bolm-Audorff. U, Faldum. A, Janssen. K, Reifenrath. M, Gotte. W, Jung. D, Mayer-Popken. O, Fuchs. J, Gebhard. S, Bienfait. HG, Schlink. K, Dietrich.C, Faust. D, Epe. B, Oesch. F** (2003) Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *J. Carcinog.* 24: 63–73.
- Hennebel. T, De Gusseme. B, Boon. N, Verstraete. W** (2008) Biogenic metals in advanced water treatment. *J. Trend. Biotechnol.* 27: 90–98.
- Hissen. AHT, Chow. JMT, Pinto. LJ, Moore. MM** (2004) Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. *Infec. Immu.* 72: 1402–1408.
- Hong. Q, Dong. X, He. L, Jiang. X, Li.S** (2009). Isolation of a biphenyl-degrading bacterium, *Achromobacter* sp. BP3, and cloning of the bph gene cluster. *J. Int .Biodeterior. Biodegrad.* 63: 365–370.
- Huang. YH, Shih. CM, Huang. CJ, Lin. CM, Chou. CM, Tsai. ML, Liu.TP, Chiu. JF, Chen. CT** (2006) Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu, Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J. cell. Biochem.* 98: 577–589.
- Hughes. MN, Poole. RK, Chapman, Hall** (1989) Metal toxicity In: Hughes MN, Poole RK (eds) Metals and Microorganisms. N.Y. 252–302.
- Hurtubise. Y, Barriault. D, Powlowski. J, Sylvestre. M** (1995) Purification and Characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 Biphenyl Dioxygenase Components. *J. Bacteriol.* 177: 6610–6618.

Hydutsky. BW, Mack EJ, Beckerman. BB, Skluzacek. JM, Mallouk. TE (2007) Optimization of nano- and microiron transport through sand columns using polyelectrolyte mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 41: 6418–6424.

Hynninen, A (2010) Thesis University of the Helsinki. Zinc, cadmium and lead resistance mechanisms in bacteria and their contribution to biosensig. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/>

I

ICON. 2006, A Review of Current Practices in the Nanotechnology Industry–Phase two report: Survey of current practices in the nanotechnology workplace. University of California, Santa Barbara for the *International Council on Nanotechnology* (ICON).

Ike. M, Takahashi.K, Fujita.T, Kashiwa.M, Fujita. M (2000) Selenate reduction by bacteria isolated from aquatic environment free from selenium contamination. *Water. Res.* 34: 3019–3025.

Indu Nair. C, Jayachandran. K, Shashidhar. S (2008) Biodegradation of Phenol. *African. J. Biotechnol.* 7: 4951–4958.

International Agency for Research on Cancer (2003) Evaluations of carcinogenicity to humans. Available from <http://www.iarc.fr/>. Accessed 3 March 2003

Iwanade. A, Jang. JH, Hirai. M, Shoda. M (2005) Enhancement of styrene removal by *Pseudomonas sp.* SR-5 in mixed culture with a benzoic acid-degrading. *Environ. Technol.* 26: 941–449.

Iyer. A, Kalpana. M, Jha. B (2006) Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enz. Microbiol. Technol.* 38: 200–222.

F

Finnerty, WR (1992) The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Ann. rev. Microbiol.* 46: 193–218.

J

Jakoncic. J, Jouanneau. Y, Meyer. C, Stojanoff. V (2007) The catalytic pocket of the ringhydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352: 861–866.

Japan Bioassay Research Center (1996) Two year feeding study of biphenyl in rats and mice. Rapport inédit. Tokyo (Japon): National Institute of Health Sciences.

Jouanneau. Y, Willison. JC, Meyer. C, Krivobok. S, Chevron. N, Besombes. JL, BlaKe.G (2005) Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *J. Environ. Sci. Technol.* 39: 5229–5235.

K

Kabata-Pendias. A and Pendias. H (2001) Trace elements in soils and plants. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Kagan. VE, Tyurina. YY, Tyurin. VA, Konduru. NV, Potapovich. AI, Osipov. AN, Kisin. ER, Schwegler-Berry. D, Mercer. R, Castranova. V, Shvedova. AA (2006) Direct and Indirect Effects of Single Walled Carbon Nanotubes on RAW 264.7 Macrophages: Role of Iron. *J. Toxicol. Lett.* 165: 88–100.

Kaiser. A, G örsmann. C, Schubert. U (1997) Influence of the Metal Complexation on Size and Composition of Cu/Ni Nano-Particles Prepared by Sol-Gel Processing. *J. Sol-Gel. Sci. Technol.* 8: 795–799.

Karunakaran.C and Senthilvelan.S (2005) Photocatalysis with ZrO ₂: oxidation of aniline. *J.Mol. Catal. A: Chemical.* 233: 1–8.

Kasemets. K, Ivask. A, Dubourguier. HC, Kahru. A (2009) Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. In Vitro.* 23: 1116–1122.

Khan. FI, Husain.T, Hejazi. R (2004) An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* 71: 95–122.

Khan.MA and Ghouri.AM (2011) Environmental pollution: its effects on life and its remedies. *J. Art. Sci.Comme.* 2: 276–285.

Kikuchi. Y, Nagata. Y, Ohtsubo Y, Koana. T, Takagi. M (1995) *Pseudomonas fluorescens* KKL101, a benzoic acid degrader in a mixed culture that degrades biphenyl and polychlorinated biphenyls. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2303–4

Kim. SJ, Kweon O, Freeman. JP, Jones. RC, Adjei. MD, Jhoo. JW, Edmondson. RD, Cerniglia. CE (2006) Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular- weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1045–1054.

Kim. SJ, Kweon. O, Cerniglia. CE (2010) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *mycobacterium* Strains. *Handb. Hydro. Lipid. Microbiol.* Pp: 1865–187.

- Knaapen.** AM, Borm. PJ, Albrecht C, Schins. RPF (2004) Inhaled Particles and Lung Cancer. Part A: Mechanisms. *Int.J. Canc.* 109: 799–809.
- Kosman,** DJ (2003) Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol. Microbiol.* 47: 1185–1197.
- Kosono.** S, Maeda. M, Fuji. F, Arai. H, Kudo. T (1997) Three of the Seven bphC Genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, Isolated from a Termite Ecosystem, Are Located on an Indigenous Plasmid Associated with Biphenyl Degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3282–3285.
- Kotresha.** GD and Vidyasagar. M (2008) Isolation and characterisation of phenol-degrading *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 541–547.
- Kraemer,** SM (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *J. Aquat. Sci.* 66: 3–18.
- Krumschnabel.** G, Manzl. C, Berger. C, Hofer. B (2005) Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. *Toxicol. Appl. pharmacol.* 209: 62–73.
- Kumara.** M, Leon. V, De Sisto. Materano A, Ilzins. OA, Galindo-Castro. I, Fuenmayor. SL (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. IR1. *Naturforsch. C.* 61: 203–212.
- Kuo** CW and Sharak Genthner BR (1996) Effect of added heavy metals on biotransformation and biodegradation of 2-chlorophenol and 3-chlorobenzoate in anaerobic bacterial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2317–2323.
- Kuony,** S (2005) Thèse de l'Université Joseph fourier – Grenoble I. France. Caractérisation d'arene dioxygénases impliquées dans la biodegradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez *mycobacterium* sp. 6py1. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00009997>.
- Kuriyama.**S, Fidalgo-Neto.A, Mathar.W, R. Palvinskas.R, Friedrich. K, Chahoud. I (2003) Effect of low dose mono-ortho 2, 3', 4, 4', 5 pentachlorobiphenyl on thyroid hormone status and EROD activity in rat offspring: consequences for risk assessment. *J. Toxicol.* 186: 11–20.
- L**
- Lambert.** SD, Tran. KY, Arrachart. G, Noville. F, Henrist. C, Bied. C, Moreau. JJE, Wong Chi Man. M, Heinrichs. B (2008) *Micropor. Mesopor. Mat.* Tailor-made morphologies for Pd/SiO₂ catalysts through sol-gel process with various silylated ligands. 115: 609–617.

- Lambert. S, Polard. J-F, Pirard. J-P, Heinrichs. B (2004a) Improvement of metal dispersion in Pd/SiO₂ cogelled xerogel catalysts for 1, 2-dichloroethane hydrodechlorination. *Appl. Catal. B: Environ.* 50: 127–140.
- Lambert. S, Cellier. C, Grange. P, Pirard. J-P, Heinrichs. B (2004b) Synthesis of Pd/SiO₂, Ag/SiO₂, and Cu/SiO₂ cogelled xerogel catalysts: study of metal dispersion and catalytic activity. *J. Catal.* 221: 335–346.
- Lambert. S, Alié. C, Pirard. J-P, Heinrichs. B (2004c) Study of textural properties and nucleation phenomenon in Pd/SiO₂, Ag/SiO₂ and Cu/SiO₂ cogelled xerogel catalysts. *J. Non-Cryst. Solids.* 342: 70–81.
- Lambert. S, Polard J-F, Pirard J-P, Heinrichs B (2004 d) Improvement of metal dispersion in Pd/SiO₂ cogelled xerogel catalysts for 1,2-dichloroethane hydrodechlorination. *Appl. Catal B: Environ.* 50: 127–140.
- Lang. S and Philp. JC (1998) Surface-active lipids in *Rhodococci*. *Antonie. Van. Leeuwenhoek.* 74: 59–70.
- Larpent, JP (2000) Introduction à la nouvelle classification bactérienne Paris: Technique et documentation lavoisier.
- Lee. SM, Grass. G, Rensing. C, Barrett. SR, Yates. CJ, Stoyanov. JV, Brown. NL (2002) The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. J. Res. Commun.* 295: 616–620.
- Leon.M, Castig Lioni.J, Bussi. J, Sergio. M (2008) Catalytic activity of an iron-pillared montmorillonitic clay mineral in heterogeneous photo-Fenton process. *J. Catal. Today.* 133–135: 600–605.
- Leveau. JY and Bouix M (1993) Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Paris: technique et documentation - Lavoisier. 612p. ISBN 2-85206-850-8.
- 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. *J. Environ. Manag.* 95: 99–103.
- Leys. NM, Bastiaens. L, Verstraete. W, Springael. D (2005) Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 726–736.

- Li. C, Lin. Y, Lee. W, Tsai. P** (2003) Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and their carcinogenic potencies from cooking sources to the urban atmosphere. *Environ. Heal. Pers.* 111: 483–487.
- Lke. M, Takahashi. K, Fujita.T, Kashiwa. M, Fujita. M** (2000) Selenate reduction by bacteria isolated from aquatic environment free from selenium contamination. *J. Water. Res.* 34: 3019–3025.
- Lima de. Oliveira L, Costa. R B, Okada. DY, Daniele Vital Vich. DV, Duarte. ICS, Silva. E L, Varesche. MBA** (2010) Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in fluidized bed reactor by microbial consortia in different support materials. *Bioresour. Technol.* 101: 5112–5122.
- Li. L, Fan. M H, Brown. RC, Van Leeuwen. JH, Wang. JJ, Wang. WH, Song. YH, Zhang. PY** (2006) Synthesis properties, and environmental applications of nanoscale iron-based materials. A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 36: 405–431.
- Li. Z, Greden. K, Alvarez. PJJ, Gregory.KB, Lowry. GV** (2010) Adsorbed Polymer and NOM Limits Adhesion and Toxicity of Nano Scale Zerovalent Iron to *E. coli*. *Appl. Environ. Sci. Technol.* 44: 3462–3467.
- Lin. CW, Chen. SY, Cheng.Y-W** (2006). Effect of metals on biodegradation kinetics for methyl tert-butyl ether. *J. Biochem. Eng.* 32: 25–32.
- Linder. MC and Hazegh-Azam. M** (1996) Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 797S–811S.
- Lipczynska-Kochany. E, Harms. S, Milburn. R, Sprah. G, Nadarajah. N** (1994) Degradation of carbon tetrachloride in the presence of iron and sulphur containing compounds. *Chemosphere.* 29: 1477–1489.
- Lob. KC and Tar. PP** (2000) Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64:756–763.
- Loh KC, Chung TS, Wei-Fern A** (2000) Immobilized cell membrane bioreactor for high strength phenol wastewater. *J. Environ. Eng.* 126: 75–79.
- Lovanh. N, Hunt. CS, Alvarez. PJJ** (2002) Effect of ethanol on BTEX biodegradation kinetics: aerobic continuous culture experiments. *J. Water. Res.* 36: 3739–3746.
- Ludwig. B, Akundi. A, Kendall. K** (1995) A long-chain secondary alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3729–3733.

Luna-del. Risco M, Orupold. K, Dubourguier. HC (2011) Particle-size effect of CuO and ZnO on biogas and methane production during anaerobic digestion. *J. Hazard. Mater.* 189: 603–608.

M

MacLeod. CT and Daugulis. AJ (2005) Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by hydrophobic mycobacterium. *Process. Biochem.* 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. *Micropor. Mesopor. Mat.* 197: 164–173.

Mahy, JG (2013) TFE. Faculté des Sciences Appliquées. Université de Liège, Belgique Assainissement des sols pollués par l'action couplée de micro-organismes et de nanoparticules métalliques.

Ma. J, Xu. L, Jia. L (2012) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. JM2 isolated from active sewage sludge of chemical plant. *J. Environ. Sci. (China)* 24: 2141–2148.

Masai. E, Yamada. A, Healy. JM, Hatta. T, Kimbara. K, Fukuda. M, Yano. K (1995). Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2079–2085.

Mason. JR and Cammack. R (1992). The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 277–305.

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

McHugh. JP, Rodríguez-Quinoñes. F, Abdul-Tehrani. H, Svistunenko. DA, Poole. RK, Cooper. CE, Andrews. SC (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278: 29478–29486.

Meessen, M (2007) TFE. Faculté des Sciences Appliquées. Université de Liège, Belgique La bioremédiation des PCB: La déchloration anaérobie.

Mergeay, M (1997) Microbial resources for bioremediation of sites polluted by heavy metals. *Perspective. Bioremed.* 19: 65–73.

- Mergeay. M, Nies. D, Schlegel. HG, Gerits. J, Charles. P, van Gijsegem. F** (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy met- als. *J. Bacteriol.* 162: 328–334.
- Meyer. C and Stitt. M** (2001) Nitrate reduction and signalling. *In: Lea, P., Morot-Gaudry, J. F., eds. Plant Nitrogen.* INRA Springer Verlag, 37–59.
- Mhiri. C and Tandeau de Marsac .N** (1997) Réhabilitation par les microorganismes des sites contenant du pyralène: problématique et perspectives d'étude. *Bulletin. Institut. Pasteur.* 95: 3–28.
- Mills. NL, Donaldson. K, Hadoke. PW, Boon. NA, MacNee. W, Cassee. FR** (2009) Adverse cardiovascular effects of air pollution. *J. Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 6: 36–44.
- Miyata. N, Iwahori. K, Foght. JM, Gray. MR** (2004) Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium* sp strain RJGII-135. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 363–369.
- Moisan, S** (2006) Thèse de l'Université Bordeaux1, France. Nouvelles approches pour l'elaboration de nanobarticules hybrides fonctionnelles en milieux fluides supercritiques. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00131983>
- Monchy, S** (2007) Thèse de l'Université Libre de Bruxelles, Belgique. Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. theses.ulb.ac.be/ETD-db/collection/available//ULBetd-05232007-163002/
- Monéger. R, Vermeesch. J, Lechevallier. D, Richard. C** (1977) Micro-analyse du NADP et du NAD réduits et oxydés dans les tissus foliaires et dans les plastes isolés de Spirodèle et de Blé. *J. Physiol. Vég.* 15: 29–62.
- Monzyk.B, Crumbliss. AL** (1982) Kinetics and Mechanism of the Stepwise Dissociation of Iron (III) from Ferrioxamine B in Aqueous Acid. *J. Americ. Chem. Soc.* 104: 4921–4929.
- Morones. JR, Elechiguerra. JL, Camacho. A, Holt. K, Kouri. JB, Ramírez. JT, Yacaman. MJ** (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnol.* 16: 2346–2353.
- Mrozik. A, Cycoń. M, Piotrowska-Seget. Z** (2010) Changes of FAME profiles as a marker of phenol degradation in different soils inoculated with *Pseudomonas* sp. CF600. *J. Int. Biodeter. Bioter.* 64: 86–96.
- Mu H, Chen Y, Xiao N** (2011) Effects of metal oxide nanoparticles (TiO₂, Al₂O₃, SiO₂ and ZnO) on waste activated sludge anaerobic digestion. *J. Bioresour. Technol.* 102: 10305–10311.

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. *Bioresour. Technol.* 102: 6019–6025.

N

Nadaf. NH and Ghosh. JS (2011) Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus* sp. NCIM 2891. *J. Environ. Earth. Science.* 3: 608–613.

Nagy. S and Wardowski. WF (1981) Diphenyl absorption by honey tangerines: The effects of washing and waxing and time and temperature storage. *J. Agric. Food. Chem.* 29: 760–763.

Nakajima. H, Ishida. T, Tanaka H, Horiike. K (2002) Accurate measurement of near-micromolar oxygen concentrations in aqueous solutions based on enzymatic extradiol cleavage of 4-chlorocatechol: Applications to improved low-oxygen experimental systems and quantitative assessment of back diffusion of oxygen from the atmosphere. *J. Biochem.* 131: 523–531.

Nácher-Mestre. J, Serrano. R, Benedito-Palos. L, Navarro. JC, López. FJ, Kaushik. S, Pérez-Sánchez. J (2010) Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) exposed to long term feeding trials with different experimental diets. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 137–146

Naidu. R, Semple. KT, Megharaj. M, Juhasz. AL, Bolan. NS, Gupta.SK, Clothier. BE, R. Schulin. R (2008) Chapter 3 Bioavailability: Definition, assessment and implications for risk assessment. 32: 39–51.

Neilands, JB (1984) Methodology of Siderophores. *Stru. Bond.* 58: 1–24.

Newman. LA, Reynolds. CM (2004) Phytodegradation of organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 225–230.

Nies, DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5: 730–750.

Nishioka.T, Iwata.M, Imaoka.T, Mutoh.M, Egashira, Y, Nishiyama. T, Shin. T, Fujii.T (2006) A mono-2-ethylhexyl phthalate hydrolase from a *Gordonia* sp. that is able to dissimilate di-2-ethylhexyl phthalate. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2394–2399.

O

O’Connor. KE, Dobson. AD, Hartmans. S (1997) Indigo Formation by Microorganisms Expressing Styrene Monooxygenase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4287-4291.

Oberdörster. G, Maynard. A, Donaldson. K, Castranova. V, Fitzpatrick. J, Ausman. K, Carter. J, Karn. B, Kreyling W, Lai. D, Olin. S, Monteiro-Riviere. N, Warheit. D, Yang. H and A report from

the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group (2005) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *J. Part. Fibre. Toxicol.* 2: 8.

Oberdörster. G, Oberdörster. E, Oberdörster. J (2005) Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *J. Environ. Health. Perspect.* 113: 823–839.

Ohmori T, Morita H, Tanaka M, Miyauchi K, Kasai D, Furukawa K, Miyashita K, Ogawa N, Masai E, Fukuda M (2011) Development of a strain for efficient degradation of polychlorinated biphenyls by patchwork assembly of degradation pathways. *J. Biosci. Bioeng.* 111: 437–442.

Okkeri. J, Bencomo. E, Pietilä .M, Halti T (2002) Introducing Wilson disease mutations into the zinc-transporting P-type ATPase of *Escherichia coli*: The mutation P634L in the 'hinge' motif (GDGXNDXP) perturbs the formation of the E2P state. *Eur. J. Biochem.* 269: 1579–1586.

Olle. B, Bucak.S, Holmes. TC, Bromberg. L, Hatton. TA, Wang. DIC (2006) Enhancement of Oxygen Mass Transfer Using Functionalized Magnetic. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* 45: 4355–4363.

Ostiguy. C and Lesage. J (1998) Les émissions de moteurs diesels: revue sommaire de leur composition et des risques de développement de cancer pulmonaire, Rapport IRSST # R-194, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail, Montréal, 32.

P

Pal. S, Tak.YK, Song. JM (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1712–1720.

Panyala. NR, Pena-Mendez. EM, Havel. J (2008) Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health. *J. Appl. Biomedicine.* 6: 117–129.

Papanastasiou, AC (1982) Kinetics of biodegradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetate in the presence of glucose. *J. Biotechnol. Bioeng.* 24: 2001–2011.

Pascaly. M, Duda. M, Schweppe. F, Zurlinden. K, Müller. FK, Krebs. B (2001) The systematic influence of tripodal ligands on the catechol cleaving activity of iron(III) containing model compounds for catechol 1,2-dioxygenases. *J. Chem. Soc.* 828–837.

Pekkanen. J, Peters. A, Hoek. G, Tiittanen. P, Brunekreff. B, de Hartog. J (2002) Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease. The exposure and risk assessment for fine and ultrafine particles in ambient air (ULTRA) study. *Circulation.* 106: 933–938.

Pelmont, J (1993) Bactéries et environnement, adaptations physiologiques: adaptations physiologiques Presses Universitaires de Grenoble. Collection Grenoble sciences, ISSN 0767-371X

Pelmont, J (2005) Biodégradation et métabolisme les Bactéries pour les technologies de l'environnement, chapitre 14. EDP Sciences. France.

Phale. PS, Basu. A, Majhi. PD, Deveryshetty. J, C. Vamsee-Krishna. C, Shrivastava. R (2007) Metabolic diversity in bacterial degradation of aromatic compounds. *OMICS: A. J. Int. Biol.* 11: 252–279.

Pétriacq, P (2011) Thèse de l'Université Paris Sud 11–UFR Sciences d'Orsay, France. Étude de la biosynthèse du nad chez les plantes: conséquences physiologiques de sa manipulation chez *Arabidopsis thaliana*. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00661699>

Pignatello. JJ, Oliveros. E, MacKay. A (2006) Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *J. Environ. Scien. Technol.* 36: 1–84.

Pierre. JL, Fontecave. M, Crichton. RR (2002) Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *J. Biometal.* 15: 341–346.

Pirard. S, Mahy. J, Pirard. J-P, Heinrichs. B, Raskinet. L, Lambert SD (2014) Development by the sol-gel process of highly dispersed Ni-Cu/SiO₂ xerogel catalysts for selective 1,2-dichloroethane hydrodechlorination into ethylene. *Micropor. Mesopor. Mat.*

Pirnack, MP (1977) Micorbial oxidation of methyl branched alkanes. *J. Crit. Rev. Biotechnol.* 5: 413–422.

Pollak. N, Dölle. C, Ziegler. M (2007) The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *J. Biochem.* 402: 205–18.

Q

Qu.J, Li. H, Liu. H, He. H (2004) Ozonation ofalachlor catalyzed by Cu/Al₂O₃ in water. *J. Catal. Today.* 90: 291–296.

R

Rajapaksha. RM, Tobor-Kapłon. MA, Bååth E (2004) Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2966–2973.

Regalbuto, J (2007) Catalyst Preparation, Science and Engineering, Taylor and Francis Group, CRC Press.

- Regalbuto, JR** (2006) A scientific method to prepare supported metal catalysts, surface and nanomolecular catalysis. Pp. 161–190.
- Regeard. C, Maillard. J, Dufraigne. C, Deschavanne. P, Holliger. C** (2005) Indications for acquisition of reductive dehalogenase genes through horizontal gene transfer by *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2955–2961.
- Rehmann. L and Daugulis. AJ** (2006) Biphenyl degradation kinetics by *Burkholderia xenovorans* LB400 in two-phase partitioning bioreactors. *Chemosphere* 63: 972–979.
- Rentz. JA, Alvarez. PJJ, Schnoor. JL** (2005) Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation. *J. Environ. Pollut.* 136: 477–484.
- Risebrough. RW and Lappe. B de** (1972) Accumulation of polychlorinated biphenyls in ecosystems. *J. Environ. Health. Perspect.* 1: 39–49.
- Rittmann, BE** (2008) Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol. Bioengi.* 100: 203–212.
- Robert. C and Nguyen. TA**: Molecular Chemistry of Sol-Gel Derived Nanomaterials. (2009) John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-72117-9.
- Roanne. TM and Pepper. IL** (2000) Metalloids resistance mechanism in prokaryotes. *J. Bioch.* 123: 16–23.
- 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^e édition, DUNOD, Paris
- Rysavy.JP, Yan.T, Novak. PJ** (2005) Enrichment of anaerobic polychlorinated biphenyl dechlorinators from sediment with iron as a hydrogen source. *J. Water. Res.* 39: 569–578.
- S**
- Sagripanti. JL, Goering. PL, Lamanna. A** (1991) Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Appl. Toxicol. Pharmacol.* 110: 477–85.
- Saito. A, Iwabuchi. T, Harayama. S** (2000) A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182: 2134–2141.
- Sakai. M, Miyauchi. K, Kato. N, Masai E, Fukuda. M** (2003) 2-Hydroxypenta-2, 4-dienoate metabolic pathway genes in a strong polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 427–433.

- Santodonato. J, Howard. P, Basu. D (1981) Health and ecological assessment of polynuclear aromatic hydrocarbons. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 5:1–364.
- Santos. EC, Jacques. RJS, Bento. FM, Peralba. MCR, Selbach. PA, Sà. EL, Camargo. FA (2008) Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *J. Bioresour. Technol.* 99: 2644–2649.
- Senda. M, Kishigami. S, Kimura. S, Fukuda. M, Ishida. T, Senda. T (2007) Molecular mechanism of the redox-dependent interaction between NADH dependent ferredoxin reductase and Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin. *J. Mol. Biol.* 373: 382–400.
- Sensi. SL and Jeng. JM (2004) Rethinking the excitotoxic ionic milieu: the emerging role of Zn (2+) in ischemic neuronal injury. *J. Curr. Mol. Med.* 4: 87–111.
- Sève. E and Antonini. G (2000) Traitement des graisses de station d'épuration urbaine. *Chemi. Engine. J.* 76: 179–187.
- Schach. S, Tshisuaka. B, Fetzner. S, Ligens F (1995) Quinoline 2-oxidoreductase and 2-oxo-1,2-dihydroquinoline 5,6-dioxygenase from *Comamonas testosteroni* 63. The first two enzymes in quinoline and 3-methylquinoline degradation. *Eur. J. Biochem.* 232: 536–544.
- Schadeck. S, Vanderheyden. V, kreit. JF, Siterem. SA (2007) pollution locale des sols en région wallonne. Dossier scientifique réalisé dans le cadre de l'élaboration du rapport analytique 2006-27 sur l'état de l'environnement wallon.
- Schmid. A, Kollmer. A, Witholt. B (1998) Effects of biosurfactant and emulsification on two-liquid phase *Pseudomonas oleovorans* cultures and cell-free emulsions containing ndecane. *J. Enzyme. Microb. Technol.* 22: 487–493.
- Schwyn. B, Neilands. JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47–56.
- Shahverdi. AR, Fakhimi. A, Shahverdi. HR (2007) Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* *Nanomedicine. Nanotechnol. Biol. Med.* 3: 168–171.
- Shim. H, Shin. EB, Yang. ST (2002) A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Adv. Environ. Res.* 7: 203–216.
- Siedlecka. EM, W. Mrozik.W, Kaczynski. Z, Stepnowski. P (2008) Degradation of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid in a Fenton-like system. *J. Hazard. Mater.* 154: 893–900.

- Silver. S, Phung. LT** (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 753–789.
- Silver. S, Nucifora. G, Phung. LT** (1993) Human Menkes X-chromosome disease and the staphylococcal cadmium-resistance ATPase: a remarkable similarity in protein sequences. *J. Mol. Microbiol.* 10: 7–12.
- Singh. OV, Labana. S, Pandey. G, Budhiraja. R, Jain. RK** (2003) Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 405–412
- Smith. MR and Ratledge. C** (1989) Catabolism of biphenyl by *Pseudomonas* sp NCIB 10643 and *Nocardia* sp NCIB 10503. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 395–401.
- Snow, GA** (1970) Mycobactins: iron-chelating growth factors from mycobacteria. *Bacteriol. Revi.* 34: 99–125.
- Solano-Serena. F, Marchal. R, Ropars. M, Lebeault. JM, Vandecasteele, JP** (1999) Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. *Appl. Microbiol.* 86: 1008–1016.
- Speitel .GE and Maclay. DS** (1993) Biofilm reactors for the treatment of gaz stream containing chlorinate solvents. *J. Environ. Eng.* 119: 658–678.
- Sridevi1.V, Chandana Lakshmi. MVV, Swamy. AVN, Narasimha Rao. M** (2011) Implementation of Response Surface Methodology for Phenol Degradation using *Pseudomonas putida* (NCIM 2102). *J. Bioremed. Biodegrad.* 2: 114–121.
- Stampfer. W, Kosjek .B, Kroutil. W, Faber. K** (2003) On the organic solvent and thermostability of the biocatalytic redox system of *Rhodococcus ruber* DSM 4454. *J. Biotechnol. Bioeng.* 81: 865–869.
- Sterritt. RM and Lester. JN** (1980) Interactions of heavy metals with bacteria. *J. Sci. Total. Environ.* 14: 5–17.
- Stohs. SJ and Bagghi. D** (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *J. Free. Radic. Biol. Med.* 18: 321–336.
- Strachan. PD, Freer. AA, Fewson. CA** (1998) Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing its *catA* gene. *J. Biochem.* 333: 741–747.
- Suenaga. H, Watanabe. T, Sato. M, Ngadiman, Furukawa. K** (2002) Alteration of Regiospecificity in Biphenyl Dioxygenase by Active-Site Engineering. *J. Bacteriol.* 184: 3682–3688.

Sylvestre, M (2004) Genetically modified organisms to remediate polychlorinated biphenyls. Where do we stand?. *J. Int. Biode. Biode.* 54:153–162.

Szeliga. J and Dipple. A (1998) DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. *J. Chem. Res. Toxicol.* 11:1–11.

T

Taguchi. K, Motoyama. M, Iida. T, Kudo. T (2007) Polychlorinated biphenyl/ biphenyl degrading gene clusters in *Rhodococcus* sp. K37, HA99, and TA431 are different from well-known bph gene clusters of *Rhodococci*. *J. Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 1136–1144.

Takeda. H, Yamada. A, Miyauchi. K, Masai. E, Fukuda. M (2004) Characterization of transcriptional regulatory genes for biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J. Bacteriol.* 186: 2134–2146.

Takeo. M, Murakami. M, Niihara. S, Yamamoto. K, Nishimura. M, Kato. DI (2008) Mechanism of 4-nitrophenol oxidation in *Rhodococcus* sp. Strain PN1: characterization of the two-component 4-nitrophenol hydroxylase and regulation of its expression. *J. Bacteriol.* 190: 7367–7374.

Tandlich. R, Vrana. B, Payne. S, Dercová. K, Balaz. S (2011) Biodegradation mechanism of biphenyl by a strain of *Pseudomonas stutzeri*. *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 46: 337–344.

Tilagam. M, Sharifah. M, Yatimah. A (2014) Synthesis and characterization of new silica–titania mixed oxide in the presence of 1-butyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide by sol–gel technique. *J. Sol–Gel. Sci. Technol.* 70: 104–110.

Todd. RS and Raina. MM (2003) Impact of Metals on the Biodegradation of Organic Pollutants. *J. Environ. Heal. Perspec.* 111: 1093–1101.

Topp. E and Hanson. RS (1990) Degradation of pentachlorophenol by a Flavobacterium species grown in continuous culture under various nutrient limitations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 541–544.

Touati, D (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 1–6.

Tsormpatsidis. E, Henbest. RGC, Battey. NH, Hadley. P (2010) The influence of ultraviolet radiation on growth, photosynthesis and phenolic levels of green and red lettuce: potential for exploiting effects of ultraviolet radiation in a production system. *Ann. Appl. Biol.* 156: 357–366.

Tuli, R (2007) Environmental Bioremediation Technologie: Foreword, Springer, pg V.

U

UK Marine SAC (2001) United Kingdom Marine Special Areas of Conservation. Biphenyl. [consulté en avril 2013]. Accès: http://www.ukmarinesac.org.uk/activities/water/quality/wq8_30.htm.

V

Vallee. BL and Auld. DS (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *J. Biochem.* 29: 5647–59.

Van der Meer. JR and Belkin. S (2010) Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *J. Nat. Rev. Microbiol.* 8: 511–522.

Van Doesburg.W, van Eekert. MHA, Middeldorp.PJM, Balk. M, Schraa .G, Stams, AJM (2005) Reductive dechlorination of β -hexachlorocyclohexane (β -HCH) by a *Dehalobacter* species in coculture with a *Sedimentibacter* sp. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 54: 87–95.

Vandecasteele, JP (2005) Biodegradation des hydrocarbures aliphatiques et alicycliques. In *Microbiologie Pétrolière*, 173–239. Edited by E. Technip. Paris.

Vasconcelos. DCL, Nunes. EHM, Houmard. M, Motuzas J, Nascimento. JF, Grava. W, Ciminelli. VST, Costa. JCD da, Vasconcelos. WL (2013) Structural investigation of cobalt-doped silica derived from sol–gel synthesis. *J. Non-Crys. Solids* 378: 1–6.

Vergne. AF, Walz. AJ, Miller. MJ (2000) Iron chelators from mycobacteria (1954–1999) and potential therapeutic applications. *Natu. Prod. Rep.* 17: 99–116.

Verma. V, Joshi. K, Mazumdar. B (2012) Study of siderophore formation in nodule-forming bacterial species. *Res. J. Chem. Sci.* 2: 26–29.

Vetting. MW and Ohlendorf. DH (2000) The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. *J. Structure. Fold. Des.* 8: 429–440.

Villacieros.M, Whelan.C, Mackova. M, Molgaard. J, Sánchez -Contreras. M, Lloret. J, Aguirre de Cárcer. D, Oruezábal.RI, Bolaños. L, Macek. T, Karlson. U, Dowling. DN, Martín.M, Rivilla. R (2005) Polychlorinated Biphenyl Rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 Derivatives, Using a Sinorhizobium meliloti nod System To Drive bph Gene Expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2687–2694.

W

Wackett, LP (2002) Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases. *J. Enzyme. J. Microbial. Technol.* 31: 5775–87.

- Wackett. PW, Kwart. LD, Gibson. DT (1988) Benzenic monooxygenation catalysed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida*. *J. Biochem.* 27: 1360–1367.
- Wagner. S, Münzer. S, Behrens .P, Scheper. T, Bahnemann. D, Kasper. C (2009) Cytotoxicity of titanium and silicon dioxide nanoparticles. *J. Phys. Conf. Ser.* 170: 12–22.
- Waid, JS (1986) PCBs and the environment, 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, 215 pp.
- Waisberg. M, Joseph. P, Hale. B, Beyersmann. D (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *J.Toxicol.* 192: 95–117.
- Walther. UI, Muckter. H, Fichtl. B, Forth. W (1999) Influence of glutathione on zinc mediated cellular toxicity. *J. Biol. Trace. Elem. Res.* 67: 97–107.
- Wang. J, Sheppard. GS, Lou. P, Kawai. M, Park. C, Egan. DA, Schneider. A, Bouska. J, Lesniewski. R, Henkin. J (2003) Physiologically relevant metal cofactor for methionine aminopeptidase-2 is manganese. *J. Biochem.* 42: 5035–5042.
- Wang. L, Lin. L, Lai. S (2009) Emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from fluidized and fixed bed incinerators disposing petrochemical industrial biological sludge. *J. Hazard. Mater.* 186: 438–444.
- Wang. SJ and Loh. KC (1999) Modelling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme. J. Microb. Technol.* 25:177–184.
- Wang.YT and Shen, H (1997) Modelling Cr(VI) reduction by pure bacterial cultures. *Water. Res.* 31:727–732.
- Wannoussa. W, Masy. T, Lambert. SD, Heinrichs. B, Tasseroul. L, Al-Ahmad. A, Weekers. F, Thonart. P, Hiligsmann. S (2015a) Effect of iron nanoparticles synthesized by a sol-gel process on *R. ery.T902.1* for biphenyl degradation. *J. Water. Res. Prot.* 7: 264–277.
- Wannoussa. W, Hiligsmann. 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 *R. ery.T902.1*. *Sol. Gel. Sci. Technol.* 75: 235–245.
- Wannoussa. W, Hiligsmann. S, Tasseroul. L, Lambert. SD, Heinrichs. B, Masy. T, Weekers. F, Lavigne. B, Delvigne. F, Jacques. P, Thonart P (2015c) Amélioration de la biodégradation du biphenyle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de Fe₂O₃ et de nanoparticules de fer encapsulées dans un xérogel de silice. *J. Déch. Sci. Tec.* N° 69.

- Wannoussa. W, Hiligsmann. S, Tasseroul. L, Lambert. SD, Heinrichs. B, Masy. T, Delvigne F, Jacques P and Thonart P (2015d) Biphenyl biodegradation enhancement by *Rhodococcus erythropolis* T902.1 with FeCl₃ and iron nanoparticles encapsulated in porous silica. *J. Environ. Sci. Pollu. Res* (soumis).
- Warner. PJ, Williams, PH, Bindereif. A, Neilands. JB (1982) ColV plasmid-specific aerobactin synthesis by invasive strains of *Escherichia coli*. *Infec. Immu.* 33: 540–545.
- Watanabe, K (2001) Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 237–241.
- Weaver. WC, Simmons. PB, Thompson. QE (1979) Diphenyl and terphenyls. In: Grayson, M. (Ed.), Kirk– Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. *J. Wiley. New. York.* 782–793.
- Weekers. F, Jacques. P, Springael. D, Mergeay. M, Diels. L, Thonart. P (1999) Improving the catabolic functions of desiccation-tolerant soil bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77: 251–266.
- Weekers. F, Jaques. P, Springdael. D, Mergeay. M, Diels. L, Thonart. P (1994) Effect of drying and long term conservation on bioremediation properties of *Rhodococcus erythropolis*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 62/4b.
- Wei. G, Yu. J, Zhu. Y, Chen. W, Wang. L (2008) Characterization of Phenol degradation by *Rhizobium* Sp. CCNWTB 701 isolated from astragalus chrysopteru in mining tailing region. *J. Hazard. Mater.* 151: 111–117.
- Wei G, Yu J, Zhu Y, Chen W, Wang L (2008) Characterization of Phenol degradation by *Rhizobium* Sp. CCNWTB 701 isolated from astragalus chrysopteru in mining tailing region. *J. Hazard. Mater.* 151:111–117
- Wiegel. J and Wu. Q (2000) Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 32: 1–15.
- Winkelmann, G (2007) Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometal.* 20: 379–392.
- Wong. SW, Leung. PT, Djurisić. AB, Leung. KM (2010) Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: Influences of aggregate size and ion solubility. *J. Anal. Bioanal. Chem.* 396: 609–618.
- Wu. M, Chen. L, Tian. Y, Ding. Y, Dick. WA (2013) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environ. Pollut.* 178: 152–158.

X

Y

Yamashita. S, Satoi. M, Iwasa. Y, Ohtake. H (2007) Utilization of hydrophobic bacterium *Rhodococcus opacus* B-4 as whole-cell catalyst in anhydrous organic solvents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 761-767.

Yamashita. S, Satoi. M, Iwasa. Y, Honda. K, Sameshima. Y, Omasa. T, Kato. J, Yeom. SH and Yoo. YJ (1997) Overcoming the inhibition effects of metal ions in the degradation of Benzene and Toluene by *Alcaligenes xylosoxipans* Y234. *J. Chem. Eng.* 14: 204–208.

Yoo. J-Y, Choi. J, Leer. T, Park. J-W (2004) Organobentonite adsorption and degradation of phenol in the presence of heavy metals. *Water. Air. Soil. Pollut.* 154: 225–237.

Yoshikawa. O, Ishii. Y, Koizumi. I, Ohshiro. T, Izumi. Y, Maruhashi. K (2002) Enhancement and Stabilization of Desulfurization Activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by Feeding Ethanol and Sulfur Components. *J. Biosc. Bioeng.* 94: 447–452.

Z

Zaki, S (2006) Detection of meta- and ortho-cleavage dioxygenases in bacterial phenol-degraders. *J. Sci. Environ. Mgt.* 10: 75–81.

Zhai. HJ, Sun. DW, Wang. HS (2006) Catalytic properties of silica/silver nanocomposites. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 1968–1972.

Zhai. Y, Zhang. S, Pang. H (2007) photocatalytic activity of CeO₂ nanocrystalline using ammonium bicarbonate as precipitant. *J. Mater. Lett.* 61: 1863–1866.

Zhang, WX (2003) Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *J. Nanopart. Res.* 5: 323–332.

Zhang. YM, Maier. WJ, Miller. RM (1997) Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2211–2217.

Zhang. T and Ma. J (2008) Catalytic ozonation of trace nitrobenzene in water with synthetic goethite. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 279: 82–89.

Zheng. ZM and Obbard .JP (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbon removal from soil by surfactant solubilization and Phanerochaete chrysosporium oxidation. *J. Environ. Qual.* 31: 1842–1847.

European Food Safety Authority: www.efsa.eu.int/

Site du National Institute of Standards and Technology (NIST), WebBook de chimie: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>, consulté le 2/12/2012.

<http://www.be.total.com/content/fr/etrochimie/etrochimie-Total.aspx>, consulté le 9/03/2013

<http://webbook.nist.gov/chemistry>

www.efsa.eu.int/

DPD: Drug Product Database. 2013. Ottawa: Health Canada. Access: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/databasdon/index-fra.php>. Accessed 28 May 2013

[PISSC] Programme international sur la sécurité des substances chimiques. 1999. Biphenyl. [consulté en novembre 2009]. Accès : <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad06.htm>