

## Recherche de souches pures présentant un potentiel pour la dégradation de polluants de nature phénolique

**Préalable** : analyse des risques liés aux manipulations proposées. Cette analyse devra apparaître dans le compte-rendu.

### 1 Description des caractéristiques des souches recherchées

On recherche des micro-organismes susceptibles d'intervenir dans un processus biologique aérobie visant à biodégrader des pollutions au phénol. On s'oriente a priori vers la recherche de micro-organismes du sol présentant l'équipement enzymatique de catabolisme aérobie du phénol à l'état inductible.

### 2 Mode opératoire d'enrichissement

Le phénol est un toxique très puissant (déstructure les membranes et dénature les protéines). Il est raisonnable de supposer de la part des souches des capacités d'adaptation au phénol : adaptations membranaires, adaptations au niveau de la paroi .... On ne peut a priori pas envisager de dépasser une concentration de 0,1 à 0,2% (w/v) en phénol dans les milieux de culture (valeur obtenue d'après les données de la littérature, cf. bibliographie).

**Attention**, le travail à réaliser implique d'utiliser une solution mère de phénol. Cette solution doit être préparée en respectant les règles de sécurité nécessaires, par une personne qualifiée, dans des conditions adéquates (Valeur limite d'exposition = 19 mg/m<sup>3</sup>). 50 mL de solution mère à 8 g/L (0,8 %) sont convenables. Ne jamais autoclaver une solution phénolique. Ne manipuler la solution phénolique diluée à 0,8 % qu'après formation à son usage par l'enseignant responsable et sous son contrôle. (<http://www.inrs.fr> fiche toxicologique phénol , ft15.pdf (1997))

4 milieux liquides sont nécessaires (voir le tableau de préparation du paragraphe 6):

- F1 = liquide synthétique minéral complet stérile + succinate stérile 0,1% + phénol 0,005% ;
- F2 = liquide synthétique minéral complet stérile + succinate stérile 0,1% + phénol 0,02% ;
- F3 = liquide synthétique minéral complet stérile + succinate stérile 0,002% + phénol 0,04% ;
- F4 = liquide synthétique minéral complet stérile + phénol 0,08%.

On essaie de travailler avec des échantillons de sols pollués. L'enrichissement est réalisé en fioles aérées, agitées, sous faible hauteur de milieu et à température ambiante :

- 5g de sol échantillon dans 45 mL d'eau stérile et on agite et on décante ;
- on introduit (J1) alors 5 mL de phase liquide dans 25 mL de milieu F1 et on incube 2 jours ;
- on reprend alors 5 mL (J3) de cette culture F1 dans 25 mL de milieu F2 et on incube 3 jours ;
- on reprend alors 5 mL (J6) de cette culture F2 dans 25 mL de milieu F3 et on incube 2 jours ;
- on reprend alors 5 mL (J8) de cette culture F3 dans 25 mL de milieu F4 et on incube 2 jours.

**Compte-rendu** : discuter la stratégie d'enrichissement proposée.

### 3 Primo isolement

**J10**

Isoler le résultat de la culture F4 sur le milieu agarosé I1. Incuber quelques jours à température ambiante.

Milieu I1 = liquide synthétique minéral complet stérile + phénol 0,02%. + agar 15 g/L coulé en boîte de Pétri. (Voir le tableau de préparation du paragraphe 6).

### 4 Purification d'une souche

**J15**

Purifier une souche pure à partir d'une colonie et d'une seule obtenue lors du primo-isolement. Cultiver 48 heures à température ambiante °C.

Compte rendu : justifier le milieu de culture choisi pour l'étape de purification.

## 5 Conservation en attente d'études ultérieures suivants

A partir d'une colonie isolée, mettre en culture aérée agitée en bouillon. Après 6 à 18 heures, mettre en oeuvre une technique de conservation de la souche en milieu glycérolé à 20% ou sur cryobilles en milieu glycérolé et à -20°C ou -70°C. La souche ainsi conservée pourra être reprise pour caractérisation ultérieure (identification).

## 6. Tableau de préparation des milieux (pour 4 séries de milieux F et 15 primo-isolements)

	Milieu F1	Milieu F2	Milieu F3	Milieu F4	Milieu I1
milieu liquide de Vinogradsky sans azote (voir note 1)	120 mL	120 mL	120 mL	120 mL	-
Agar en surfusion (48°C) de Vinogradsky sans azote (voir note 1)	-	-	-	-	300 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 20%	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	3 mL
On obtient ainsi la base liquide synthétique minérale complète					
Succinate 10%	mL	mL	mL	-	-
Phénol 0,8 % (toxique, voir note 2)	mL	mL	mL	mL	mL
	Répartir en 4 fois 30 mL	Répartir en 4 fois 30 mL	Répartir en 4 fois 30 mL	Répartir en 4 fois 30 mL	Couler 15 boîtes de Pétri

Note 1 : on utilise une base minérale concentrée de Vinogradsky sans azote : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50g/L, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 25 g/L, NaCl 25 g/L, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1,0 g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 1g/L, MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O 1g/L, pH 7,2. On prépare alors le milieu liquide de Vinogradsky sans azote par : 5 mL de base minérale synthétique + 0,1 g de CaCO<sub>3</sub> + qsp 1 litre puis autoclavage. (Agar à 14g/L si milieu agarosé).

Note 2 : Ne manipuler la solution phénolique diluée à 0,8 % qu'après formation à son usage par l'enseignant responsable et sous son contrôle. Valeur limite d'exposition = 19 mg/m<sup>3</sup>. Volume de solution à 0,8% disponible = 50 mL (plafond). (<http://www.inrs.fr> fiche toxicologique phénol , ft15.pdf (1997)).

### Bibliographie :

- J. Pelmont, *Bactéries et environnement*, PUG éditeur, (1994).
- <http://www.inrs.fr> fiche toxicologique phénol , ft15.pdf (1997)
- G Molin and I Nilsson ; *Degradation of phenol by Pseudomonas putida ATCC 11172 in continuous culture at different ratios of biofilm surface to culture volume ; Appl Environ Microbiol. 1985 October; 50(4): 946-950.*
- H J Heipieper, R Diefenbach, and H Keweloh ; *Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading Pseudomonas putida P8 from substrate toxicity ; Appl Environ Microbiol. 1992 June; 58(6): 1847-1852.*
- Grit Neumann, Riho Teras, Liis Monson, Maia Kivisaar, Frieder Schauer, and Hermann J. Heipieper ; *Simultaneous Degradation of Atrazine and Phenol by Pseudomonas sp. Strain ADP: Effects of Toxicity and Adaptation ; Applied and Environmental Microbiology, April 2004, p. 1907-1912, Vol. 70, No. 4*