

## 79

### ÉTUDE DES LIENS TROPHIQUES AU SEIN D'UNE COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE SÉLECTIONNÉE A PARTIR D'UN SÉDIMENT MARIN SUR LE CYCLOHEXÈNE-4 DICARBOXIMIDE-1,2 (THPI)

G. TERROM\*, G. GIL\*\* et J. LE PETIT\*

\* Laboratoire de Microbiologie

\*\* Laboratoire de Synthèse Organique - L.A. 109

Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme, rue H.-Poincaré, 13397 MARSEILLE  
Cedex 13. (FRANCE)

**RÉSUMÉ** - Une communauté bactérienne a été sélectionnée, à partir d'un sédiment marin, sur le THPI ou cyclohexène-4 dicarboximide-1,2 (fongicide). Elle est composée d'une souche "principale", *Photobacterium mandapamensis*, qui dégrade le THPI par diverses voies métaboliques dont plusieurs nécessitent des séquences co-oxydatives et de huit souches "auxiliaires" qui interviennent à des niveaux divers le long de la chaîne trophique ainsi créée par la souche principale. Les souches "auxiliaires" permettent l'élimination de composés qui s'accumulent en leur absence dans le milieu de culture et provoquent ainsi une augmentation de la vitesse et de l'intensité de la dégradation du THPI.

**Mots clés** : mer, fongicide, biodégradation, communauté bactérienne.

**ABSTRACT** - A bacterial community has been selected from a marine sediment on 4-cyclohexene-1,2 dicarboximide or THPI (fungicide). This community consists of nine strains. The "principal" strain, *Photobacterium mandapamensis*, degrades THPI by different metabolic pathways many of which require co-oxidative sequences. The other eight "auxiliary" strains occur at different states along the trophic chain formed by the "principal" strain, so increasing velocity and intensity of the THPI biodegradation.

**Key words** : sea, fungicide, biodegradation, bacterial community.

### INTRODUCTION

Les dérivés du cis tétrahydro-1,2,3,6-phthalimide (THPI) sont des composés très utilisés dans le monde agricole en tant que fongicides. Si le THPI lui-même ne possède pas les effets cancérigènes et mutagènes de ses dérivés N-substitués, il est caractérisé par des effets toxiques non négligeables (Lukens et Sisler, 1958 ; Bridge, 1975). Sa stabilité chimique dans les conditions du milieu naturel ainsi que sa résistance à l'action bactérienne pourraient être dues à la présence de liaisons de type imide cyclique comme dans le cas du Lénacil, un pesticide dont la structure est comparable à celle du THPI (Trudgill, 1978). Il en résulte une biodégradation lente et une accumulation dans le milieu naturel.

Le THPI est présent en quantité importante dans un effluent industriel destiné à être traité par voie microbiologique avant son rejet en mer. La composition saline de cet effluent se rapprochant notablement de celle de l'eau de mer, la dégradation du THPI a été étudiée en utilisant une communauté bactérienne sélectionnée à partir d'un sédiment marin. Ce

travail a eu pour but la détermination des voies métaboliques pouvant être suivies dans la dégradation bactérienne du THPI et des relations existant entre les différents membres de la communauté bactérienne adaptée à ce substrat.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

La sélection de la communauté bactérienne étudiée a été faite à partir d'un sédiment marin prélevé dans l'étang de Berre (France). Une présélection a d'abord été faite en incubant le sédiment en présence de 5 % de l'effluent industriel dans le milieu de Le Petit *et al.* (1975) ; la stabilisation de la communauté a été réalisée ensuite en présence de THPI ajouté au même milieu à des concentrations variant de 0,1 à 2 grammes/litre.

Les souches bactériennes constituant la communauté ont été isolées sur milieu trypticase + phytone (Mérieux) gélosé, préparé avec de l'eau de mer. Elles ont été déterminées à l'aide du système API 20 B complété par les tests morphologiques et biochimiques nécessaires. L'identification des souches a été faite selon la méthode décrite par Baleux (1977) en utilisant le Bergey's Manual (Buchanan and Gibbons, 1974) et le Handbook of Prokaryotes (Starr *et al.*, 1981).

Les cinétiques de dégradation du THPI (0,250 g/l) et du THPA (1g/l) ont été réalisées en cultures proliférantes sur milieu trypticase + phytone. Elles ont permis de mettre en évidence l'apparition progressive de produits de métabolisme. Ceux-ci ont été déterminés après action de cellules non proliférantes mises en suspension dans une eau de mer synthétique (Burkholder, 1963) tamponnée avec du tampon Tris-HCl (0,1 M- pH 7,2) et additionnée de 1 g/l de THPI ou de THPA. L'incubation était faite dans un réacteur thermostaté à 30° C permettant l'agitation et l'aération, la régulation du pH étant assurée ( $7,1 \pm 0,1$ ) à l'aide d'un pH-stat Metrohm. Après disparition de 75 % du substrat initial, le milieu de culture et les cellules étaient séparés par centrifugation et les cellules détruites par sonication. L'extraction à l'éther éthylique, après acidification, permettait d'obtenir ainsi 2 extraits qui étaient analysés séparément. Les analyses chimiques ont été réalisées par chromatographie phase vapeur capillaire couplée à un spectromètre de masse, chromatographie liquide haute pression et infra-rouge. Les composés de référence provenaient soit du commerce soit de synthèse, leur structure étant alors déterminée par résonance magnétique nucléaire  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .

## RÉSULTATS

La communauté bactérienne stabilisée est composée de 9 souches qui ont reçu toutes un nom de genre et certaines un nom d'espèce : *Alcaligenes pacificus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp. 2*, *Photobacterium mandapamensis*, *Photobacterium leiognati*, *Photobacterium sp.*, *Vibrio logei*, *Vibrio fisheri* (Bianchi, 1976).

Les études préliminaires ont montré que seul *Photobacterium mandapamensis*, dite souche "principale" est capable de provoquer la disparition du THPI. Cependant, si après son isolement cette souche pouvait utiliser ce substrat comme source unique de carbone, pour une cause encore non déterminée elle a très rapidement perdu cette propriété et par la suite a nécessité, pour réaliser les mêmes réactions, la présence d'une deuxième source de carbone et d'énergie telle que l'acétate ou une substance protéique.

La comparaison des activités de dégradation du THPI (fig. 1) et du diacide correspondant, le THPA, (fig. 2) en milieu trypticase + phytone de cellules proliférantes de *Photobacterium mandapamensis* et de la communauté bactérienne montre que celle-ci est beaucoup plus efficace. L'allure des courbes obtenues avec *P. mandapamensis* permet de concevoir un processus de saturation qui fait tendre le taux de dégradation vers un seuil

limite qui pourrait correspondre à une accumulation de produits intermédiaires ou de fin de métabolisme excrétés dans le milieu de culture. Ces substances, en s'accumulant, deviennent inhibitrices de la biodégradation comme dans tout processus catabolique. L'analyse chimique du milieu de culture, après 72 heures d'incubation, a montré en effet une accumulation importante de ces produits avec *P. mandapamensis* alors qu'ils sont indécélables avec la communauté bactérienne.

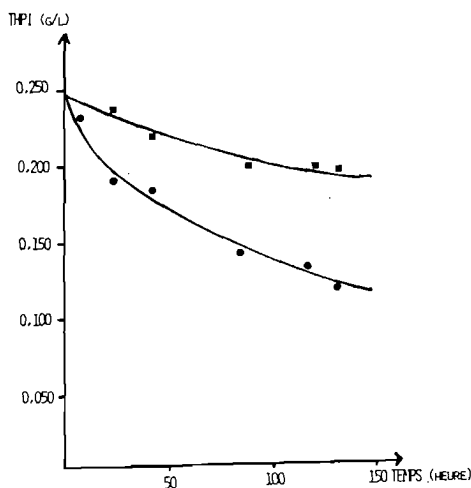


Figure 1 : Cinétique comparée de la dégradation du THPI par :  
 1 - *Photobacterium mandapamensis*  
 2 - La communauté bactérienne

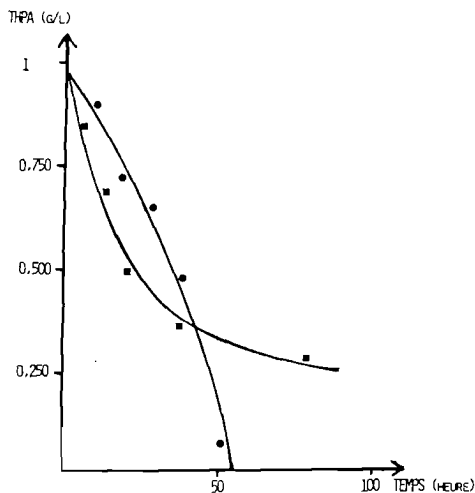


Figure 2 : Cinétique comparée de la dégradation de l'acide cyclohexène-4 cis, dicarboxylique-1,2 (THPA) par :  
 1 - *Photobacterium mandapamensis*  
 2 - La communauté bactérienne

Ces cinétiques ont également montré que les produits de métabolisme libérés dans le milieu de culture sont strictement les mêmes avec le THPI ou le TPHA.

Le schéma métabolique proposé pour la dégradation du THPI par *P. mandapamensis* (fig. 3) a été établi à partir des cinétiques de dégradation du THPI et du TPHA et en utilisant des cellules non proliférantes obtenues par culture sur milieu trypticase + phytone en présence de 0,020 g/l de THPI ou de TPHA, additionnés alors à des concentrations susceptibles de provoquer les inductions enzymatiques éventuellement nécessaires.

Les tableaux 1 et 2 démontrent que la souche "principale" est bien la seule capable de réaliser les deux premières séquences de la dégradation du THPI. Ils confirment le rôle important des souches "auxiliaires" dans la dégradation du THPI, résultat déjà mis en évidence par les figures 1 et 2. Ils montrent ainsi que *Staphylococcus sp.1* est plus performant que *P. mandapamensis* dans la dégradation du TPHA et que chacune des souches "auxiliaires", à l'exception de *Streptococcus sp.*, est capable de métaboliser au moins l'un des intermédiaires métaboliques identifiés dans le schéma de dégradation du THPI par *P. mandapamensis*. *Streptococcus sp.* qui se maintient cependant dans la communauté doit donc utiliser les acides volatils de fin de métabolisme ou d'autres composés non encore identifiés ou consommer les intermédiaires connus en présence d'un substrat de co-oxydation.

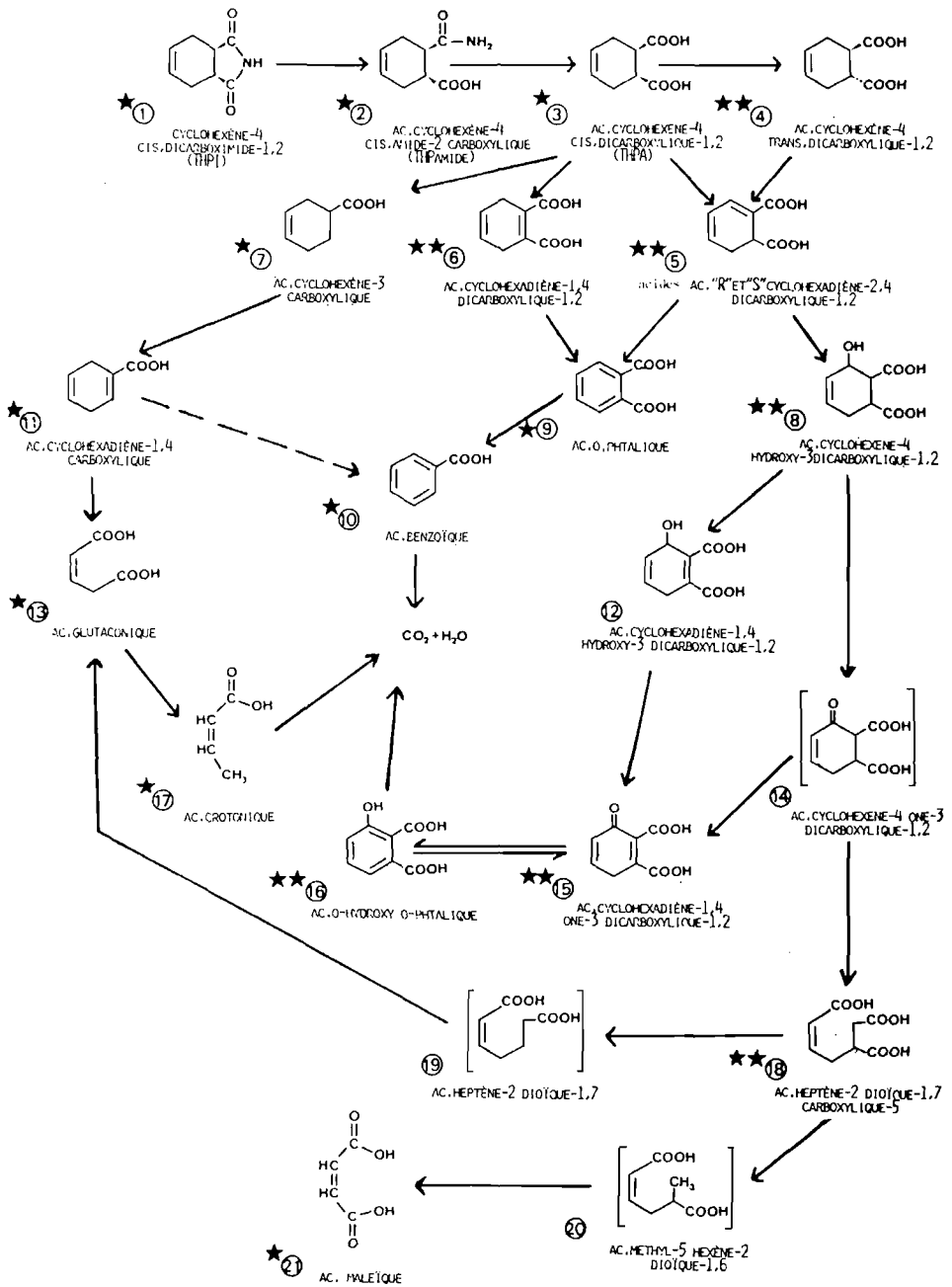


Figure 3 : Schéma métabolique proposé pour la dégradation du THPI par *Photobacterium mandapamensis*. (Voir noms des composés dans l'annexe)

\* Composé caractérisé par chromatographie liquide haute pression

\*\* Composé caractérisé par spectrométrie de masse

[ ] Intermédiaire métabolique vraisemblable mais non identifié

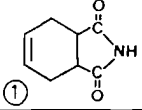
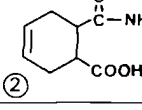
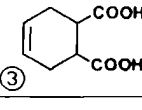
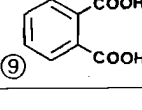
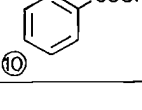
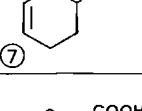
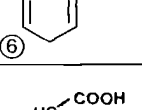
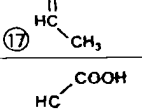
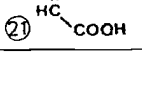
	Photobactérium Mandapamensis	Staphylococcus SP.1	Streptococcus SP.	Vibrio Fisheri	Staphylococcus SP.2	Vibrio Logei	Photobactérium Leiognati	Photobactérium SP.	Alcaligenes Pacificus	Communauté Bactérienne
① 	★ 18 %	★ —	★ —	★ —	★ —	★ —	★ —	★ —	★ —	★ 42 %
② 	★ 32 %	★ —	★ —	★ —	★ —	★ —	★ —	★ —	★ —	★ 100 %
③ 	★ 62 %	95 %	—	—	—	17 %	—	—	—	★ 100 %
⑨ 	★ 12 %	—	—	100 %	—	98 %	100 %	—	—	100 %
⑩ 	—	—	—	100 %	—	55 %	100 %	—	—	100 %
⑦ 	—	—	—	—	—	—	98 %	—	—	30 %
⑥ 	—	—	—	80 %	—	60 %	68 %	14 %	—	95 %
⑰ 	★ 21 %	—	—	100 %	40 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
⑳ 	—	—	—	93 %	—	—	100 %	—	—	100 %

Tableau 1 : Activité des diverses souches de la communauté bactérienne sur les substrats reconnus comme intermédiaires métaboliques de la dégradation du THPI par *Photobacterium mandapamensis*. (Résultats exprimés en % de dégradation)

\* Dégradation en présence d'un substrat de co-oxydation

-- Résultat négatif : essai non encore réalisé en présence d'un substrat de co-oxydation

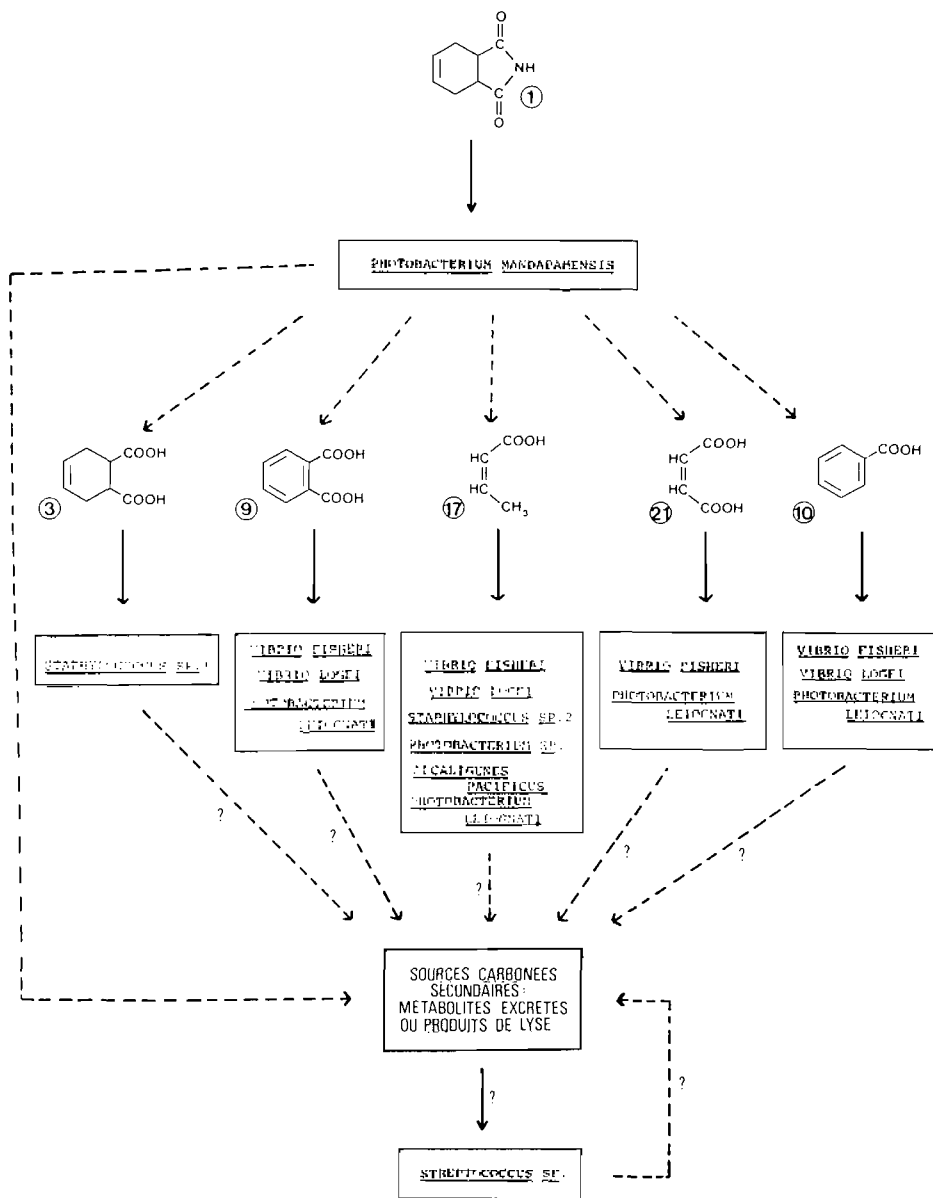


Tableau 2 : Rôle vraisemblable des différentes souches de la communauté bactérienne dans la dégradation du THPI.

(Détermination des souches : système API 20 B, Bergey's manual 8<sup>e</sup> Ed., The prokaryotes de Starr *et al.*)

— Substance consommée par

----- Substance rejetée par

1 - Cyclohexène-4 cis,dicarboximide-1,2 (THPI). 2 - Acide cyclohexène-4 cis,amide carboxylique (THPa-mide). 3 - Acide cyclohexène-4 cis, dicarboxilique-1,2 (THPA). 4 - Acide cyclohexène-4 trans,dicarboxylique-1,2. 5 - Acides "R" et "S" cyclohexadiène-2,4 dicarboxylique-1,2. 6 - Acide cyclohexadiène-1,4 dicarboxylique-1,2. 7 - Acide cyclohexène-3 carboxylique. 8 - Acide cyclohexène-4 hydroxy-3 dicarboxylique-1,2. 9 - Acide O-phthalique. 10 - Acide benzoïque. 11 - Acide cyclohexadiène-1,4 carboxylique. 12 - Acide cyclohexadiène-1,4 hydroxy-3 dicarboxylique-1,2. 13 - Acide glutaconique. 14 - Acide cyclohexène-4 one-3 dicarboxylique-1,2. 15 - Acide cyclohexadiène-1,4 one-3 dicarboxylique-1,2. 16 - Acide O-hydroxy O-phthalique. 17 - Acide crotonique. 18 - Acide heptène-2 dioïque-1,7 carboxylique-5. 19 - Acide heptène-2 dioïque-1,7. 20 - Acide méthyl-5 hexène-2 dioïque-1,6. 1 - Acide maléique

## CONCLUSION

La communauté bactérienne sélectionnée sur THPI correspond à la communauté de classe 5 selon Slater (1981). Celle-ci est caractérisée par le fait qu'une population primaire peut, en se développant sur un substrat facilement métabolisable tel que l'acétate ou le mélange trypticase + phytone utilisé dans ce travail, co-oxyder une substance xénobiotique telle que le THPI, produisant ainsi un support de croissance à d'autres populations qui évitent ainsi l'accumulation de composés issus du métabolisme de la population primaire.

Ce travail aboutit à des résultats identiques à ceux obtenus par Daughton et Hsieh (1977) avec le parathion qui est co-oxydé par une souche de *Pseudomonas stutzeri*. Le p-nitro-phénol, ainsi libéré, est consommé par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* et ne s'accumule pas dans le milieu de culture. Il met en évidence l'importance des phénomènes de co-oxydation et de co-métabolisme dans la dégradation de composés xénobiotiques tels que le THPI.

---

BALEUX B., 1977. A computer study of the evolution of aerobic heterotrophic bacterial populations in sewage and river waters. *Microbial Ecology*, 4, 53-65.

BIANCHI M., 1976. Étude taxonomique et distribution écologique des bactéries vibrioïdes du milieu marin. *Thèse Doct. État, Université Aix-Marseille II*.

BRIDGE B.A., 1975. The mutagenicity of captan and related compounds. *Mutat. Res.* 32, 3-34.

BUCHANAN R. E. and GIBBONS N. E., 1974. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, 8th Ed. Williams and Wilkins (Ed.), Baltimore

BURKHOLDER P. R., 1963. Some nutritional relationships among microbes of sea sediments and waters. p. 133-152. In: "*Marine Microbiology*" (*Symposium of Marine Microbiology*). Oppenheimer Ed., Thomas Publ.

DAUGHTON C. G. and HSIEH D. P., 1977. Parathion utilization by bacterial symbionts in a chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 175-184.

LE PETIT J., BLERAND J. C., NGUYEN M. H. et TAGGER S., 1975. Étude taxonomique et physiologique de bactéries se développant sur hydrocarbures en milieu marin. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur, Paris)*, 126 A, 367-380.

LUKENS R. J. and SINFEL H. D., 1958. Chemical reactions involved in the fungitoxicity of captan. *Phytopathology*, 48, 235-244.

SLATER J. H., 1981. Mixed cultures and Microbial communities. p. 1-24. In: "*Mixed culture fermentations*" Bushell M. E. and Slater J. H. Ed., Academic Press Publ. London.

STARR M.P., STOLP H., TRUPER H.G., BALOWS A. and SCHLEGEL H.G., 1981. The Procaryotes. A Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer Verlag Ed. Berlin.

TRUDGILL P.W., 1978. Microbial degradation of alicyclic hydrocarbons. P. 47-84. In: "*Developments in biodegradation of hydrocarbons-1*". Watkinson R.J. Ed. Applied Science Publ. Ripple Road, Barking, Essex, England.