

Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Mention : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Composition et fonctionnement d'une communauté microbienne au sein d'un drainage minier acide : Approches culturelles et fonctionnelles

Présentée par :
François Delavat

Soutenue publiquement le 05/10/2012

Composition du jury

Mme Valérie Geoffroy (Université de Strasbourg)	Rapporteur interne
M. Alain Dufour (Université de Bretagne Sud)	Rapporteur externe
M. Pascal Simonet (Université de Lyon)	Rapporteur externe
Mme Marie-Claire Lett (Université de Strasbourg)	Directrice de thèse
M. Didier Lièvremont (Université de Strasbourg)	Membre invité

Équipe Écophysiologie Moléculaire des Micro-organismes
Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie
UMR7156 CNRS et Université de Strasbourg
28, rue Goethe, 67000 Strasbourg (France)

REMERCIEMENTS

Me voici à l'embouchure d'un long fleuve tortueux, celui qui a mené à écrire ce manuscrit. Le long du cours d'eau, de nombreuses personnes m'ont aidé, soutenu, et ont navigué avec moi. Au bout du fleuve, la mer, d'innombrables chemins, autant de destinations. Aujourd'hui, je tiens en ces quelques lignes à exprimer ma reconnaissance envers ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à ce périple.

Merci aux commandants de bord, Serge Potier et Philippe Bertin, qui m'ont permis de monter à bord du navire GMGM, équipage EM².

Merci à tous les membres d'équipage (les deux Florence, Frédéric, Sandrine, Audrey, Jessica, Marie, David et Jérémy, mais aussi l'ensemble des autres membres du navire, notamment M. Kammerer) pour leur aide sur le ponton. À Vincent Phalip et Anne Forster, mais aussi aux stagiaires (Kévin, Lisa et Daphné) qui sont ponctuellement montés à bord pour m'aider aux manœuvres. À Lucie, plus qu'un mousse, une amie qui m'a soutenu.

Un grand merci aux capitaines Didier et Marie-Claire, qui ont tenu la barre lors d'avis de tempête, mais qui m'ont laissé prendre le cap durant ces 3 dernières années.

Un énorme MERCI à mes parents, qui m'ont donné la chance de naviguer sur le fleuve que j'ai choisi, mais qui surtout avaient toujours un œil attentif et bienveillant sur la direction prise et sur la santé du petit matelot.

Un merci tout particulier à Aurélie, pour m'avoir essuyé le front, avoir pansé mes blessures et tiré la corde avec moi en toutes circonstances.

Enfin, merci aux membres du jury pour avoir accepté l'évaluation de ce travail de thèse, dernière écluse avant de se jeter dans la mer

TABLE DES MATIERES

PARTIE 1 : PRÉSENTATION DU SUJET.....	15
A. Étude d'une communauté microbienne : les grandes avancées	21
I. <i>Historique de l'écologie microbienne</i>	21
a. Diversité et impact des micro-organismes	21
b. Découverte des micro-organismes	22
c. Débuts de l'écologie microbienne	23
d. Découverte des limites des approches culturelles	25
II. <i>Avènement de l'ère moléculaire en laboratoire</i>	27
a. Classification phylogénétique par analyse du gène codant l'ARNr 16S.....	27
b. Approches globales sur des bactéries cultivées	27
III. <i>De la structure au fonctionnement in situ d'une communauté</i>	28
a. Métagénomique descriptive ciblée.....	28
b. Métagénomique fonctionnelle ciblée	30
c. Métagénomique descriptive globale.....	31
d. Méta -omique fonctionnelle	33
IV. <i>Conclusion</i>	34
B. Limites des techniques moléculaires	36
I. <i>Introduction</i>	36
II. <i>Extraction du matériel d'étude</i>	36
a. Stabilité de l'ADN exogène au sein d'une matrice.....	36
b. Influence du protocole de lyse cellulaire.....	37
c. Impact sur la compréhension de la structure et du fonctionnement d'une communauté.....	39
III. <i>Biais liés à l'amplification par PCR</i>	39
a. Introduction	39
b. Amorces « universelles ».....	40
c. ADN « difficile ».....	41
d. Quantité d'ADN matrice.....	41

IV. Conclusion	42
C. Nouvelles techniques de culture	44
I. Introduction	44
II. Approches « classiques » améliorées	45
a. Introduction	45
b. Modification de la concentration en nutriments.....	46
c. Définition du milieu en fonction des conditions <i>in situ</i>	47
d. Augmentation du temps d'incubation	47
e. Ajout de molécules de signal.....	48
III. Co-culture.....	49
a. Introduction	49
b. Efficacité de la co-culture.....	49
IV. Techniques « récentes ».....	52
a. Introduction	52
b. Chambres de diffusion.....	52
c. Soil Substrate Membrane System (SSMS).....	53
d. Approches à haut débit.....	55
D. La communauté bactérienne	57
I. Introduction	57
II. La notion d'espèce.....	58
a. Définition.....	58
b. Notion d'espèce chez les procaryotes.....	58
III. Biosphère rare.....	60
a. Notion de biosphère rare	60
b. Activité de la biosphère rare.....	61
IV. Variation temporelle dans une communauté microbienne	62
a. Introduction	62
b. Variation journalière.....	63
c. Variation annuelle	64
d. Variations à long terme.....	65

e.	Influence de ces variations	66
V.	<i>L'hypothèse : « Everything is everywhere, but the environment selects »</i>	67
a.	Histoire de cette hypothèse.....	67
b.	Observations récentes.....	67
E.	Les drainages miniers acides et l'arsenic.....	70
I.	<i>Introduction</i>	70
a.	Choix du site d'étude	70
b.	Caractéristiques des drainages miniers acides.....	70
II.	<i>L'arsenic</i>	71
a.	Généralités.....	71
b.	Toxicité	72
c.	Arsenic et micro-organismes	73
III.	<i>Site de Carnoulès</i>	76
a.	Présentation du site.....	76
b.	Diversité microbienne dans l'eau de Carnoulès	77
c.	Diversité microbienne dans les sédiments de Carnoulès	78
d.	Analyses physiologiques et génomiques en conditions de laboratoire.....	79
e.	Approche méta-protéogénomique	81
PARTIE 2 :	OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	85
PARTIE 3 :	PRINCIPAUX RÉSULTATS	91
A.	Approches culturelles	93
I.	<i>Métagénomique inverse</i>	93
a.	Principe.....	93
b.	Application à Carnoulès.....	95
c.	Mise au point des milieux de culture	96
d.	Résultats obtenus.....	98
II.	<i>Diversité bactérienne cultivée à Carnoulès par des approches culturelles et conséquences</i>	101
a.	Article 1 accepté dans Biology Direct.....	101
b.	Discussion et conclusions	132

III. <i>Caractérisation taxonomique d'un nouveau genre inféodé aux milieux extrêmes</i>	135
a. Introduction.....	135
b. Article 2 à soumettre dans Systematic and Applied Microbiology.....	136
c. Discussion et conclusions.....	152
B. Approches fonctionnelles.....	153
I. <i>Recyclage de la matière organique complexe à Carnoulès</i>	153
a. Introduction.....	153
b. Article 3 paru dans Microbial Cell Factories.....	154
c. Discussion et conclusions.....	166
II. <i>Criblage fonctionnel de l'ADN métagénomique de Carnoulès</i>	167
a. Introduction.....	167
b. Article 4 paru dans Scientific Reports.....	168
c. Discussion et conclusions.....	175
PARTIE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	177
PARTIE 5 : ANNEXES.....	187
A. Protocole de FISH utilisé.....	189
B. Un nouveau fournisseur de matière organique dans les milieux extrêmes.....	192
C. Découverte de nouvelles amylases dans un milieu extrême.....	195
D. Book chapter: "Remediation using arsenite-oxidizing bacteria" (CRC Press 2012).....	197
PARTIE 6 : BIBLIOGRAPHIE.....	213
A. Références.....	215
B. Publications et communications.....	232

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Girolamo Fracastoro 1484-1553. Image extraite de (Haas, 1991)..... 22
- Figure 2 : Possiblement la première représentation de bactéries et de leur mobilité, par Antonie Van Leeuwenhoek (Dunn and Jones, 2004)..... 23
- Figure 3 : Nombre de séquences de gènes codant l'ARNr 16S dans les banques de données (données 2010 : <http://rdp.cme.msu.edu>) 30
- Figure 4 : Reconstruction de 2 génomes quasi complets à partir d'ADN métagénomique issu d'un drainage minier acide. Les potentialités génétiques de *Leptospirillum* (en haut) et *Ferroplasma* (en bas) sont retrouvées dans ce schéma (Tyson et al., 2004). 33
- Figure 5 : Analyse en composantes principales de la diversité bactérienne récupérée en fonction des protocoles d'extraction utilisés (Delmont et al., 2011) Chaque groupe encerclé représente une série d'expériences présentant un profil de diversité RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) proche. Il est donc observé que ce profil est dépendant du protocole utilisé pour l'extraction d'ADN..... 38
- Figure 6 : Nombre d'UFC par boîte en fonction du temps d'incubation. Le nombre d'UFC augmente régulièrement avec le temps, jusqu'à un temps d'incubation de 12 semaines (Janssen et al., 2002)..... 48
- Figure 7 : Test de co-culture pour cultiver KLE1104. *E. coli* est utilisée comme souche helper, tandis que l'utilisation de différents mutants ou l'ajout d'entérobactine montrent que la souche KLE1104 a besoin d'un sidérophore (sécrété par *E. coli* ou déposé sous forme d'entérobactine) pour se développer sur boîtes (D'Onofrio et al., 2010). 51
- Figure 8 : Mise en place du SSMS. Le sol est déposé dans la cellule TCI (Tissue Culture Inserts) qui est retournée. L'inoculum filtré sur une 2^e membrane est ensuite déposé sur cette cellule TCI et le sol sert de milieu de culture par diffusion (Ferrari et al., 2005). 54
- Figure 9 : Représentation du nombre de taxons en fonction de l'abondance. Le nombre d'espèces retrouvées à faible abondance est très important tandis que le nombre d'espèces retrouvées à forte abondance est faible. En bleu, les données d'un drainage minier acide, en rouge, du plancton marin et en jaune du sédiment. Les flèches noires correspondent aux possibilités de détection des bactéries rares en fonctions de la limite de détection de la méthode utilisée (Fuhrman, 2009)..... 60
- Figure 10 : Variation journalière de l'abondance de *Cycloclasticus* en fonction du nombre de jours après ajout du polluant (PAH), en fonction des saisons. Les courbes présentant les points creux correspondent au contrôle, c'est-à-dire à la condition sans ajout de PAH, tandis que les courbes avec les points pleins correspondent au culture mise en présence de PAH. La concentration en PAH est présentée en pointillés. Quelques jours après ajout de PAH, l'abondance de *Cycloclasticus* augmente puis revient presque à l'initiale. Ces variations sont également dépendantes de la période de l'année. (A) : Mars, (B) : Juillet, (C) : Septembre, (D) : Janvier (Teira et al., 2007)..... 64

- Figure 11 : Les différentes espèces d'arsenic inorganiques autre que l'As(0) (O'Day, 2006). L'arsine est très peu retrouvé naturellement, tandis que l'arsénite et l'arséniate sont retrouvés communément..... 72
- Figure 12 : Métabolisme de l'arsenic chez les bactéries. En 1 sont représentés les systèmes d'entrée de l'arsenic, via les aquaglycéroporines (pour l'As(III)) ou les transporteurs du phosphate (pour l'As(V)). En 2, l'extrusion de l'As(III) via les pompes ArsB. En 3, la chélation de l'As(III) sur des peptides. En 4, l'oxydation de l'arsénite via l'arsénite oxydase Aio. En 5, la réduction de l'As(V) pour la respiration en anaérobie. En 6, la méthylation de l'arsenic (Páez-Espino et al., 2009). 74
- Figure 13 : Description schématique du site de Carnoulès. Le Reigous est le cours d'eau lourdement contaminé, qui se jette ensuite dans la rivière Amous (Bruneel et al., 2005). 77
- Figure 14 : Le Reigous à Carnoulès. La couleur orangée correspond à la précipitation du fer le long du cours d'eau..... 78
- Figure 15 : Modèle de fonctionnement de la communauté bactérienne issue de Carnoulès, réalisé à partir de données métagénomique et RT-PCR. Le génome de CARN3 n'est pas représenté sur ce modèle car celui-ci n'a été que partiellement reconstruit. CARN1 et CARN4 sont 2 populations distinctes d'un nouveau phylum et sont représentées par une seule bactérie. Le modèle attribue à chaque bactérie certaines fonctions, permettant d'expliquer le fonctionnement de la communauté (Bertin et al., 2011). 83
- Figure 16 : Concept de la métagénomique inverse. Les génomes reconstitués à partir de l'approche métagénomique sont analysés, pour définir les conditions de culture théoriques nécessaires pour la souche ciblée. Ceci permettra la définition d'un milieu de culture qui sera utilisé pour la culture de la bactérie cible, qui sera ensuite testée pour confirmer physiologiquement la fonctionnalité des voies métaboliques retrouvées dans son génome. 94
- Figure 17 : Hybridation « FISH » sur l'échantillon de Carnoulès. La sonde marquée à la Cyanine 3 est spécifique de CARN1, et émet une coloration rouge après excitation à 550 nm. Les bactéries visibles en rouge sur fond noir seraient donc des bactéries appartenant à *Candidatus Fodinabacter communicans*. En bleu, les bactéries totales (coloration au DAPI). La forme plus grosse (en haut à gauche) correspond à une euglène également retrouvée à Carnoulès..... 99

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
As	Arsenic
As(III)	Arsénite
As(V)	Arséniate
CAA	CasAminoAcides
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CowG	Carnoulès oxidizing wetland, point G
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DGGE	Denaturing Gel Gradient Eletrophoresis
DMA	Drainage Minier Acide
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTU	Operational Taxonomic Unit
pb	paires de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	rotation par minute
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
SSMS	Soil Substrate Membrane System
TGGE	Temperature Gel Gradient Eletrophoresis
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

Partie 1 :

Présentation

du sujet

Un écosystème est défini comme « un système formé par un environnement (biotope) et par l'ensemble des espèces (biocénose) qui y vivent, s'y nourrissent et s'y reproduisent » (dictionnaire Larousse). Le biotope correspond donc au compartiment abiotique, contenant les conditions physico-chimiques (pH, température, oxygénation,...) et l'environnement général (roche, sable, eau, terre, air,...). La biocénose correspond au compartiment biotique, comprenant tout le Vivant (eucaryotes et procaryotes) ainsi que les virus. Ces deux compartiments interagissent fortement l'un avec l'autre. En effet, le compartiment abiotique déterminera la structure de la communauté, mais cette dernière est également capable de modifier son environnement abiotique. L'étude des relations entretenues par ces deux compartiments est là aussi séparée en deux composantes selon les organismes étudiés. Ainsi les chercheurs en écologie étudient les relations faisant intervenir les organismes « supérieurs », pluricellulaires, tandis que les micro-organismes sont étudiés par les chercheurs en écologie microbienne. Ces deux disciplines sont très souvent cloisonnées, généralement par souci de simplicité. Ce travail de doctorat sera focalisé sur le monde microbien en général, et sur le monde bactérien en particulier.

L'étude des relations entre les micro-organismes et leur environnement est une discipline relativement « nouvelle ». En effet, l'Homme n'a réellement conscience que très tardivement que les micro-organismes non seulement existent, mais ont colonisé la plupart des niches écologiques. Cette prise de conscience, ainsi que les avancées sur la compréhension du fonctionnement de ces micro-organismes, ont été rendues possibles par les avancées technologiques progressives depuis le XVIIe siècle et

en particulier par le développement du microscope par Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723).

Cependant, encore à l'heure actuelle, l'étude d'une communauté microbienne dans son ensemble reste très « embryonnaire », et la compréhension parfaite de son fonctionnement est pour l'instant impossible. Ce « retard » est d'une part dû aux limites des techniques disponibles ; d'autre part elle est intrinsèquement liée à la communauté elle-même et à sa complexité. Ainsi, la structure de la communauté de notre flore intestinale et son fonctionnement sont encore largement incompris, du fait de la connaissance très partielle de la grande diversité microbienne présente. Pour tenter de définir le rôle de chaque micro-organisme au sein d'une communauté donnée et évaluer les interactions entre micro-organismes, certaines études se sont focalisées sur des communautés moins complexes. Les Drainages Miniers Acides (DMAs) sont des environnements qualifiés d'extrêmes (Leblanc et al., 1996), c'est-à-dire considérés comme hostiles à la vie pour de nombreux organismes. Les conditions physico-chimiques présentes sur ces sites empêchent le développement de nombreux (micro-) organismes, et la diversité microbienne est donc considérée comme faible. L'étude de la relation biotique-abiotique et des interactions entre organismes est donc rendue plus facile. Cependant, la structure et la fonction de chaque micro-organisme au sein d'une communauté donnée restent difficiles à appréhender et nécessitent différentes approches complémentaires.

Le manuscrit de thèse sera donc articulé comme suit :

La partie introductive reprendra brièvement l'histoire des principales grandes avancées technologiques depuis le XVII^e siècle dans le domaine de l'écologie microbienne, permettant d'étudier un micro-organisme isolé ou une communauté bactérienne dans son ensemble, ainsi que leurs limites. Les nouvelles techniques de culture seront également présentées. Ces outils permettent de formuler des notions théoriques très diverses sur la structure, la fonction et l'évolution d'une communauté microbienne. Ces notions sont cruciales pour la compréhension du monde microbien et des études d'écologie microbienne. Les caractéristiques des DMA en général et de celui de Carnoulès étudié ici seront exposées, et les études qui y ont été précédemment menées seront présentées.

Les résultats seront axés en deux parties : la première traitera de la composition de la communauté bactérienne à Carnoulès, en se focalisant sur le compartiment cultivé. Les approches culturales menées y seront présentées, et les résultats obtenus discutés. Le 2^e axe sera articulé autour du fonctionnement de la communauté bactérienne de Carnoulès, en s'intéressant particulièrement à la dégradation, au recyclage de la matière organique. Le rôle d'un isolat dans la communauté de Carnoulès sera étudié, et la diversité fonctionnelle liée à la dégradation de l'amidon sera investiguée en utilisant une banque d'ADN métagénomique. Ceci permettra notamment d'aborder des notions de dynamique de communautés et de redondance fonctionnelle dans ces sites extrêmes.

Enfin, les principaux résultats seront synthétisés pour les remettre dans le contexte du site de Carnoulès, et plus généralement dans l'étude de communautés bactériennes. Les perspectives découlant de ce travail seront également discutées.

A. ÉTUDE D'UNE COMMUNAUTÉ MICROBIENNE : LES GRANDES AVANCÉES

I. Historique de l'écologie microbienne

a. *Diversité et impact des micro-organismes*

Le nombre d'espèces eucaryotes présentes sur Terre a récemment été estimé par des outils statistiques à 8,7 millions, dont 7,5 millions restent encore à découvrir (Mora et al., 2011). Ces mêmes auteurs estiment la diversité procaryotique à un peu plus de 10000. Cependant ceux-ci admettent que le terme « d'espèce » constitue au sein des procaryotes une notion très floue, notamment lié à l'absence de reproduction sexuée chez ces organismes. La détermination de la diversité chez les procaryotes dépend également de l'outil utilisé pour la quantifier. Ainsi, Ganz et al. (2005) estiment –par outil statistique également, mais en tenant compte des abondances relatives– que cette diversité procaryotique peut atteindre 10 millions d'espèces. Néanmoins, et malgré cet écart important, il est accepté que les procaryotes, constitués de bactéries et d'archées, sont extrêmement nombreux et ont colonisé tous les écosystèmes terrestres et aquatiques. Au sein de la biosphère, il est estimé que le nombre de procaryotes atteint 4 à $6 \cdot 10^{30}$ cellules (Whitman et al., 1998). Cette abondance importante et le fait qu'ils aient pu coloniser tous les écosystèmes font de ces organismes des éléments majeurs du cycle de vie sur Terre. En effet, les procaryotes sont capables d'interagir et de modifier leur environnement, que ce soit à petite échelle mais aussi à l'échelle planétaire. Un des phénomènes les plus remarquables est sans doute l'apparition des cyanobactéries il y a plus de 2700 millions d'années (datation de marqueurs lipidiques spécifiques des

cyanobactéries) (Brocks et al., 1999; Schopf, 2006; Falcón et al., 2010), ayant conduit à la production d'oxygène sur toute la planète et permis aux organismes aérobies de se développer.

b. Découverte des micro-organismes

Ce n'est finalement qu'au XVI^e siècle, alors que la syphilis provoque des ravages en Europe, que Girolamo Fracastoro (Jérôme Fracastor en français) (Figure 1), médecin et philosophe italien, propose une théorie sur la « contagion » et les différents moyens de transmission : par contact direct entre les individus, par contacts d'objets communs à un individu sain et un malade, et par « distance » sans contact direct ((Rodriguez-Castellon, 1980) citant le livre de Girolamo Fracastoro : « Hieronymi Fracastrorii de Contagioni et Contagiosis Morbis et Eorum Curatione, Libri III (1546)). Il énonce que les maladies infectieuses sont propagées par la présence d'organismes invisibles qu'il appelle « seminaria contagionis », capables de se multiplier et de se transmettre d'un individu malade à un individu sain.



Figure 1 : Girolamo Fracastoro 1484-1553. Image extraite de (Haas, 1991).

Un siècle plus tard, ces organismes invisibles à l'œil nu sont observés et minutieusement décrits par Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723). Celui-ci développe des microscopes (pouvant grossir jusqu'à 200 fois), ce qui lui permet alors de visualiser dès 1676 de petits « animaux », dénommés « animalcules » (Gest, 2004). Ceux-ci sont en fait des bactéries, dont il peut observer la mobilité (Figure 2) (Dunn and Jones, 2004).

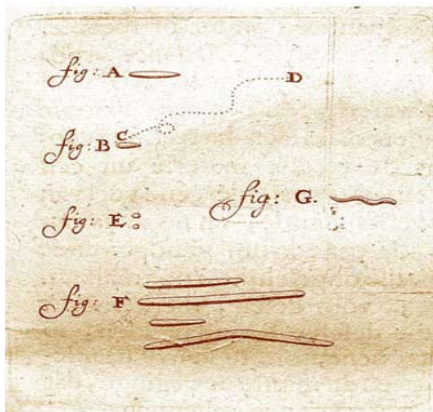


Figure 2 : Possiblement la première représentation de bactéries et de leur mobilité, par Antonie Van Leeuwenhoek (Dunn and Jones, 2004).

Cette avancée technique majeure a permis ainsi d'ouvrir un champ scientifique quasiment inépuisable : celui de l'étude des micro-organismes.

c. Début de l'écologie microbienne

Martinus Beijerinck et Sergei Winogradsky, deux contemporains de Koch et Pasteur, ont été des pionniers de l'écologie microbienne et de la microbiologie environnementale, en étudiant les micro-organismes et leurs rôles dans les cycles biogéochimiques.

Sergei Winogradsky (1856-1953) est un pionnier dans l'étude du « cycle de Vie », faisant intervenir les micro-organismes dans tous les cycles biogéochimiques. Ainsi, il fut le premier à démontrer, dans les années 1880 à l'Université de Strasbourg, l'existence de bactéries (appartenant au genre *Beggiatoa*) oxydant les sulfures et stockant des granules de soufre visibles au microscope. Il montre ainsi que des micro-organismes interviennent donc directement dans les transformations chimiques de molécules inorganiques, ce qui illustre le rôle des bactéries dans le cycle de différents atomes tels que le soufre (Winogradsky, 1887). Il met également en évidence l'existence de bactéries pouvant « vivre dans un milieu minéral », grâce à un métabolisme qu'il appelle « chimiosynthèse », c'est-à-dire une utilisation du CO_2 comme source de carbone sans utilisation de lumière comme source d'énergie (ici, c'est l'oxydation du soufre qui sert de source d'énergie) (pour revue, voir (Ackert Jr, 2007)). Plus tard, il démontre également que des bactéries sont responsables de la nitrification, c'est-à-dire de la transformation de l'ammonium en nitrite. Enfin, c'est aussi lui qui cultiva des organismes (bactéries, champignons, protistes et algues) dans un microcosme, appelé colonne de Winogradsky. Celle-ci permet de visualiser ces différents types d'organismes par strates correspondant à des conditions physico-chimiques particulières et différentes (aérobie et lumière, anaérobie et lumière, anaérobie...). Winogradsky a donc pour la première fois étudié une communauté microbienne dans son ensemble, et pas uniquement sur boîtes de Petri à partir d'une culture pure.

Par ses travaux, Martinus Beijerinck (1851-1931), scientifique hollandais, va poser les bases de l'écologie microbienne. Il isole dès 1901 les premières bactéries

(*Azotobacter chroococcum* et *A. agilis*) capables de fixer l'azote atmosphérique N_2 , et responsables de la nodulation, c'est-à-dire de la symbiose avec les plantes (Beijerinck, 1901). Peu après, Beijerinck prouve qu'il existe des bactéries (qu'il nomme du genre *Thiobacillus*) capables de vivre en absence d'oxygène et d'utiliser l'oxydation des sulfures comme source d'énergie (Beijerinck, 1904; Sawhney and Nicholas, 1977) et le nitrate comme accepteur terminal d'électrons. Il exposera la théorie de la culture par enrichissement, qui repose sur le fait qu'un milieu de culture spécifique permettra l'enrichissement et la culture spécifique de bactéries particulières, même si ces micro-organismes étaient initialement en faible nombre *in situ*.

d. *Découverte des limites des approches culturales*

Comme Van Leeuwenhoek ou Winogradsky, de nombreux microbiologistes ont utilisé le microscope comme outil d'étude des micro-organismes, et de grandes découvertes ont ainsi pu être réalisées. En complément de cette approche, la culture *in vitro* sur milieu solide en boîtes, mise au point par Robert Koch et Julius Richard Petri, a été largement utilisée et diffusée depuis son origine. Cette technique a permis l'isolement d'espèces et de genres nouveaux, qui ont ensuite pu être analysés et caractérisés. Elle présente l'avantage de pouvoir tester dans des conditions maîtrisées de nombreux paramètres, et de découvrir certaines capacités métaboliques des organismes isolés. En écologie microbienne, il devient dès lors possible d'émettre des hypothèses quant au(x) rôle(s) de chacun de ceux-ci au sein d'une communauté donnée.

Néanmoins, les techniques de culture montrent des biais importants. En effet, Conn observa dès 1918 qu'à partir d'un même échantillon, la quantité de bactéries cultivées sur boîtes est bien moins importante que celle qui est comptée au microscope (Conn, 1918). Ce phénomène reproductible (Razumov, 1932) a été plus tard appelé « great plate count anomaly » (Staley and Konopka, 1985). Il est maintenant couramment admis que 99 % des bactéries restent récalcitrantes à la culture *in vitro*. Cette difficulté a plusieurs origines. La première vient du fait qu'il est *a priori* impossible de connaître les besoins nutritionnels précis d'une bactérie, ni des concentrations de ceux-ci. Les milieux de culture ainsi préparés ne sont donc pas forcément adéquats. De plus, certains micro-organismes peuvent être auxotrophes pour un ou plusieurs cofacteurs et/ou vitamines, et ne peuvent donc pousser en culture pure sans ces ajouts. L'identification de ces auxotrophies est très difficile, voire impossible pour parvenir à cultiver ces micro-organismes. Cependant, de nouvelles techniques de culture seront présentées dans la partie C de l'introduction.

Ainsi, malgré ces avancées il s'avère très difficile voire impossible de déterminer par culture uniquement la structure d'une communauté, ainsi que son fonctionnement qui dépend de la structure de celle-ci.

II. Avènement de l'ère moléculaire en laboratoire

a. *Classification phylogénétique par analyse du gène codant l'ARNr 16S*

En 1977 a eu lieu une « révolution biologique » concernant l'étude de communautés bactériennes et la classification phylogénétique des différentes espèces bactériennes. Carl Woese (1977) utilise pour la première fois les ARNr 16S connus alors, ce qui lui permet de séparer les procaryotes en deux groupes distincts, et présente pour la première fois le domaine des *Archaea* (qu'il appelle alors *Archaeobacteria*). Ces travaux ont permis notamment l'utilisation d'un marqueur moléculaire universellement retrouvé au sein du monde procaryote. De plus, le gène codant l'ARNr 16S variant très peu, il est possible d'utiliser cet instrument comme outil taxonomique, c'est-à-dire de définir à partir de la séquence du gène à quel rang taxonomique (jusqu'à l'espèce) appartient une bactérie donnée (Woese, 1987). Cet outil a été rendu accessible notamment par le développement des techniques de séquençages. En effet, la technique de séquençage mise au point par Sanger permet à cette époque d'obtenir des séquences d'ADN plus « rapidement » (Sanger, 1975) et ainsi d'utiliser ces séquences pour déterminer la position taxonomique d'une souche donnée.

b. *Approches globales sur des bactéries cultivées*

La technique de séquençage Sanger a ainsi permis d'accéder rapidement au contenu génétique d'une souche donnée. Il a fallu pourtant attendre 1995 pour obtenir le premier génome complet, par séquençage « shotgun » du génome d'une souche

d'*Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al., 1995). Le fait de pouvoir disposer du génome entier d'un organisme donné permet d'accéder au potentiel génétique complet de cet organisme, et d'avoir ainsi une vue d'ensemble de toutes les voies métaboliques retrouvées chez celui-ci. De plus, les techniques de protéomique se sont développées en parallèle et ont permis de visualiser et de quantifier de façon globale les protéines produites par un organisme donné (Shevchenko et al., 1996; Wilkins, 1996). Cette technique ne « se contente pas » de visualiser les potentialités génétiques d'un organisme, mais permet de déterminer dans les conditions de laboratoire la réponse globale, au niveau protéique, pour une condition donnée. Il devient dès lors possible de corrélérer à l'échelle du génome entier les données génétiques aux protéines, et ainsi de valider de façon expérimentale les capacités métaboliques d'un organisme donné. Ainsi, à l'échelle environnementale, il est possible d'attribuer plus facilement une/des fonction(s) à une souche cultivée au sein d'une communauté donnée à partir du moment où le contenu génomique de cette souche est connu.

III. De la structure au fonctionnement *in situ* d'une communauté

a. Métagénomique descriptive ciblée

Les années 1990 ont ainsi été des années cruciales pour la microbiologie environnementale. En effet, dès 1991, il a été possible sans culture de déterminer la composition bactérienne dans un échantillon d'eau de mer, à partir de l'ensemble des gènes codant l'ARNr 16S (Schmidt et al., 1991). Les auteurs ont récupéré les bactéries totales et ont extrait l'ADN directement de cette communauté, avant une étape de

clonage. Cette étude a permis notamment de montrer la présence de ces bactéries non-cultivées et de définir pour la première fois la position taxonomique de ces bactéries responsables de cette « great plate count anomaly ». L'ADN utilisé ne comprenant pas un génome unique, les termes de métagénome et de métagénomique ont donc été adoptés (Handelsman et al., 1998). Cette étude a ouvert la voie à l'analyse de la structure d'une communauté dans son ensemble, indépendamment de la culture, déverrouillant ainsi l'accès à un vaste champ jusqu'alors inexploré de la microbiologie. Ainsi, les années 1990 marquent le début de l'analyse de la diversité procaryotique « totale » par l'approche « métagénomique 16S ». En effet, il devient ainsi plus facile, et surtout plus rapide que par la culture, de déterminer la structure d'une communauté donnée, en s'affranchissant des biais de culture exposés par Conn (1918). De plus, le développement actuel des nouvelles techniques de séquençage permet maintenant de s'affranchir d'une étape de clonage préalablement nécessaire, diminuant là encore la difficulté et les biais liés à cette approche « métagénomique 16S ». Cette approche est encore aujourd'hui universellement utilisée pour déterminer la structure d'une communauté, l'écologie microbienne basculant dans l'ère moléculaire, et la quantité de séquences de gènes codant l'ARNr 16S provenant de souches non-cultivées augmente encore aujourd'hui à un rythme effréné (Figure 3).

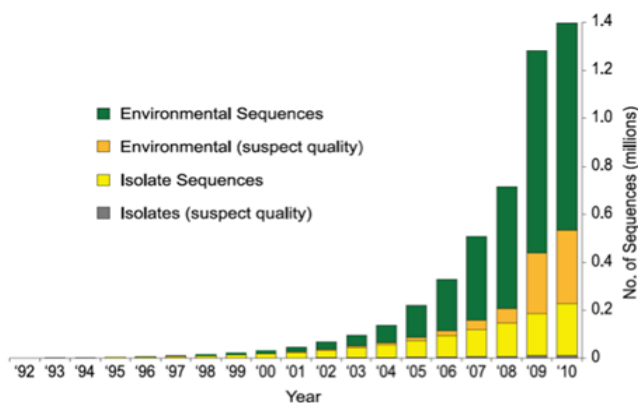


Figure 3 : Nombre de séquences de gènes codant l'ARNr 16S dans les banques de données (données 2010 : <http://rdp.cme.msu.edu>)

b. Métagénomique fonctionnelle ciblée

À partir du moment où il devint possible de s'affranchir de l'étape de culture pour déterminer la structure d'une communauté, les mêmes approches indépendantes de la culture ont été utilisées pour comprendre le fonctionnement de cette communauté. Ainsi, en 1995, des auteurs ont construit une banque d'ADN métagénomique à partir d'un consortium complexe et ont criblé cette banque pour rechercher des cellulases et des xylosidases (Healy et al., 1995). Ils ont pu isoler et séquencer pour la première fois des gènes de fonction (autre que le gène codant l'ARNr 16S), pouvant appartenir à des bactéries non-cultivées. De cette manière, il devient possible d'accéder aux fonctions portées par des espèces appartenant à la majorité non-cultivée. Ces mêmes auteurs ont également constaté que les séquences primaires de ces enzymes étaient très divergentes de ce qui était connu. Ainsi, le criblage basé sur la fonction, en utilisant comme matrice l'ADN métagénomique, permet d'ouvrir de nouvelles perspectives au niveau industriel, par la découverte d'enzymes nouvelles possédant des caractéristiques différentes de ce qui est connu. C'est pour cette raison que de nombreuses études, basées sur le même principe, ont depuis lors été conduites, pour rechercher des enzymes fonctionnant dans

des conditions extrêmes de température, pH, salinité, concentration en métaux, etc (Niehaus et al., 1999; Amylase et al., 2002; Voget et al., 2006; Coleri et al., 2009; Heath et al., 2009; Sharma et al., 2010; Graham et al., 2011; Wang et al., 2011; Zhang and Zeng, 2011). Les fonctions criblées ne sont pas uniquement des enzymes à intérêt biotechnologique. Ainsi en 2002, la première rhodopsine bactérienne, provenant d'une *γ-proteobacteria*, a été découverte par criblage fonctionnel à partir d'ADN issu du bactérioplancton (Beja et al., 2000). Cependant, ces études restent limitées à des fonctions ciblées, ne permettant pas une étude globale du fonctionnement d'une communauté.

c. *Métagénomique descriptive globale*

Les années 2000 ont également été un tournant pour l'étude du fonctionnement d'une communauté. Ainsi, en 2004, deux études indépendantes ont permis de séquencer de façon globale l'ADN métagénomique issu de 2 communautés. D'un côté, Venter et al. (2004) ont collecté différents échantillons de la mer des Sargasses et séquencé ensuite la totalité des fragments d'ADN clonés, soit $1,6 \cdot 10^6$ lectures de plus de 800 pb en moyenne. Cette étude a notamment permis de montrer la présence de plus de 1800 « espèces génomiques », dont de nombreuses sont inconnues, ainsi que plus de 1,2 millions de gènes de fonctions inconnues. Dès lors, il est possible d'avoir accès aux génomes entiers de bactéries non-cultivées, et d'avoir une vision plus globale de la diversité génétique présente au sein d'une communauté entière. L'étude menée par Venter et al. a permis la reconstitution partielle de génomes majoritaires,

mais la grande diversité génétique retrouvée a empêché une reconstruction entière de génomes. Il était dès lors difficile de déterminer les rôles potentiels de chaque membre de la communauté pour comprendre le fonctionnement de celle-ci. Ainsi, une diminution de la diversité microbienne permettrait d'avoir accès aux génomes complets des espèces majoritaires (Denef et al., 2010). En se basant sur cette hypothèse, Tyson et al. (2004) ont extrait l'ADN métagénomique, issu d'un biofilm complexe, provenant d'un Drainage Minier Acide (DMA). Ils ont déterminé que la diversité procaryotique est très faible, car composée de 3 lignées bactériennes et de 3 lignées d'*Archaea*. À partir de ce même ADN métagénomique, les auteurs ont cloné puis séquencé 76 millions de paires de bases. L'assemblage en contigs des fragments séquencés a permis la reconstruction quasi complète de 2 génomes, appartenant au groupe II des *Leptospirillum* et au type II des *Ferroplasma*, ainsi que la reconstruction partielle de 3 autres génomes (Figure 4).

Ainsi, il devient possible d'assigner directement une/des fonction(s) donnée(s) à un organisme donné, donc d'attribuer un rôle à un organisme au sein de la communauté. Dans le cadre de l'étude menée par Tyson et al. par exemple (2004), la souche correspondant au groupe II des *Leptospirillum* possède les gènes de fixation du carbone, tandis que *Ferroplasma* serait capable d'une croissance hétérotrophe.

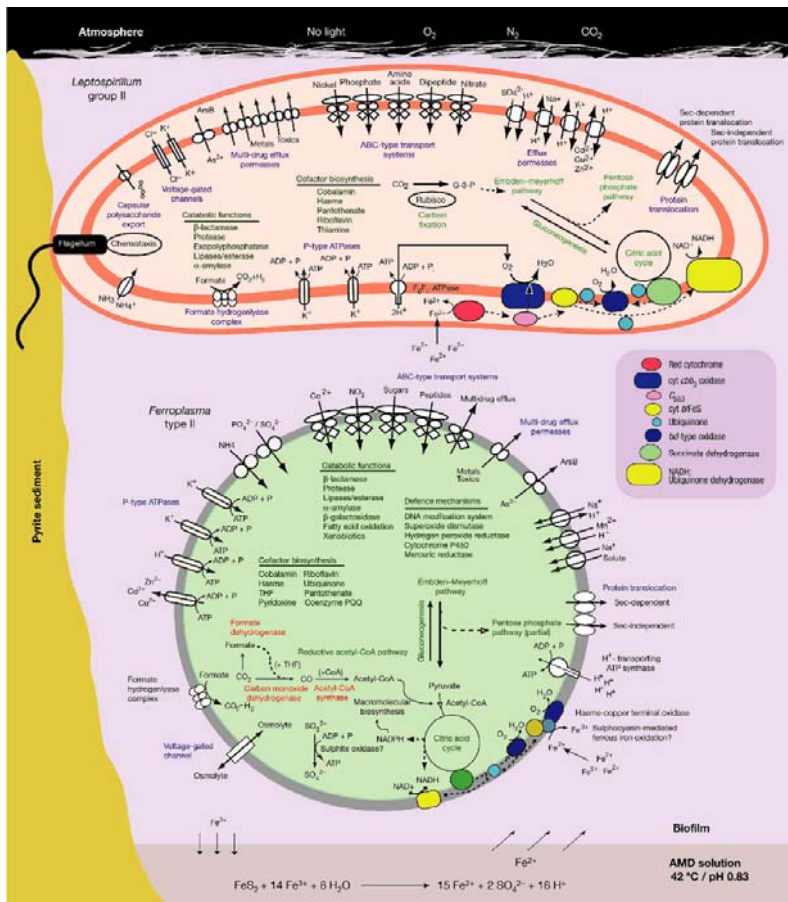


Figure 4 : Reconstruction de 2 génomes quasi complets à partir d'ADN métagénomique issu d'un drainage minier acide. Les potentialités génétiques de *Leptospirillum* (en haut) et *Ferroplasma* (en bas) sont retrouvées dans ce schéma (Tyson et al., 2004).

d. Méta -omique fonctionnelle

Ces approches de séquençage globale, suivi de l'assemblage de génomes et analyse *in silico* des génomes retrouvés permet donc d'établir un modèle de fonctionnement d'une communauté, à un temps donné, dans un écosystème donné. Cette approche permet donc de faire une photographie de ce qui se passe à l'échelle moléculaire. Pour dépasser la seule description et analyser les processus environnementaux se déroulant *in situ*, des approches de métatranscriptomique et métaprotéomique ont également vu le jour. Ces approches reprennent les mêmes outils que la transcriptomique et la protéomique, mais la technique est ici appliquée à l'ensemble de la communauté, et pas uniquement à une espèce cultivée en laboratoire.

La métaprotéomique a pour la première fois été testée à partir de protéines extraites d'un consortium microbien issu de boues activées (Wilmes and Bond, 2004). Ce sont d'ailleurs ces mêmes auteurs qui ont nommé cette nouvelle science « métaprotéomique ». Du fait de la rapidité croissante des techniques/analyses et du coût décroissant des expériences, certaines études proposent un couplage entre approches métagénomique et métaprotéomique (métaprotéogénomique), ce qui permet d'avoir une vision intégrée du fonctionnement d'une communauté (Bertin et al., 2011). Ceci permet, à partir des génomes assemblés, d'identifier les produits de l'expression des gènes correspondants, et ainsi de valider le modèle de fonctionnement *in situ* de cette communauté. Cette étude sera commentée plus en détail dans la partie E de l'introduction, sur les drainages miniers acides.

IV. Conclusion

Ainsi, en quelques décennies, les différentes approches moléculaires, d'abord utilisées sur des souches isolées puis appliquées à des extraits environnementaux totaux, ont permis de réaliser des avancées considérables dans la compréhension de la structure et du fonctionnement d'une communauté *in situ*. Ces approches sont globales, employées sans *a priori*, et permettent en outre de déverrouiller l'accès à cette majorité non-cultivée, et éliminent donc ce biais de culture. Néanmoins et à l'instar de la culture, ces approches moléculaires ne sont pas exemptes de biais non plus, et il convient de les connaître pour analyser de manière objective les résultats obtenus et

proposer des approches alternatives et/ou complémentaires pour diminuer l'impact de ces biais.

B. LIMITES DES TECHNIQUES MOLÉCULAIRES

I. Introduction

Les approches métagénomique, métatranscriptomique et métabotéomique comportent le grand avantage de s'affranchir de l'étape de culture, permettant ainsi de déverrouiller l'accès à la grande majorité des bactéries. Néanmoins, ces approches nécessitent d'une part l'extraction du matériel d'étude (ADN, ARN, protéines) et d'autre part le traitement de ces échantillons pour l'analyse. Chacune de ces étapes présente cependant des biais inhérents à la technique utilisée (Wintzingerode et al., 1997) pouvant diminuer de 50% la diversité microbienne détectée (Hong et al., 2009).

II. Extraction du matériel d'étude

a. *Stabilité de l'ADN exogène au sein d'une matrice*

La première étape de ces techniques -omiques repose sur l'extraction du matériel d'étude (ADN, ARN ou protéines). L'ADN, étant plus stable que l'ARN, est capable de se maintenir nu, c'est-à-dire en dehors d'une cellule, pendant une longue période sur certains supports comme de l'argile par exemple (pour revue, voir (Nielsen et al., 2007)). Ainsi, l'extraction de l'ADN total de la matrice permettra non seulement la récupération de l'ADN des cellules qui auront été lysées pour l'extraction, mais également celui de l'ADN nu préalablement extra-cellulaire (Frostegård et al., 1999). L'analyse par « métagénomique 16S » de la diversité bactérienne présentera donc une

diversité qui ne reflètera pas uniquement la diversité correspondant aux organismes effectivement vivants, mais également la diversité ayant été présente à un moment donné et ayant peut-être disparu. Ceci conduira donc à une surestimation de la diversité et à une vision faussée de celle-ci (Frostegård et al., 1999).

b. *Influence du protocole de lyse cellulaire*

A contrario, l'efficacité de lyse cellulaire nécessaire à la récupération de l'ADN des cellules vivantes est extrêmement dépendante de la souche. Il est fréquemment démontré que les bactéries appartenant au phylum *Actinobacteria* sont sous-représentées par approches moléculaires, malgré leur présence en abondance dans les sols (Hill et al., 2006; Farris and Olson, 2007; Feinstein et al., 2009). Par exemple, des bactéries issues d'un échantillon de sol complexe et appartenant au genre *Micromonospora* ont pu être cultivées après avoir été exposées à différents protocoles de lyse, montrant leur extrême récalcitrance à la lyse, donc à une détection et analyse par toutes les approches moléculaires (métagénomique, métatranscriptomique, métaprotéomique) (Frostegård et al., 1999). Ce biais peut conduire d'abord à une sous-estimation importante de la diversité présente au sein d'une communauté et de leurs abondances relatives. Ainsi, alors que ces bactéries peuvent être majoritaires *in situ*, ce seront d'autres espèces que l'on détectera et qui seront qualifiées de « majoritaires ». En ce sens, la notion de « bactéries majoritaires » est très difficile à estimer, puisqu'elle s'appuie sur les abondances relatives de chacune des espèces détectées ; elle est donc dépendante du protocole utilisé. Ainsi, celui-ci joue un rôle crucial pour l'analyse de

communauté (structurale et fonctionnelle). Delmont et al. (2011) ont testé l'influence de nombreux paramètres (notamment l'échantillonnage, le fractionnement cellulaire, le protocole de lyse) sur la diversité retrouvée. Ils ont pu démontrer que l'échantillonnage jouait un rôle non négligeable, mais néanmoins mineur dans la diversité détectée. Au contraire, le fractionnement cellulaire, c'est-à-dire le fait de séparer ou non les cellules de la matrice dans un gradient de Nycodenz avant lyse cellulaire, affecte la diversité retrouvée. De même le protocole de lyse utilisé (protocoles « maison », kits commerciaux) influence également beaucoup la diversité extraite. Ainsi, 20% de la diversité retrouvée dans chaque protocole est spécifique du protocole. En cumulant la diversité obtenue avec chaque protocole, ils ont ainsi pu augmenter la diversité totale de 80% par rapport à la diversité obtenue avec le meilleur protocole (Delmont et al., 2011). Les résultats de cette étude sont présentés en Figure 5 et des résultats similaires sont par ailleurs retrouvés dans d'autres études (Martin-Laurent et al., 2001; Robe et al., 2003).

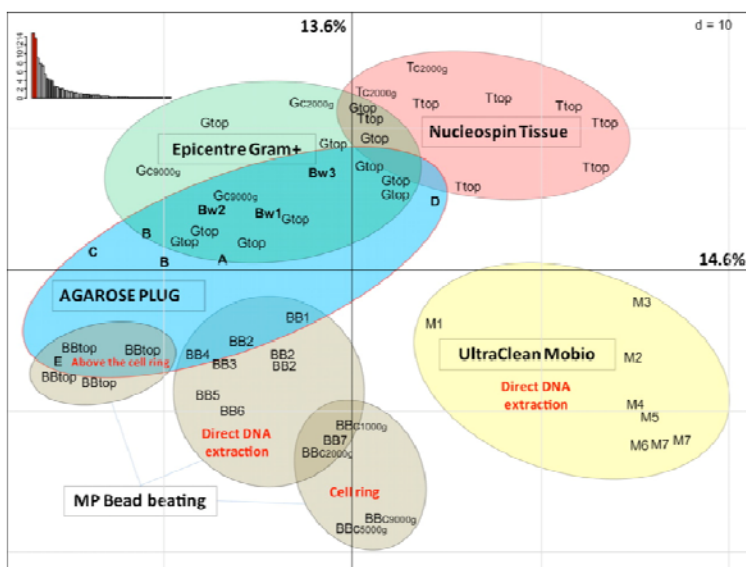


Figure 5 : Analyse en composantes principales de la diversité bactérienne récupérée en fonction des protocoles d'extraction utilisés (Delmont et al., 2011) Chaque groupe encerclé représente une série d'expériences présentant un profil de diversité RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) proche. Il est donc observé que ce profil est dépendant du protocole utilisé pour l'extraction d'ADN.

c. Impact sur la compréhension de la structure et du fonctionnement d'une communauté

Les biais d'extraction d'ADN présentés ci-dessus sont en général démontrés en comparant les diversités bactériennes détectées. Mais cette détection est corrélée à l'extraction d'ADN total des bactéries lysées. Ainsi, ce n'est donc pas seulement la « diversité 16S » qui est biaisée, mais aussi (et surtout) l'ensemble des gènes de fonction qui vont être récupérés, donc l'étude du fonctionnement de la communauté sera également biaisée. De plus, si des bactéries ne peuvent être lysées, il s'avère impossible de récupérer les ARNm et/ou protéines de ces bactéries. Les approches métagénomiques et métagénomiques présentent donc également les mêmes biais, qui s'avèrent donc être un obstacle majeur pour toute approche moléculaire. Il convient donc d'une part d'en tenir compte, et d'autre part de réellement mettre en relation les résultats obtenus avec le protocole utilisé.

III. Biais liés à l'amplification par PCR

a. Introduction

Chaque technique présente des biais plus ou moins importants, et il serait impossible de présenter chaque technique et de détailler chaque biais. Néanmoins, il est possible de s'attarder sur une étape commune à de nombreuses techniques fréquemment utilisées pour déterminer la diversité bactérienne d'un échantillon à partir d'ADN métagénomique. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est en effet utilisée dans

cette optique, et en constitue la 2^e étape cruciale après l'extraction d'ADN. Elle est utilisée pour amplifier le fragment d'ADN d'intérêt (souvent codant l'ARNr 16S) avant analyse de la diversité bactérienne, que ce soit par DGGE/TGGE (Denaturing/Temperature Gel Gradient Electrophoresis) (Fischer and Lerman, 1979), T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) (Liu et al., 1997), puces taxonomiques (Brodie et al., 2006) ou pour du clonage/séquençage notamment. Cependant, la PCR présente des biais importants pouvant là aussi fausser l'analyse subséquente.

b. *Amorces « universelles »*

Le gène codant l'ARNr 16S variant très peu, il est possible, comme il a été défini dans la première partie, d'utiliser sa séquence pour définir le rang taxonomique d'une souche donnée (Woese, 1987). Ce gène contient certaines régions extrêmement stables, communes à l'ensemble des espèces procaryotes. Des amorces dites « universelles » ont donc été créées, ciblant l'ensemble des espèces procaryotes, dès 1991 (Weisburg et al., 1991). Néanmoins, il a été montré dès 1992 que ces amorces universelles ne permettent pas d'amplifier le gène codant l'ARNr 16S de tous les procaryotes (Reysenbach et al., 1992). Cette absence d'amplification provient notamment d'une absence de complémentarité avec les ADN cibles. Ces amorces sont en effet élaborées sur base de séquences de gènes codant l'ARN 16S préalablement connues. Il est alors, par définition, évident que ces amorces ne permettront pas l'amplification de séquences très divergentes du consensus (Baker et al., 2003).

c. *ADN « difficile »*

D'autre part, il a également été montré que, malgré une identité de 100% entre les amorces « universelles » et l'ADN de certaines *Actinobacteria*, il soit possible qu'aucune amplification ne fonctionne (Farris and Olson, 2007). Ces souches ne pourront donc pas être détectées à partir d'un métagénome, malgré leur présence au sein de l'échantillon. Cette particularité est encore incomprise. En effet, le modèle de structure secondaire de ces ARNr 16S ne semble pas expliquer cette absence d'amplification. Il a été supposé en revanche, sans pour autant l'expliquer, que c'est l'ADN génomique en dehors de la séquence amplifiée qui pourrait expliquer ce phénomène (Hansen et al., 1998; Farris and Olson, 2007).

d. *Quantité d'ADN matrice*

Il a été montré qu'une souche dont l'extraction d'ADN ne pose pas de soucis, et qui ne présente pas de difficulté/biais liés à l'amplification par PCR, peut être absente d'une analyse de diversité. En effet, l'analyse par toute approche moléculaire nécessite une quantité d'ADN non négligeable pour être utilisée (Kakirde et al., 2010). Ainsi, un ADN rare au sein d'un mélange complexe d'ADN (métagénome) ne pourra pas être amplifié et il en résultera une absence de détection (Picard et al., 1992). C'est typiquement le cas si la souche n'est présente qu'à un faible nombre de cellules au sein de la matrice (quelques cellules par litre d'eau par exemple). Ces bactéries appartiennent à la catégorie de la biosphère rare (Sogin et al., 2006) (cf. Partie D de l'introduction). Il est admis que la grande majorité des espèces bactériennes au sein d'un

échantillon est présente à un faible nombre de cellules et fait donc partie de cette biosphère rare (Curtis and Sloan, 2005) et peut de ce fait être sujette à ce biais.

IV. Conclusion

La plupart des études s'intéressant à la structure et/ou au fonctionnement d'une communauté sont basées sur les différentes approches globales de biologie moléculaire présentées précédemment. Néanmoins, ces approches indépendantes de la culture présentent également des biais importants, pouvant entraîner une vision trop restreinte, voire faussée, de la diversité microbienne. Étant donné qu'il est, par définition, impossible de prévoir le comportement d'une souche non-cultivée vis à vis de ces approches moléculaires (en termes d'efficacité d'extraction d'ADN et de PCR notamment), il s'avère impossible de déterminer les abondances relatives de chaque espèce par analyse du gène codant l'ARNr 16S. Ainsi, il sera par la même occasion impossible de déterminer la structure de la communauté, qui prend en compte ces abondances relatives (Farrelly et al., 1995). De plus, ces biais sont également valables pour l'analyse par méthodes -omiques du fonctionnement de la communauté. Il convient alors d'en tenir compte pour l'interprétation des résultats obtenus.

Depuis quelques années, et peut-être pour palier aux biais présentés ci-dessus, il existe au sein de la communauté scientifique un intérêt croissant pour un retour à la culture, en complément des approches moléculaires. C'est ainsi que de nouvelles techniques de culture ont été développées récemment et ont permis d'obtenir

des résultats intéressants concernant l'analyse de la diversité cultivée et la culture de bactéries préalablement « non-cultivables ».

C. NOUVELLES TECHNIQUES DE CULTURE

I. Introduction

Le retour à la culture, indiqué précédemment, est lié à plusieurs facteurs. D'un point de vue fondamental, il est intéressant d'essayer de repousser les limites du « non-cultivable », d'accéder à de nouveaux taxons et d'étudier le métabolisme et la physiologie de ces nouvelles souches. De plus, au niveau industriel, il est particulièrement intéressant de disposer de nouvelles souches pour accéder plus facilement à leurs potentialités génétiques, notamment pour la population rare – poussant souvent lentement – pour laquelle pas ou trop peu d'ADN a pu être récupéré et qui donc échappe aux méthodes de criblages fonctionnelles à partir de banques métagénomiques (Hobel et al., 2004). Enfin, du point de vue de l'« écologie microbienne », l'accession à une diversité cultivée plus large reste cruciale. En effet, il est possible de déterminer la diversité bactérienne cultivée au sein d'un échantillon, en s'affranchissant des biais présentés dans la partie B de l'introduction (bactéries résistantes à la lyse, dont l'ADN est récalcitrant à l'amplification, faisant partie de la biosphère rare). L'addition de la diversité cultivée détectée avec la diversité moléculaire détectée permet donc de déterminer plus exactement la composition de la diversité microbienne totale au sein d'un environnement. De plus, les hypothèses de fonctionnement de communautés créées à partir des approches –omiques (notamment métagénomique, métatranscriptomique, métagénomique) peuvent être testées physiologiquement, ce qui permettra de confirmer/infirmier ces hypothèses (Tyson et al., 2005). L'approche culturelle peut donc en ce sens être considérée comme le

complément des approches moléculaires, afin d'obtenir une vision intégrée du fonctionnement d'une communauté.

Néanmoins, en utilisant des approches classiques, comme l'utilisation d'un seul type de milieu, une condition physico-chimique unique, etc., les bactéries cultivées ne représentent qu'un faible pourcentage de la diversité bactérienne totale (Conn, 1918). C'est pour cette raison que des techniques innovantes ont récemment vu le jour, que ce soit en mimant le contexte *in situ*, en intégrant les interactions inter-espèces ou en utilisant des dispositifs nouveaux.

II. Approches « classiques » améliorées

a. Introduction

Bien qu'il soit aisé d'utiliser des milieux usuels (par exemple LB ou TSA (Tryptic Soy Agar) comme milieu riche ou R2A comme milieu plus pauvre) comme milieu de culture, chaque souche bactérienne possède des besoins spécifiques, notamment liés aux conditions *in situ* existant dans l'écosystème d'où elle provient. Ainsi, les milieux de culture peuvent être modifiés pour se rapprocher de ces conditions naturelles.

b. *Modification de la concentration en nutriments*

De nombreux milieux utilisés couramment en laboratoire contiennent un excès en nutriments. Cet excès engendrera un biais au niveau des genres isolés car cela favorisera les bactéries cultivant rapidement (bactéries à stratégie r) tout en inhibant les bactéries à croissance lente (bactéries à stratégie K). Il a en effet été montré que les bactéries à croissance rapide telles qu'*Escherichia coli* possèdent des transporteurs à faible affinité et une machinerie d'expression cellulaire rapide (Koch, 1971) tandis que les bactéries à croissance lente, poussant souvent dans des milieux pauvres (oligotrophes), possèdent des transporteurs à forte affinité (Button, 1991). Ainsi, un excès en nutriments pour ces dernières provoquera une saturation des transporteurs et peut avoir un effet toxique pour les cellules, favorisant les bactéries à croissance rapide (Vieira-Silva and Rocha, 2010). Plusieurs études montrent l'intérêt de la culture en utilisant des faibles concentrations en nutriments (Connon and Giovannoni, 2002; Janssen et al., 2002; Joseph et al., 2003). Cette technique simple a par exemple permis l'isolement de nombreuses souches appartenant au phylum *Acidobacteria*, pourtant connu pour être récalcitrant à la culture (Joseph et al., 2003). D'autres études ont suivi ce même principe et ont donné des résultats intéressants avec notamment l'isolement en culture pure de souches appartenant à la sous-classe *Rubrobacteridae* ou à la subdivision 2 du phylum *Verrucomicrobia*, connues jusqu'alors uniquement par des approches indépendantes de la culture (Janssen et al., 2002).

c. Définition du milieu en fonction des conditions in situ

La culture en laboratoire de bactéries environnementales nécessite donc une adaptation de ces milieux pour permettre leur croissance. Ceci est valable pour les sources de nutriments, notamment la source de carbone, mais également pour la solution minérale. Il a par exemple été montré que la solution d'éléments traces joue un rôle important, d'une part dans la diversité cultivée obtenue, d'autre part dans la vitesse de croissance de cette communauté cultivée. Ainsi, une solution d'éléments traces de concentration voisine de celle retrouvée *in situ* (à Yellowstone) a permis d'obtenir une diversité plus importante qu'avec le même milieu mais contenant une solution d'éléments traces différente (Meyer-Dombard et al., 2012).

d. Augmentation du temps d'incubation

Parallèlement aux faibles concentrations en nutriments, les bactéries à croissance lente (bactéries à stratégie K) nécessitent des temps d'incubation supérieurs. Or, la plupart des études portant sur la diversité cultivée sont basées sur des temps d'incubation de moins d'une semaine. Il a pourtant été montré dans de nombreuses études qu'augmenter le temps d'incubation (à plusieurs mois) permet d'augmenter la diversité cultivée sur un même milieu et l'isolement d'espèces rarement cultivées au préalable (voir la Figure 6 en exemple) (Janssen et al., 2002; Sait et al., 2002; Davis et al., 2005; Davis et al., 2011).

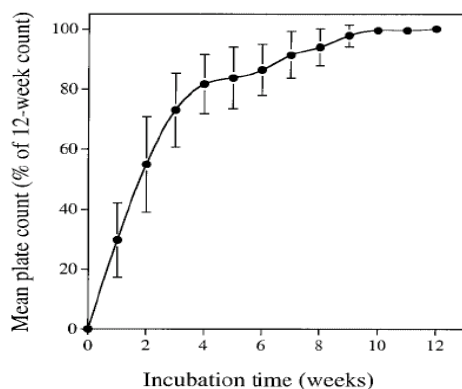


Figure 6 : Nombre d'UFC par boîte en fonction du temps d'incubation. Le nombre d'UFC augmente régulièrement avec le temps, jusqu'à un temps d'incubation de 12 semaines (Janssen et al., 2002).

e. *Ajout de molécules de signal*

Chaque cellule bactérienne, présente au sein d'un écosystème donné, n'est pas seule, mais vit en contact étroit avec des cellules de même espèce et d'espèces différentes. Ainsi, elle émet et perçoit de nombreux signaux et molécules de signal, qui peuvent induire ou réprimer la croissance bactérienne. Afin de mimer ces conditions naturelles, il est possible d'ajouter dans le milieu certaines de ces molécules. Bruns et al. (2002) ont montré que l'efficacité de culture pouvait augmenter de 100% lors de l'ajout d'AMP cyclique ou d'homosérine lactone dans le milieu de culture, même dans des concentrations très faibles (de l'ordre du μM). Ces mêmes auteurs ont ensuite montré que la diversité cultivée était différente en absence ou présence d'AMP cyclique (Bruns et al., 2003). Nichols et al. (2008) ont également montré que l'ajout dans le milieu de culture d'un petit peptide de 5 acides aminés permet la culture en culture pure d'une souche au préalable non-cultivée (voir ci après). Enfin, l'ajout d'extraits cellulaires d'un (micro-)organisme dans le milieu de culture a également permis l'isolement de souches dépendantes de ces extraits pour être cultivées en conditions de laboratoire (Gardères

et al., 2012). La détermination de cette dépendance est une étape importante pour l'étude et l'isolement de souches lors de co-cultures.

III. Co-culture

a. *Introduction*

Comme nous l'avons discuté précédemment, l'ajout de molécules de signal peut avoir un effet bénéfique sur l'efficacité de culture. Ainsi, la stratégie consistant à cultiver plusieurs espèces en même temps, qui libéreront et échangeront des molécules de signal, est la conséquence logique de cette approche. Pourtant, cette stratégie n'est pas sans risques, puisqu'au contraire de l'ajout contrôlé de molécules chimiques de concentrations connues en laboratoire, la co-culture se réfère plutôt à une boîte noire, dans laquelle il devient difficile voire impossible de déterminer les échanges entre les organismes. De plus, parmi les interactions entre organismes il peut y avoir des antagonismes et des inhibitions de croissance, par la production d'antibiotiques notamment.

b. *Efficacité de la co-culture*

Néanmoins, cette approche a permis avec succès l'isolement de bactéries jusqu'alors non-cultivées. C'est ainsi qu'une souche appartenant au genre *Psychrobacter* (MSC33) a pu être cultivée en co-culture avec une souche « helper » appartenant au genre *Cellulophaga* (MSC105) (Nichols et al., 2008). Les auteurs ont pu démontrer que

l'inducteur de la croissance sur boîtes pour la souche MSC33 était un peptide de 5 acides aminés (LQPEV) issu de la dégradation –par la souche helper– de la caséine présente dans le milieu. De plus, l'étalement répété de la souche MSC33 sur le même milieu a conduit à la production d'un variant, capable de pousser en culture pure. Cette stratégie est donc intéressante puisqu'une fois isolée, il est possible de l'étudier physiologiquement comme toute autre souche « classique », beaucoup plus facilement qu'en co-culture.

Une étude récente a également pu obtenir une souche (KLE1104) en co-culture (appartenant au genre *Maribacter*) avec une autre souche issue du même environnement et appartenant au genre *Micrococcus* (D'Onofrio et al., 2010). Les auteurs ont ensuite pu montrer qu'*E. coli* pouvait également induire la croissance de cette souche KLE1104, ainsi que celle de plusieurs autres souches issues du même environnement. Différents mutants d'*E. coli*, affectés ou non dans les gènes de biosynthèse du sidérophore entérobactine, ont été testés, et ont permis de montrer que la molécule nécessaire à la croissance de la souche était un sidérophore. L'ajout de cette molécule seule dans le milieu de culture permettait la croissance en culture pure de KLE1104 (Figure 7)

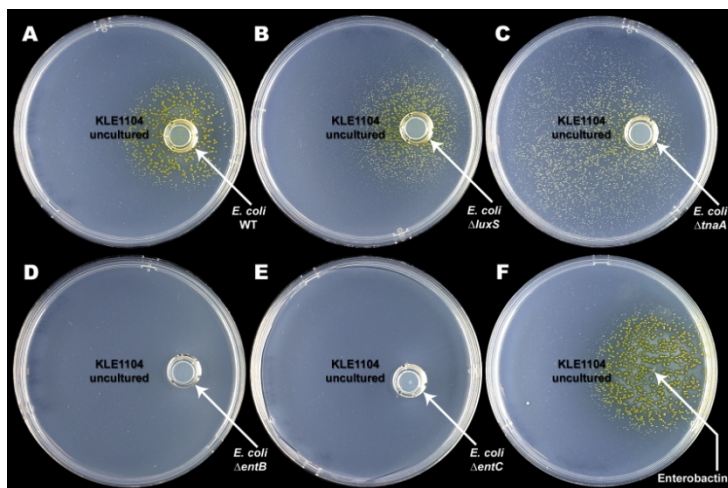


Figure 7 : Test de co-culture pour cultiver KLE1104. *E. coli* est utilisée comme souche helper, tandis que l'utilisation de différents mutants ou l'ajout d'entérobactine montrent que la souche KLE1104 a besoin d'un sidérophore (sécrété par *E. coli* ou déposé sous forme d'entérobactine) pour se développer sur boîtes (D'Onofrio et al., 2010).

Il est donc également possible d'inclure une espèce cultivée dans le milieu de culture gélosé, ce qui a pour effet d'augmenter la diversité cultivée sur ces plaques en comparaison des milieux « vierges » (Burmølle et al., 2009).

Pour conclure, il est maintenant admis que certaines bactéries sont donc capables d'induire la croissance de souches préalablement non-cultivées (Lewis et al., 2010). Cependant, des interactions inter-domaines existent également, puisqu'il a déjà été montré que des cellules eucaryotes, notamment humaines, sont capables d'induire le développement sur boîtes de bactéries « viables mais non-cultivables » (VBNC) (Steinert et al., 1997; Senoh et al., 2010). Les intermédiaires moléculaires responsables de cette synergie restent en revanche assez méconnus.

IV. Techniques « récentes »

a. *Introduction*

La co-culture est donc un moyen intéressant pour accéder à une diversité jusqu'alors « non-cultivée ». De plus, elle permet de se rapprocher des conditions « naturelles » en faisant intervenir les interactions inter-cellulaires complexes occurrentes *in situ*, et ainsi d'avancer dans la compréhension des interactions biotiques, donc dans la compréhension du fonctionnement d'une communauté. Dans ce même but, différentes approches de culture ont vu le jour récemment afin d'inclure l'ensemble des interactions biotiques, mais aussi abiotiques, permettant de mimer les conditions naturelles et donc permettant la culture de nouvelles espèces.

b. *Chambres de diffusion*

Les chambres de diffusion sont constituées d'un système basé sur la diffusion de molécules chimiques à travers une membrane (Kaeberlein et al., 2002). Concrètement, l'inoculum est mélangé avec de l'agar (0,7%) et, éventuellement, une source de nutriments supplémentaire (comme la caséine à 0,01%) et déposé entre 2 membranes de polycarbonate de 0,03 μm de diamètre de pore. Cette chambre de diffusion est ensuite déposée sur un sédiment non stérile, qui servira de source de nutriments d'une part, mais aussi (et surtout ?) qui permettra la diffusion de molécules de signal depuis les micro-organismes vivants dans ses sédiments vers ceux piégés dans la chambre. Cette technique a permis la culture, sous forme de micro-colonies invisibles

à l'œil nu, de bactéries représentant jusqu'à 40% de la quantité totale de cellules inoculées (Kaeberlein et al., 2002). Ces cellules sont pourtant incapables de pousser en culture pure sur boîtes de Petri contenant le même milieu, au delà de quelques divisions lors du premier repiquage, alors qu'elles peuvent être repiquées indéfiniment sur chambre de diffusion en cultures pures.

Cette étude montre ainsi qu'il est possible de cultiver certaines bactéries jusqu'alors non-cultivées en intégrant les interactions entre les micro-organismes et le milieu extérieur. Cette stratégie a ensuite été utilisée avec succès pour isoler d'autres souches bactériennes jusqu'alors non-cultivées (Bollmann et al., 2007; Bollmann et al., 2010; Nichols et al., 2010)

c. *Soil Substrate Membrane System (SSMS)*

Il est possible d'utiliser le sol comme substrat. Cette technique a été mise au point par Hamaki et al. (2005), et est basée sur la mise en suspension d'un sédiment, suivi d'une centrifugation, filtration du surnageant et utilisation comme milieu de culture après ajout d'agar. Ce procédé présente l'avantage d'être parfaitement fidèle en terme de composition chimique des conditions *in situ*, et a permis l'isolement de nombreuses souches jusqu'alors non-cultivées appartenant à la famille *Bradyrhizobiaceae*.

Néanmoins, le milieu est filtré, et les interactions biotiques sont donc réduites. Ainsi, une autre stratégie consiste en l'utilisation du sol non stérile comme source de nutriments et permettant les échanges biotiques entre l'inoculum et la matrice. Ce système SSMS (Soil Substrate Membrane System) (Figure 8) est basé sur l'utilisation du sol comme milieu de culture (Ferrari et al., 2005). Le système permet la diffusion de tous les facteurs de croissance (nutriments, molécules de signal) depuis le sol non stérile vers l'inoculum, sans risque de contamination. De plus, l'inoculum est fixé sur une membrane polycarbonate, qui peut ensuite être facilement manipulée.

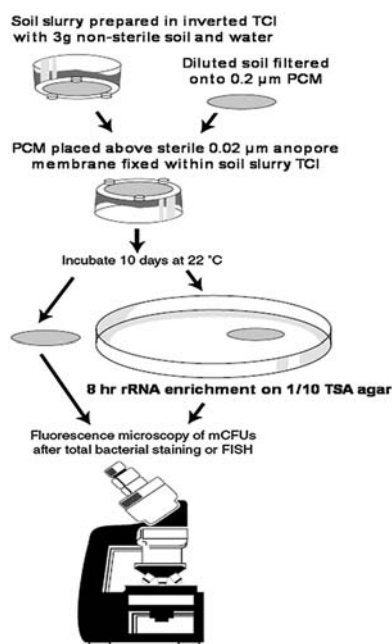


Figure 8 : Mise en place du SSMS. Le sol est déposé dans la cellule TCI (Tissue Culture Inserts) qui est retournée. L'inoculum filtré sur une 2^e membrane est ensuite déposé sur cette cellule TCI et le sol sert de milieu de culture par diffusion (Ferrari et al., 2005).

Cette technique a permis le développement en micro-colonies de nombreux groupes bactériens différents, incluant notamment ceux appartenant à la division candidate TM7 jusqu'ici non cultivés. Il est ensuite possible d'isoler en culture pure sur une autre membrane une micro-colonie, soit en découpant celle-ci au scalpel (Ferrari et

al., 2005), soit en faisant de la micro-manipulation (Ferrari and Gillings, 2009). De plus, des repiquages successifs sur boîtes de Petri permettent d'avoir des variants de ces nouveaux genres capables de former des macro-colonies visibles à l'œil nu, permettant ainsi des études physiologiques de ces souches plus faciles (Rasmussen et al., 2008).

d. *Approches à haut débit*

Ces approches font intervenir des techniques « single-cell », c'est-à-dire l'isolement puis l'étude d'une seule cellule à partir d'un échantillon complexe. En effet, la culture de bactéries jusqu'alors non cultivées est rendue possible par la prise en compte des interactions inter-cellulaires. Néanmoins, ces interactions sont plus complexes, et incluent également les antagonismes, c'est-à-dire ici une inhibition de la croissance d'une souche par une autre. Il a ainsi été observé qu'une diminution de la taille de l'inoculum pouvait résulter en une augmentation de la cultivabilité (Olsen and Bakken, 1987; Davis et al., 2005). Ainsi, des bactéries appartenant au phylum *Verrucomicrobia* ne peuvent pousser sur boîtes que lorsque le nombre de colonies sur chaque boîte n'excède pas 5 (Sangwan et al., 2005). Connon et Giovannoni (2002) ont appliqué ce principe en diluant leur inoculum pour arriver à des concentrations de 1 à 5 cellules par ml et ont inoculé 1 ml de cet inoculum dans des milieux de culture pauvre en nutriments dans des microplaques 48 puits. Cette première technique « à haut débit » leur a permis l'isolement de nouveaux groupes bactériens, notamment les bactéries appartenant au clade SAR11, se développant au maximum à des densités de l'ordre de 10^3 cellules/ml.

Cette approche résulte d'un mécanisme plus général lié à la séparation physique des cellules entre elles. Ainsi, un système de « micro boîtes de Petri » a été mis au point, qui autorise la culture séparée de bactéries dans des cupules séparées (Ingham et al., 2007) et l'obtention d'une diversité cultivée 10 fois plus grande que sur boîtes de Petri normales. Cette séparation physique peut être réalisée par cytométrie en flux, soit directement depuis l'échantillon, soit après une croissance des cellules en micro-colonies dans des micro-gouttes de gel d'agarose (Zengler et al., 2002).

D. LA COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE

I. Introduction

La structure de la communauté bactérienne est souvent déterminée par « métagénomique 16S », c'est-à-dire par une approche indépendante de la culture. Pourtant, il est supposé que les approches moléculaires –en plus des biais exposés précédemment– ne détectent que la diversité communément retrouvée dans un écosystème donné et ne représentent donc que les bactéries les plus abondantes, tandis que la culture –notamment les nouvelles approches culturales– permet d'avoir accès à des bactéries rares (Fuhrman, 2009).

Mais qu'est-ce qu'une population rare ? Comment la mesurer ? Quel est son impact dans les processus biogéochimiques ? Plus généralement, une communauté bactérienne est-elle stable ou varie-t-elle au cours du temps ? Si elle varie, quels sont les facteurs influençant cette structure ? Ainsi, les chercheurs en écologie microbienne tentent de répondre à deux questions majeures : « qui est là » et « qui fait quoi » (« who's there and what are they doing? ») (Nealson, 1997).

II. La notion d'espèce

a. Définition

Afin de définir la diversité présente au sein d'une communauté, il convient en premier lieu de définir des critères discriminatoires permettant d'affilier une souche donnée à une espèce donnée. La notion d'espèce chez le eucaryotes est définie par rapport à la reproduction sexuée et correspond à des groupes de populations naturelles qui se croisent (réellement ou potentiellement) et qui sont isolées, sur le plan de la reproduction, des autres groupes similaires. (Mayr, 1942). Cependant, cette définition ne peut s'appliquer aux procaryotes puisqu'ils sont asexués. La frontière délimitant la souche, l'espèce et le genre est donc plus floue et nécessite d'autres critères.

b. Notion d'espèce chez les procaryotes

En taxonomie procaryotique, une souche définit une nouvelle espèce si elle possède des caractéristiques phénotypiques et génétiques qui permettent de la différencier d'autres espèces déjà décrites. Il est généralement admis que 2 souches sont d'espèces différentes si elles présentent une séquence de gène codant l'ARNr 16S présentant moins de 97% d'identité entre elles (Tindall et al., 2010). Pour des souches possédant plus de 97% d'identité, il est indispensable de réaliser une hybridation ADN-ADN (DDH) afin de déterminer l'identité globale entre les 2 souches, la limite admise pour appartenir à la même espèce étant une valeur DDH de 70% (Tindall et al., 2010). Cependant, cette distinction génétique ne suffit pas, notamment parce qu'il a déjà été

montré qu'au sein d'un même clone peuvent coexister plusieurs gènes codant l'ARNr 16S, présentant jusqu'à 5% de différence nucléotidique entre eux (Mylvaganam and Dennis, 1992; Nübel et al., 1996). Cette différence de 5% est souvent considérée comme étant la limite séparant deux genres différents (Tindall et al., 2010). C'est pour cette raison que des différences phénotypiques bien marquées doivent également être présentes, et que chaque nouvelle espèce doit être caractérisée de façon la plus complète possible, incluant également la composition en acides gras et lipides polaires de la membrane, ainsi que des données génomiques comme le taux de G+C (Tindall et al., 2010) ou des données métaboliques.

De par ces définitions, la culture reste le seul moyen de définir une espèce. C'est pour cette raison que ce terme n'est en général pas utilisé pour nommer les bactéries retrouvées par approches moléculaires basées sur le gène codant l'ARNr 16S, qui utilisent généralement le terme d'OTU (Operational Taxonomic Unit) (Sokal and Sneath, 1963). L'OTU est définie dans chaque étude, les auteurs définissant eux-mêmes le pourcentage de similarité caractérisant une OTU. Ainsi une OTU peut correspondre à une espèce, un genre, une famille voire même des rangs taxonomiques supérieurs, en fonction de la précision de l'étude.

III. Biosphère rare

a. Notion de biosphère rare

Tous les taxons bactériens ne sont pas retrouvés à même abondance dans un écosystème donné. Au contraire, il est admis que chaque échantillon est composé d'un faible nombre de taxons retrouvés à grande abondance, et d'un très grand nombre retrouvés à faible abondance. Cette observation est valable pour les écosystèmes les plus « simples » comme les drainages miniers acides (en bleu sur la Figure 9) aux plus complexes comme des sédiments (en jaune sur la Figure 9) (Curtis and Sloan, 2005; Pedrós-Alió, 2007).

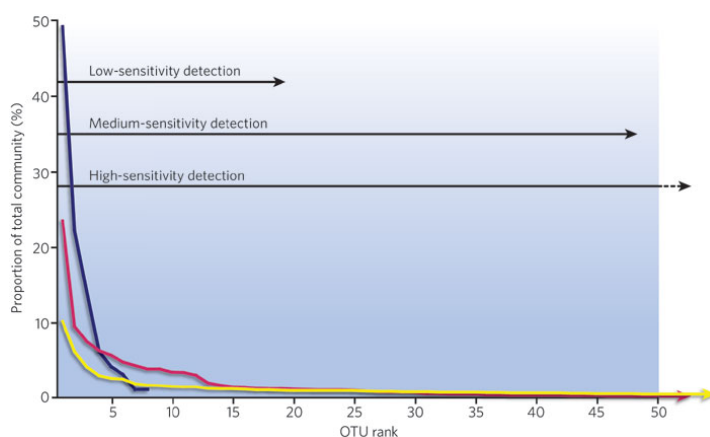


Figure 9 : Représentation du nombre de taxons en fonction de l'abondance. Le nombre d'espèces retrouvées à faible abondance est très important tandis que le nombre d'espèces retrouvées à forte abondance est faible. En bleu, les données d'un drainage minier acide, en rouge, du plancton marin et en jaune du sédiment. Les flèches noires correspondent aux possibilités de détection des bactéries rares en fonctions de la limite de détection de la méthode utilisée (Fuhrman, 2009).

Cette seconde catégorie a été appelée « biosphère rare » par Sogin et al. (2006). Ces derniers ont utilisé les nouvelles technologies de séquençage (pyroséquençage) afin d'obtenir plus de données provenant d'un métagénome, en amplifiant la partie hypervariable V6 du gène codant l'ARNr 16S. Il a ainsi pu identifier

expérimentalement les taxons présents et mesurer l'abondance de cette biosphère rare. Cette détection est notamment rendue possible grâce aux nouveaux outils de séquençage, permettant de séquencer plusieurs dizaines de milliers de fragments aisément, permettant la détection de séquences faiblement représentées au sein de l'échantillon (Figure 9) . Il est maintenant considéré que la biosphère rare correspond aux taxons dont les individus représentent moins de 1% de la communauté totale (Fuhrman, 2009). Il est globalement accepté que les bactéries « dominantes » sont responsables de la grande majorité des processus biogéochimiques (Gobet et al., 2011). Néanmoins, celles-ci peuvent avoir un rôle important dans le fonctionnement et la stabilité d'une communauté bactérienne.

b. *Activité de la biosphère rare*

Une partie de cette biosphère rare peut être en dormance ou sous forme de spores (Dworkin and Shah, 2010) mais peuvent devenir actives, voire abondantes, quand les conditions physico-chimiques changent (Brazelton et al., 2010; Dworkin and Shah, 2010). Néanmoins, cette biosphère rare peut aussi être active (Campbell et al., 2011) et jouer un rôle majeur dans le fonctionnement d'une communauté. En effet, il a par exemple été montré que des bactéries sulfato-réductrices, représentant 0,006% des procaryotes totaux au sein d'un échantillon issu d'une tourbière, étaient responsables d'une part considérable de la réduction du sulfate (Pester et al., 2010). De façon identique, des bactéries rares appartenant au genre *Methylophaga* constituent le groupe majeur de bactéries marines métabolisant le méthanol (Neufeld et al., 2008).

Ainsi, les bactéries « rares » peuvent contribuer significativement aux processus biogéochimiques réalisés par une communauté bactérienne. De plus, ces espèces rares peuvent constituer un réservoir d'espèces, qui peuvent devenir abondantes et avoir un rôle, notamment en cas de changements des conditions environnementales (Lennon and Jones, 2011). Ces bactéries contribuent donc au maintien et à l'équilibre de chaque communauté bactérienne à travers le temps.

IV. Variation temporelle dans une communauté microbienne

a. Introduction

Les études s'intéressant à la communauté microbienne –que ce soit sa structure ou son fonctionnement– portent généralement sur un point de prélèvement précis, à un instant donné. Ainsi, les résultats obtenus présentent une image instantanée de la communauté. Cependant, il a été montré que la structure et donc le fonctionnement d'une communauté peuvent varier en fonction des changements des conditions physico-chimiques (pH, température, oxygénation, concentration en métaux, etc.) (Comeau et al., 2011; Gobet et al., 2011). Ces facteurs sont nombreux, et il est très difficile de discriminer un facteur unique comme étant responsable des variations observées, de même qu'il est impossible d'exclure les variations stochastiques comme intervenant dans ces variations (Böer et al., 2009).

b. *Variation journalière*

Une communauté microbienne peut varier rapidement –à l'échelle de quelques jours– suite à un changement environnemental, comme par exemple après ajout de débris de diatomées (Abell and Bowman, 2005). De la même façon, un travail en mésocosmes montre par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) une augmentation importante en quelques jours de l'abondance de bactéries marines appartenant au genre *Cycloclasticus* après ajout d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAHs) suivi d'un retour à une densité plus faible, lorsque la quantité de PAH diminue (Teira et al., 2007). Ils montrent aussi que cette fluctuation est liée au mois de prélèvement, donc à la saison, avec une plus faible augmentation de l'abondance lors de la saison estivale (Figure 10). Ces études montrent bien que des facteurs environnementaux (qu'ils soient d'origine biotiques ou abiotiques) influent sur la structure de la communauté microbienne, et que celle-ci peut varier rapidement.

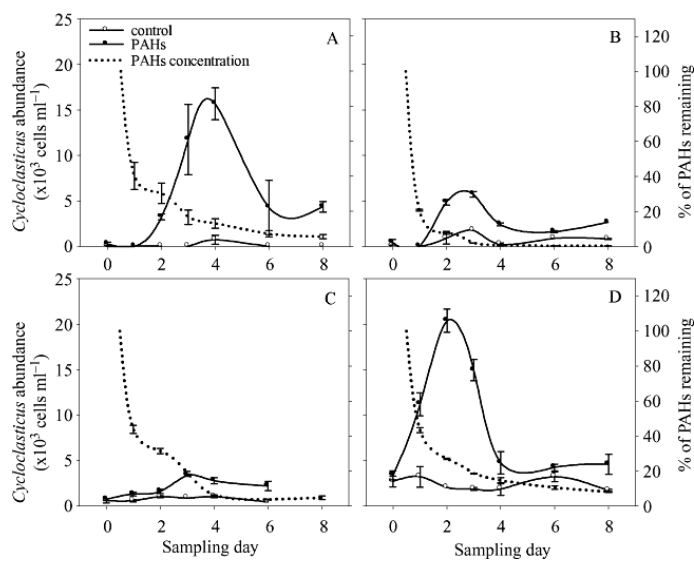


Figure 10 : Variation journalière de l'abondance de *Cycloclasticus* en fonction du nombre de jours après ajout du polluant (PAH), en fonction des saisons. Les courbes présentant les points creux correspondent au contrôle, c'est-à-dire à la condition sans ajout de PAH, tandis que les courbes avec les points pleins correspondent au culture mise en présence de PAH. La concentration en PAH est présentée en pointillés. Quelques jours après ajout de PAH, l'abondance de *Cycloclasticus* augmente puis revient presque à l'initiale. Ces variations sont également dépendantes de la période de l'année. (A) : Mars, (B) : Juillet, (C) : Septembre, (D) : Janvier (Teira et al., 2007).

c. Variation annuelle

Étant donné qu'une communauté bactérienne semble varier en fonction des différents facteurs environnementaux (biotiques et abiotiques), il serait possible de prédire les conséquences sur la communauté bactérienne de la variation d'un ou de plusieurs de ces facteurs. Ainsi, Fuhrman et al. (2006) montrent dans une étude se déroulant sur 54 mois qu'une certaine proportion d'OTUs est retrouvée périodiquement, de sorte qu'il est possible de prévoir sa présence au sein d'une communauté complexe en fonction de changements des conditions environnementales. Néanmoins, ils n'ont pas pu définir quel(s) paramètre(s) expliquai(en)t la présence cyclique de ces OTUs. De même, une étude récente menée sur 6 ans sur des échantillons marins confirme une certaine saisonnalité, et il leur a même été possible de déterminer le mois de prélèvement d'un échantillon en fonction du pattern de communauté retrouvé (Gilbert et al., 2012). Cependant, étant donné leur rapide réactivité (voir le point précédent) vis-

à-vis des différents changements environnementaux, il est difficile de démontrer qu'une communauté microbienne varie selon un cycle annuel. Ceci est d'autant plus valable pour les petits cours d'eau, où les changements environnementaux peuvent être brutaux, les communautés répondant plus rapidement aux changements ponctuels et présentant donc une composition de communauté très variable (Portillo et al., 2012).

d. *Variations à long terme*

Les communautés bactériennes sont donc sujettes à des variations en fonction des conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent. Cette observation est valable à l'échelle de quelques jours (Teira et al., 2007), de quelques années (Fuhrman et al., 2006) et même de quelques siècles (Brazelton et al., 2010). Cette dernière est encore plus difficile à démontrer, étant donné l'absence de recul dans l'étude des micro-organismes. Cependant, certains sites bien particuliers présentent des caractéristiques permettant une telle approche. En effet, une étude a été menée récemment sur des cheminées hydrothermales atlantiques (The Lost City hydrothermal field, Atlantique). Celles-ci sont présentes et conservées depuis plusieurs dizaines de milliers d'années, de sorte qu'il est possible d'une part de dater chaque prélèvement réalisé sur une cheminée et d'autre part d'extraire l'ADN métagénomique retrouvé dans cette cheminée (Brazelton et al., 2010). Ceci permet ainsi de déterminer la structure de la communauté bactérienne (par amplification de la région V6 du gène codant l'ARNr 16S) avec une datation précise. Ainsi, les auteurs ont pu montrer que des bactéries qui étaient rares il y a plus de 1200 ans sont devenues abondantes aujourd'hui, et

inversement et que ces abondances peuvent être corrélées à des changements dans les conditions physico-chimiques du milieu.

e. *Influence de ces variations*

Ces variations de communautés sont importantes, puisqu'elles permettent à l'écosystème de se maintenir. En effet, une fonction donnée peut être portée par différents groupes bactériens, dont les abondances relatives varient en fonction des conditions physico-chimiques, sans pour autant que la fonction ne soit perdue (Lamy et al., 2010). Ainsi, 2 communautés provenant d'une niche écologique similaire (la surface d'une algue) présentent uniquement 15% de similarité phylogénique mais 70% en composition fonctionnelle (COG) (Burke et al., 2011). De la même façon, une étude en microcosmes montre qu'une dilution de plusieurs ordres de l'inoculum (simulant donc une diminution de la diversité) n'affecte pas les activités de dénitrification ou d'oxydation des nitrites retrouvées au sein de ces microcosmes (Wertz et al., 2007). Ceci s'explique par la redondance fonctionnelle, c'est-à-dire le fait qu'une fonction puisse être assurée suite à des changements environnementaux, alors même que la composition de la communauté change (Bowen et al., 2011). Ces mêmes auteurs estiment d'ailleurs qu'il faudrait analyser une communauté non pas en fonction de la composition bactérienne de celle-ci, mais en fonction des gènes qui la composent.

Toute communauté semble être plus complexe et diverse que ce qui avait été auparavant imaginé. Cependant, la diversité totale peut rester largement invisible ou

très difficile à détecter, notamment à cause de la sensibilité des techniques moléculaires (Pedrós-Alió, 2006). Beaucoup de chercheurs en écologie microbienne ont intégré cette notion dans un concept plus vaste : « everything is everywhere, but the environment selects ».

V. L'hypothèse : « Everything is everywhere, but the environment selects »

a. *Histoire de cette hypothèse*

Dès le début du XXe siècle, alors que les outils moléculaires étaient encore rudimentaires, voire inexistantes, quelques scientifiques s'intéressaient à cette notion de communauté bactérienne et à celle des variations des abondances relatives. Ainsi, Baas-Becking (1895-1963), Hollandais inspiré par son compatriote Beijerinck, exposa en 1934 sa théorie selon laquelle tous les micro-organismes sont retrouvés partout, mais seul l'environnement va sélectionner et enrichir certains d'entre eux spécifiquement (pour revue, voir (De Wit and Bouvier, 2006)). Cette théorie est en fait une extension des principes de Beijerinck, qui expliqua la notion de culture par enrichissement : en fonction des conditions du milieu de culture, il est possible de sélectionner certaines souches bactériennes précises et de les enrichir.

b. *Observations récentes*

Cette hypothèse du « everything is everywhere » est appuyée aujourd'hui par plusieurs études (Finlay, 2002; Fenchel and Finlay, 2004), notamment parce qu'elle est

liée à la théorie de la dispersion, selon laquelle il n'existe pas de barrière physique entre les habitats, et que chaque micro-organisme peut être transporté (par l'eau, le vent, les animaux...) vers tout autre habitat que celui d'origine (Fuhrman, 2009). Une étude récente (Hubert et al., 2009) détermine à $10^8/m^2/an$ le nombre de spores non actives – mais activables après augmentation de la température à $50^\circ C$ – d'une souche thermophile appartenant au phylum *Firmicutes* dans des sédiments marins de l'arctique, et les auteurs expliquent que cette présence est due aux courants d'eaux provenant d'environnements lointains plus chauds.

La théorie « everything is everywhere but the environment selects » est impossible à contredire, étant donné qu'il est (pour l'instant ?) impossible de démontrer l'absence totale d'une souche au sein d'une communauté –notamment à cause des biais exposés précédemment– (Martiny et al., 2006; Fuhrman, 2009). Certains estiment que la théorie neutraliste (neutral theory), c'est-à-dire basée sur le hasard (spéciation, dispersion, et extinction), prédomine pour expliquer l'évolution de la structure d'une communauté (Ofiteru et al., 2010). D'autres au contraire tendent à montrer que la théorie des niches, c'est-à-dire basée sur les interactions entre individus d'une part, et entre individus et l'environnement d'autre part, déterminent la structure de la communauté (Jeraldo et al., 2012).

Ces études, parfois contradictoires, montrent la complexité liée à l'étude de communautés dans son ensemble. Lorsqu'il faut ajouter des paramètres environnementaux, parfois inconnus, à cette étude, la difficulté croît encore. C'est

notamment pour cette raison que des écosystèmes *a priori* plus simples sont abondamment étudiés.

E. LES DRAINAGES MINIERS ACIDES ET L'ARSENIC

I. Introduction

a. *Choix du site d'étude*

Tout environnement est colonisé par une communauté bactérienne et fongique. Ainsi, ces (micro-)organismes participent à la stabilité de l'écosystème dont ils sont issus. Les environnements extrêmes sont étudiés pour plusieurs raisons. Ils permettent d'obtenir des enzymes aux propriétés intéressantes, souvent fonction de leur origine (Niehaus et al., 1999). Certains environnements extrêmes peuvent également refléter les conditions initiales de vie et leur étude permet de proposer des hypothèses quant aux origines de la Vie et aux processus biologiques associés (Lebrun et al., 2003). Enfin, certains sites sont étudiés principalement en recherche fondamentale, notamment pour comprendre le fonctionnement de communautés microbiennes. C'est le cas des drainages miniers acides.

b. *Caractéristiques des drainages miniers acides*

Depuis des centaines d'années, l'activité minière a conduit à l'accumulation de stériles miniers contenant généralement des roches toujours riches en soufre, métaux et métalloïdes (fer, arsenic, zinc...). Ainsi, l'érosion de ces roches par les eaux de pluie va provoquer la formation d'un drainage riche de ces éléments. De plus, les composés soufrés vont contribuer à la formation d'acide sulfurique, engendrant ainsi une

acidification massive du drainage, appelé Drainage Minier Acide (DMA). De part leurs fortes concentrations en métaux et un pH très acide, les DMAs sont qualifiés d'environnements extrêmes (Leblanc et al., 1996), c'est-à-dire hostiles à la vie pour de nombreux organismes. Il est donc généralement admis que la diversité bactérienne au sein de ces sites est faible (Bond et al., 2000; Baker and Banfield, 2003; Bruneel et al., 2005). Il a par exemple été calculé qu'une contamination importante par des métaux (cadmium, cuivre, nickel et zinc à plusieurs dizaines de mg/kg) provoque une diminution de la diversité microbienne de 99.9% (Gans et al., 2005). Cette faible diversité retrouvée dans les DMAs est propice à l'étude du fonctionnement d'une communauté, car il est plus facile d'attribuer un/des rôles à des organismes quand ceux-ci sont peu diversifiés (Denef et al., 2010). C'est pour cette raison que la première étude métagénomique globale, ayant permis la reconstruction complète de génomes issus de bactéries non-cultivées, a été faite sur un biofilm provenant d'un DMA (Tyson et al., 2004).

II. L'arsenic

a. Généralités

Parmi les éléments chimiques fréquemment retrouvés dans les DMAs et influençant grandement la structure et la fonction de ces écosystèmes se trouve l'arsenic. L'arsenic est un métalloïde, c'est-à-dire possédant des caractéristiques hybrides entre les métaux et les non-métaux. C'est un élément retrouvé de façon ubiquiste dans la croûte terrestre (Vaughan, 2006). L'arsenic est étroitement lié au

soufre et à différents métaux, comme le fer, le zinc ou le cobalt (O'Day, 2006) pour former des minéraux comme l'orpiment As_2S_3 ou l'arsénoyrite FeAsS .

L'arsenic inorganique existe sous 4 degrés d'oxydation : l'arséniate As(V) , l'arsénite As(III) , l'arsenic natif As(0) et le gaz arsine As(-III) (Figure 11). Ces 2 dernières formes sont rares dans la nature. Au contraire, les formes réduites As(III) et oxydées As(V) sont présentes naturellement dans l'eau et le sol. L'espèce As(III) , très mobile, est considérée comme la forme d'arsenic la plus toxique. L'espèce As(V) qui a tendance à s'adsorber plus facilement sur de nombreux éléments organiques et minéraux est aussi considérée comme étant un peu moins toxique (Morin and Calas, 2006), même si ces deux espèces sont responsables d'empoisonnements tristement célèbres.

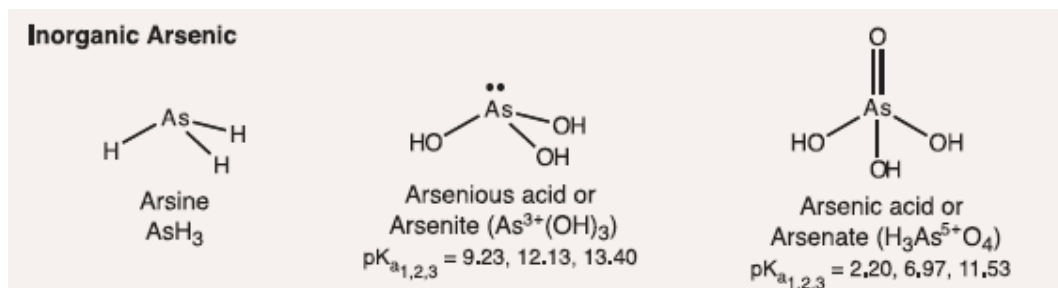


Figure 11 : Les différentes espèces d'arsenic inorganiques autre que l' As(0) (O'Day, 2006). L'arsine est très peu retrouvé naturellement, tandis que l'arsénite et l'arséniate sont retrouvés communément.

b. Toxicité

L'arsenic est considéré par l'OMS comme responsable du plus grand empoisonnement de masse de l'histoire de l'humanité (Smith et al., 2000), avec plus de 80 millions de personnes touchées pour le seul Bangladesh (Hopenhagen, 2006).

Énormément de régions montagneuses sont touchées, l'arsenic présent dans les roches et le fond géochimique est également retrouvé dans les eaux souterraines puisées pour la consommation humaine (Charlet and Polya, 2006). Les contaminations chroniques à l'arsenic engendrent des cancers et lésions de la peau, notamment la maladie du pied noir (Blackfoot disease) (Hopenhayn, 2006). À l'échelle moléculaire, l'As(III) est notamment capable de se lier aux groupements sulfhydryl -SH des protéines et perturbe le fonctionnement de celles-ci. L'As(V) est un analogue du phosphate et peut ainsi se substituer à lui dans les molécules clés de la cellule. Cette substitution dérèglera d'une part le métabolisme énergétique par la formation d'un complexe ADP-arséniate instable à la place de l'ATP. D'autre part, il peut se substituer au groupement phosphate au niveau de l'ADN pour le rendre beaucoup moins stable et donc facilement cassable (Carter et al., 2003; Rosen et al., 2011).

c. Arsenic et micro-organismes

L'arsenic étant un élément toxique, la plupart des organismes, procaryotes et eucaryotes, possède des mécanismes de résistance à ce métalloïde (Figure 12). L'arsenic entre dans les cellules par différents moyens en fonction de sa forme. La forme As(V), analogue du phosphate, entrera par des transporteurs du phosphate Pit (Phosphate Inorganic Transport) ou Pst (Phosphate Specific Transport), mais de façon beaucoup plus efficace avec le Pit (Rosen, 2002). *A contrario*, l'entrée de l'As(III) est moins connue. Il a été montré que l'aquaglycéroporine Glpf chez *E. coli* est responsable de l'entrée de

l'As(III) (Meng et al., 2004), mais d'autres mécanismes existent, faisant intervenir des hexoses perméases chez *Saccharomyces cerevisiae* notamment (Liu et al., 2004).

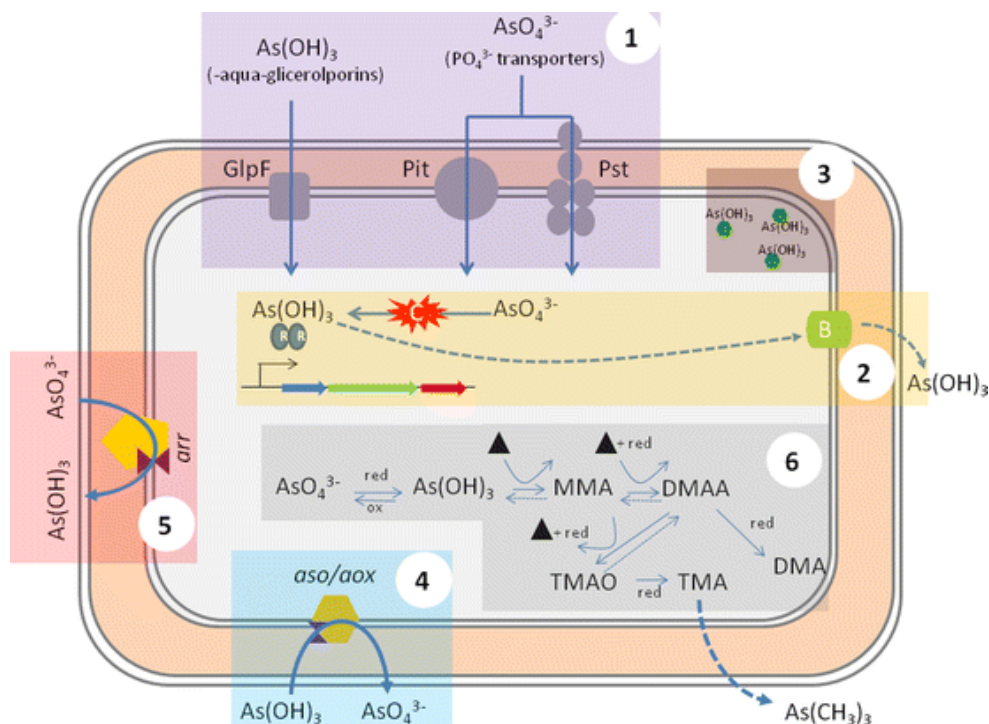


Figure 12 : Métabolisme de l'arsenic chez les bactéries. En 1 sont représentés les systèmes d'entrée de l'arsenic, via les aquaglycéroporines (pour l'As(III)) ou les transporteurs du phosphate (pour l'As(V)). En 2, l'extrusion de l'As(III) via les pompes ArsB. En 3, la chélation de l'As(III) sur des peptides. En 4, l'oxydation de l'arsénite via l'arsénite oxydase Aio. En 5, la réduction de l'As(V) pour la respiration en anaérobie. En 6, la méthylation de l'arsenic (Páez-Espino et al., 2009).

Une fois dans la cellule, l'As(III) peut être sécrété hors de la cellule par une pompe d'efflux ArsB, couplée ou non à une ATPase ArsA. La forme As(V) nécessite une réduction sous sa forme As(III) par ArsC avant extrusion hors de la cellule par ArsB (Carlin et al., 1995). Ce mécanisme de résistance à l'arsenic est très largement répandu chez les procaryotes et est également retrouvé chez les eucaryotes avec des protéines homologues. L'arsenic peut également être méthylation pour être ensuite volatilisé sous

forme de triméthylarsine (TMA), grâce à une méthylase ArsM. Ce mécanisme de défense est moins courant chez les procaryotes mais se retrouve plus fréquemment chez les champignons et les cellules humaines (Páez-Espino et al., 2009).

De nombreuses bactéries sont en outre capables d'utiliser l'arsenic dans leur métabolisme énergétique. En effet, certaines sont capables d'oxyder l'As(III) en As(V) grâce à une enzyme dimérique appelée arsénite oxydase dont la nomenclature a été revue récemment (AioBA=AoxAB=AroBA=AsoBA (Lett et al., 2012)). Il existe cependant encore un doute sur le rôle exact de l'oxydation de l'arsenic. En effet, il a été montré chez *Herminiimonas arsenicoxydans* que cette oxydation n'engendrait pas une augmentation de la vitesse de croissance, mais un mutant incapable d'oxyder l'As(III) résistait moins bien à l'arsenic (Muller et al., 2003), ce mécanisme semblant donc être un mécanisme de résistance. *A contrario*, certaines souches chimiolithotrophes sont capables d'utiliser l'As(III) comme donneur inorganique d'électrons (Battaglia-Brunet et al., 2006) pour leur croissance.

Enfin, certaines bactéries sont capables d'utiliser l'As(V) comme accepteur terminal d'électrons pour une respiration anaérobie (Malasarn et al., 2004; Hoeft et al., 2007). Cette réaction fait intervenir une enzyme dimérique appelée ArrAB, qui est une arséniate réductase respiratoire.

Ainsi, les micro-organismes interagissent fortement avec l'arsenic et jouent donc un rôle majeur dans le cycle de l'arsenic, en particulier dans les écosystèmes contaminés par l'arsenic, comme au niveau du drainage minier acide de Carnoulès.

III. Site de Carnoulès

a. *Présentation du site*

Le DMA situé à Carnoulès (Gard) est issu d'une ancienne mine de plomb et de zinc (Figure 13). Les eaux de drainages percolent à travers le terril pour se déverser dans le Reigous, petit ruisseau passant directement sous ce terril. Cette eau est lourdement chargée en arsenic (jusqu'à 350 mg/L) et en fer (2700 mg/L) notamment, et présente un pH acide (pH 2,7-3,4) (LeBlanc et al., 2002). Au cours de l'écoulement de l'eau jusqu'à sa dilution dans la rivière Amous 1,5 km en aval, l'activité microbienne engendre une décroissance importante de la concentration en arsenic dans les eaux (LeBlanc et al., 2002). Cette diminution naturelle est due aux réactions d'oxydoréduction se déroulant le long du Reigous. En effet, l'arsenic est présent en amont du ruisseau principalement sous sa forme réduite As(III). Cet As(III) est progressivement oxydé en As(V), forme moins mobile que sa forme réduite, puisqu'il co-précipite plus facilement avec différents métaux comme le fer présent sous forme d'oxyhydroxydes (LeBlanc et al., 2002; Egal et al., 2010).

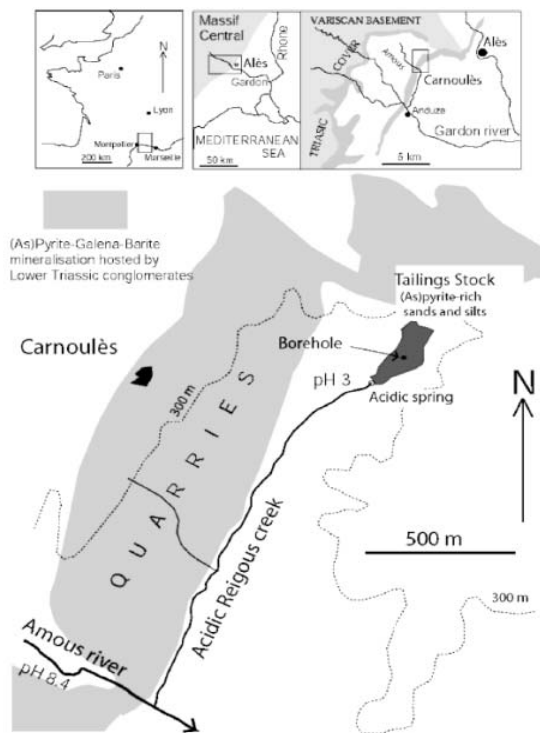


Figure 13 : Description schématique du site de Carnoulès. Le Reigous est le cours d'eau lourdement contaminé, qui se jette ensuite dans la rivière Amous (Bruneel et al., 2005).

b. Diversité microbienne dans l'eau de Carnoulès

Afin de comprendre les mécanismes intervenant dans cette bio-atténuation, et par voie de conséquence comment fonctionne la communauté, la détermination de la composition microbienne est fondamentale.

Ainsi, les premières études biologiques sur ce site ont été réalisées sur les eaux de drainage constituant le Reigous. Ces études étaient principalement basées sur l'analyse « métagénomique 16S » (Bruneel et al., 2005; Bruneel et al., 2006; Bruneel et al., 2008), et ont toutes pointé une diversité stable mais faible, en concordance avec d'autres études menées sur d'autres DMAs (Bond et al., 2000; Baker and Banfield, 2003). En parallèle, les approches culturales sur l'eau de Carnoulès ont permis l'isolement de seulement 3 genres bactériens, appartenant aux genres *Thiomonas* sp., *Acidithiobacillus*

sp. et *Burkholderia* sp. (Bruneel et al., 2003; Casiot et al., 2003; Duquesne et al., 2003; Duquesne et al., 2007). À ce jour, aucun eucaryote n'a été isolé de l'eau de Carnoulès.

c. Diversité microbienne dans les sédiments de Carnoulès

Les sédiments oxiqes se trouvant dans le lit du Reigous ont également été étudiés par des approches indépendantes de la culture (Figure 14). La composition bactérienne se révèle être relativement faible, composée d'une vingtaine de genres différents (Bertin et al., 2011; Bruneel et al., 2011). Cependant, aucune approche culturale n'a été menée pour isoler des bactéries issues du sédiment de Carnoulès. Le seul micro-organisme isolé des sédiments de Carnoulès est un eucaryote : le protiste unicellulaire appelé *Euglena mutabilis* (Halter et al., 2012a).



Figure 14 : Le Reigous à Carnoulès. La couleur orangée correspond à la précipitation du fer le long du cours d'eau.

d. *Analyses physiologiques et génomiques en conditions de laboratoire*

Comme nous l'avons indiqué, le métabolisme bactérien joue un rôle central dans les processus minéralogiques de Carnoulès. En effet, certaines souches bactériennes isolées du DMA de Carnoulès, appartenant notamment au genre *Thiomonas*, sont capables d'oxyder l'As(III) en As(V), grâce à l'arsénite oxydase (AioAB) (Bruneel et al., 2003; Casiot et al., 2003; Duquesne et al., 2008). Cette oxydation biotique va induire une transformation progressive de la forme As(III) en As(V) le long du Reigous. Différentes souches appartenant au genre *Thiomonas*, isolées ou non de Carnoulès, ont ensuite été testées physiologiquement, notamment pour leurs réponses à l'arsenic (Bryan et al., 2009). Ce travail a permis de montrer que ces souches possèdent des variabilités phénotypiques importantes, notamment en relation avec le métabolisme de l'arsenic. En effet, deux de ces souches, *Thiomonas* 3As et *Thiomonas arsenivorans*, sont capables d'utiliser l'As(III) comme donneur inorganique d'électrons et le carbone inorganique comme source de carbone, pour une croissance totalement lithoautotrophe tandis que les souches non issues de Carnoulès et n'oxydant par l'arsenic sont moins résistantes à ce métalloïde.

En concordance avec ces résultats, le génome de *Thiomonas* 3As a été entièrement séquencé, annoté et analysé, puis utilisé comme matrice pour l'analyse par puces CGH (Comparative Genomic Hybridization) avec d'autres souches de *Thiomonas* non-séquencées (Arsène-Ploetze et al., 2010). La variabilité phénotypique intra- comme inter-spécifique au sein du genre *Thiomonas* est corrélée à de grandes variations

génomiques, principalement sous forme de gains et pertes d'îlots génomiques complets induisant cette variabilité phénotypique.

Parallèlement, une souche appartenant à l'espèce *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolée du site est capable d'oxyder le fer Fe(II) en Fe(III) (Duquesne et al., 2003), permettant la co-précipitation du Fe(III) formé avec l'arsenic. Cette co-précipitation fer-arsenic est responsable de la couleur orangée caractéristique de Carnoulès (Figure 14) et explique la bio-atténuation naturelle mesurable *in situ* (LeBlanc et al., 2002).

Euglena mutabilis isolée du sédiment a été étudié pour sa capacité à résister à de fortes concentrations en arsenic, et la réponse au stress arsénié a été comparée à celle d'*Euglena gracilis*, souche modèle ne provenant pas d'environnements extrêmes. Il a par exemple été montré que les cellules d'*Euglena mutabilis* possèdent des propriétés de surface bien plus hydrophobes que celles d'*Euglena gracilis*, la rendant beaucoup plus résistante aux composés arséniés solubles dans l'eau et accumulant moins d'arsenic dans le compartiment intra-cellulaire (Halter et al., 2012a). De plus une analyse protéométabolomique montre le rôle de producteur primaire d'*Euglena mutabilis* à Carnoulès, notamment pour sa capacité à sécréter des acides aminés et de l'urée, utilisables par le reste de la communauté (Halter et al., 2012b).

e. *Approche méta-protéomique*

Les approches méta-omiques permettent d'étudier de manière globale, sans *a priori* le comportement *in situ* d'une communauté entière. Ces approches ont été menées à Carnoulès au niveau d'un point de prélèvement appelé CowG (Carnoulès oxidizing wetland, G) (Bertin et al., 2011). Les ADN ont été extraits, puis séquencés par les techniques de Sanger et pyroséquençage « 454 » avant d'être réassemblés. Les protéines ont été extraites après fractionnement de l'échantillon par gradient de Nycodenz, séparées sur gel avant analyse par spectrométrie de masse.

L'approche métagénomique a permis l'assemblage quasi complet de 7 génomes dominants à Carnoulès (appelés CARN1 à CARN7), dont 5 appartiennent à des souches non-cultivées (Bertin et al., 2011). CARN2 fait partie des bactéries du genre *Thiomonas*, tandis que CARN5 fait partie du genre *Acidithiobacillus*, 2 genres préalablement isolés à Carnoulès et intervenant directement dans la bio-atténuation observée *in situ* par leur capacité à oxyder l'As(III) et le Fe(II), respectivement (Bruneel et al., 2003; Duquesne et al., 2003). Les génomes reconstitués de chaque CARN ont été annotés et analysés pour estimer le rôle de chacune de ces souches dans le fonctionnement de la communauté. Pour confirmer les potentialités génétiques de chaque CARN, de la méta-protéomique ainsi que des RT-PCR ciblées ont été menées.

Ainsi, ces approches ont permis l'élaboration d'un modèle intégré des interactions métaboliques possibles à Carnoulès et ont permis d'attribuer un/des rôle(s)

pour chacune de ces CARNs au sein de la communauté (Figure 15). Les gènes codant l'arsénite oxydase (*aioAB*) ont par exemple été retrouvés uniquement dans le génome de CARN2, tandis que la métaprotéomique a permis de confirmer la synthèse *in situ* de la protéine correspondante. De même, la rusticyanine RusA permettant l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) n'est retrouvée que chez CARN5, suggérant un rôle majeur de cette espèce dans le fonctionnement de la communauté. Parallèlement, les gènes codant le ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase ainsi que ceux correspondant au carboxysome ont été retrouvés dans les génomes de CARN2, CARN5 et CARN7, et l'expression de ceux-ci a été confirmée par métaprotéomique. Ainsi les bactéries correspondantes sont capables de fixer le carbone inorganique et de produire de la matière organique dans ce site oligotrophe.

Cette étude a également permis de mettre en évidence la présence de 2 souches correspondant à 2 sous-populations d'un nouveau phylum non-cultivé. Ce phylum, dont les représentants CARN1 et CARN4 sont appelés *Candidatus Fodinabacter communicans*, est retrouvé en abondance à Carnoulès et est très actif, en atteste la quantité importante de protéines correspondant à ces 2 génomes retrouvées par métaprotéomique. Cependant, il semble n'avoir aucun rôle directement visible dans le fonctionnement de Carnoulès, puisqu'il ne possède pas de gènes permettant l'oxydation de l'arsenic ou du fer, les deux mécanismes visibles majeurs retrouvés au niveau du site car responsables de la couleur observée (Figure 14) et de l'atténuation naturelle en arsenic. Cependant, il est supposé que *Candidatus Fodinabacter communicans* intervient dans le fonctionnement de la communauté en recyclant la matière organique

et en sécrétant acides aminés et cofacteurs pour le reste de la communauté. Par exemple, les gènes de biosynthèse de la cobalamine (vitamine B12) *cobSTU* sont uniquement retrouvés dans les génomes de CARN1/CARN4, tandis que CARN2 et CARN5 possèdent le gène codant le transporteur de la cobalamine *btuC*. Il a de plus été montré en conditions de laboratoire que l'oxydation du fer par *Acidithiobacillus ferrooxidans* est augmentée en présence de cobalamine (Bertin et al., 2011).

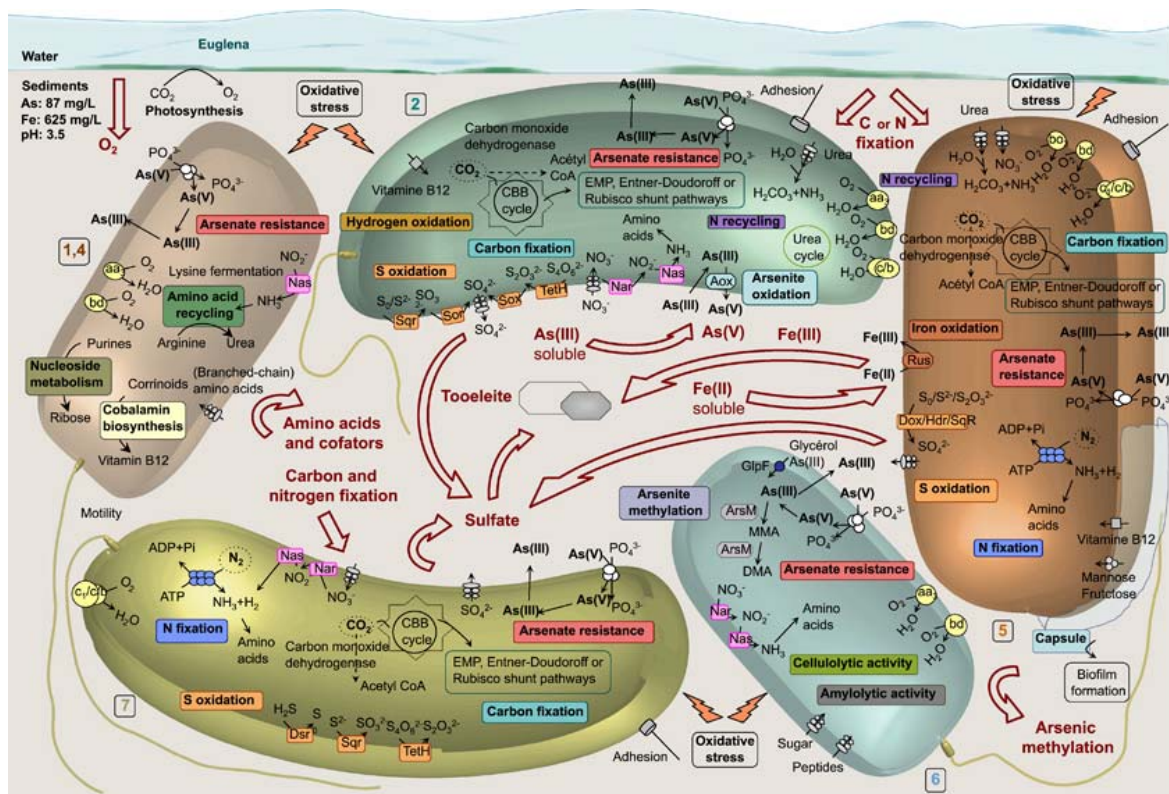


Figure 15 : Modèle de fonctionnement de la communauté bactérienne issue de Carnoulès, réalisé à partir de données métagénomique et RT-PCR. Le génome de CARN3 n'est pas représenté sur ce modèle car celui-ci n'a été que partiellement reconstruit. CARN1 et CARN4 sont 2 populations distinctes d'un nouveau phylum et sont représentées par une seule bactérie. Le modèle attribue à chaque bactérie certaines fonctions, permettant d'expliquer le fonctionnement de la communauté (Bertin et al., 2011).

Partie 2 :

Objectifs

du travail

Les drainages miniers acides (DMAs) sont caractérisés par des conditions physico-chimiques extrêmes, notamment en terme de pH et de concentration en métaux. Le DMA situé à Carnoulès dans le Gard présente notamment une forte acidité (pH moyen de 3) et une forte concentration en arsenic (350 mg/L) (LeBlanc et al., 2002). Pour ces raisons, la diversité microbienne observée par approches moléculaires est considérée comme faible (Bruneel et al., 2005; Bruneel et al., 2006). Il a été montré que les activités microbiennes présentes *in situ* sont responsables de la bio-atténuation naturelle en arsenic dans les eaux de Carnoulès (LeBlanc et al., 2002). Ainsi, une approche de méta-protéogénomique globale a été menée pour comprendre le fonctionnement de la communauté de Carnoulès, permettant notamment la reconstruction quasi complète de 7 génomes bactériens. L'analyse des génomes et du métaprotéome permet d'avoir une vision intégrée du fonctionnement de cette communauté, basée sur les 7 souches correspondantes (Bertin et al., 2011). Cette approche a permis d'attribuer un/des rôle(s) à chaque souche pour expliquer les phénomènes macroscopiques observés (oxydation et précipitation progressive de l'arsenic et du fer).

Mes travaux de thèses, basés sur les approches culturelles et fonctionnelles, s'intègrent dans la suite de ce projet, pour confirmer ou infirmer certaines hypothèses de fonctionnement de la communauté déterminées par les approches moléculaires précédentes.

La composition de la communauté microbienne présente à Carnoulès a été analysée. Étant donné que la grande majorité des approches menées précédemment à

Carnoulès l'ont été par des approches moléculaires, cette composition a été déterminée par culture, en mettant au point de nouvelles approches culturales (cf. Partie C de l'introduction) prenant en compte les conditions physico-chimiques du site d'étude. Cette stratégie permet de s'affranchir des biais des approches moléculaires (cf. Partie B de l'introduction) et donc d'avoir accès à des bactéries rares et/ou non-détectées précédemment.

La recherche de la plus grande diversité possible par culture a permis de bouleverser notre représentation de la diversité totale à Carnoulès : additionnée à la diversité retrouvée par les approches moléculaires précédentes, elle nous autorise une vision plus complète de la communauté bactérienne. Cette volonté de se rapprocher au maximum de la diversité « totale » est importante puisque c'est à partir de cette composition détectée qu'il est possible d'étudier le comportement d'une communauté bactérienne dans son ensemble (cf. Partie D de l'introduction). L'isolement par culture des différents genres bactériens à Carnoulès permet ensuite l'étude physiologique de ces souches, permettant de comprendre leur(s) rôle(s) au sein de la communauté. Dans cette optique, je me suis intéressé à 2 isolats de Carnoulès.

La première bactérie correspond à un nouveau genre appartenant à la famille *Xanthomonadaceae*, retrouvée très souvent dans les environnements acides comme les DMAs (et notamment à Carnoulès) et semblant donc être inféodée à ces milieux. Cette souche a été caractérisée taxonomiquement et appelée *Acidiminas carnoulesii*.

La deuxième bactérie est une souche appartenant au genre *Paenibacillus*, genre connu pour son arsenal enzymatique permettant la dégradation de différents polymères. Je me suis intéressé ici à son rôle dans le fonctionnement de la communauté, en me focalisant sur le recyclage de la matière organique complexe (amidon, xylane et cellulose) dans un environnement oligotrophe, processus pouvant permettre aux autres membres de la communauté de profiter des produits de dégradation. Cette activité est mise en relation avec les données physico-chimiques du site et permet de s'intéresser à la redondance fonctionnelle –une même fonction portée par plusieurs organismes distincts–, principe indispensable pour permettre le maintien de la communauté lorsque les conditions physico-chimiques changent (en termes de pH et concentration en arsenic notamment).

Enfin, la redondance fonctionnelle a également été testée pour la dégradation de l'amidon, en se focalisant cette fois directement sur le potentiel génétique global retrouvé à Carnoulès. Une banque d'ADN métagénomique de Carnoulès réalisée pour la reconstruction des 7 CARNs génomes a été criblée sur la base des activités de dégradation de l'amidon, et certaines amylases ont été caractérisées *in vitro*. Ce criblage basé sur la fonction (cf. Partie A de l'introduction) permet éventuellement de confirmer les potentialités fonctionnelles retrouvées dans les génomes correspondants, mais surtout de travailler sans *a priori* et de détecter de nouveaux gènes, de nouvelles protéines qui n'avaient pas été annotées *in silico* comme des amylases. Cette approche permet ainsi d'affiner le modèle de fonctionnement de la communauté de Carnoulès par des résultats fonctionnels.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les travaux réalisés lors de cette thèse sont présentés sous forme d'articles scientifiques et de manuscrits en préparation.

Partie 3 :

Principaux

résultats

A. APPROCHES CULTURALES

I. Métagénomique inverse

a. Principe

Comme il a été exposé précédemment (cf. Partie C de l'introduction), différentes approches novatrices concernant la culture de micro-organismes ont été publiées récemment. Le projet initial de doctorat s'intitulait « métagénomique inverse d'un site contaminé par de l'arsenic ». La « métagénomique inverse » est un concept nouveau, selon lequel il est possible, en se basant sur des données obtenues par une approche de métagénomique, de mettre au point des milieux de culture permettant l'isolement spécifique de bactéries jusqu'alors non cultivées. En ce sens, il convient donc d'analyser les voies métaboliques présentes et absentes dans le génome d'une souche d'intérêt, de déterminer les nutriments, cofacteurs et vitamines indispensables pour cette souche et de les incorporer dans un milieu défini.

Cette technique permet d'isoler des bactéries de façon ciblée, souvent des bactéries jusqu'alors non-cultivées. Plus encore, cette stratégie permettra ensuite d'étudier physiologiquement la souche isolée, pour confirmer/infirmier les résultats obtenus par l'approche métagénomique. Il sera donc possible de montrer expérimentalement le rôle d'une souche dont la/les fonction(s) n'avai(en)t été jusqu'alors que modélisée(s) (Figure 16).

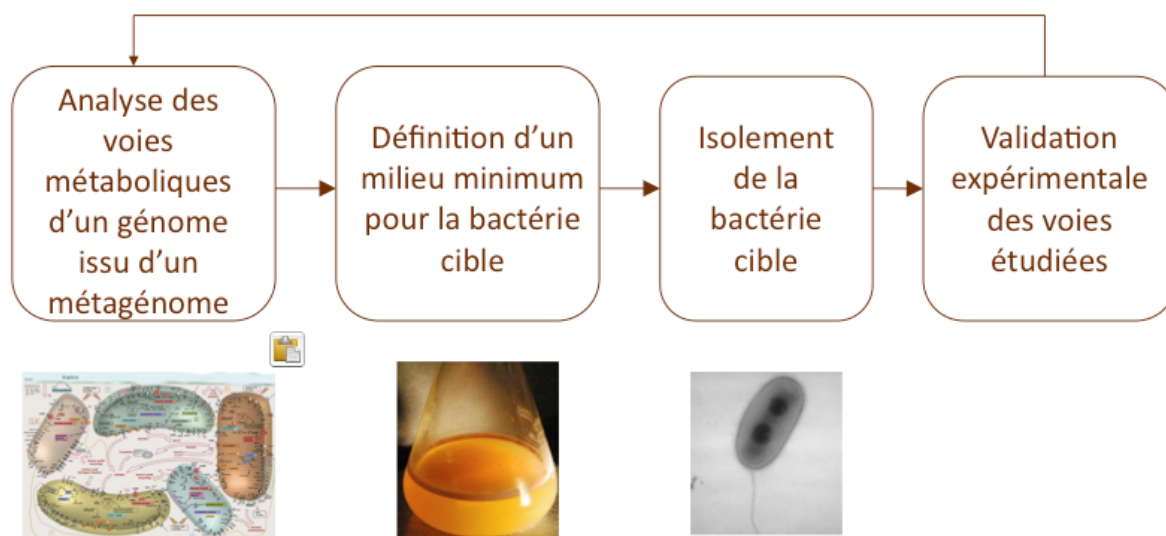


Figure 16 : Concept de la métagénomique inverse. Les génomes reconstitués à partir de l'approche métagénomique sont analysés, pour définir les conditions de culture théoriques nécessaires pour la souche ciblée. Ceci permettra la définition d'un milieu de culture qui sera utilisé pour la culture de la bactérie cible, qui sera ensuite testée pour confirmer physiologiquement la fonctionnalité des voies métaboliques retrouvées dans son génome.

Lors du début de mon travail de doctorat, cette approche et ce concept étaient nouveaux, et n'avaient pas permis l'isolement de nouveaux genres. Un exemple permettait cependant d'envisager la réussite de cette approche. En effet, le premier métagénome ayant permis la reconstitution de génomes d'espèces non-cultivées (issu d'un DMA, cf. Partie A de l'introduction) (Tyson et al., 2004) a été utilisé pour l'approche « métagénomique inverse ». Dans cette étude (Tyson et al., 2005), l'analyse du métagénome montre que l'opéron *nif* permettant la fixation de l'azote était retrouvé uniquement chez une souche appartenant au genre *Leptospirillum* de groupe III, groupe ne possédant aucun représentant cultivé. Les auteurs ont donc utilisé un milieu de culture permettant la croissance des *Leptospirillum* des groupes I et II, auquel ils ont enlevé la source d'azote $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cette stratégie a permis l'isolement sélectif en

culture pure d'une souche fixatrice d'azote appartenant au genre *Leptospirillum* de groupe III, confirmant ainsi les résultats obtenus par l'approche métagénomique.

b. *Application à Carnoulès*

L'approche métagénomique menée précédemment à Carnoulès a permis la reconstitution de 7 génomes quasi complets, 5 appartenant à des espèces non-cultivées (cf. Partie E de l'introduction) (Bertin et al., 2011). Parmi ces 5, CARN1/CARN4, 2 sous-populations distinctes appartenant à un nouveau phylum et appelées *Candidatus Fodinabacter communicans* sont dominantes et très actives dans cet écosystème. En effet, la grande majorité de protéines détectées par métaprotéomique proviennent de ces 2 souches. L'analyse de leurs génomes a permis de montrer que parmi les 7 souches dominantes, *Candidatus Fodinabacter communicans* était la seule possédant les gènes de biosynthèse de la cobalamine (vitamine B12), et des RT-PCR ciblées ont permis de confirmer l'expression de ces gènes. Les autres CARN-génomes ne possèdent pas une telle voie, mais peuvent au contraire posséder des gènes permettant le transport de la cobalamine vers le cytoplasme. Ainsi, *Candidatus Fodinabacter communicans* semble jouer un rôle majeur dans le fonctionnement de la communauté, non pas directement en oxydant le fer ou l'arsenic présent dans le milieu, mais en fournissant certaines vitamines et cofacteurs indispensables pour les autres bactéries. De plus, il a été montré récemment qu'*Euglena mutabilis*, un protiste photosynthétique également isolé de Carnoulès, était auxotrophe pour la cobalamine (Halter et al., 2012a). Cette dernière est ensuite capable de sécréter différents composés comme les acides aminés ou l'urée, qui

peuvent ensuite être utilisés par le reste de la communauté (et dont les gènes codant les transporteurs ont été retrouvés dans les génomes des CARNs) (Halter et al., 2012b). De plus, CARN1/4 possèdent de nombreux gènes liés au recyclage de la matière organique, notamment les acides aminés, permettant là aussi à toute la communauté de profiter de cette matière organique supplémentaire.

c. Mise au point des milieux de culture

Étant donné le rôle de CARN1/CARN4 au sein de la communauté et parce qu'il s'agit d'un nouveau phylum –donc ayant probablement des caractéristiques uniques, donc intéressantes–, le but premier de ma thèse fut d'isoler cette souche, en utilisant pour cela les données de métagénomique obtenues précédemment. Le critère de sélection utilisé est le fait que la souche est la seule à être prototrophe pour la cobalamine. Il fallait donc mettre au point un/des milieu(x) de culture défini(s), ne contenant pas de cobalamine. Cependant, cette souche peut être auxotrophe pour d'autres vitamines. Ainsi, une analyse bio-informatique détaillée (en utilisant pour cela l'interface Mage du Génoscope (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/carnoulescopes>)) des voies de biosynthèse de chaque vitamine a été effectuée, permettant l'élaboration d'une solution de vitamines pour lesquelles la souche semble être auxotrophe, c'est-à-dire les vitamines pour lesquelles la voie de biosynthèse est absente ou incomplète.

La source de carbone choisie est constituée de casaminoacides (CAA), puisqu'il apparaît que *Candidatus Fodinabacter communificans* joue un rôle important dans le recyclage de la matière organique, notamment des acides aminés. Cette poudre CAA a été traitée spécifiquement pour ne plus contenir de traces de vitamines, permettant ainsi la sélection par les vitamines. Néanmoins, il est *a priori* impossible de connaître les concentrations nécessaires pour chaque élément ajouté. Ainsi, 3 concentrations en CAA ont été utilisées 1%, 0,1% et 0,01%, pour avoir une gamme de concentrations en matière organique large (d'un milieu assez riche à un milieu très pauvre).

De la même façon, il est *a priori* impossible de savoir quel est son optimum de pH de croissance. La souche a été isolée d'un milieu à pH acide (environ pH 3), donc le pH 3,5 a été utilisé pour se rapprocher au maximum des conditions *in situ*. Néanmoins, il est possible que cette souche se développe plus rapidement lorsque les conditions sont moins extrêmes en terme de pH. Ainsi, le pH 5,5 a également été utilisé pour les milieux de culture.

Cette combinaison de 3 concentrations en CAA et 2 pH a donc permis l'élaboration de 6 milieux de culture solidifiés avec de la gomme gellane. Étant donné que les sédiments récupérés pour l'approche métagénomique correspondaient aux 2 premiers centimètres, cette couche est au contact de l'air. De plus, l'analyse des génomes montre la présence de cytochromes, attestant d'un probable métabolisme aérobie. Ainsi, l'incubation s'est faite en aérobose, et à la température de 20°C pour éviter la croissance

de bactéries poussant trop rapidement et inhibant la croissance des bactéries à croissance lente.

d. *Résultats obtenus*

Du sédiment de Carnoulès a été prélevé en novembre 2009 pour l'isolement de CARN1. En parallèle, des amorces spécifiques à CARN1 ont été conçues pour amplifier la partie intergénique 16-23S de la souche. Ce « design » d'oligonucléotides (GGCTCCCAATTAAAGGGGG pour l'amorce 16S-23SF et GGACTACGAAATTGCATCAC pour l'amorce 16S-23SR) a été fait de sorte que chacun des oligonucléotides n'hybride pas à 100% avec n'importe quelle autre séquence déposée dans les bases de données (NCBI). Un programme de 35 cycles d'amplification incluant 20 secondes à 95°C, 40 secondes à 58°C et 1 minutes 30 secondes à 72°C suivi d'une amplification finale de 10 minutes à 72°C a été utilisé. Testé sur l'ADN métagénomique utilisé pour l'approche métagénomique (Bertin et al., 2011), ce programme permet une amplification spécifique d'un fragment d'environ 230 pb dont la séquence correspond bien à la séquence attendue pour CARN1, montrant l'efficacité de ces amorces. Testé sur l'ADN métagénomique issu du prélèvement de novembre 2009, une amplification spécifique a pu être obtenue, permettant de conclure que CARN1 est bien présente dans les échantillons qui ont été traités par l'approche culturale.

De plus, une sonde marquée en 5' à la Cyanine 3 ([Cy3]TTAGCGACTCGCTGTCCTCCCA) complémentaire à l'ARNr 16S de CARN1 a été

synthétisée pour vérifier la présence des cellules dans l'échantillon. Le protocole de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) est disponible en annexe A. Le pourcentage en formamide a été déterminé en utilisant un clone d'*E. coli* possédant un plasmide contenant le gène codant l'ARNr 16S dans le sens du promoteur Plac pour le contrôle positif (transcription du gène codant l'ARNr 16S possible), et dans le sens inverse du promoteur Plac pour le témoin négatif (dont la transcription du gène codant l'ARNr 16S est impossible). Une concentration de 35% de formamide semble être le pourcentage idéal et a été utilisée pour tester la sonde directement depuis l'échantillon de Carnoulès. Sur celui-ci, un signal positif a été retrouvé pour certaines cellules, suggérant qu'il s'agit bien de CARN1 (Figure 17). Cependant, il est impossible, avec cette expérience, d'être parfaitement certain que les bactéries observées correspondent bien à CARN1, étant donné que la sonde n'a pas pu être testée en culture pure.

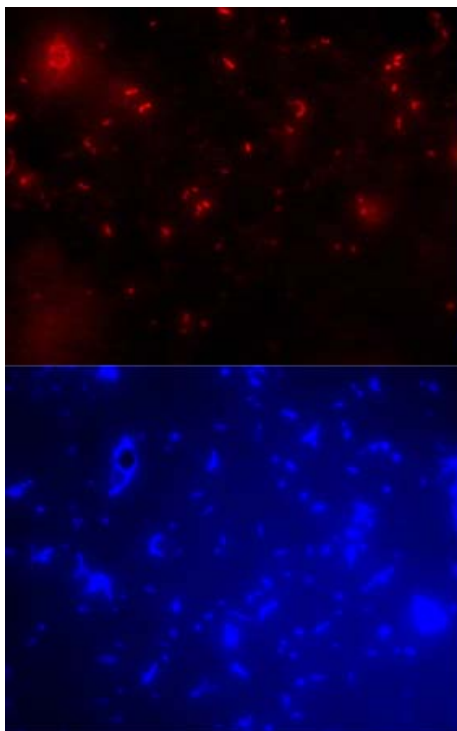


Figure 17 : hybridation « FISH » sur l'échantillon de Carnoulès. La sonde marquée à la Cyanine 3 est spécifique de CARN1, et émet une coloration rouge après excitation à 550 nm. Les bactéries visibles en rouges sur fond noir seraient donc des bactéries appartenant à *Candidatus Fodinabacter communicans*. En bleu, les bactéries totales (coloration au DAPI). La forme plus grosse (en haut à gauche) correspond à une euglène également retrouvée à Carnoulès.

La présence de CARN1 dans les sédiments de Carnoulès a été démontrée par PCR et observée par FISH non seulement au point de prélèvement CowG, mais également à d'autres points de prélèvement du Reigous. Des échantillons des différents points de prélèvement ont été dilués avec l'eau de Carnoulès stérilisée par filtration pour rester dans les conditions proches du milieu naturel. Les dilutions 10^0 , 10^{-1} et 10^{-2} pour chaque point de prélèvement ont été étalées sur les différents milieux précédemment décrits. Ces milieux ont été laissés à incuber pendant plusieurs semaines et chaque nouvelle colonie a été systématiquement repiquée sur son milieu d'isolement pour l'avoir en culture pure. L'ADN de chaque isolat a été extrait, puis un fragment (environ 1350 pb) du gène codant l'ARNr 16S de chaque isolat a été amplifié en utilisant des amorces universelles, avant d'être séquencé.

Malheureusement, aucun isolat bactérien correspondant à la bactérie *Candidatus Fodinabacter communicans* n'a pu être isolé. Néanmoins, cette approche ne s'est pas révélée inutile, puisque des genres jusqu'alors non-détectés à Carnoulès ont pu être isolés en cultures pures. Dans le but d'élargir plus largement la diversité bactérienne cultivée totale à Carnoulès, d'autres milieux ont été utilisés, permettant notamment de couvrir une large gamme de pH (de 3,5 à 9,8), un gamme de concentrations en nutriments important (du milieu très pauvre jusqu'au milieu LB) et en utilisant la technique SSMS présentée en partie C de l'introduction. Cette nouvelle direction de recherche a permis d'obtenir des résultats permettant une publication dans Biology Direct présenté ci-après. Les conséquences de ces découvertes, en termes de compréhension de fonctionnement de la communauté de Carnoulès, mais aussi pour

l'étude de communautés en général par des approches de culture, sont discutées après la présentation de l'article.

Il est à noter que pour beaucoup d'isolats, l'amplification du gène codant l'ARNr 16S n'a pas fonctionné. C'est pour cette raison que chaque isolat dont l'amplification a échoué a été observé au microscope, permettant de révéler l'isolement fortuit de nombreuses souches de levure appartenant à des espèces différentes. Jusqu'à cette approche, aucune levure n'avait été isolée de Carnoulès. Celles-ci ont été conservées à -80°C mais n'ont pas été étudiées plus en détail.

II. Diversité bactérienne cultivée à Carnoulès par des approches culturelles et conséquences

a. Article 1 accepté dans Biology Direct

1 **Novel and unexpected bacterial diversity in an arsenic-rich**
2 **ecosystem revealed by culture-dependent approaches**

3 **François Delavat¹, Marie-Claire Lett¹ and Didier Lièvre^{1*}**

4 ¹UMR7156 Université de Strasbourg/CNRS. Génétique Moléculaire, Génomique,
5 Microbiologie

6 *Corresponding author: Didier Lièvre. Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, Institut de Botanique, Université de
7 Strasbourg, 28 rue Goethe, Strasbourg 67000, France. E-mail: didier.lievremont@unistra.fr Tel +(0033) 368851811; Fax +(0033)
8 368852028

9 E-mail: lett@unistra.fr; delavat@unistra.fr

10

11

12

13 **Abstract**

14

15 **Background:** Acid Mine Drainages (AMDs) are extreme environments
16 characterized by very acid conditions and heavy metal contaminations. In these
17 ecosystems, the bacterial diversity is considered to be low. Previous culture-
18 independent approaches performed in the AMD of Carnoulès (France) confirmed
19 this low species richness. However, very little is known about the cultured
20 bacteria in this ecosystem. The aims of the study were firstly to apply novel
21 culture methods in order to access to the largest cultured bacterial diversity, and
22 secondly to better define the robustness of the community for 3 important
23 functions: AsIII oxidation, cellulose degradation and cobalamine biosynthesis.

24 **Results:** Despite the oligotrophic and acidic conditions found in AMDs, the
25 newly designed media covered a large range of nutrient concentrations and a pH
26 range from 3.5 to 9.8, in order to target also non-acidophilic bacteria. These
27 approaches generated 49 isolates representing 19 genera belonging to 4 different
28 phyla. Importantly, overall diversity gained 16 extra genera never detected in
29 Carnoulès. Among the 19 genera, 3 were previously uncultured, one of them being
30 novel in databases. This strategy increased the overall diversity in the Carnoulès
31 sediment by 70% when compared with previous culture-independent
32 approaches, as specific phylogenetic groups (*e.g.* the subclass *Actinobacteridae* or
33 the order *Rhizobiales*) were only detected by culture. Cobalamin auxotrophy,
34 cellulose degradation and As(III)-oxidation are 3 crucial functions in this
35 ecosystem, and a previous meta- and proteo-genomic work attributed each
36 function to only one taxon. Here, we demonstrate that other members of this

37 community can also assume these functions, thus increasing the overall
38 community robustness.

39 **Conclusions:** This work highlights that bacterial diversity in AMDs is much
40 higher than previously envisaged, thus pointing out that the AMD system is
41 functionally more robust than expected. The isolated bacteria may be part of the
42 rare biosphere which remained previously undetected due to molecular biases.
43 No matter their current ecological relevance, the exploration of the full diversity
44 remains crucial to decipher the function and dynamic of any community. This
45 work also underlines the importance to associate culture-dependent and -
46 independent approaches to gain an integrative view of the community function.

47

48 **Reviewers:** This paper was reviewed by Sándor Pongor, Eugene V. Koonin and Brett
49 Baker (nominated by Purificacion Lopez-Garcia).

50

51 Keywords: acid mine drainage (AMD), alkaliphilic bacteria, neutrophilic bacteria,
52 functional redundancy, rare biosphere, uncultured bacteria, molecular biases, culture-
53 dependent approaches, *Actinobacteria*, bacterial diversity.

54

55 **Background**

56

57 Acid Mine Drainages (AMDs) are extreme environments characterized mostly by heavy
58 metal contaminations and very acidic conditions. It has been already shown that the
59 presence of metals can lead to a decrease of 99.9% of the overall bacterial diversity in
60 soil [1]. The combination of high metal concentration and acidic pH in AMDs further
61 trigger this process, and various studies concluded on the occurrence of a low *in situ*
62 bacterial diversity [2-4].

63 The Reigous is a small creek (pH 2.7-3.4) flowing down the ancient mining site of
64 Carnoulès (Gard, France) characterized by high arsenic (up to 350 mg.l⁻¹) and iron (up to
65 2700 m.l⁻¹) concentration in waters [5]. A follow-up study linked the progressive arsenic
66 removal to bacterial activities, especially their As(III)-oxidizing activities [5]. In order to
67 understand the biological processes occurring *in situ*, several studies aimed at
68 determining the bacterial diversity in the water body or in the sediment.

69 In the water, both culture-dependent and culture-independent approaches had already
70 been undertaken. The culture-independent studies pointed out the low procaryotic
71 diversity [3, 6, 7], characterized by a stable composition over time. In parallel, only three
72 bacterial genera were isolated from the water, corresponding to the genera *Thiomonas*
73 *sp.*, *Acidithiobacillus sp.* and *Burkholderia sp.* [8-11]. *Thiomonas* species was shown to be
74 involved in As(III) oxidation [8, 11-13] whereas the *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain
75 performed iron Fe(II) oxidation [10].

76 In the soft sediment lying below the running water, up to now only culture-independent
77 approaches were undertaken. A recent study, combining global metagenomic,
78 metaproteomic and RT-PCR, and deciphering both the bacterial diversity present and
79 the community function, highlighted a low bacterial diversity in the sediment allowing

80 the reconstruction of 7 nearly complete genomes (called CARN1 to CARN7), 5 of which
81 representing uncultured bacteria [14]. In-depth analysis of the genomes as well as
82 metaproteomic and RT-PCR resulted in an integrated model of the community function
83 illustrating potential inter-species interactions. This powerful strategy has clearly
84 enhanced the comprehension of the community function. However, in the proposed
85 model, each of three crucial functions was each linked to only one bacterium *i.e.* the
86 As(III) oxidation only to CARN2, cobalamin biosynthesis only to CARN1/4 (both
87 belonging to *Candidatus Fodinabacter communicans*) or cellulose degradation only to
88 CARN6 [14].

89

90 The aim of the present work was to investigate the bacterial diversity in the sediment by
91 culture-dependent approaches. In a first step, we implemented various strategies to
92 access to the largest cultured bacterial diversity. They integrated modern cultivation
93 methods such as the use of 1) a mineral base that mimicks the AMD water conditions, 2)
94 low organic carbon content to avoid growth inhibition of slow-growing bacteria by fast-
95 growing bacteria, 3) less stringent growth conditions (particularly in terms of pH) to
96 enhance bacterial growth, 4) gellan gum instead of agar as a solidifying agent, and 5)
97 innovating techniques such as the Soil Slurry Membrane System (SSMS) [15]. These
98 culture-dependent approaches allowed the detection of 16 genera that were never
99 detected previously in Carnoulès, thus increasing the overall bacterial diversity by 70%.

100 These results demonstrated that AMD bacterial diversity is larger than previously
101 recognized. They also illustrate that culture-dependent methods remain crucial to
102 determine the bacterial community composition and are really complementary to
103 genomic methods to improve our understanding of natural ecosystems.

104 In a second step, we investigated the functional redundancy in the cultured bacterial

105 community for important functions *i.e.* As(III) oxidation, cobalamin biosynthesis, and
106 cellulose degradation. These results showed that by maintaining the integrity of
107 functional processes within the bacterial community, the AMD ecosystem gains more
108 stability and robustness than previously thought.

109

110

111 **Results and discussion**

112

113 **Bacterial diversity in the sediment of Carnoulès by novel culture-dependent** 114 **approaches**

115

116 The diversity of cultured bacteria was tested in the soft and unstable sediment collected
117 directly under the running water of Carnoulès. The physical and chemical characteristics
118 of the running water were described elsewhere [16]. For this purpose, 11 media
119 corresponding to commonly used media and newly designed FD media were used. The
120 mineral base of all FD media was identical and was formulated to be as close as possible
121 to the mineral conditions found in Carnoulès, with the exception of the absence of toxic
122 compounds such as arsenic in order to decrease the selective pressure. The importance
123 of the carbon concentration and the pH of the media were tested. All in all, the media
124 used in this study varied from pH 3.5 to 9.8, and from 0.01% CAA as sole carbon source
125 to the LB-rich medium (Table 1).

126 The different media and growth conditions allowed the isolation of 49 bacterial strains.

127 All strains were identified by comparison of their nearly complete 16S rRNA gene
128 sequences with the NCBI-nr and RDP databases (Table 1). The isolates were assigned to
129 19 genera belonging to 4 phyla (Fig. 1). Among the 19 genera detected, 9 (47%) were

130 found within *Proteobacteria*, 7 (37%) within *Actinobacteria*, 2 (11%) within *Firmicutes*
131 and 1 (5%) within the phylum *Acidobacteria*. Among the *Proteobacteria*, members of the
132 α - (4 out of 9 genera, 44.5%) and γ -subdivisions (4 out of 9, 44.5%) were well
133 represented, while only one member of the β -subdivision (1 out of 9, 11%) was isolated.
134 *Actinobacteria* were all found within the order *Actinomycetales* and were assigned into 5
135 suborders, namely *Micrococcineae* (3 genera out of 7, 42.8%), *Propionibacterineae* (1 out
136 of 7, 14.3%), *Corynebacterineae* (1 out of 7, 14.3%), *Streptomyicineae* (1 out of 7, 14.3%)
137 and *Micromonosporineae* (1 out of 7, 14.3%). The 2 *Firmicutes* were found within the
138 order *Bacillales* whereas the *Acidobacteria* was member of the subdivision 1 of this
139 phylum.

140

141 Interestingly, no growth was detected on FD3, FD5 and FD6 characterized by very low
142 pH (FD3) and/or high CAA concentration (respectively FD5 and FD6). By contrast, FD2,
143 characterized by less acidic pH (5.5) and low carbon concentration (0.01% CAA),
144 allowed the isolation of the largest diversity, with strains belonging to 11 out of the 19
145 genera. Those genera were found within *Proteobacteria* (5 genera out of 11, 45%),
146 *Actinobacteria* (5 genera out of 11, 45%) and *Acidobacteria* (1 genera out of 11, 9%). It
147 should be noted that FD2 was the most appropriate medium to isolate *Actinobacteria*,
148 since it allowed the isolation of 5 bacterial strains out of the 7 strains affiliated to
149 phylum *Actinobacteria*. FD1 medium, differing from FD2 in the pH used (3.5 for FD1)
150 allowed the isolation of representatives of 3 genera, namely *Acidisoma*, *Acidocella* and
151 *Cellulomonas*. The latter two were however also isolated on FD4 and/or FD2 media.
152 Thus, the isolates K16 and L2, both belonging to genus *Acidisoma*, were the only bacteria
153 that were isolated solely on very acidic medium. These results indicate that the increase
154 of the incubation time and the reduction of the carbon concentration allowed the

155 isolation of the slow-growing bacteria, as previously suggested by Vieira-Silva [17]. It
156 also shows that the complete mimicking of *in situ* conditions in terms of pH (3.5)
157 resulted in a poor recovery of genera, since only *Acidocella*, *Acidosoma*, and *Cellulomonas*
158 have been isolated on FD1 (Table 1). These results are consistent with those of Hallberg
159 and Johnson [18] who isolated moderate acidophilic bacteria by increasing the pH of the
160 growth medium compared to the natural environment as well as with data reported by
161 Hao [19] who detected neutrophilic bacteria in AMD.

162 Another important factor to explain this diversity is the use of gellan gum instead of agar
163 as a solidifying agent. Indeed, when grown on their culturing medium with agar instead
164 of gellan, the growth rate of all strains was slower, except for strains affiliated to the
165 genera *Arthrobacter* (J9), *Acidocella* (L5, Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6 and I10), and *Acidisoma*
166 (K16, L2) (data not shown). N3B and H7p, affiliated to the phylum *Acidobacteria* and the
167 family *Propionibacteriaceae*, respectively, were even unable to grow on agar plates.
168 These results are consistent with a previous work showing that the cultured microbial
169 diversity was increased with gellan gum when compared with agar [20].

170

171 Direct spreading on modified m126 medium (mm126), CDM and 1/100 YPD media
172 supplemented with 100 mg.l⁻¹ As(III) or As(V) allowed the isolation on each medium of
173 only one bacterial genus, respectively a new genus of the family *Xanthomonadaceae*
174 (X11), *Ancylobacter* sp. (X1), *Thiomonas* sp. (X19) and *Micromonospora* sp. (X14) (Table
175 1). We showed here that when using a broad range of pH (from 3.5 to 9.8), neutrophilic
176 and even alkaliphilic bacteria could be isolated (Table 1). Especially, using a high pH
177 medium (9.8), we succeeded in isolating a strain belonging to the genus *Thiomonas* sp.
178 (X19). Several bacteria belonging to the group 1 of *Thiomonas* had been previously
179 isolated from the water of Carnoulès [8, 9, 11]. However, significant differences between

180 the 16S rRNA sequence of X19 and other *Thiomonas* from group 1 (e.g. 90% identity
181 between X19 and *Thiomonas* sp. CB2 (FJ014922) over the full alignment) showed that
182 X19 does not belong to the group 1 of the *Thiomonas* genus. By contrast, X19 and CARN2
183 (one of the dominant species detected previously by a culture-independent approach
184 [14]) differed by only a single nucleotide mismatch over the nearly full length of the 16S
185 rRNA gene. Thus, X19 corresponds to the first representative of the group 2 of the
186 *Thiomonas* isolated in Carnoulès so far. Members of this genus are routinely grown on
187 m126 medium (pH 5) [12, 13] and were not known to grow in alkaline conditions [21],
188 to the contrary to X19. Nevertheless, spreading X19 on this modified mm126 medium
189 then led to the formation of visible colonies after 10 to 14 days as compared to the 14 to
190 21 days needed on 1/100 YPD +100 mg.l⁻¹ As(III) plates. When compared to other
191 *Thiomonas* bacteria, X19 grew however much slower on mm126 (data not shown) [12,
192 13]. Since the CARN2-like X19 strain adapts *in vitro* to different conditions such as high
193 pH variation, one can hypothesize about its adaptation potentialities to various *in situ*
194 physico-chemical conditions.

195 Lastly, a 10 days-incubation of the samples on SSMS [15] followed by the spreading of
196 the microcolonies on solid media [22] allowed the culture of isolates belonging to 4
197 genera. Among them, 3 were detected only on LB plates. Those strains belong to the
198 genera *Bacillus* (Q9) and *Paenibacillus* (Q8) from the phylum *Firmicutes* and *Micrococcus*
199 (Q7) from the phylum *Actinobacteria*. The advantage of this strategy was here to avoid
200 fungal contamination compared to direct spreading for which different moulds invaded
201 the LB plates, despite the presence of antifungal agents. *Acidocella* (Q1 to Q6) were also
202 detected after growth on SSMS and spreading on FD1 media. They shared an identical
203 16S rRNA gene sequence with strains isolated directly on FD media.

204

205 Our results indicate that the isolated strains are highly specific to the medium used for
206 primary isolation, since the majority of them were found on only one medium. As
207 previously mentioned, exceptions are found for members of the genus *Cellulomonas* sp.
208 which were isolated on both FD1 and FD2 media and *Acidocella* sp. which were found on
209 FD1, FD2 and FD4 media.

210

211 **Isolation of previously uncultured bacteria**

212

213 The culture strategy led here to the isolation of representatives of 3 new genera as
214 defined by Tindall *et al.* [23]. Indeed, these 3 isolates shared less than 95% 16S rRNA
215 gene sequence identity with their closest taxonomically characterized species. The first
216 one (N3B) belongs to the phylum *Acidobacteria* and shared 98% 16S rRNA gene
217 sequence identity with uncultured clone IRON_SNOW_NB_E11 (FR667807) whereas its
218 closest taxonomically characterized species was *Acidobacterium capsulatum*
219 (CP001472) with 94% identity. *Acidobacteria* correspond to some of the most abundant
220 microorganisms in the environment but are recalcitrant to cultivate in laboratory [24].
221 Only 8 genera from this phylum have been taxonomically isolated so far [25]. The recent
222 metagenomic investigation of Carnoulès AMD, led to the detection of a strain of
223 *Acidobacteria* *i.e.* CARN3 [14]. However, N3B showed less than 95% 16S identity with
224 CARN3. The second one (X11) belongs to the family *Xanthomonadaceae*. X11 sequence
225 was closely related to the uncultured γ -*Proteobacterium* DKE (100% identity,
226 HQ909259) but the closest taxonomically characterized strain was *Dokdonella koreensis*
227 (AY987368) with less than 94% identity. X11 and its closest related strains are common
228 inhabitants of mines and acidic environments, since BLAST analysis revealed the
229 presence of their 16S rDNA in Carnoulès (clone CG-36 (FN391831) [14]) as well as in

230 various other acid mine drainages and acidic waters (e.g. “Rio Tinto” in Spain, “Lower
231 Red Eyes” in Pennsylvania, “Wheal Jane” in England).

232

233 The third one is H7p, a member of the *Propionibacteriaceae* family. Its best matching 16S
234 rRNA gene sequence is *Luteococcus* sp. (AJ132334) found in human peritoneum sharing
235 only 95% identity with H7p. No better identity was found in any database (NCBI-nr and
236 RDP) even with « uncultured bacteria ». The closest taxonomically characterized strain
237 is *Luteococcus peritonei* (NR_028882) also sharing 95% identity with H7p. It should be
238 noted that the species *Propionibacterium acnes*, belonging to this family but presenting
239 only 90% sequence identity with H7p, has been previously detected in AMDs [18]. All
240 these results indicate that H7p belongs to a novel genus that has never been detected
241 previously in AMDs or in any other environment.

242

243 **From the bacterial diversity to the community function**

244

245 Deciphering the biological processes occurring *in situ* in any environment requires both
246 the knowledge of the overall bacterial diversity and the comprehension of the role of
247 each microorganism in the community function. However, the more diverse is the
248 community, the more difficult it is to understand the role of each taxon in this
249 community. In this sense, acid mine drainages are well-suited models as the bacterial
250 community is considered to harbour a low diversity, with only a few dominant taxa [2-
251 4]. In the AMD of Carnoulès, both culture-dependent and culture-independent
252 approaches were already undertaken to unravel this diversity when using the water
253 body as template [3, 6-11]. However, only culture-independent approaches were carried
254 out when searching in the soft sediment collected directly under the running water [14,

255 26]. All these experiments highlighted the low bacterial diversity occurring both in the
256 sediment and in the above running water.

257 In the present study, we succeeded in isolating 49 strains belonging to 19 genera.
258 Importantly, 16 of these genera had never been detected previously on this site [14, 26],
259 thus increasing the overall bacterial diversity in the sediments by 70% (Fig. 2). Indeed,
260 only 3 strains, belonging to *Rhodanobacter*, *Thiomonas* and the new genus belonging to
261 the family *Xanthomonadaceae* (X11) were found both by our culture-dependent
262 investigations and by culture-independent approaches [14, 26]. Moreover, members of 3
263 phyla were detected only by culture-independent approaches, namely *Spirochaetes*,
264 *Nitrospira* and the novel phylum represented by CARN1/CARN4 [14]. On the other hand,
265 phylogenetic groups like the subclass *Actinobacteridae* or the order *Rhizobiales* were
266 only detected via the present culture strategy. A phylogenetic tree representing all taxa
267 detected in the sediments of Carnoulès by both methods allowed to highlight the overall
268 microbial diversity and to point out the complementarity between the approaches (Fig.
269 2).

270 To confirm this result, specific primers targeting each genus previously undetected by
271 previous culture-independent studies [14, 26] were designed and tested by using
272 metagenomic DNA from the Carnoulès sediment as template. Among them, only H7p,
273 member of the new genus within *Propionibacteriaceae*, had an identical sequence in the
274 metagenomic DNA. This result suggests that only this latter strain could have been
275 detected by the previous molecular techniques, if more clones would have been
276 sequenced. Indeed, no rarefaction curve was presented in the previous studies. More
277 generally, this result suggests that the DNA concentration corresponding to all other
278 cultured strains was too low or even absent to be detected inside the metagenome
279 mixture. Therefore, one could hypothesize that the isolated strains correspond to rare

280 populations [27] in the sediment of Carnoulès. Indeed, rare bacteria should be
281 considered [28] since recent studies indicated that even if they are present at a dormant
282 or a spore stage, they may become active and abundant when the *in situ* conditions
283 change [29, 30]. Moreover, it has been shown that rare bacteria eventually not detected
284 by molecular techniques can significantly contribute to the global functioning of any
285 ecosystem [31, 32]. It is also recognized that culture may be a powerful strategy to
286 access to this previously undetected rare biosphere [33, 34]. Here, the dilutions used
287 (100 µL of the dilutions 10^{-1} and 10^{-2} were spread on each plate) allowed to estimate the
288 population of each genus by several hundreds to thousands CFU per gram of sediment.
289 Alternatively, they can have been missed out previously because their DNA was
290 inaccessible by the extraction methods used for metagenomic investigations. Indeed, it
291 is already known that *Actinobacteria*, representing 37% of the genera detected here, are
292 often underestimated by molecular approaches due to poor DNA extraction [35, 36]. For
293 instance, it has been proved that *Micromonospora* species (as X14) are insensitive to
294 most lysis treatments [37]. More generally, the metagenomic DNA protocol affects
295 importantly the DNA recovered [38] and thus the bacterial diversity which is detected.

296

297 No matter the current *in situ* ecological relevance of the strains, they can play an
298 essential role when the physico-chemical conditions change. In this sense, it remains
299 crucial to approach as far as possible the full bacterial diversity to better understand
300 how a community works and evolves. In addition to the extension of the bacterial
301 diversity, our work also allows to test some physiological characteristics and to provide
302 potential role(s) of the strains for the community function. As such, we decided to
303 screen for functions, which are crucial for the survival of the bacterial community in
304 AMDs but which lack the necessary redundancy, *i.e.* functions that are carried only once

305 in the previous global metagenomic approach [14].

306

307 The first tested function concerns the biosynthesis of cobalamin (vitamin B12).
308 Interestingly, all FD media were designed without cobalamin and vitamin-free CAA was
309 used. Thus, all bacteria growing on such media are prototroph for cobalamin. Indeed, 12
310 genera out of the 19 (belonging to *Acidobacteria* bacterium, *Cellulomonas*, *Streptomyces*,
311 *Propionibacteriaceae* bacterium, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Acidocella*, *Acidisoma*,
312 *Methylorosula*, *Pseudomonas*, *Rhodanobacter* and *Dyella*, see table 1) were isolated on
313 the newly designed FD media. The cobalamin biosynthesis pathway genes were
314 previously found by metagenomics only in CARN1/CARN4 (both grouped within the
315 uncultured bacterium *Candidatus Fodinabacter communicans*) whereas the other
316 genomes (such as CARN2 and CARN5) carry the cobalamin transporter *btuC* gene.
317 Moreover, the photosynthetic microorganism *Euglena mutabilis* isolated from Carnoulès
318 was recently shown to be auxotroph for cobalamin [39]. *Candidatus Fodinabacter*
319 *communicans* was therefore thought to be essential for the community, at least by
320 providing vitamin B12 for the rest of the community [14]. It is tempting to hypothesize
321 that some of the isolated strains in the present work are able to produce this vitamin
322 and provide it to the rest of the AMD community.

323

324 The second function tested was the cellulose degradation. As the AMD of Carnoulès is at
325 least partly oligotroph [14], any possibility to catabolize unusual nutrients would be
326 advantageous for the corresponding bacterium [40]. The released by-products can be
327 also useful for the rest of the community as it can allow syntrophic interactions. As such,
328 the metagenomic approach allowed the detection of the genes encoding proteins
329 responsible for the degradation of the cellulose polymers only in the genome of CARN6

330 [14]. The ability to degrade the cellulose was tested for one representative of each of the
331 19 genera (strains code E10, H7, H7p, I10, J9, K4, K7, K16, L12, N3B, N4, Q7, Q8, Q9, U2,
332 X1, X11, X14, X19), using carboxymethylcellulose (CMC) as substrate. A yellow halo was
333 observed for K16 (*Acidisoma* sp.), X14 (*Micromonospora* sp.) and Q8 (*Paenibacillus* sp.),
334 demonstrating their ability to degrade this complex compound (Table 1). When used
335 with the strain X19 on mm126 plates, the degradation test resulted in a coagulation of
336 the Congo red dye, which turned violet, making impossible the lecture of the results.
337 This reaction, due to the acidification of the medium, has already been described [41].
338 To our knowledge, this is the first time that polymer-degrading activities of bacteria
339 isolated from oligotrophic AMDs were physiologically demonstrated. Q8 was then
340 further studied in details for its numerous polymer-degradation activities under a wide
341 range of stress conditions *i.e.* for its ecological relevance when ambient environmental
342 conditions change [16].

343

344 The third function is As(III) oxidation, an important function in Carnoulès since it allows
345 the co-precipitation of arsenic and iron and leads to a sharp decrease of the arsenic
346 concentration in the AMD [5] and to the detoxification of the ecosystem. We tested in
347 laboratory conditions the As(III) oxidation capability for one representative of each
348 genus (strains code E10, H7, H7p, I10, J9, K4, K7, K16, L12, N3B, N4, Q7, Q8, Q9, U2, X1,
349 X11, X14, X19) in their liquid culturing medium supplemented with 100 mg.l⁻¹ As(III). All
350 strains were able to grow but only X19 was able *in vitro* to oxidize As(III) to As(V) as
351 measured by HPLC-ICP-OES experiments (Table 1). The isolation of the CARN2-like X19
352 strain is of importance, since it allowed to test and measure physiologically its As(III)-
353 oxidizing potentiality previously hypothesized by metagenomic and metaproteomic
354 [14]. This strategy allowed therefore to confirm one major role for CARN2 in the

355 community function. In accordance to the 16S rRNA gene sequence similarity between
356 X19 and CARN2, the *aioA* gene sequence (984 bp) of X19 encoding the large subunit of
357 the arsenite oxidase amplified with degenerated primers [42] shared 98% identity with
358 one copy of the *aioA* gene from CARN2 (CARN2_1330).

359 It should be noted that we obtained a specific sequence of the *aioA* gene from X14,
360 belonging to the phylum *Actinobacteria*. Despite the absence of oxidation measured in
361 laboratory conditions, X14 may therefore be able to also oxidize As(III) *in situ* as does
362 CARN2. Interestingly, the X14 *aioA* sequence was 100% identical over its full length
363 (989 bp) to the *aioA* gene from *Thiomonas* sp. CB2 (EU339212), belonging to the phylum
364 *Proteobacteria* and previously isolated from the Carnoulès water [8]. This observation
365 suggests a recent horizontal gene transfer (HGT) between these 2 bacteria, belonging to
366 very distant phylogenetic groups. The occurrence of HGT for the *aioA* gene had
367 previously been observed in another study site [43] but never in Carnoulès, further
368 highlighting the complex interactions between bacteria *in situ*.

369

370 **Conclusions**

371

372 Our study provided evidences that culture-dependent approaches enable the
373 characterization of a different diversity compared to the one obtained by culture-
374 independent approaches, highlighting the complementarity between the 2 approaches.
375 We also pointed out that the community structure is not as simple as previously
376 established (a 70% increase in overall diversity). Functional experiments showed that
377 important community functions, such as cobalamin biosynthesis, the degradation of
378 cellulose and the oxidation of As(III) are redundant in the ecosystem thus increasing the
379 functional robustness essential for any ecosystem. Additionally, the isolation of

380 neutrophilic or even alkaliphilic strains further highlights the capability carried by the
381 whole community to adapt to *in situ* conditions changes such as an increase of the pH,
382 thus improving the knowledge of the system resilience. We showed that it remains
383 crucial to associate culture-dependent and culture-independent approaches to gain an
384 integrative view of the community structure and function.

385 However, measuring the exact *in situ* role of each non-dominant species remains hard to
386 determine, since they are hardly detectable with standard molecular techniques. Specific
387 FISH-probes experiments can be performed more easily after isolation, but the relative
388 abundances remains unknown, since no (or too few) DNA was recovered from the
389 isolated genera. The determination of the full extent of the microbial diversity is
390 therefore still challenging, and considerable efforts in terms of technologies and work
391 have to be undertaken to approach this aim.

392

393 **Materials and methods**

394

395 **Soil sample and preparation**

396

397 Sediment samples (up to 2 cm deep) were collected in November 2009 from the soft and
398 unstable sediment of the Acid Mine Drainage (AMD) located in Carnoulès, Gard (France),
399 at the station called CowG (44°07'01.80"N/4°00'06.90"E) [6]. The samples were then
400 stored at 4°C in sterile 50 ml tubes until use.

401 Sediment sample was serially diluted with filtered-sterilized Carnoulès water and 100
402 µL of the dilutions 10^{-1} and 10^{-2} were plated on solid media. All colonies were then
403 isolated by streaking at least three times to ensure purity.

404

405 **Media used in this study**

406

407 Unless otherwise stated, all chemicals and reagents were supplied by Sigma-Aldrich.

408 Culture media used for bacterial growth were as follows:

409 LB medium (MP Biomedicals); m126 described in [13] without Na_2HPO_4 (hereafter
410 called mm126); CDM described in [44]; a one hundred-fold dilution of YPD (MP
411 Biomedicals) medium supplemented with 100 mg.l^{-1} As(III) or 100 mg.l^{-1} As(V).

412 Additionally, new synthetic media were designed, composed of (per litre MQ-water) 1.5
413 g KH_2PO_4 (VWR); 10 mL of a 35 g.l^{-1} $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific) solution; 10 mL of a 20
414 g.l^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Euromedex) solution; 10 mL of a 30 g.l^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution; 10 mL
415 trace solution (contains: 30 mg.l^{-1} $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1.5 g.l^{-1} MnSO_4 ; 3 g.l^{-1} $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 34
416 mg.l^{-1} $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and 10 mL of a vitamin solution (per litre): 100 mg riboflavin, 100 mg
417 thiamine, 60 mg pyridoxine, 2 mg folic acid, 0.25 mg lipoic acid. This mineral base was
418 completed with either 1%, 0.1% or 0.01% final concentrations of vitamin-free
419 casaminoacids (CAA) (Fisher Scientific). Those media were then adjusted with H_2SO_4
420 and KOH either to pH 3.5 or 5.5, making 6 media (hereafter called FD1 (0.01%
421 CAA/pH3.5); FD2 (0.01% CAA/pH5.5); FD3 (0.1% CAA/pH3.5); FD4 (0.1% CAA/pH5.5);
422 FD5 (1% CAA/pH3.5) and FD6 (1% CAA/pH5.5), see table 1). The vitamin solution was
423 sterilized by filtration and added to the autoclaved medium. It should be noted that the
424 FD media precipitate above 5.5 and thus should be prepared with caution. For solid
425 cultures, 1.5% gellan gum (Sigma) was used as a solidifying agent.

426 After incubation, bacterial colonies were isolated and re-streaked on the same FD media,
427 with yeast extract (100 mg.l^{-1}) instead of the vitamin solution (culturing medium).

428 *Pseudomonas* and *Rhodococcus* strains were routinely cultured on LB plates and

429 *Thiomonas* on mm126 plates.

430 In addition to those standard media, microcultivation in a soil slurry membrane system
431 (SSMS) was used as described by Ferrari *et al.* [15]. Briefly, sediment sample taken from
432 the same site was used as a growth medium in an inverted Tissue Culture Insert (TCI),
433 and one millilitre of a 1:100 dilution sample was filtered on a Polycarbonate Membrane
434 (PCM). This PCM was placed onto the inverted TCI, which supplied nutrients for the
435 bacteria fixed on the PCM. After the incubation time (10 days at 20°C), the membrane
436 was removed, cut with a sterile razor blade and vortexed one minute with 1 mL 0.9%
437 NaCl and 100 µL of the supernatant was then spread onto LB and all FD media.

438

439 Incubation on mm126, CDM, 1/100 YPD +100 mg.l⁻¹ As(III) or As(V) were done at 25°C;
440 LB at 30°C and FD media at 20°C for up to 4 weeks.

441 For long-term storage, all strains were stored at -80°C in 20% glycerol.

442

443 **Cellulose degradation**

444

445 Cellulolytic activity was detected on all culturing media supplemented with 0.2%
446 carboxymethylcellulose CMC (Sigma). After the incubation time, colonies were stained
447 with Congo red (0.2%) for 20 minutes and plates were washed with 1M NaCl. Cellulase-
448 expressing colonies were surrounding by a yellow halo against a red background.

449

450 **Molecular and *in silico* analyses**

451

452 DNAs were extracted using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega)
453 according to the manufacturer's protocol. 16S rRNA genes were amplified using fd1 and
454 rD1 primers [45]. PCR products were sequenced (Millegen, France) and DNA sequences

455 were analyzed using the NCBI-nr BLAST program and the RDP database. All the
456 sequences obtained were submitted to the EMBL databases under accession numbers
457 FR874224 to FR874242.

458 Sequences were aligned with the MEGA 5 implementation of ClustalW algorithm
459 (<http://www.megasoftware.net/>) and 5' and 3' extension were trimmed. Neighbor
460 joining phylogenetic trees were performed with this software and trees were drawn up
461 using the iTOL website (<http://itol.embl.de/>) if necessary.

462 Primers aoxBM1-2F (5'-CCACTTCTGCATCGTGGGNTGYGGNTA-3' and aoxBM3-2R (5'-
463 TGTCGTTGCCCCAGATGADNCCYTTYTC-3') were used to amplify the partial sequence of
464 the *aiiA* gene (previously named *aoxB/aroA/asoA* [46] of one representative of each
465 genus, as defined by [42]. Amplicons were sequenced and DNA sequences were analyzed
466 using the NCBI-nr BLAST program. The sequences obtained for X14 and X19 were
467 submitted to the EMBL databases under the accession numbers HE588125 and
468 FR874243, respectively.

469 Specific primers targeting the 16S rRNA gene of each genus newly detected by
470 cultivation approaches were designed (Additional file 1). Forward primers
471 corresponded to the V2 hypervariable region (*Escherichia coli* positions 137-242) and
472 reverse primers corresponded to the V5 hypervariable region (*E. coli* positions 822-
473 879). Because K4 and L12 showed exact identity in the V5 region, the reverse primers
474 for these strains corresponded to the V7 hypervariable region (*E. coli* positions 1117-
475 1173). Amplification using the metagenomic DNA from the Carnoulès sediment as
476 template was performed with the following conditions: 35 amplification cycles of 95°C
477 for 10 min, 58°C for 1 min 20 s, 72°C for 1 min 30 sec, followed by a final elongation
478 cycle (72°C for 10 min).

479

480 **Arsenic speciation**

481

482 One representative of each genus was tested for As(III) oxidation. Their corresponding
483 culturing media were supplemented with 100 mg.l⁻¹ As(III), adjusted to pH 5.5 and
484 autoclaved. Media without inoculation was used as a control for abiotic oxidation. After
485 the incubation time, the supernatant were filtered and 10-fold diluted with sterile Milli-
486 Q system (Millipore) water and arsenic speciation was performed by HPLC-ICP-OES.
487 Separation was performed on a reversed-phase polymeric resin (Hamilton, PRP-X100,
488 250 mm × 4.1 mm *i.d.*, particle size 10 μm) equipped with the corresponding guard
489 column. Arsenic compounds were eluted with a phosphate buffer [44]. For ICP-OES
490 experiments, a Varian 720 ES operating at a forward power of 1.2 kW and equipped with
491 a Meinhard type nebulizer was used. Flow-rates: Plasma gas = 15 l.min⁻¹, nebulizer gas =
492 1 l.min⁻¹ (optimized each day), auxiliary gas = 1 l.min⁻¹. Wavelength was fixed at 193.7
493 nm. All experiments were done at least in duplicates.

494

495 **Competing interests**

496 The authors declare that they have no competing interests.

497

498 **Authors' contributions**

499 FD, MCL and DL conceived, supervised and coordinated this study. FD carried out all
500 experiments and interpretation of data. FD wrote the manuscript and MCL and DL
501 critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

502 |

503

504 Acknowledgments

505
506 FD was supported by a grant from the French Ministry of Education. This work was
507 performed as part of the program of the « Groupement de Recherche - Métabolisme de
508 l'Arsecenic chez les Microorganismes (GDR2909-CNRS)» (<http://gdr2909.alsace.cnrs.fr/>)
509 in the frame of the RARE project.

510 The authors would like to thank A. Boos and P. Ronot from the Laboratoire de chimie
511 Analytique et Sciences Séparatives, UMR 7178 IPHC-DSA, ECPM-Université de
512 Strasbourg, for excellent assistance during As speciation. They also want to thank Joseph
513 Schacherer for the revision of the manuscript.

514

515 References

- 516
517 1. Gans J, Wolinsky M, Dunbar J: **Microbiology: Computational improvements**
518 **reveal great bacterial diversity and high toxicity in soil.** *Science* 2005, **309**:1387-1390.
519 2. Baker BJ, Banfield JF: **Microbial communities in acid mine drainage.** *FEMS*
520 *Microbiol Ecol* 2003, **44**:139-152.
521 3. Bruneel O, Duran R, Koffi K, Casiot C, Fourçans A, Elbaz-Poulichet F, Personné JC:
522 **Microbial diversity in a pyrite-rich tailings impoundment (Carnoulès, France).**
523 *Geomicrobiol J* 2005, **22**:249-257.
524 4. Tan GL, Shu WS, Hallberg KB, Li F, Lan CY, Huang LN: **Cultivation-dependent**
525 **and cultivation-independent characterization of the microbial community in acid mine**
526 **drainage associated with acidic Pb/Zn mine tailings at Lechang, Guangdong, China.**
527 *FEMS Microbiol Ecol* 2007, **59**:118-126.
528 5. LeBlanc M, Casiot C, Elbaz-Poulichet F, Personné C: **Arsenic removal by oxidizing**
529 **bacteria in a heavily arsenic-contaminated acid mine drainage system (Carnoulès,**
530 **France).** *J Geol Soc* 2002, **198**:267-274.
531 6. Bruneel O, Duran R, Casiot C, Elbaz-Poulichet F, Personné JC: **Diversity of**
532 **microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoulès, France.** *Appl*
533 *Environ Microbiol* 2006, **72**:551-556.
534 7. Bruneel O, Pascualt N, Egal M, Bancon-Montigny C, Goñi-Urriza MS, Elbaz-
535 Poulichet F, Personné JC, Duran R: **Archaeal diversity in a Fe-As rich acid mine drainage**
536 **at Carnoulès (France).** *Extremophiles* 2008, **12**:563-571.
537 8. Bruneel O, Personné JC, Casiot C, Leblanc M, Elbaz-Poulichet F, Mahler BJ, Le
538 Flèche A, Grimont PAD: **Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine**
539 **drainage (Carnoulès, France).** *J Appl Microbiol* 2003, **95**:492-499.

- 540 9. Casiot C, Morin G, Juillot F, Bruneel O, Personné JC, Leblanc M, Duquesne K,
541 Bonnefoy V, Elbaz-Poulichet F: **Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid**
542 **mine drainage (Carnoulès creek, France)**. *Water Res* 2003, **37**:2929-2936.
- 543 10. Duquesne K, Lebrun S, Casiot C, Bruneel O, Personné JC, Leblanc M, Elbaz-
544 Poulichet F, Morin G, Bonnefoy V: **Immobilization of arsenite and ferric iron by**
545 ***Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage**. *Appl Environ*
546 *Microbiol* 2003, **69**:6165-6173.
- 547 11. Duquesne K, Lieutaud A, Ratouchniak J, Yarzabal A, Bonnefoy V: **Mechanisms of**
548 **arsenite elimination by *Thiomonas* sp. isolated from Carnoulès acid mine drainage**. *Eur*
549 *J Soil Biol* 2007, **43**:351-355.
- 550 12. Arsène-Ploetze F, Koechler S, Marchal M, Coppée JY, Chandler M, Bonnefoy V,
551 Brochier-Armanet C, Barakat M, Barbe V, Battaglia-Brunet F, et al: **Structure, function,**
552 **and evolution of the *Thiomonas* spp. genome**. *PLoS Genet* 2010, **6**:art. e1000859.
- 553 13. Bryan CG, Marchal M, Battaglia-Brunet F, Kugler V, Lemaitre-Guillier C,
554 Lièvreumont D, Bertin PN, Arsène-Ploetze F: **Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas***
555 **strains: Differences revealed diverse adaptation processes**. *BMC Microbiol* 2009, **9**:art.
556 127.
- 557 14. Bertin PN, Heinrich-Salmeron A, Pelletier E, Goulhen-Chollet F, Arsène-Ploetze F,
558 Gallien S, Lauga B, Casiot C, Calteau A, Vallenet D, et al: **Metabolic diversity among main**
559 **microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-**
560 **genomics**. *ISME J* 2011, **5**:1735-1747.
- 561 15. Ferrari BC, Binnerup SJ, Gillings M: **Microcolony cultivation on a soil substrate**
562 **membrane system selects for previously uncultured soil bacteria**. *Appl Environ Microbiol*
563 2005, **71**:8714-8720.
- 564 16. Delavat F, Phalip V, Forster A, Lett MC, Lièvreumont D: **Deciphering the role of**
565 ***Paenibacillus* strain Q8 in the organic matter recycling in the acid mine drainage of**
566 **Carnoules**. *Microb Cell Fact* 2012, **11**:art. 16.
- 567 17. Vieira-Silva S, Rocha EPC: **The systemic imprint of growth and its uses in**
568 **ecological (meta)genomics**. *PLoS Genet* 2010, **6**:art. e1000808.
- 569 18. Hallberg KB, Johnson DB: **Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine**
570 **drainage waters**. *Hydrometallurgy* 2003, **71**:139-148.
- 571 19. Hao C, Wang L, Gao Y, Zhang L, Dong H: **Microbial diversity in acid mine**
572 **drainage of Xiang Mountain sulfide mine, Anhui Province, China**. *Extremophiles* 2010,
573 **14**:465-474.
- 574 20. Tamaki H, Hanada S, Sekiguchi Y, Tanaka Y, Kamagata Y: **Effect of gelling agent**
575 **on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment**.
576 *Environ Microbiol* 2009, **11**:1827-1834.
- 577 21. Battaglia-Brunet F, Joulain C, Garrido F, Dictor MC, Morin D, Coupland K, Barrie
578 Johnson D, Hallberg KB, Baranger P: **Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and**
579 **characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov.** *Antonie Leeuwenhoek* 2006, **89**:99-
580 108.
- 581 22. Rasmussen LD, Zawadsky C, Binnerup SJ, Øregaard G, Sørensen SJ, Kroer N:
582 **Cultivation of hard-to-culture subsurface mercury-resistant bacteria and discovery of**
583 **new *merA* gene sequences**. *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:3795-3803.
- 584 23. Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P: **Notes on the**
585 **characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes**. *Int J Syst Evol Microbiol*
586 2010, **60**:249-266.
- 587 24. Janssen PH: **Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA**
588 **and 16S rRNA genes**. *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:1719-1728.

- 589 25. Pankratov TA, Dedysh SN: ***Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *Granulicella***
590 ***pectinivorans* sp. nov., *Granulicella aggregans* sp. nov. and *Granulicella rosea* sp. nov.,**
591 **acidophilic, polymer-degrading acidobacteria from Sphagnum peat bogs.** *Int J Syst Evol*
592 *Microbiol* 2010, **60**:2951-2959.
- 593 26. Bruneel O, Volant A, Gallien S, Chaumande B, Casiot C, Carapito C, Bardil A, Morin
594 G, Brown Jr GE, Personné CJ, et al: **Characterization of the active bacterial community**
595 **involved in natural attenuation processes in arsenic-rich creek sediments.** *Microb Ecol*
596 2011, **61**:793-810.
- 597 27. Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM,
598 Herndl GJ: **Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere".**
599 *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 2006, **103**:12115-12120.
- 600 28. Campbell BJ, Yu L, Heidelberg JF, Kirchman DL: **Activity of abundant and rare**
601 **bacteria in a coastal ocean.** *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 2011, **108**:12776-12781.
- 602 29. Brazelton WJ, Ludwig KA, Sogin ML, Andreishcheva EN, Kelley DS, Shen CC,
603 Edwards RL, Baross JA: **Archaea and bacteria with surprising microdiversity show shifts**
604 **in dominance over 1,000-year time scales in hydrothermal chimneys.** *Proc Natl Acad Sci*
605 *Unit States Am* 2010, **107**:1612-1617.
- 606 30. Dworkin J, Shah IM: **Exit from dormancy in microbial organisms.** *Nat Rev*
607 *Microbiol* 2010, **8**:890-896.
- 608 31. Pester M, Bittner N, Deevong P, Wagner M, Loy A: **A 'rare biosphere'**
609 **microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland.** *ISME J* 2010, **4**:1-12.
- 610 32. Neufeld JD, Chen Y, Dumont MG, Murrell JC: **Marine methylotrophs revealed by**
611 **stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomics.** *Environ*
612 *Microbiol* 2008, **10**:1526-1535.
- 613 33. Fuhrman JA: **Microbial community structure and its functional implications.**
614 *Nature* 2009, **459**:193-199.
- 615 34. Pedrós-Alió C: **Dipping into the rare biosphere.** *Science* 2007, **315**:192-193.
- 616 35. Farris MH, Olson JB: **Detection of *Actinobacteria* cultivated from environmental**
617 **samples reveals bias in universal primers.** *Lett Appl Microbiol* 2007, **45**:376-381.
- 618 36. Hill JE, Town JR, Hemmingsen SM: **Improved template representation in cpn 60**
619 **polymerase chain reaction (PCR) product libraries generated from complex templates**
620 **by application of a specific mixture of PCR primers.** *Environ Microbiol* 2006, **8**:741-746.
- 621 37. Frostegård Å, Courtois S, Ramière V, Clerc S, Bernillon D, Le Gall F, Jeannin P,
622 Nesme X, Simonet P: **Quantification of bias related to the extraction of DNA directly**
623 **from soils.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**:5409-5420.
- 624 38. Delmont TO, Robe P, Cecillon S, Clark IM, Constancias F, Simonet P, Hirsch PR,
625 Vogel TM: **Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity.** *Appl*
626 *Environ Microbiol* 2011, **77**:1315-1324.
- 627 39. Halter D, Goulhen-Chollet F, Gallien S, Casiot C, Hamelin J, Gilard F, Heintz D,
628 Schaeffer C, Carapito C, Van Dorsselaer A, et al: **In situ proteo-metabolomics reveals**
629 **metabolite secretion by the acid mine drainage bio-indicator, *Euglena mutabilis*.** *ISME J*
630 2012.
- 631 40. Delavat F, Phalip V, Forster A, Plewniak F, Lett MC, Liévremont D: **Amylases**
632 **without known homologues discovered in an acid mine drainage: Significance and**
633 **impact.** *Scientific Reports* 2012, **2**:art. 354.
- 634 41. Weiser HB, Radcliffe RS: **The physical chemistry of color lake formation. IV. Red**
635 **Congo acid and Congo red lakes.** *Journal of Physical Chemistry* 1928, **32**:1875-1885.
- 636 42. Quéméneur M, Heinrich-Salmeron A, Muller D, Liévremont D, Jauzein M, Bertin PN,
637 Garrido F, Joulain C: **Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in**
638 **aerobic arsenite-oxidizing bacteria.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:4567-4573.

- 639 43. Heinrich-Salmeron A, Cordi A, Brochier-Armanet C, Halter D, Pagnout C,
640 Abbaszadeh-Fard E, Montaut D, Seby F, Bertin PN, Bauda P, Arsène-Ploetze F:
641 **Unsuspected diversity of arsenite-oxidizing bacteria as revealed by widespread**
642 **distribution of the *aoxB* Gene in prokaryotes.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:4685-
643 4692.
- 644 44. Weeger W, Lièvreumont D, Perret M, Lagarde F, Hubert JC, Leroy M, Lett MC:
645 **Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment.**
646 *BioMetals* 1999, **12**:141-149.
- 647 45. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ: **16S ribosomal DNA amplification**
648 **for phylogenetic study.** *J Bacteriol* 1991, **173**:697-703.
- 649 46. Lett MC, Muller D, Lièvreumont D, Silver S, Santini JM: **Unified nomenclature for**
650 **genes involved in prokaryotic aerobic arsenite oxidation.** *J Bacteriol* 2012, **194**:207-208.
651
652

Table 1: Strains affiliation, isolating medium characteristics and physiological and genetic properties of the isolated strains.

Taxonomy		Isolation Medium			Metabolism and genetic		
Strains affiliation (isolates)	Closest type strain / identity (acc. num.)	Name	CAA %	pH	<i>aioA</i> gene amplification	arsenite oxidation	cellulose degradation
<i>Acidobacteria</i> bacterium (N3B)	<i>Acidobacterium capsulatum</i> ATCC 51196 / 94% (NR_043386)	FD2	0.01	5.5	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. (Q9*)	[<i>Brevibacterium</i>] <i>frigorigerans</i> DSM 8801 / 99% (NR_042639)	LB	-	7	-	-	-
<i>Paenibacillus</i> sp. (Q8*)	<i>Paenibacillus taichungensis</i> BCRC 17757 / 99% (NR_044428)	LB	-	7	-	-	+
<i>Cellulomonas</i> sp. (O1) (E10, J12, J13, J14, J16, K13 K5, K6, K8, L7, L8, L9, L11, L14, L15, P2, U3)	<i>Cellulomonas chitinilytica</i> X.bu-b / 97% (NR_041511)	FD1	0.01	3.5			
		FD2	0.01	5.5	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. (H7)	<i>Streptomyces atratus</i> NRRL B-16927 / 99% (NR_043490)	FD2	0.01	5.5	-	-	-
<i>Propionibacteriaceae</i> (H7p)	<i>Luteococcus peritonei</i> CCUG38120 / 95% (NR_028882)	FD2	0.01	5.5	-	-	-
<i>Arthrobacter</i> sp. (J9)	<i>Arthrobacter albidus</i> LC13 / 98% (NR_041403)	FD2	0.01	5.5	-	-	-
<i>Micrococcus</i> sp. (Q7*)	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM / 99% (FJ214355)	LB	-	7	-	-	-
<i>Rhodococcus</i> sp. (U2)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> N11 / 99% (NR_037024)	FD2	0.01	5.5	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. (X14)	<i>Micromonospora coriariae</i> NARO / 99% (NR_042314)	1/100 YPD + 100 mg/lAs(V)	-	8	+	-	+
<i>Acidocella</i> sp.	<i>Acidocella facilis</i>						

	/ 99%							
(Q3*, Q6*)	(NR_025852)	FD1	0.01	3.5				
(I10)		FD2	0.01	5.5	-	-	-	
(L5, Q1*, Q2*, Q4*, Q5*)		FD4	0.1	5.5				
<i>Acidisoma</i> sp.	<i>Acidisoma tundrae</i> WM1 / 98% (NR_042705)	FD1	0.01	3.5	-	-	+	
(K16, L2)								
<i>Methylosorusula</i> sp.	<i>Methylosorusula polaris</i> V-22 / 98% (EU586035)	FD2	0.01	5.5	-	-	-	
(N4)								
<i>Ancylobacter</i> sp.	<i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> DM16 / 97% (EU589386)	CDM	-	7	-	-	-	
(X1)								
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 / 99% (NR_042191)	FD2	0.01	5.5	-	-	-	
(K7, L10)								
<i>Rhodanobacter</i> sp.	<i>Rhodanobacter ginsengisoli</i> GR17-7 / 99% (NR_044127)	FD2	0.01	5.5	-	-	-	
(L12, N3J, U4, U5, U7)								
<i>Dyella</i> sp.	<i>Dyella japonica</i> XD53 / 97% (NR_040974)	FD2	0.01	5.5	-	-	-	
(K4)								
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Dokdonella koreensis</i> DS-123 / 93% (NR_043322)	mm126	-	5	-	-	-	
(X11)								
<i>Thiomonas</i> sp.	<i>Thiomonas cuprina</i> NBRC 102145 / 98% (NR_041628)	1/100 YPD + 100 mg/l As(III)	-	9.8	+	+	ND	
(X19)								

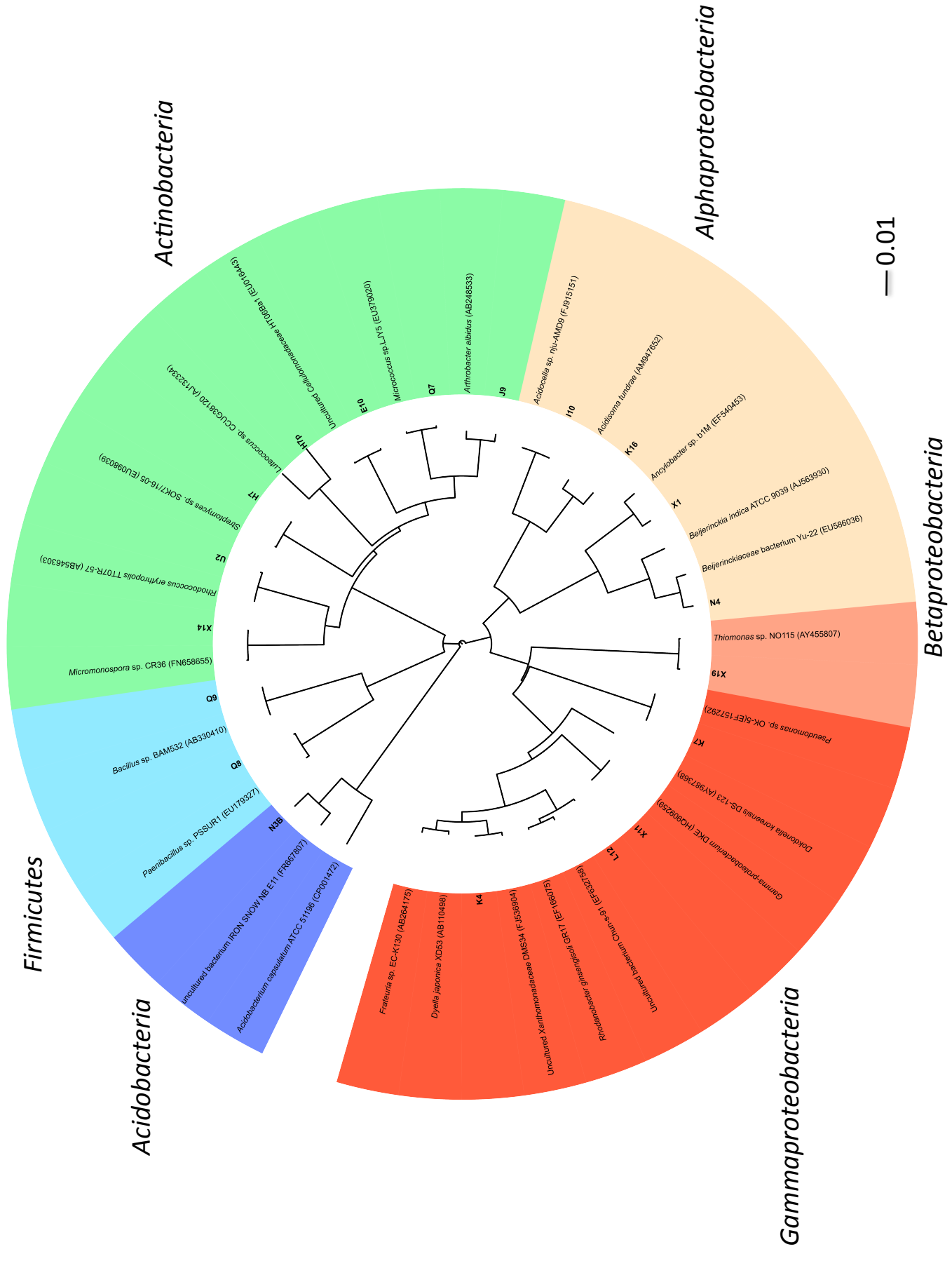
In brackets are the strains code and * indicates the strains isolated via SSMS. In bold are the isolates used for 16S rRNA gene sequencing and physiological experiments. Accession numbers are as follows: N3B (FR874231); Q9 (FR874233); Q8 (FR874235); E10 (FR874226); H7 (FR874234); H7p (FR874241); J9 (FR874236); Q7 (FR874239); U2 (FR874228); X14 (FR874224); I10 (FR874225); K16 (FR874240); N4 (FR874230); X1 (FR874229); K7 (FR874238); L12 (FR874232); K4 (FR874237); X11 (FR874227) and X19 (FR874242). ND: Not determined.

Additional file 1.

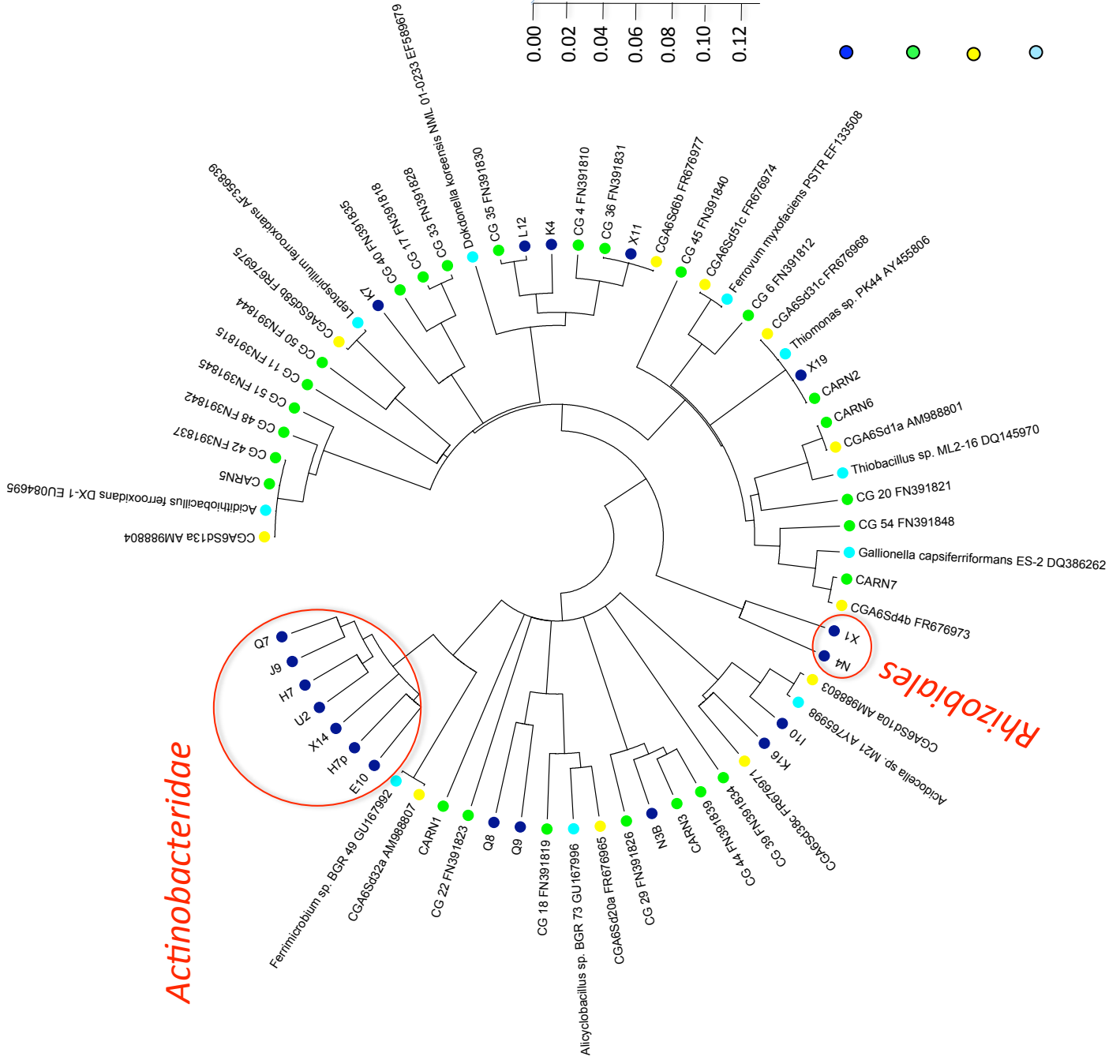
.doc file. 16S-specific primers used for each genus.

666 **Figure 1**
667 **Phylogenetic tree representing the taxonomic affiliation of the Carnoulès isolates.**
668 The 16S rRNA gene sequences of the isolates (in bold) and their closest relatives were
669 aligned with the MEGA 5 implementation of ClustalW algorithm. Neighbor joining tree
670 was performed with this software and tree was drawn up using the website ITOL
671 (<http://itol.embl.de/>).

672
673 **Figure 2**
674 **Phylogenetic tree representing all taxa detected in the sediments of Carnoulès.**
675 The 16S rRNA gene sequences of the isolates (filled dark-blue circles), closest relative
676 (filled light-blue circles) and other taxa found in Carnoulès by Bertin *et al.*, 2011 (filled
677 green circles); Bruneel *et al.*, 2011 (filled yellow circles) were aligned with the MEGA 5
678 implementation of ClustalW algorithm. Neighbor joining tree and tree representation
679 were performed with this software. The open red circles correspond to phylogenetic
680 groups detected only by culture-dependent approach (this study).
681



Actinobacteridae



b. Discussion et conclusions

L'approche de métagénomique inverse qui avait été menée n'a pas permis la culture de CARN1/4, mais a conduit à l'isolement de nombreux autres genres bactériens à partir du DMA de Carnoulès. Cette approche de métagénomique inverse est nouvelle, puisqu'un seul article relatant avec succès cette approche était publié au commencement de ce travail (Tyson et al., 2005). Depuis, cette approche a permis l'isolement de certaines souches jusqu'alors non-cultivées, que ce soit par la mise au point de milieux à partir de données de métatranscriptomique (métatranscriptomique inverse) (Bomar et al., 2011) ou de métagénomique (métagénomique inverse) (Pope et al., 2011), mais les exemples sont rares, montrant qu'il reste difficile de comprendre tous les besoins de la bactérie pour la croissance en laboratoire.

De nombreuses études se sont intéressées à comparer les approches culturelles et moléculaires sur la diversité détectée (Ellis et al., 2003; Tan et al., 2007; Vaz-Moreira et al., 2011). Néanmoins, la partie cultivée se limite en général à un seul milieu, dans une condition donnée, et avec un temps d'incubation assez court. Cependant, toutes ces études montrent que l'approche indépendante de la culture permet l'obtention d'une diversité beaucoup plus grande que par culture.

Les approches menées ici étaient destinées à isoler la plus grande diversité possible. À partir du moment où il ne peut exister un milieu universel permettant la culture de toutes les bactéries, il faut donc multiplier les milieux, en changeant les

paramètres. Ici, le pH (3,5 à 9,8), la concentration en nutriments (du milieu FD2 au milieu LB) et l'agent polymérisant (agar et gomme gellane) ont permis l'isolement de 19 genres. La diversité révélée par culture permet ainsi l'augmentation de 70% de la diversité détectée à Carnoulès par rapport aux résultats obtenus par approches moléculaires. De plus, cette approche a permis l'isolement de X19, une souche de *Thiomonas* très proche de CARN2, une des souches majoritaires du métagénome. Elle a également permis l'isolement de bactéries se développant sur des milieux alcalins, alors même que le pH global *in situ* est très acide. En outre, cette stratégie permet de démontrer la complémentarité des approches puisque la diversité obtenue ici est différente de la diversité détectée par approches moléculaires. Ce résultat peut être mis en relation avec les biais des techniques moléculaires exposés en partie B de l'introduction. Par exemple, 37% de cette diversité cultivée appartient au phylum *Actinobacteria*, tandis que celui-ci n'a pas été détecté dans l'approche « métagénomique globale » (Bertin et al., 2011). De la même façon, le genre *Micromonospora* –dont un représentant a été isolé lors de cette étude– est un genre très difficile à lyser (Frostegård et al., 1999) et restera donc non détecté par approche moléculaire.

À ce stade, il est impossible d'affirmer que chacune de ces souches n'a pas pu être détectée à cause des biais des approches moléculaires (cf. Partie B de l'introduction), parce qu'elles appartiennent à la population « rare » (Sogin et al., 2006) (cf. Partie D de l'introduction) ou/et parce qu'elles ne sont là que « transitoirement », telles des « contaminations ». Cependant, pour ce dernier point, cette question peut être posée à n'importe quelle approche, à n'importe quel moment. Rien n'empêche en effet

de se questionner sur le fait qu'un genre détecté dans une étude « métagénomique 16S » ait pu être détecté à cause d'un évènement environnemental externe (souche allochtone arrivée par les pluies par exemple). L'approche culturelle comme l'approche moléculaire ponctuelle ne permettent finalement que de faire une « photographie » d'une communauté, à un instant donné dans des conditions physico-chimiques données.

L'hypothèse de contamination semble d'autant moins probable lorsque l'on s'intéresse plus particulièrement au contenu génétique de certains isolats. En effet par exemple, X14, une des souches isolées de Carnoulès et n'ayant jamais été détectée précédemment, appartient au genre *Micromonospora*. Cette souche n'est pas capable d'oxyder l'As(III) en As(V) dans les conditions de laboratoire. Cependant, nous avons pu montré que celle-ci possédait un fragment du gène *aioA* codant la grande sous-unité de l'arsénite oxydase. La séquence de ce fragment présente 100% d'identité nucléotidique avec celle de *Thiomonas* sp. CB2, isolée de Carnoulès quelques années avant (Bruneel et al., 2003). La présence de ce fragment dans le génome de X14 suggère un transfert horizontal ayant eu lieu *in situ*, ce qui permet d'éliminer d'office l'hypothèse d'une contamination de laboratoire.

Indépendamment du fait qu'il ne s'agisse « que » d'une « photographie » de la communauté bactérienne, il n'en reste pourtant pas moins vrai que la diversité cultivée détectée ici permet d'améliorer la vision de la composition bactérienne totale à Carnoulès. Cette détermination au plus juste est primordiale, puisqu'il est indispensable de savoir « qui est là », pour savoir « qui fait quoi ». De plus, la culture permet également

de tester physiologiquement les isolats, de manière à leur attribuer un/des rôles au sein de la communauté, permettant ainsi d'affiner le modèle de fonctionnement de celle-ci. Nous avons pu par exemple montrer que X19, la souche « CARN2-like », était capable d'oxyder l'arsénite, comme cela avait été supposé par méta-protéogénomique. Parmi les souches isolées, 2 ont fait l'objet d'une caractérisation plus approfondie.

III. Caractérisation taxonomique d'un nouveau genre inféodé aux milieux extrêmes

a. Introduction

Parmi les 19 genres détectés par culture, 3 n'ont pas pu être affiliés à un genre taxonomiquement caractérisé. En effet, ces souches présentent un gène codant l'ARNr 16S avec moins de 95% d'identité avec toute autre souche taxonomiquement caractérisée (Tindall et al., 2010) (cf. Partie D de l'introduction). Parmi ces 3 genres, X11, isolée de Carnoulès, présente une similarité maximale de 93.4% avec *Dokdonella koreensis*, membre de la famille *Xanthomonadaceae* (γ -*proteobacteria*), donc bien en dessous des 95%. Cependant, des séquences identiques ou très proches de celles de X11 ont été détectées par des approches indépendantes de la culture à Carnoulès (Bertin et al., 2011), mais aussi dans d'autres DMAs et environnements acides (« Rio Tinto » en Espagne, « Lower Red Eyes » en Pennsylvanie, « Wheal Jane » en Angleterre (non publié, séquences retrouvées par BLAST sur le site du NCBI)). Il semble donc que ce nouveau genre soit inféodé à ces milieux. Il est alors peu probable que la présence constante de ces bactéries dans ces environnements extrêmes soit due à un phénomène stochastique.

Plus probablement, ceci peut s'expliquer par le fait que cette souche se soit adaptée à ces environnements, suggérant qu'elle pourrait jouer un rôle non négligeable dans le fonctionnement *in situ* de ces communautés. La caractérisation taxonomique de ce nouveau genre est donc un premier point important pour ensuite comprendre son rôle. Ce travail est actuellement en préparation pour une soumission dans *Systematic and Applied Microbiology*.

b. *Article 2 à soumettre dans Systematic and Applied Microbiology*

1 ***Acidiminas carnoulesii* gen. nov., sp. nov., a commonly**
2 **detected but previously uncultured bacterium from acidic**
3 **environments and acid mine drainages**

4 **François Delavat¹, Marie-Claire Lett¹ and Didier Lièvre^{1*}**

5

6 ¹UMR7156 Université de Strasbourg/CNRS. Génétique Moléculaire, Génomique,
7 Microbiologie

8 *Corresponding author: Didier Lièvre. Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, Institut de
9 Botanique, Université de Strasbourg, 28 rue Goethe, Strasbourg 67000, France. E-mail: didier.lievremont@unistra.fr

10 Tel +(0033) 368851811; Fax +(0033) 368852028

11

12 **Abstract**

13

14 A Gram negative, strict aerobic, rod-shaped bacterial strain X11^T previously isolated from an
15 Acid Mine Drainage AMD (Carnoulès, France) was investigated for its taxonomic position. X11^T
16 showed no more than 93.4% 16S rRNA gene sequence identity with its closest relative,
17 *Dokdonella koreensis*. The predominant fatty acids were iso-C16:0 and iso-17:1 ω9c and the sole
18 isoprenoid quinone was ubiquinone Q-8. The strain X11^T had
19 phosphatidylmonomethylethanolamine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol,
20 diphosphatidylglycerol, phosphoaminolipids and small amount of unidentified aminolipid as
21 main polar lipids. The DNA G+C content was 66.8 mol%. All physiological, chemotaxonomical
22 and genetic results confirmed the novelty of this strain within the family *Xanthomonadaceae*. As
23 X11^T and related strains are often detected in AMDs and other acidic environments, the name
24 *Acidiminas carnoulesii* gen. nov. sp. nov. is proposed for this new genus and species within the
25 *Gammaproteobacteria*. The type strain is X11^T (=LMG 26724^T =...).

26

27 **Introduction**

28

29 Acid Mine Drainages (AMDs) are ecosystems characterized by very acidic conditions, high metal
30 concentrations and a low biodiversity. In the Carnoulès AMD (Gard, France) a recent
31 metagenomic study allowed the detection of members of the family *Xanthomonadaceae* closely
32 related to the genera *Rhodanobacter* and *Dokdonella* [1]. This study also allowed the *in situ*
33 detection of a 16S rRNA gene sequence (CG-36, FN391831) within the family *Xanthomonadaceae*
34 but only distantly related to any taxonomically characterized genus.

35 In contrast to the low diversity previously described in Carnoulès, a recent work highlighted a
36 larger *in situ* diversity obtained by culture-dependent approaches [2]. Among the 19 genera
37 isolated in the cited study, the strain X11 presented a 16S rRNA gene sequence that precluded
38 its affiliation to any known genus within the family *Xanthomonadaceae*. However, this strain
39 shared a common 16S rRNA gene sequence with the uncultured bacterium clone CG-36
40 (FN391831) detected previously in Carnoulès using a culture-independent approach [1].
41 Moreover, this strain is closely related to uncultured bacteria detected in other AMDs and acidic
42 environments (“Rio Tinto” in Spain, “Lower Red Eyes” in Pennsylvania, “Wheal Jane” in England
43 (NCBI-nr BLAST, unpublished results)). The systematic presence of this strain and relatives in
44 these extreme environments suggests a possible important role in their corresponding
45 community. Here, the characteristics of the strain X11 are presented, on the basis of which X11
46 represents a novel genus within the family *Xanthomonadaceae*.

47

48 **Materials and methods**

49

50 ***Sampling site, isolation medium and partial 16S rRNA gene characterization***

51 X11^T was isolated from the sediment (up to 2 cm deep) of the Carnoulès AMD (Gard, France)
52 collected in November 2009 at the station called CowG (44°07'01.80"N/4°00'06.90"E) [1, 2].

53 The isolation medium was a modified m126 plates (mm126) comprising (per litre MQ water):
54 0.5 g yeast extract (YE) (MP biomedical), 1.5 g KH₂PO₄ (VWR), 0.3 g NH₄Cl (Acros organics), 0.1
55 g MgSO₄ (Acros organics) and 5 g Na₂S₂O₃ (Prolabo) and 15 g agar.

56

57 ***Physiological and biochemical characteristics***

58 Physiological characteristics of X11^T were tested until otherwise stated in liquid medium at 25°C
59 and growth was monitored by spectrophotometry at 600 nm. Various conditions were tested,
60 including optimal growth temperature (from 4°C to 37°C), NaCl concentration (0 to 9%) and pH
61 resistance (3 to 9). Anaerobic growth was tested by incubating Petri plates in an anaerobic
62 chamber.

63 Because X11^T could not grow without yeast extract (YE), possibly because of the absolute
64 requirement of growth factors, potential carbon sources suitable for X11^T were tested in mm126
65 medium supplemented with 0.1% (w/v) of a single carbon source (Supplementary information
66 SI) and carbon was assumed to be used when growth distinctly improved when compared with
67 mm126 medium alone, as previously reported [3].

68 Cellulolytic activity was tested on mm126 plates supplemented with 0.2%
69 Carboxymethylcellulose CMC. Gelatin, casein, urea and esculin degradation, nitrate and nitrite
70 reduction, catalase and oxidase activity, H₂S production, β-galactosidase activity and Gram
71 staining were tested according to [4]. Arsenic oxidation was measured by HPLC-ICP-OES [2].
72 Motility was observed with optic and electronic microscopy to reveal the presence of flagella.

73

74 ***DNA G+C content, full 16S rRNA gene characterization and phylogenetic analyses***

75 The G+C content, respiratory quinones, fatty acids, polar lipids and full 16S rRNA gene sequence
76 analyses were performed by the Identification Service of the Deutsche Sammlung von
77 Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany). X11^T 16S rRNA gene
78 sequence (accession number HE858262) was compared with that of each of 34 organisms
79 belonging to the family *Xanthomonadaceae* and with *Ignatzschineria larvae*. The results are
80 presented as a similarity matrix (Table SI) and phylogenetic tree (Fig. 1). The scale bar below
81 the dendrogram indicates 10 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

82

83 Results and discussion

84

85 After 14 incubation days on mm126 plates, X11^T formed pale-yellow coloured, raised and
86 smooth colonies (1 mm in diameter). Cells are strict aerobic, Gram negative, non-mobile small
87 rods (0.8 µm x 0.4 µm) (Fig. SI).

88 As the GenIII MicroPlate (Biolog) did not work with this strain, possibly because of its slow
89 growth, biochemical and physiological tests were performed individually. X11^T was not able to
90 perform the reduction of nitrate to nitrite what is in agreement with most of the closest strains
91 [5-15]. Additionally, cytochrome-oxidase activity was absent in X11^T and *Dyella marensis* but
92 present in all other strains (Table 1), and X11^T catalase activity was negative. X11^T was not able
93 to hydrolyse casein, esculin, urea, CMC nor gelatin, but produced an active β-galactosidase. The
94 strain could not produce H₂S.

95 Despite the *in situ* oligotrophic conditions, X11^T could use many organic compounds as carbon
96 sources, such as glucose, galactose, ribose, rhamnose, mannose, sucrose and levulose, as well as
97 sorbitol and some amino acids (YE, isoleucine and lysine). In contrast, the strain could not
98 metabolize lactate, acetate, and all other amino acids tested.

99 Strain X11^T grew at temperatures ranging from 20 to 30 °C without difference in generation
100 time, but not at 4°C nor at 37°C. Growth was completely inhibited at NaCl concentration above
101 0.75% and at pH below 5 and above 7, with an optimum at pH 5. Strain X11^T can resist to 100
102 mg l⁻¹ arsenite (As(III)) but was not able to oxidize As(III) into As(V), and did not carry the gene
103 *aioA* encoding the large subunit of the arsenite oxidase responsible for the As(III) oxidation
104 (Delavat, 2012).

105 The sole respiratory quinone detected for X11^T was ubiquinone Q-8, in agreement with the
106 major ubiquinone detected for the closest relatives (Table 1). The membrane fatty acid
107 composition of X11^T (Table S2) was composed of two major components (>10% of the total),
108 iso-C16:0 (31.00%) and summed Feature 9 (31.03%), which can comprise both iso-17:1 ω9c
109 and 16:0 10 methyl. However, the ECL value (DSMZ data) showed that the component found in
110 summed Feature 9 was iso 17:1 ω9c. Polar lipid profile of X11^T is shown in Figure S2, and
111 comprised phosphatidylmonomethylethanolamine, phosphatidylethanolamine,
112 phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, phosphoaminolipids and small amount of
113 unidentified aminolipid.

114 The best 16S rRNA gene sequence identity of X11^T was obtained with *Dokdonella koreensis*
115 (93.4%). The DNA G+C content can vary between the *Xanthomonadaceae* strains between 63
116 and 75% (Table 1), and X11^T showed a G+C content of 66.8 mol%, whereas *Dokdonella koreensis*
117 shows a G+C content of 71%.

118

119 In summary, the strain X11^T isolated from the AMD of Carnoulès (Gard, France) possesses
120 genetic, chemotaxonomical and physiological characteristics (Table 1) that clearly differ from
121 any relatives. Based on the results presented, it becomes evident that X11^T belongs to a novel
122 species of a new genus within the family *Xanthomonadaceae*. The 16S rRNA gene sequence
123 analysis (BLAST-nr in the NCBI database) showed that bacteria closely related to X11^T were
124 often detected –but previously never isolated or described– in different AMDs and acidic
125 environments (“Rio Tinto” in Spain, “Lower Red Eyes” in Pennsylvania, “Wheal Jane” in
126 England). As a consequence, the name *Acidiminas carnoulesii* is proposed. The phylogenetic
127 position of *Acidiminas carnoulesii* within the family *Xanthomonadaceae* is presented in Figure 1.

128

129 **Description of *Acidiminas gen. nov.***

130 *Acidiminas* (a.ci.di.mi'nas. acid mine, extreme environments where many strains close to X11^T
131 were detected, and where X11^T was isolated).

132 Cells are small aerobic, Gram negative rods. Negative for catalase and oxidase activity. Contains
133 iso-C16:0 and iso 17:1 ω9c as major membrane fatty acids, and the only respiratory quinone is
134 Q-8. Contains phosphatidylmonomethylethanolamine, phosphatidylethanolamine,
135 phosphatidylglycerol, Diphosphatidylglycerol, phosphoaminolipids and small amount of
136 unidentified aminolipid as main polar lipids. The type species is *A. carnoulesii*.

137

138 **Description of *Acidiminas carnoulesii, sp. nov.***

139 *Carnoulesii* (car.nou.le'sii, Carnoulès, the name of the city where the acid mine drainage, from
140 which the strain X11^T was isolated, is located).

141 Cells are small rods, non-motile which form pale-yellow coloured, raised and smooth colonies
142 after 7-10 days at 25°C. YE is absolutely required for growth. No growth at pH 4 nor above 7, with
143 on optimum of 5. Positive for β-galactosidase production and for nitrate and nitrite reduction.
144 Negative for gelatin, esculin, urea, CMC and casein hydrolysis. The predominant quinone is Q-8,
145 and the major fatty acids are iso-C17:1 ω9c and iso-C16:0. Contains
146 phosphatidylmonomethylethanolamine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol,
147 diphosphatidylglycerol, phosphoaminolipids and small amount of unidentified aminolipid as
148 main polar lipids. The DNA G+C content is 66.8 mol%. The type strain is X11^T (=LMG 26724^T
149 =...), which was isolated from the Carnoulès AMD sediment (France).

150

151 **Acknowledgments**

152

153 This work was performed as part of the program of the « Groupement de Recherche -
154 Métabolisme de l'Arsecenic chez les Microorganismes (GDR2909-CNRS)»
155 (<http://gdr2909.alsace.cnrs.fr/>) in the frame of the RARE project.

156 The authors would like to thank M. Erhardt (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS,
157 Université de Strasbourg, France) for all electronic microscopy experiments.

158

159 **References**

160

161 [1] Bertin, P.N., Heinrich-Salmeron, A., Pelletier, E., Goulhen-Chollet, F., Arsène-Ploetze,
162 F., Gallien, S., Lauga, B., Casiot, C., Calteau, A., Vallenet, D., Bonnefoy, V., Bruneel, O.,
163 Chane-Woon-Ming, B., Cleiss-Arnold, J., Duran, R., Elbaz-Poulichet, F., Fonknechten, N.,
164 Giloteaux, L., Halter, D., Koechler, S., Marchal, M., Mornico, D., Schaeffer, C., Smith, A.A.T.,
165 Van Dorsselaer, A., Weissenbach, J., Médigue, C., Le Paslier, D., Metabolic diversity among
166 main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-
167 genomics, *ISME J*, 5 (2011) 1735-1747.

168 [2] Delavat, F., Lett, M.C., Lièvreumont, D., Novel and unexpected bacterial diversity in an
169 arsenic-rich ecosystem revealed by culture-dependent approaches, *Biol Direct*, (2012).

170 [3] Belova, S.E., Pankratova, T.A., Detkova, E.N., Kaparullina, E.N., Dedysh, S.N., *Acidisoma*
171 *tundrae* gen. nov., sp. nov. and *Acidisoma sibiricum* sp. nov., two acidophilic,
172 psychrotolerant members of the *Alphaproteobacteria* from acidic northern wetlands, *Int*
173 *J Syst Evol Microbiol*, 59 (2009) 2283-2290.

174 [4] Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R.,
175 Phillips, G.B., Manual of methods for general bacteriology, American Society for
176 Microbiology, Washington, 1981.

177 [5] Mergaert, J., Cnockaert, M.C., Swings, J., *Fulvimonas soli* gen. nov., sp. nov., a γ -
178 *proteobacterium* isolated from soil after enrichment on acetylated starch plastic, *Int J*
179 *Syst Evol Microbiol*, 52 (2002) 1285-1289.

180 [6] Saha, P., Krishnamurthi, S., Mayilraj, S., Prasad, G.S., Bora, T.C., Chakrabarti, T.,
181 *Aquimonas voraii* gen. nov., sp. nov., a novel *gammaproteobacterium* isolated from a
182 warm spring of Assam, India, *Int J Syst Evol Microbiol*, 55 (2005) 1491-1495.

183 [7] An, D.S., Im, W.T., Yang, H.C., Yang, D.C., Lee, S.T., *Dyella koreensis* sp. nov., a β -
184 glucosidase-producing bacterium, *Int J Syst Evol Microbiol*, 55 (2005) 1625-1628.

185 [8] Kämpfer, P., Lodders, N., Falsen, E., *Luteibacter anthropi* sp. nov., isolated from
186 human blood, and reclassification of *Dyella yejuensis* Kim et al. 2006 as *Luteibacter*
187 *yejuensis* comb. nov, *Int J Syst Evol Microbiol*, 59 (2009) 2884-2887.

188 [9] Kim, B.Y., Weon, H.Y., Lee, K.H., Seok, S.J., Kwon, S.W., Go, S.J., Stackebrandt, E., *Dyella*
189 *yejuensis* sp. nov., isolated from greenhouse soil in Korea, *Int J Syst Evol Microbiol*, 56
190 (2006) 2079-2082.

191 [10] Lee, D.W., Lee, S.D., *Dyella marensis* sp. nov., isolated from cliff soil, *Int J Syst Evol*
192 *Microbiol*, 59 (2009) 1397-1400.

193 [11] Xie, C.H., Yokota, A., *Dyella japonica* gen. nov., sp. nov., a γ -*proteobacterium* isolated
194 from soil, *Int J Syst Evol Microbiol*, 55 (2005) 753-756.

195 [12] Cunha, S., Tiago, I., Pires, A.L., Da Costa, M.S., Veríssimo, A., *Dokdonella fugitiva* sp.
196 nov., a *Gammaproteobacterium* isolated from potting soil, *Syst Appl Microbiol*, 29 (2006)
197 191-196.

- 198 [13] Ten, L.N., Jung, H.M., Im, W.T., Oh, H.W., Yang, D.C., Yoo, S.A., Lee, S.T., *Dokdonella*
199 *ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil from a ginseng field, and emended description of
200 the genus *Dokdonella*, Int J Syst Evol Microbiol, 59 (2009) 1947-1952.
- 201 [14] Yoo, S.H., Weon, H.Y., Anandham, R., Kim, B.Y., Hong, S.B., Jeon, Y.A., Koo, B.S., Kwon,
202 S.W., *Dokdonella soli* sp. nov., a *gammaproteobacterium* isolated from soil, Int J Syst Evol
203 Microbiol, 59 (2009) 1965-1968.
- 204 [15] Yoon, J.H., Kang, S.J., Oh, T.K., *Dokdonella koreensis* gen. nov., sp. nov., isolated from
205 soil, Int J Syst Evol Microbiol, 56 (2006) 145-150.
- 206
207

Table 1. Physiological, chemotaxonomical and genetic comparisons between *Acidiminas carneulesii* X11^T and its closest relatives

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X11 ^T										
Physiology										
Cell shape	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Motility	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Colony colour	cream-yellow	dark yellow	yellowish-brown	greenish-yellow	yellow	ND	yellow	yellow	yellow	yellow
Anaerobic growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth temperature range (°C)	10-37	20-37	25-42	>15 and <50	15-42	10-37	5-37	5-35	28-37	10-39
Optimal temperature	20-30	30-37	ND	40	30	25-30	28	30	ND	30
pH range	>4 and <8	5.1-9.1	6-11	>5 and <8	5.5-10	5.6-8	4.5-8.5	5-8	ND	5-9
Optimal growth pH	5	6.1-9.1	ND	7	6.5-7	6.5-7.2	ND	6-7	ND	6.5
NaCl tolerance	0.75%	1-2%	2%	2%	4%	ND	5%	<1%	ND	<3%
Oxidase	+	-	+	w	+	-	+	+	+	+
Catalase	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
nitrate reduction	-	-	-	-	-	+	ND	+	-	v
Genetic										
16S rRNA gene % identity with X11 ^T	/	92.3	92.3	92.4	92.6	92.7	92.7	92.7	92.9	93.4
G+C mol%	66.8	63.8	65.7-66.6	68.3	68.7	63.4-64	63	73	71.9	71
Chemotaxonomy										
Major fatty acids*	iso-C16:0 Summed Feature 9**	iso-C15:0 iso-C17:0 C17:1ω9c	iso-C15:0 iso-C16:0 iso-C17:1ω9c	iso-C15:0 iso-C17:0 iso-C17:1ω9c	iso-C15:0 iso-C17:0 C17:1ω9c	iso-C15:0 iso-C17:0 iso-C17:1ω9c	iso-C15:0 iso-C17:0 iso-C17:1ω9c	iso-C15:0 iso-C17:0 iso-C17:1ω9c	iso-C15:0 iso-C16:0 iso-C17:0 iso-C17:1ω9c	iso-C15:0 iso-C17:0 iso-C17:1ω9c
Major quinone	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8

1: *Dyella koreensis*; 2: *Dyella marenisii*; 3: *Aquimonas voratii*; 4: *Dokdonella fugitiviva*; 5: *Dokdonella ginsengisoli*; 6: *Dyella japonica*; 7: *Luteibacter yeojuensis****; 8: *Dokdonella soli*; 9: *Fulvimonas soli*; 10 *Dokdonella koreensis*.

* >10% of total fatty acids, data from the original articles

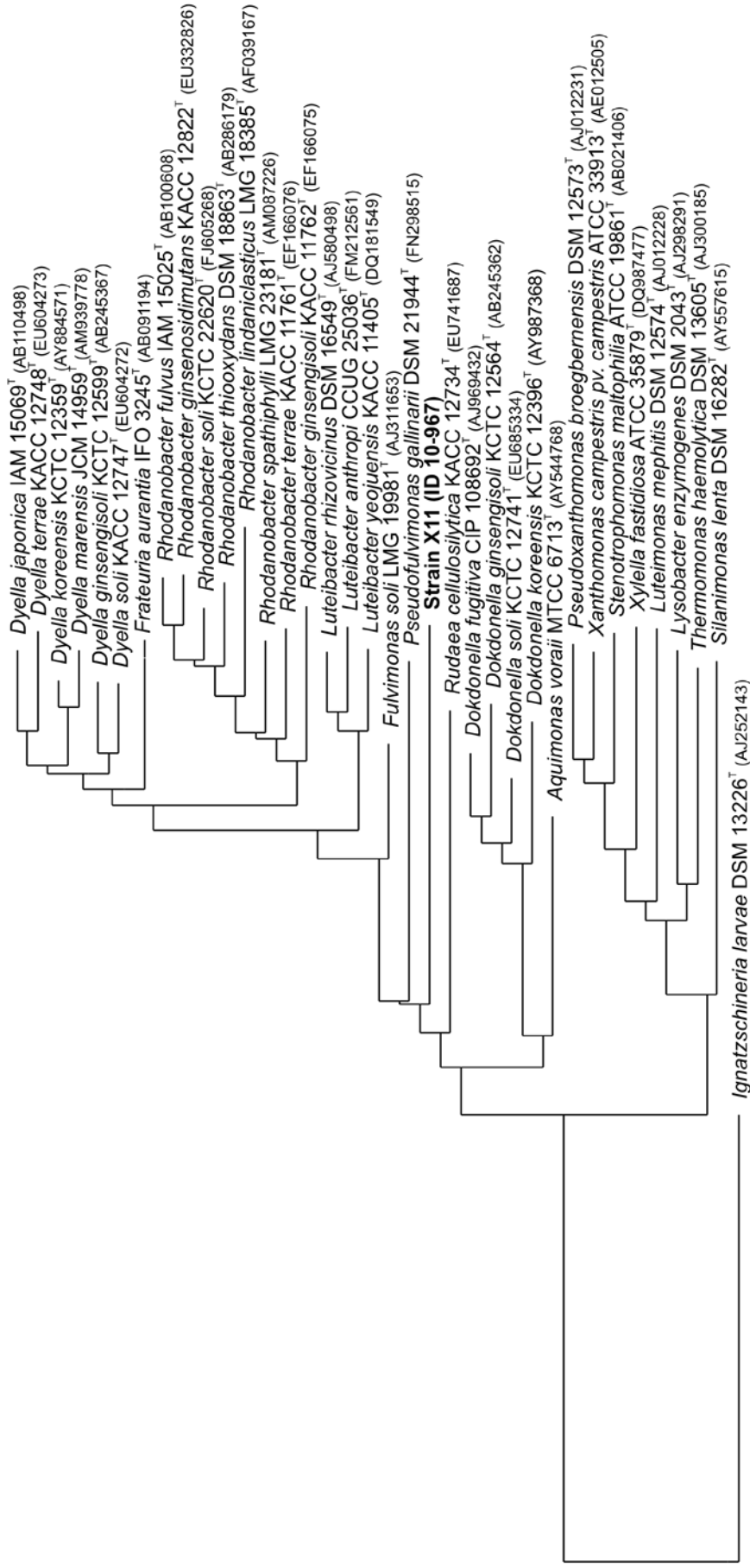
** Summed feature 9 contains iso-C17:1 ω9c and 16:0 10-methyl

*** Formerly called *Dyella yeojuensis*

(The table should be placed after the first paragraph of the section "results and discussion")

Fig. 1. Phylogenetic tree based on the evolutionary distance constructed with the neighbor-joining method using the correction of Jukes and Cantor. The root of the tree was determined by including the 16S rRNA gene sequence of *Ignatzschineria larvae* into the analysis. The scale bar below the dendrograms indicates 10 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

(The figure should be placed at the end of the section "results and discussion" and before the Protologue)



Supplementary information SI.

Carbon substrates (0.1% w/v) tested for X11^T:

YE, L-isoleucine, L-valine, L-histidine, L-leucine, L-arginine, L-alanine, L-methionine, L-serine, L-lysine, DL-phenylalanine, di-glycine, lactate (v/v), Na-acetate, D-glucose, D-galactose, D-sorbitol, D-ribose, α -L-rhamnose, D-mannose, saccharose, levulose, D-xylose.

Table S2. Fatty acid composition of strain X11^T

Fatty acid	X11^T
Straight-chain fatty acid	
C16 : 0	0.67
Branched fatty acid	
iso-C10:0	0.40
iso-C11:0	2.39
anteiso-C11:0	0.14
iso-C12:0	0.13
iso-C13:0	0.11
iso-C14:0	1.24
iso-C15:0	6.97
iso-C15:1 isoF	0.40
anteiso-C15:0	2.33
iso-C16:0	31.00
iso-C16:1 iso H	1.67
iso-C17:0	6.95
anteiso-C17:0	2.17
anteiso-C17:1 ω9c	0.24
iso-C18:0	1.85
iso-C19:0	0.31
iso-C20:0	0.85
Unsaturated fatty acid	
C17:1 ω6c	1.43
Hydroxy fatty acid	
iso-C11:0 3-OH	6.01
iso-C12:0 3-OH	0.44
Summed feature*	
3	1.03
4	0.25
9	31.03

*summed feature 3 comprises C16:1 ω7c and/or 16:1 ω6c ; summed feature 4 comprises C17:1 iso I and/or anteiso B ; summed feature 9 contained iso-C17:1 ω9c and/or C16:0 10-methyl.

Figure SI. Electronic microscopy of *Acidiminas carnoulesii* X11^T

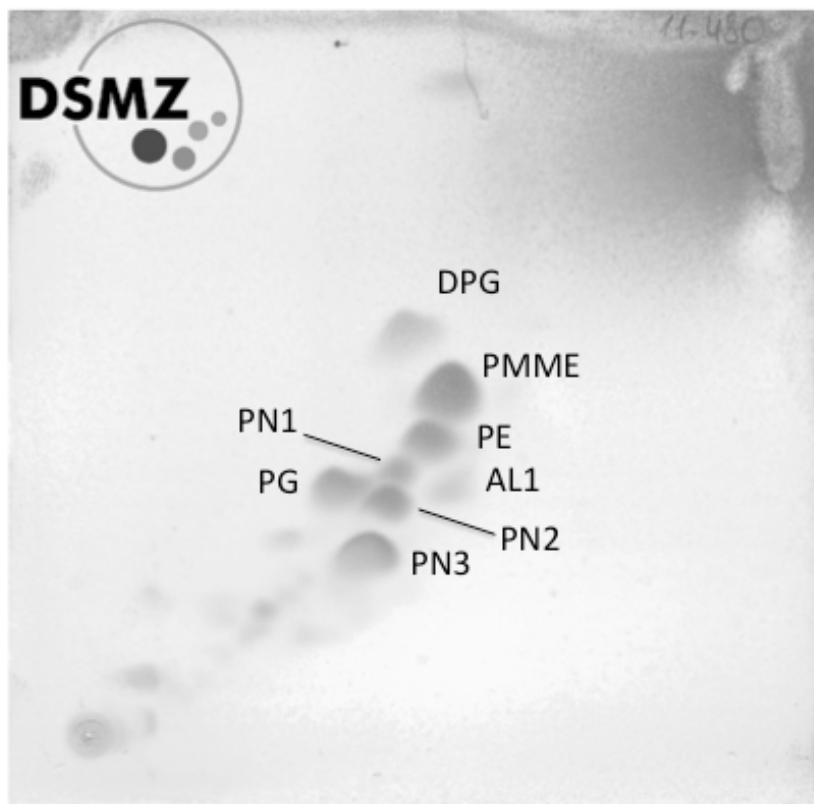


Taxo-08.tif
Acidiminas carnoulesii
Print Mag: 62100x @ 7. in
10:42 10/19/11

500 nm
HV=75kV
Direct Mag: 20000x
AMT Camera System

Photography taken after an 8 days incubation in mm126 medium

Fig. S2. Polar lipid profile for the strain X11^T



Polar lipid analyses were carried out by the Identification Service of the DSMZ and Dr B.J. Tindall, DSMZ, Braunschweig, Germany. Abbreviations: DPG, diphosphatidylglycerol; PMME, phosphatidylmonomethylethanolamine; PE, phosphatidylethanolamine; AL1, unidentified aminolipids; PN1-3, Phosphoaminolipids; PG, phosphatidylglycerol.

c. Discussion et conclusions

L'approche culturelle a donc permis d'une part la détection de genres jusqu'alors non-détectés à Carnoulès, mais aussi de genres nouveaux, notamment le nouveau genre *Acidiminas carnoulesii*. Cette dernière, inféodée aux milieux extrêmes, a pu être dans un premier temps isolée, puis caractérisée. Le positionnement phylogénétique de cette souche X11 au sein du règne bactérien constitue la première étape pour une étude plus approfondie de son rôle dans le fonctionnement de la communauté de Carnoulès. Il s'avère par exemple que cette souche est capable de dégrader de nombreux substrats carbonés organiques simples, malgré les conditions oligotrophes généralement retrouvées dans les DMAs. Cette dégradation et, plus généralement, le recyclage de la matière organique est un processus fondamental pour tout écosystème, puisqu'il permet la croissance de chaque bactérie, et contribue ainsi au maintien de la communauté. Les interactions entre les différents micro-organismes jouent un rôle crucial dans ce recyclage. Ainsi par exemple, il a été montré qu'*Euglena mutabilis* est capable de sécréter certains composés, tels que les acides aminés et certains sucres (Halter et al., 2012b), qui peuvent être utilisés par d'autres souches comme *Acidiminas carnoulesii*. Cependant, la dégradation de la matière organique complexe est également indispensable pour fournir la matière organique supplémentaire. C'est pour cette raison que des approches fonctionnelles ont été menées pour caractériser plus avant ce recyclage.

B. APPROCHES FONCTIONNELLES

I. Recyclage de la matière organique complexe à Carnoulès

a. *Introduction*

La dégradation de la matière organique complexe par des bactéries polymères-dégradantes a un intérêt majeur dans une communauté microbienne puisqu'elle permet un apport supplémentaire en matière organique pour l'ensemble des micro-organismes présents et en particulier pour les souches non-dégradantes. Cet apport est d'autant plus intéressant lorsque la quantité de matière organique est faible, comme c'est généralement le cas dans les DMAs. Le recyclage de la matière organique complexe est également un processus fondamental pour tout écosystème. En effet, il permet également aux autres bactéries ne dégradant pas les polymères de profiter des produits de dégradation de ceux-ci comme source supplémentaire de carbone, dans le cadre d'une syntrophie. Ainsi, les bactéries dégradant la matière organique complexe peuvent jouer un rôle, certes indirect, mais pourtant majeur dans le fonctionnement de la communauté. Par exemple, l'analyse des génomes des 7 souches CARNs montre que seul CARN6 possède les gènes de dégradation de la cellulose (Bertin et al., 2011). Cette souche serait donc la seule à dégrader le polymère. De la même façon, les gènes de dégradation de la xylane (composant majeur de l'hémicellulose) sont uniquement retrouvés chez CARN3. Ces 2 souches ont donc des rôles majeurs dans le recyclage de cette matière organique complexe. Pourtant, les activités de dégradation des polymères pour une souche peuvent varier avec les conditions environnementales. CARN3 et

CARN6 peuvent par exemple ne plus être actives lorsque le pH ou la température augmente. Or, toute fonction nécessite une redondance, c'est-à-dire le fait que cette fonction soit retrouvée dans différents organismes. Cette redondance fonctionnelle est indispensable, puisqu'elle permet à la communauté entière de se maintenir, en maintenant les fonctions malgré les changements des conditions environnementales (cf. Partie D de l'introduction). D'autres souches capables de dégrader cette matière organique complexe doivent donc être présentes au sein de la communauté, souches qui pourront être actives lorsque les conditions physico-chimiques changent.

Parmi les 19 genres isolés de Carnoulès, une souche isolée sur milieu LB appartenait au genre *Paenibacillus*. Jusqu'alors, aucun représentant de ce genre n'avait pu être mis en évidence dans un DMA. Pourtant, le genre *Paenibacillus* est connu pour l'arsenal enzymatique qu'il sécrète, permettant de dégrader de nombreux composés et notamment la matière organique complexe (Ruijsenaars et al., 2000; Harada et al., 2005; Chow et al., 2007; Park et al., 2009; Hwang et al., 2010). Ainsi, cette souche a été étudiée physiologiquement et fonctionnellement pour ses capacités à dégrader la matière organique.

b. *Article 3 paru dans Microbial Cell Factories*

RESEARCH

Open Access

Deciphering the role of *Paenibacillus* strain Q8 in the organic matter recycling in the acid mine drainage of Carnoulès

François Delavat¹, Vincent Phalip², Anne Forster², Marie-Claire Lett¹ and Didier Lièvremont^{1,3*}

Abstract

Background: The recycling of the organic matter is a crucial function in any environment, especially in oligotrophic environments such as Acid Mine Drainages (AMDs). Polymer-degrading bacteria might play an important role in such ecosystem, at least by releasing by-products useful for the rest of the community. In this study, physiological, molecular and biochemical experiments were performed to decipher the role of a *Paenibacillus* strain isolated from the sediment of Carnoulès AMD.

Results: Even though *Paenibacillus* sp. strain Q8 was isolated from an oligotrophic AMD showing an acidic pH, it developed under both acidic and alkaline conditions and showed a heterotrophic metabolism based on the utilization of a broad range of organic compounds. It resisted to numerous metallic stresses, particularly high arsenite (As(III)) concentrations (> 1,800 mg/L). Q8 was also able to efficiently degrade polymers such as cellulose, xylan and starch. Function-based screening of a Q8 DNA-library allowed the detection of 15 clones with starch-degrading activity and 3 clones with xylan-degrading activity. One clone positive for starch degradation carried a single gene encoding a "protein of unknown function". Amylolytic and xylanolytic activities were measured both in growing cells and with acellular extracts of Q8. The results showed the ability of Q8 to degrade both polymers under a broad pH range and high As(III) and As(V) concentrations. Activity measurements allowed to point out the constitutive expression of the amylase genes and the mainly inducible expression of the xylanase genes. PACE demonstrated the endo-acting activity of the amylases and the exo-acting activity of the xylanases.

Conclusions: AMDs have been studied for years especially with regard to interactions between bacteria and the inorganic compartment hosting them. To date, no study reported the role of microorganisms in the recycling of the organic matter. The present work suggests that the strain Q8 might play an important role in the community by recycling the scarce organic matter (cellulose, hemicellulose, starch...), especially when the conditions change. Furthermore, function-based screening of a Q8 DNA library allowed to assign an amylolytic function to a gene previously unknown. AMDs could be considered as a reservoir of genes with potential biotechnological properties.

Keywords: *Paenibacillus*, Functional redundancy, Acid Mine Drainage (AMD), Amylase, Xylanase, Polymer degradation, Organic matter, Function-based screening, Community function

Background

Ecosystems are complex systems driven by two major forces: a biotic community and abiotic conditions. The two forces interact with each other in a dependent manner. Physicochemical characteristics condition both the

presence and relative abundance of each species, whereas the community modifies and adapts its surrounding environment to survive and grow. In these complex ecosystems, bacteria play key roles as they are able to efficiently change the environment, at the local scale (μm scale) as well as at much larger scales (earth scale). For example, *Cyanobacteria* are responsible for the major event that transformed the biogeochemistry of the earth about 3 billion years ago that is oxygen-

* Correspondence: didier.lievremont@unistra.fr

¹Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, UMR7156 Université de Strasbourg/CNRS, Strasbourg, France

Full list of author information is available at the end of the article

evolving photosynthesis [1,2]. Many studies highlighted the role of bacteria in the transformation of the abiotic conditions, such as anaerobic ammonium oxidation [3], oxidation of arsenite and/or iron followed by a co-precipitation of these inorganic elements [4], or degradation of pollutants such as naphthalene [5]. All these processes are catalysed by bacteria but the corresponding activities are driven by their environment.

Polymers degradation by bacteria is also driven by the *in situ* conditions. Recently, it has been shown that cellulose degradation in peat extracts (pH 4.0) was significantly enhanced by adding nitrogen [6]. Furthermore, hydrolysis of polymers is of great interest for industries as it can be used in a wide range of applications, from paper industries to biofuel production [7]. For these reasons and because of the development of metagenomic approaches, many studies focused on the screening for new polymer-degrading enzymes [8-10]. Therefore, function-based screening of a DNA library allowed the discovery of various enzymes such as amylases, cellulases and lipases. Furthermore, function-based screening allows the detection of genes, without *a priori* and could therefore lead to the discovery of completely new sequences.

The Acid Mine Drainage (AMD) of Carnoulès (France) is an extreme environment characterized by very acidic conditions (pH 2.7-3.4) and heavy arsenic and iron contaminations in the water (up to 350 mg/L and 2,700 mg/L respectively) [11]. This oligotrophic environment is however not devoid of life as bacterial communities are active *in situ* [12]. In AMDs, many studies focused on the role of both cultured and uncultured bacteria in the transformation of inorganic compounds such as the oxidation of iron or arsenic, their resistance to metals and their ability to grow at low pH [4,11,13-16]. However, to our knowledge and despite its importance in any ecosystem, no study reported the role of bacteria in the recycling of organic matter in such oligotrophic environments.

In this study, a strain belonging to the genus *Paenibacillus* was isolated. As *Paenibacillus* species are known for the number of secreted enzymes [17-20] and because they were never described in AMDs, physiological, biochemical and molecular biology experiments were implemented to decipher the role of the strain Q8 in this extreme environment. Polymer-degrading activities of this bacterium were focused, both in homologous and heterologous conditions showing that even if this bacterium was isolated from a very acidic environment, this strain was still alive and active at neutral and alkaline conditions as Q8 was also able to degrade carboxymethylcellulose, hemicellulose (xylan) and starch in these conditions. A functional screening of a Q8 DNA-library in *Escherichia coli* allowed the detection of 15

clones positive for starch degradation and 3 for xylan degradation. Interestingly, the amino acids sequence of one starch-degrading enzyme was not identified *in silico* as an amylase, and corresponded to a "protein of unknown function". By its polymer-degrading activities, this strain may be important in the community function at least by providing easily degradable by-products to the rest of the community, contributing therefore to the functional redundancy.

Results

Growth characteristics with respect to the *in situ* conditions

Paenibacillus sp. strain Q8 was isolated from the soft unstable layer corresponding to the 1-2 cm of particles sedimenting on the bottom of the water stream. The samples were collected directly below the running water of Carnoulès characterized by very acidic conditions (pH 3.2) and by heavy metals and arsenic contamination (Table 1). In order to test whether this strain has adapted to the extreme conditions found *in situ*, its growth rate in LB medium under a broad range of pH *i.e.* from 3 to 10 was measured. Q8 was able of rapid growth under a broad range of pH, from 6 to 8 without significant variation in the generation time ($\approx 140 \text{ min}^{-1}$) (Figure 1). Moreover, the strain was able to grow under both acidic (pH 5) and alkaline (pH 9) conditions with a generation time only slightly higher (*e.g.* $\approx 175 \text{ min}^{-1}$ at pH 9). Additionally, no growth occurred for Q8 at pH 10 (data not shown). According to our data, Q8 is not a true acidophilic bacterium, as its growth was completely inhibited at pH below 5 (data not shown).

To further decipher the adaptation of Q8 to the *in situ* conditions, its resistance for various metals at different concentrations was tested. As shown in Table 1, this strain was able to grow under high metal stresses. For instance, Q8 was still able to grow at the concentration of 1800 mg/L of As(III), which is by far much higher

Table 1 Comparison of the metal resistance of Q8 with the *in situ* metals concentrations

Metal	Resistance to (mg/L)	<i>In situ</i> concentration (mg/L)
Ni	50	0.86
Cu	> 250	0.28
As(III)	> 1,800	161.4
Mn	200	11.82
Hg	1	ND
As(V)	> 5,000	33.37
Ag	> 10	ND
Cr(III)	> 50	0.10*

ND = Not Determined. *No speciation for chromium was undertaken. Observations were done after 72 hours incubation in LB medium supplemented with the corresponding metal.

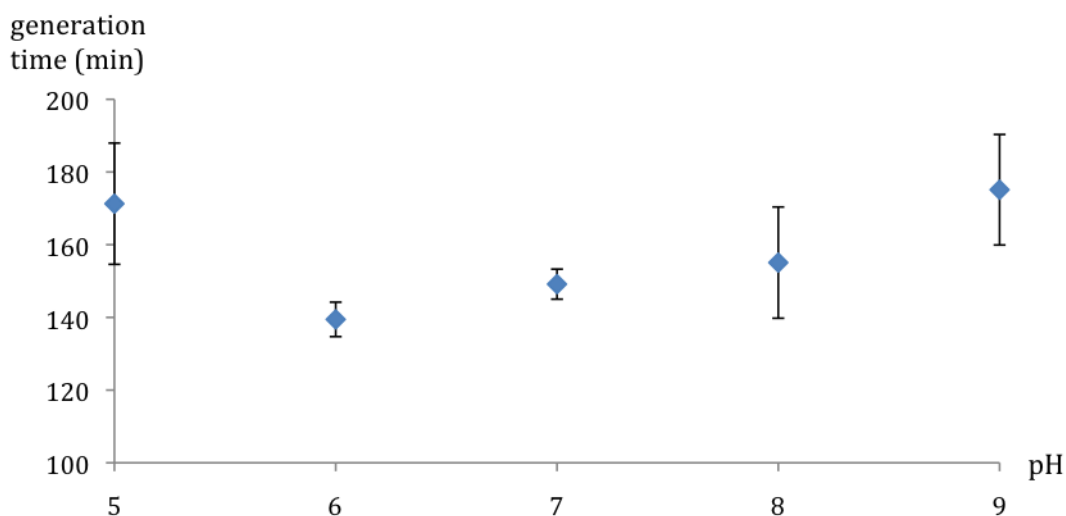


Figure 1 Growth rate of *Paenibacillus* Q8 in LB medium at different pH. Blue lozenges represent the generation time of Q8. Growth experiments were done at least in quadruplicate in LB medium at 30°C. As no growth occurred under pH 5 and above pH 9, the corresponding generation times are not reported in the figure.

than the *in situ* As(III) concentration of Carnoulès water at the Q8 sampling date (161.4 mg/L). In addition to metal resistance, Q8 was tested for its capability to resist to various antimicrobial agents. On solid media, the strain was resistant to chloramphenicol, gentamycin, kanamycin, streptomycin, spectinomycin and trimethoprim and not to ampicillin, nalidixic acid, rifampicin and tetracycline. All these results further pointed out its resistance to various stresses and its high adaptation capabilities.

The catabolic capabilities of Q8 were tested and this showed that this bacterium used a broad range of organic compounds, including sugars monomers (glucose, fructose, lactose...) as well as various polymers, such as pectin, starch and glycogen (Additional file 1). The Q8 ability to degrade polymers has then been tested on LB plates supplemented by cellulose (in its soluble form Carboxymethylcellulose CMC), hemicellulose (in the form of its major compound *i.e.* xylan) and starch. This screening allowed to confirm the starch-degrading activity already detected with API 50 CH. Moreover, Q8 was shown to degrade CMC and xylan after 24 hours incubation, thus demonstrating two more polymer-degrading activities (data not shown).

From phenotypic to genotypic characterization

To characterize the genes involved in the degradation of the different polymers, a DNA library in the pcDNA2.1 vector was constructed and screened for cellulose (CMC), hemicellulose (xylan) and starch degradation capabilities. The size of the fragments was 1-5 kb in average. Among the 6700 clones screened for the 3

activities, 15 displayed hydrolytic activity on LB plates supplemented with 1% soluble starch that represented 0.22% of the total number of clones. Three (0.045%) were positive on LB plates supplemented with 0.2% xylan (data not shown). No positive clone was obtained on LB plates supplemented with 0.2% CMC for the degradation of cellulose.

Two clones positive for starch degradation (BB9 and KF4) and one for xylan degradation (*GαC5*) were randomly chosen and the corresponding inserts were sequenced. The sequences were analyzed using the ORF Finder program from the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) and the corresponding ORFs were investigated with the NCBI-nr BLAST program.

Clone BB9 (2,152 bp), which was positive for the degradation of starch, carries a single ORF (1,614 bp) with 84% and 93% sequence identity at the nucleotidic (X60779) and proteic (CAA43194) level respectively, with the α -amylase gene *amyE* from *Bacillus circulans*.

Clone KF4 (1,635 bp) carries only one complete ORF (900 bp) whereas the two other possible ones were only 309 and 291 bp in length, and were therefore discarded. The 900 bp ORF encoded a hypothetical 299-aminoacids protein with unknown function, only partly related to a putative uncharacterized protein of *Paenibacillus polymyxa* (42% identity with YP 003869263, the first hit found by BLASTp search). The protein sequence was analyzed using the BLAST search at the Uniprot website (<http://www.uniprot.org>) and putative domains were searched using the prosite (<http://prosite.expasy.org/>) and InterProScan. Interestingly, this ORF showed no conserved hydrolytic domain, and did not share any

sequence homology with proteins belonging to the different glycoside hydrolase (GH-) families.

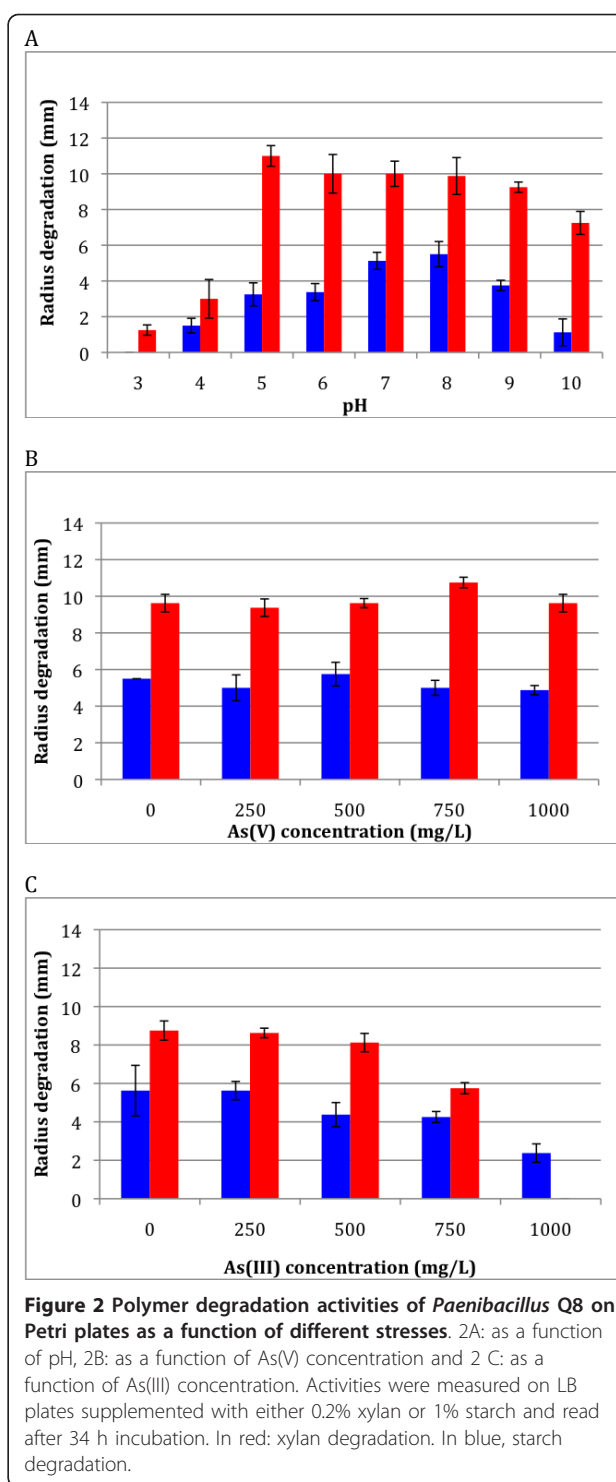
Lastly, an ORF found in the clone GαC5 (867 bp, 288 aa) shared 76% nucleotidic identity (at a query coverage of 93%) with a predicted glycosidase of *Paenibacillus polymyxa* E681 (CP000154) and 80% at the proteic level (query coverage 95%) with a glycosidase-like protein of *Paenibacillus polymyxa* SC2 (YP003949339). This ORF presented domains that allowed the classification of the corresponding protein in the glycosyl hydrolase families GH43, 62, 32 and 68. The family GH-43 includes proteins known to degrade xylan (EC 3.2.1.8) (<http://www.cazy.org>).

Partial characterization of the polymer-degrading activities

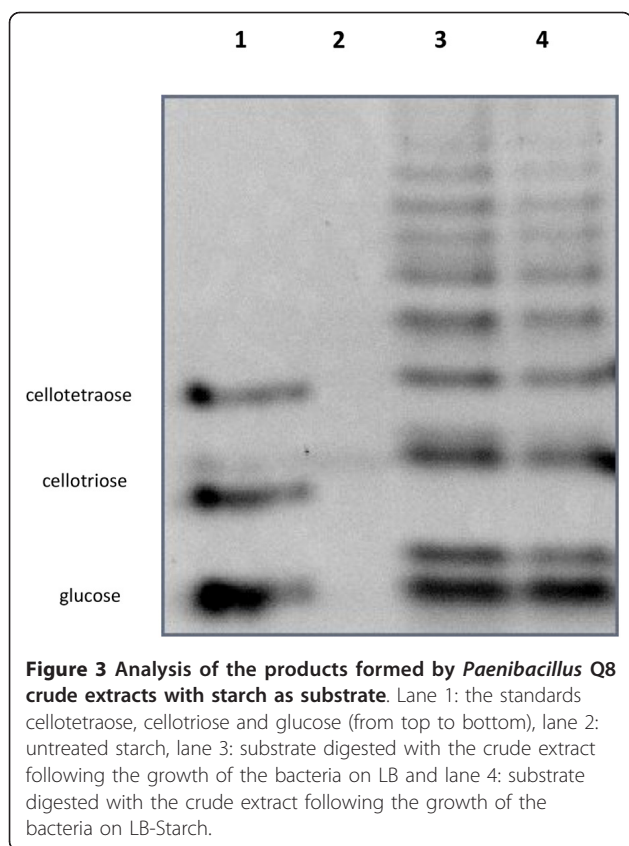
In order to characterize the global starch- and xylan-degrading activities of Q8, polymer degradation experiments were performed, both with whole cells and with crude extracts of *Paenibacillus* sp. strain Q8.

After 34 hours incubation on LB plates supplemented with either starch or xylan, degradation halos were measured at different pH and arsenic (either arsenite As(III) or arsenate As(V)) concentrations. Q8 was able to efficiently degrade both polymers at pH 5-9 (Figure 2A). Furthermore, despite the absence of visible growth in liquid medium below pH 5 and above pH 9 during the course of experiments, Q8 was able to degrade both polymers at pH 4 and 10, and xylan at pH 3, albeit at lower efficiency (e.g. more than five fold decrease for xylanolytic activity at pH 3 as compared to pH 5-8). An increase of the As(V) concentration up to 1,000 mg/L had no effect on the polymer-degrading activities of Q8 (Figure 2B). These results confirmed also the resistance of Q8 to high As(V) concentration. In contrast, although Q8 was able to grow at 1,000 mg/L As(III) (Table 1), such concentration inhibited completely the xylanolytic activity of the strain (Figure 2C). Thus, the presence of As(III) seems to have a much higher impact on the xylan-degrading activity than on the starch-degrading activity.

To further decipher the polymer-degrading activity, *in vitro* experiments with the crude extracts of Q8 grown in liquid LB medium, supplemented or not with either xylan or starch, were performed. Starch degradation was monitored by the measurement of the glucose formed after the incubation of the crude extracts with starch. For xylan degradation, reaction was monitored by the measurement of reducing sugars. Lastly, *in vitro* activity was measured both at pH 7 (pH of the LB medium) and at pH 3 (close to the pH measured *in situ*). When using starch as substrate for the crude extracts obtained for Q8 grown on LB and in LB-starch, a low activity was detected at pH 7 (5.21 +/-0.44 and 1.13 +/-0.36 nmol/h.

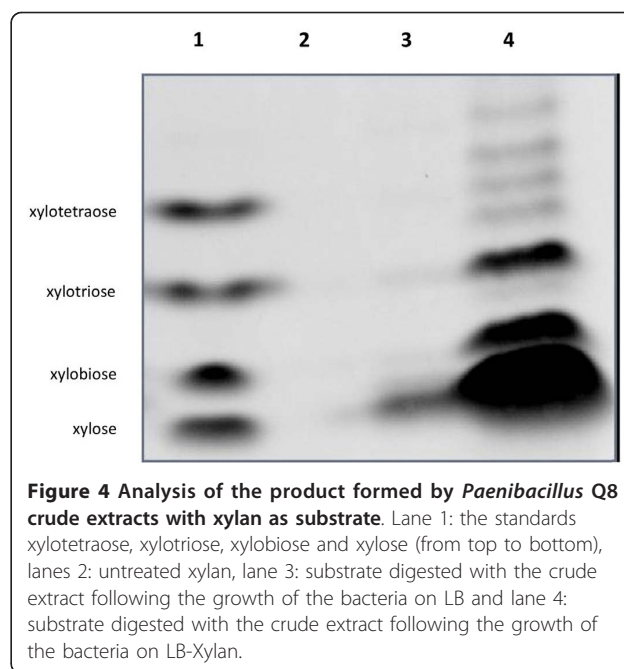


mg of protein, respectively, Figure 3). These activities were globally within the same order of magnitude, indicating that a large part of these enzymes are probably expressed constitutively. Polysaccharide Analysis using Carbohydrate gel Electrophoresis (PACE) experiments confirmed the *in vitro* activity of the crude extracts.



Indeed, bands comigrating with glucose were clearly observed at the bottom of the gel (Figure 3) for both starch-induced and non-induced cells. Furthermore, numerous other bands corresponding to glucose oligosaccharides were also formed. It should be noticed that the intensity of the glucose band is not particularly higher than the intensities of oligomers. This means that the crude extract contained mainly endo-acting amylases. Lastly, no starch-degrading activity was measured at pH 3 for the two crude extracts (data not shown). This is in good accordance with the results obtained on solid media (Figure 1A).

High xylanase activity ($2.09 \pm 0.27 \mu\text{mol/h.mg}$ of protein) was detected when the cells were grown in the presence of xylan (Figure 4). In contrast, only a low activity ($0.06 \pm 0.02 \mu\text{mol/h.mg}$ of protein) was measured without induction of the cells with xylan, indicating that the xylan-degrading activity was mainly inducible. PACE experiments confirmed this hypothesis and showed that after induction with xylan, the bacteria produced enzymes able to yield an huge band of xylose and also small oligomers of xylose in much smaller quantities. This demonstrates that both endo- and exo-degrading activities were present with prevalence for the latter one. As for starch, no xylan-degrading activity was measured at pH 3.



Discussion

Bacteria belonging to the genus *Paenibacillus* are widespread in various terrestrial environments. This genus is also known for its important enzymatic arsenal [21]. As such, those bacteria are able to interact with their surrounding environment and to transform it. This strategy has an important impact, both for *Paenibacillus* bacteria and for the microbial community as a whole. However, despite its presence and activity in various soils, this genus had never been detected in extreme environments such as AMDs, neither by culture-dependent nor -independent approaches before the isolation of Q8. To our knowledge, only a very recent work hypothesized the occurrence of a *Paenibacillus macerans* strain in AMDs [22]. In this last study, the use of GeoChip permitted to detect the presence of functional genes and a *nifH* gene close to the one of *Paenibacillus macerans*. However, this last bacterium was not detected *per se*, neither by culture nor by using a 16S rDNA library.

Q8 was isolated from the sediment of the Carnoulès AMD, characterized by very acidic (2.7-3.5) conditions and by heavy metals and arsenic contamination [11]. In order to decipher its role(s) in the community, the growth of the bacterium was tested under various pH conditions and in presence of metals or antibiotics. Although originated from an acidic environment, Q8 was able to grow under both acidic (pH 5) and alkaline (pH 9) conditions (Figure 1). It is noteworthy that under the tested conditions (LB medium at 30°C), the strain was unable to grow at pH below 5. This observation can be linked to the fact that moderate acidophilic bacteria

have previously been isolated from AMDs [16]. Alternatively, the ability of Q8 to grow at alkaline pH but not at very acidic pH may be related to the *in situ* occurrence of micro and macro-niches. Indeed, physical and chemical conditions can vary between two niches separated physically by a millimetre or centimetre order of magnitude [23-25]. It is therefore likely that *Paenibacillus* species live *in situ* in micro-environments where the pH is less acidic than the global pH measured in the ecosystem. It should be noted that this observation was confirmed by the isolation from the Carnoulès site of alkaliphilic bacteria, belonging to the genera *Micromonospora* and *Thiomonas*, using solid media at pH 8 and 9.8, respectively (unpublished work).

Metal and arsenic concentrations can vary at millimetre scale, but also during the course of the year [26] and the bacteria living in Carnoulès have to adapt to these extreme variations. The resistance of Q8 to high concentration of various metals (Table 1) would therefore allow *Paenibacillus* species to grow and to be active under such stresses. Arsenic stress is one of the most important stresses in Carnoulès, as exceptionally high concentration (up to 350 mg/L) in the water. A MIC of 750 mg/L As(III) (10 mM) was observed in a previous work for *Thiomonas* sp. 3As also isolated from Carnoulès [27]. The present work showed that Q8 was still able to grow with an As(III) concentration twice as high as for *Thiomonas* sp. 3As (Table 1).

Taken together, the high growth rate measured for Q8 (Figure 1) and the high metal resistance (Table 1) highlighted its possible ability to adapt to drastic physical and chemical changes in its environment, such as an increase of the pH or the metal concentration. At the ecosystem level, bacteria that can grow under less acidic or even alkaline conditions can play a major role in the resilience of the community, *i.e.* the capability of the community to adapt to physico-chemical changes in the environment [28]. This resilience is dependent on 1) the community structure, comprising both the abundant bacteria and the rare biosphere [29] and 2) the genetic potential carried by both abundant and rare bacteria.

Here, the possible role(s) of Q8 in the community function was investigated. The Carnoulès site is considered to be at least a partly oligotrophic environment [4]. The ability to live in oligotrophic environments requires for every bacterium specific adaptations to find essential nutrients, especially in terms of carbon sources (for review see [30]). This necessity is further amplified when additional stresses occur, such as metal and acidic stress. Different strategies are possible in such environments. For example, it has been recently shown that most bacteria isolated from the AMD of Carnoulès were able to grow on FD2 medium, characterized by very low carbon concentration (0.01% casaminoacid)

(unpublished work). Others were able to use inorganic carbon (autotrophic growth), as does *Thiomonas arsenivorans*, which was also able to use the oxidation of As(III) as sole energy source [31]. Another adaptation concerns the capability carried by some strains to metabolize unusual carbon compounds. These compounds can be pollutants (eventually toxic for other strains) such as naphthalene [5], or polymers.

In our study, Q8 was able to use various carbon sources, and to efficiently and rapidly degrade starch, cellulose and hemicellulose (xylan). The degradation of monomers is not surprising, since the majority of the bacteria possess the metabolic pathways to use glucose or fructose. However, the degradation of various polymers is more surprising when considering the *in situ* conditions. Moreover, the starch and xylan degradation activities were more important when decreasing the acidic stress (Figure 2A), confirming that the growth depends on the pH. Furthermore, its ability to degrade xylane and starch was not affected by the presence of up to 1,000 mg/L As(V) (Figure 2B). The increase of the As(III) concentration led to a decrease of the polymers degradation activities, but activity was still measured with 750 mg/L As(III) (Figure 2C). The *in vitro* polymer degradation using the acellular extracts confirmed the activity at pH 7 and absence of activity at pH 3. Moreover, the gene expression of the amylases was constitutive and corresponded to both endo- and exo-activities, whereas xylan degradation required an induction of the corresponding genes to perform the mainly exo- but also endo-degradation of xylan.

Function-based screening allowed the characterization of an amylase (BB9) and a xylanase (GαC5). Moreover, this strategy allowed us to assign an amylolytic function to a gene previously identified as encoding a "protein of unknown function" (KF4), since the protein sequence showed no sequence homology with any already described amylase or glycosidase, nor possessed any known hydrolytic domain. This result can be compared to the one obtained by Graham *et al.* [32], who described a novel cellulase in an *archaea* consortium originated from a geothermal source (temperature 90°C). This enzyme had an optimum activity at 109°C, and possessed 2 domains that were not yet observed in hyperthermophilic cellulases. However, since the authors have used a sequence-based approach to find the corresponding gene, the aminoacid sequence of the novel cellulase is therefore not be completely different from others. Moreover, a screening for amylases using metagenomic DNA from an AMD led to the detection of two amylases sharing no significant proteic sequence similarity with any known amylase or glycosidase. Purification and characterization confirmed the amylolytic function carried by both proteins (Delavat *et al.*,

submitted). One possible explanation for this novelty is that the extreme conditions found in Carnoulès (in terms of pH and metal concentrations) would trigger an accelerated adaptation for many important bacterial processes, such as polymers degradation.

Therefore, Q8 presents a heterotrophic metabolism and may be able to change its surrounding environment by degrading complex polymers. A recent study based on functional gene array (GeoChip 2.0) in an AMD in China allowed the detection of genes involved in the degradation of cellulose, lignin and chitin [22]. However, this method is based on the detection of labeled DNA, which represents the metabolic potential found in the community, but no insights was made into the functional activity as no activity was detected.

To our knowledge, no study focused on the role of a cultured organism isolated from AMDs in the recycling of complex organic matter. A recent meta- and proteogenomic study allowed the reconstruction of 7 genomes in Carnoulès, corresponding to the 7 dominant bacteria, called CARN1 to CARN7 [4]. In this previous study, it was shown that CARN6 was the sole bacterium carrying the genes involved in cellulose metabolism. In depth analysis of the 7 genomes (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/carnoulescopes>) showed that genes encoding xylanase were only found in CARN3, and genes encoding amylases were found in CARN3, CARN5 and CARN6. However, any ecosystem needs recyclers that transform complex organic matter, and, moreover, any ecosystem needs functions redundancy to assure the corresponding function when the conditions change *i.e.* when the relative abundance of the bacteria change. Here, *Paenibacillus* sp. strain Q8 was able of cellulolytic, hemicellulolytic and amylolytic activities, especially when the acidic conditions were less stringent. The bacterium Q8 is likely to use complex carbon compounds in the AMD of Carnoulès, where they are scarce. It may therefore beneficiate of this extra source, on the contrary to many other microorganisms from the same site. At the community level, the strain Q8 can play a major role in the recycling of organic molecules by degrading complex compounds, especially when the conditions change.

Conclusion

Paenibacillus sp. strain Q8 was isolated from the arsenic- and metal-contaminated AMD of Carnoulès (France). This strain was able of rapid growth under both acidic and alkaline conditions, and was resistant to high metal concentrations, highlighting its ability to survive under the extreme conditions found *in situ*. This strain carried an arsenal of polymer-degrading enzymes, as it degraded starch, cellulose and hemicellulose, and presented a polymer-degrading activity under a broad

pH range and under high arsenic concentrations. Function-based screening of the Q8-DNA allowed the detection of amylases and xylanases. The genetic analysis of some clones allowed the characterization of a gene that was previously not assigned to any function. Therefore, function-based screening also allowed to assign a function to a gene and to further decipher the community function. At the community level, Q8 can act as a recycler of the organic matter by releasing by-products from complex polymers, in this oligotrophic site, to the whole community. This activity is particularly important when the *in situ* physico-chemical conditions change (*e.g.* in terms of pH) as the polymer-degrading activities for Q8 were more important under less acidic conditions. Therefore the strain Q8 participates to the community function, especially for the functional redundancy, hence for the resilience of the community.

To our knowledge, this is the first study reporting the polymer-degrading activity at the phenotypic level and the role of polymer-degrading bacteria in the community function in AMDs. This study highlights the complexity of the community function in the AMD of Carnoulès. Further work has to be undertaken to understand the role of other bacteria in the community function. More in depth analysis of the *in vitro* polymer-degrading activities would also provide interesting informations, both in fundamental biology and in biotechnology for the finding of proteins with specific characteristics with regards to the *in situ* conditions.

Methods

Chemical analysis

Chemical analyses were performed on the Carnoulès water running above the soft unstable sediment collected for the isolation of Q8 according to procedures described previously [33,34].

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Paenibacillus sp. strain Q8 was isolated from the sediment (up to 2 cm deep) of the Carnoulès AMD (France) using the Soil Substrate Membrane System (SSMS) as described by Ferrari *et al.* [35]. Briefly, sediment sample taken from the same site was used as a growth medium, and 1 mL of a 1:100 dilution sample served as bacterial inoculum. After the incubation time (10 days at 20°C), the membrane was removed, cut with a sterile razor blade and vortexed 1 min with 1 mL 0.9% NaCl and 100 µL of the supernatant was then spread onto LB plates. This strain was routinely grown in LB medium at 30°C unless otherwise stated.

Escherichia coli strain DH5α (Invitrogen) was used for the heterologous expression of the genes from *Paenibacillus* sp. Q8. Vector pcDNA2.1 was used as cloning vectors for the DNA library construction. *E. coli* strains

were routinely grown on LB agar (MP Biomedicals) plates supplemented by 100 mg/L ampicillin and incubated at 37°C.

Physiological properties of *Paenibacillus* sp. Q8

Growth at different pH was monitored by measuring the absorbance (600 nm) in LB medium adjusted to pH 3-10 (increment 1) with H₂SO₄ and KOH before autoclaving.

Paenibacillus resistance to each metal was investigated in LB broth supplemented with the respective metal at different concentrations from stock solution previously adjusted to pH 7 and filtered-sterilized. Metals were provided in the form of salts as follows: C₄H₆NiO₃·4H₂O; CuSO₄·5H₂O; Na₂HAsO₄·7H₂O; NaAsO₂; MnSO₄; CrCl₃·6H₂O; HgCl₂; AgNO₃. Stock solutions were conserved at 4°C until use.

Antibiotic resistance tests were performed using the disc method. Antibiotics and concentrations were as follows: Nalidixic acid (1.5 µg/disc), Ampicillin (3 µg/disc), Chloramphenicol (0.6 µg/disc), Gentamycin (0.06 µg/disc), Kanamycin (0.6 µg/disc), Rifampicin (7.5 µg/disc), Streptomycin (0.6 µg/disc), Spectinomycin (1.5 µg/disc), Tetracycline (0.24 µg/disc), and Trimethoprim (0.15 µg/disc).

The GEN III Microplate™ (Biolog) were used (with the fluid IF-A) and API 50 CH (with the API 50 CHB/E medium) (Biomérieux) to screen for organic molecule degradation, according to the manufacturer's protocol.

All experiments were done at least in quadruplicate.

Polymer-degrading activity

Paenibacillus sp. strain Q8 and the DNA library were screened for the degradation of different polymers. Amylolytic activity was first screened on LB plates supplemented with 1% starch (Sigma). After 24 hours, the plates were flooded with lugol solution (Sigma) and a clear halo around the colonies indicated degradation of starch. Hemicellulolytic activity was detected by the apparition of a clear halo around the colony upon flooding with lugol solution. Cellulolytic activity was detected on LB plates supplemented with 0.2% Carboxymethylcellulose CMC (Sigma). Plates were stained with Congo red (0.2%) for 20 min and plates were washed with 1 M NaCl. Cellulase-expressing colonies were surrounding by a yellow halo.

For polymer degradation activity as a function of pH, LB medium supplemented with the corresponding substrate was adjusted to pH 3-10 with KOH and NaOH (6 M) prior to sterilization by autoclaving. For polymer degradation activity as a function of As(III) and As(V) concentration, the metal was added and the pH adjusted to pH 7 before autoclaving. After depositing 10 µL of a Q8 suspension, the plates were incubated at 30°C for 34 hours before reading.

All experiments were done at least in quadruplicate.

In vitro activity of the crude extracts of *Paenibacillus*

Paenibacillus sp. strain Q8 cells grown on LB medium (1 L) supplemented or not with either 1% wheat starch (Sigma, S2760) or 0.2% xylan from beechwood (Sigma, X4252) was collected by centrifugation (5,000 g, 10 min).

The pellets were resuspended in a minimal volume (1.5 to 2.5 mL) of Cellytic B (Sigma) containing 0.2 mg/mL of lysozyme, 48 U/mL of DNaseI and the appropriate volume of the anti-proteases cocktail Complete (Roche). They were incubated 30 min at 25°C under agitation. The supernatants, containing the bacterial crude extracts were then recovered after centrifugation (10,000 g, 30 min, 4°C). Protein concentrations were evaluated for each crude extract using the Bradford reagent (BioRad) and with BSA as standard. The action of the crude extracts on polysaccharides was tested by adding 350 mg of total proteins with a 1% solution of each substrate (potato and wheat starch, and birchwood xylan) prepared either in 0.1 M glycine-HCl buffer pH 3.0 or in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0. Incubations were performed under agitation at 45°C and 100 µL samples were taken regularly and subsequently boiled for 10 min to stop enzymatic reaction. Glucose content was estimated using the chromogen 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonate). Reducing sugars were measured by the dinitrosalicylic acid method using xylose as standard. Standard deviations were calculated from two determinations.

To visualize the oligosaccharides produced during the reaction, Polysaccharide Analysis using Carbohydrate Electrophoresis [36] was performed. Briefly 50 µL of the reaction mixture were dried, the products labelled with a fluorophore, thereafter separated by electrophoresis and visualized under UV.

Construction of the DNA library

Paenibacillus Q8 DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) and nebulized for 36 seconds and DNA fragments (1-5 kb) were gel-purified (MP biomedical). The purified fragments were repaired using the T4 DNA polymerase and *Bst*X I adapters (Invitrogen) were ligated to both ends. Plasmid pcDNA 2-1 and *Bst*X I-ligated Q8 DNA fragments were digested with *Bst*X I and ligated using a T4 DNA ligase (Fermentas). DH5α electrocompetent cells were transformed and white colonies were picked and stored in 96-well microplates at -80°C until use.

Sequencing and analysis of the positive clones

Plasmid from positive clones were extracted with the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and sequenced by

Millegen with the universal primers M13(-21) (TGTAACACGACGGCCAGT) and M13R(-29) (CAG-GAAACAGCTATGACC). ORFs were searched using the ORF Finder program at the NCBI website ORFs sequence analyses were performed by using the NCBI-nr BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and the Uniprot website (<http://www.uniprot.org/>). Putative domains were searched using the prosite (<http://prosite.expasy.org/>). The sequences of clones BB9, KF4 and GαC5 were submitted to the EMBL databases under the accession numbers HE617173, HE617174 and HE617175, respectively.

Additional material

Additional file 1: List of substrates used by *Paenibacillus* sp. strain Q8. For substrate utilization, both API 50 CH (Biomérieux) and GEN III Microplate™™ (Biolog) were used and read after 48 hours incubation.

Acknowledgements

FD was supported by a grant from the French Ministry of Education and Research. Financial support came from the Université de Strasbourg (Unistra), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR) in the frame of the RARE project. This work was done in the frame of the 'Groupement de Recherche-Métabolisme de l'Arsenic chez les Microorganismes (GDR2909-CNRS)' (<http://gdr2909.alsace.cnrs.fr/>). The authors would like to thank Observatoire des Sciences de l'Univers-OREME (<http://www.oreme.univ-montp2.fr/>) and Mustapha Ouhssain for chemical analyses of Carnoulès water.

Author details

¹Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, UMR7156 Université de Strasbourg/CNRS, Strasbourg, France. ²Laboratoire d'Ingénierie des Polymères pour les Hautes Technologies, EAC4379 ECPM-Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ³Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, Institut de Botanique, Université de Strasbourg, 28 rue Goethe, Strasbourg 67000, France.

Authors' contributions

FD, VP, MCL and DL conceived, supervised and coordinated this study. FD carried out the physiological experiments, and the cloning, screening and sequencing steps. VP and AF carried out all *in vitro* biochemical experiments. FD and VP performed the interpretation of data. FD wrote the manuscript and VP, MCL and DL critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 13 December 2011 Accepted: 3 February 2012
Published: 3 February 2012

References

1. Falcón LI, Magallón S, Castillo A: **Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast.** *ISME J* 2010, **4**(6):777-783.
2. Schopf JW: **Fossil evidence of Archaean life.** *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol Sci* 2006, **361**(1470):869-885.
3. Kuypers MMM, Silekera AO, Lavik G, Schmid M, Jørgensen BB, Kuonen JG, Sinninghe Damsté JS, Strous M, Jetten MSM: **Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea.** *Nature* 2003, **422**(6932):608-611.
4. Bertin PN, Heinrich-Salmeron A, Pelletier E, Goulhen-Chollet F, Arsène-Ploutze F, Gallien S, Lauga B, Casiot C, Calteau A, Vallenet D, et al: **Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics.** *ISME J* 2011, **5**(11):1735-1747.
5. Jeon CO, Park W, Padmanabhan P, DeRito C, Snape JR, Madsen EL: **Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for in situ biodegradation in contaminated sediment.** *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 2003, **100**(23):13591-13596.
6. Pankratov TA, Ivanova AO, Dedysh SN, Liesack W: **Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic Sphagnum peat.** *Environ Microbiol* 2011, **13**(7):1800-1814.
7. Barnard D, Casanueva A, Tuffin M, Cowan D: **Extremophiles in biofuel synthesis.** *Environ Tech* 2010, **31**(8-9):871-888.
8. Wang H, Gong Y, Xie W, Xiao W, Wang J, Zheng Y, Hu J, Liu Z: **Identification and characterization of a novel thermostable gh-57 gene from metagenomic fosmid library of the Juan De Fuca ridge hydrothermal vent.** *Appl Biochem Biotechnol* 2011, **164**(8):1323-1338.
9. Heath C, Xiao PH, Cary SC, Cowan D: **Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from antarctic desert soil.** *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**(13):4657-4659.
10. Voget S, Steele HL, Streit WR: **Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase.** *J Biotechnol* 2006, **126**(1):26-36.
11. LeBlanc M, Casiot C, Elbaz-Poulichet F, Personné C: **Arsenic removal by oxidizing bacteria in a heavily arsenic-contaminated acid mine drainage system (Carnoulès, France).** *J Geol Soc* 2002, **198**:267-274.
12. Bruneel O, Volant A, Gallien S, Chaumande B, Casiot C, Carapito C, Bardil A, Morin G, Brown GE Jr, Personné CJ, et al: **Characterization of the active bacterial community involved in natural attenuation processes in Arsenic-rich creek sediments.** *Microb Ecol* 2011, **61**(4):793-810.
13. Casiot C, Morin G, Juillot F, Bruneel O, Personné JC, Leblanc M, Duquesne K, Bonnefoy V, Elbaz-Poulichet F: **Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France).** *Water Res* 2003, **37**(12):2929-2936.
14. Duquesne K, Lieutaud A, Ratouchniak J, Muller D, Lett MC, Bonnefoy V: **Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic Thiomonas sp.: from the strain isolation to the gene study.** *Environ Microbiol* 2008, **10**(1):228-237.
15. Haferburg G, Merten D, Büchel G, Kothe E: **Biosorption of metal and salt tolerant microbial isolates from a former uranium mining area. Their impact on changes in rare earth element patterns in acid mine drainage.** *J Basic Microbiol* 2007, **47**(6):474-484.
16. Hallberg KB, Johnson DB: **Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters.** *Hydrometallurgy* 2003, **71**(1-2):139-148.
17. Harada KM, Tanaka K, Fukuda Y, Hashimoto W, Murata K: **Degradation of rice bran hemicellulose by *Paenibacillus* sp. strain HC1: gene cloning, characterization and function of β-D-glucosidase as an enzyme involved in degradation.** *Arch Microbiol* 2005, **184**(4):215-224.
18. Hwang IT, Lim HK, Song HY, Cho SJ, Chang JS, Park NJ: **Cloning and characterization of a xylanase, KRICT PX1 from the strain *Paenibacillus* sp. HPL-001.** *Biotechnol Adv* 2010, **28**(5):594-601.
19. Park DS, Jeong WJ, Lee KH, Oh HW, Kim BC, Bae KS, Park HY: ***Paenibacillus* pectinilyticus sp. nov., isolated from the gut of *Diestrammena apicalis*.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2009, **59**(6):1342-1347.
20. Ruijsenaars HJ, Hartmans S, Verdoes JC: **A novel gene encoding xanthan lyase of *Paenibacillus alginolyticus* strain XL-1.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**(9):3945-3950.
21. Nielsen P, Sørensen J: **Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyx* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere.** *FEMS Microbiol Ecol* 1997, **22**(3):183-192.
22. Xie J, He Z, Liu X, Van Nostrand JD, Deng Y, Wu L, Zhou J, Qiu G: **GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of microbial communities in acid mine drainage.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**(3):991-999.
23. Grundmann GL, Debouzie D: **Geostatistical analysis of the distribution of NH4+ and NO2-oxidizing bacteria and serotypes at the millimeter scale along a soil transect.** *FEMS Microbiol Ecol* 2000, **34**(1):57-62.
24. Nunan N, Wu K, Young IM, Crawford JW, Ritz K: **Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil.** *FEMS Microbiol Ecol* 2003, **44**(2):203-215.

25. Sanz JL, Rodríguez N, Díaz EE, Amils R: **Methanogenesis in the sediments of Rio Tinto, an extreme acidic river.** *Environ Microbiol* 2011, **13**(8):2336-2341.
26. Casiot C, Leblanc M, Bruneel O, Personné JC, Koffi K, Elbaz-Poulichet F: **Geochemical processes controlling the formation of As-rich waters within a tailings impoundment (Carnoulès, France).** *Aquat Geochem* 2003, **9**(4):273-290.
27. Bryan CG, Marchal M, Battaglia-Brunet F, Kugler V, Lemaitre-Guillier C, Lièvreumont D, Bertin PN, Arsène-Plöetze F: **Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: differences revealed diverse adaptation processes.** *BMC Microbiol* 2009, **9**, Article number 127.
28. Chapin FS, Walker BH, Hobbs RJ, Hooper DU, Lawton JH, Sala OE, Tilman D: **Biotic control over the functioning of ecosystems.** *Science* 1997, **277**(5325):500-504.
29. Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ: **Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere".** *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 2006, **103**(32):12115-12120.
30. Egli T: **How to live at very low substrate concentration.** *Water Res* 2010, **44**(17):4826-4837.
31. Battaglia-Brunet F, Joulain C, Garrido F, Dictor MC, Morin D, Coupland K, Barrie Johnson D, Hallberg KB, Baranger P: **Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov.** *Antonie Leeuwenhoek* 2006, **89**(1):99-108.
32. Graham JE, Clark ME, Nadler DC, Huffer S, Chokhawala HA, Rowland SE, Blanch HW, Clark DS, Robb FT: **Identification and characterization of a multidomain hyperthermophilic cellulase from an archaeal enrichment.** *Nature Communications* 2011, **2**(1), Article number 375.
33. Casiot C, Egal M, Elbaz-Poulichet F, Bruneel O, Bancon-Montigny C, Cordier MA, Gomez E, Aliaume C: **Hydrological and geochemical control of metals and arsenic in a Mediterranean river contaminated by acid mine drainage (the Amous River, France); preliminary assessment of impacts on fish (*Leuciscus cephalus*).** *Appl Geochem* 2009, **24**(5):787-799.
34. Egal M, Casiot C, Morin G, Elbaz-Poulichet F, Cordier MA, Bruneel O: **An updated insight into the natural attenuation of as concentrations in Reigous Creek (southern France).** *Appl Geochem* 2010, **25**(12):1949-1957.
35. Ferrari BC, Binnerup SJ, Gillings M: **Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**(12):8714-8720.
36. Carapito R, Carapito C, Jeltsch JM, Phalip V: **Efficient hydrolysis of hemicellulose by a *Fusarium graminearum* xylanase blend produced at high levels in *Escherichia coli*.** *Biores Technol* 2009, **100**(2):845-850.

doi:10.1186/1475-2859-11-16

Cite this article as: Delavat *et al.*: Deciphering the role of *Paenibacillus* strain Q8 in the organic matter recycling in the acid mine drainage of Carnoulès. *Microbial Cell Factories* 2012 11:16.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Substrates degraded by *Paenibacillus* sp. strain Q8 as observed by API 50 CH (Biomérieux) and Gen III microplate (Biolog):

API 50 CH:

Glycerol, ribose, methyl- β D-xylopyranoside, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-mannitol, methyl- α D-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-saccharose, D-trehalose, D-raffinose, starch, glycogen, gentiobiose, D-turanose.

Biolog Gen III Microplates:

Dextrin, D-maltose, D-trehalose, D-cellobiose, D-gentiobiose, sucrose, D-turanose, stachyose, D-raffinose, α -D-lactose, D-melibiose, β -methyl-D-glucoside, D-salicin, N-acethyl-D-glucosamine, N-Acetyl- β -D-mannosamine, α -D-glucose, D-fructose, D-galactose, D-mannitol, myo-inositol, glycerol, pectin, D-gluconic acid, methyl pyruvate, acetoacetic acid, acetic acid.

c. *Discussion et conclusions*

La souche *Paenibacillus* isolée de Carnoulès s'avère donc capable de dégrader différents polymères, et son activité de dégradation est dépendante du pH et de la concentration en arsenic. Ainsi, il s'avère que, malgré les conditions *in situ* très acides, la souche est capable de résister à d'énormes variations de pH et d'être métaboliquement active à ces pH très différents de son milieu d'origine. Une variation des conditions physico-chimiques, après des pluies intenses par exemple, provoquant une augmentation de pH pourrait inhiber les bactéries CARNs précédemment décrites comme « majoritaires » qui ne pourraient donc ne plus avoir de rôle direct dans le fonctionnement de la communauté. D'autres souches doivent donc les remplacer et assurer les mêmes fonctions. Cette étude montre que *Paenibacillus* pourrait d'une part croître plus rapidement dans ces conditions et devenir « majoritaire » (même si le caractère « majoritaire » est difficile à déterminer, vu les biais exposés dans la partie B de l'introduction), et d'autre part assurer les fonctions de dégradation de polymères portées précédemment par certaines CARNs.

Dans cette étude, il s'avère que le criblage fonctionnel d'une banque d'*E. coli* portant des fragments du génome de *Paenibacillus* a permis la détection de certains gènes conférant les activités de dégradation de l'amidon et de la xylane. De plus, un des clones possédant une activité amylolytique contient un seul gène de *Paenibacillus*, dont la séquence n'avait pas été annoté comme une « amylase » et pour laquelle aucune fonction n'avait pu être attribuée. Ainsi, le criblage basé sur la fonction au contraire du

criblage basé sur la séquence, permet la détection de gènes et protéines complètement nouveaux, permettant, d'un point de vue biotechnologique, d'avoir accès à des protéines nouvelles aux propriétés potentiellement intéressantes. Mais d'un point de vue fondamental, il permet d'annoter des gènes nouveaux, permettant ainsi de combler le décalage existant entre l'accumulation toujours plus importante de données issues de séquençage et l'analyse de ces données. Il permet ainsi d'attribuer des nouvelles fonctions aux bactéries possédant ces gènes, jusqu'alors de fonction inconnue, donc d'améliorer la connaissance du fonctionnement de toute communauté.

Pour aller plus loin dans ces criblages fonctionnels et l'annotation de gènes, un criblage basé sur la fonction a été mené en utilisant l'ADN métagénomique de Carnoulès comme ADN matrice.

II. Criblage fonctionnel de l'ADN métagénomique de Carnoulès

a. Introduction

Avant l'étude réalisée sur *Paenibacillus*, les activités de dégradation de polymères n'avaient jamais été étudiées dans les DMAs. Ces environnements extrêmes (en termes de pH et concentration en métaux), souvent oligotrophes, et présentant une faible diversité (Bond et al., 2000; Baker and Banfield, 2003; Bruneel et al., 2005) n'incitent en effet par forcément à s'intéresser à ces fonctions. Pourtant, et comme il a été montré précédemment, certaines souches ont la capacité de dégrader des polymères, notamment l'amidon. Étant donné les conditions particulières retrouvées *in situ* et parce

que les DMAs n'ont jamais été criblées précédemment pour ces fonctions, le même ADN métagénomique utilisé pour la reconstitution des génomes (Bertin et al., 2011) a été utilisé pour un criblage basé sur la fonction de dégradation de l'amidon. Cette approche a plusieurs finalités. Elle permet d'abord éventuellement de confirmer expérimentalement les potentialités génétiques retrouvées dans les bactéries CARNs, et ainsi de confirmer le modèle de fonctionnement pour cette fonction amylolytique. Elle permet également de caractériser de façon biochimique les activités des protéines correspondantes, en rapport avec les conditions physico-chimiques *in situ*, dans un but biotechnologique. Mais la découverte chez *Paenibacillus* d'une amylase ne présentant aucune similarité de séquence avec toute autre protéine connue permet aussi d'envisager la découverte d'enzymes complètement nouvelles par ce criblage du métagénome. Ces résultats permettent également l'attribution de nouvelles fonctions aux bactéries CARNs conduisant à affiner le modèle de fonctionnement de l'écosystème et permettant également d'améliorer l'annotation de génomes.

b. *Article 4 paru dans Scientific Reports*



Amylases without known homologues discovered in an acid mine drainage: significance and impact

SUBJECT AREAS:

ENVIRONMENTAL
MICROBIOLOGY

BIOTECHNOLOGY
ENZYMES

BIOINFORMATICS

François Delavat¹, Vincent Phalip², Anne Forster², Frédéric Plewniak¹, Marie-Claire Lett¹ & Didier Lièvre¹

¹UMR7156 Université de Strasbourg/CNRS. Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, ²EAC4379 Laboratoire d'Ingénierie des Polymères pour les Hautes Technologies, ECPM-Université de Strasbourg, France.

Received
20 December 2011

Accepted
8 March 2012

Published
5 April 2012

Correspondence and
requests for materials
should be addressed to
D.L. (didier.
lievre@unistra.fr)

Acid Mine Drainages (AMDs) are extreme environments characterized by acidic and oligotrophic conditions and by metal contaminations. A function-based screening of an AMD-derived metagenomic library led to the discovery and partial characterization of two non-homologous endo-acting amylases sharing no sequence similarity with any known amylase nor glycosidase. None carried known amyolytic domains, nor could be assigned to any GH-family. One amylase displayed no similarity with any known protein, whereas the second one was similar to TraC proteins involved in the bacterial type IV secretion system. According to the scarce similarities with known proteins, 3D-structure modelling using I-TASSER was unsuccessful. This study underlined the utility of a function-driven metagenomic approach to obtain a clearer image of the bacterial community enzymatic landscape. More generally, this work points out that screening for microorganisms or biomolecules in *a priori* incongruous environments could provide unconventional and new exciting ways for bioprospecting.

Soil microorganisms constitute a reservoir of a countless quantity of genes with potential interesting properties for fundamental research, medical and industrial applications. For this reason, cultured microorganisms have been widely screened for decades for diverse enzymes useful in the degradation of pollutants¹ or polymers² as well as for antimicrobial agents production³. However, these screenings were restricted to a very small fraction of the total microorganisms *i.e.* those which have been successfully cultured in laboratory. This phenomenon, called « the great plate count anomaly »⁴, is responsible for the lack of knowledge of all recalcitrant-to-culture bacteria. With the development of novel molecular techniques two decades ago, especially metagenomic tools, new insights into this unexplored microbial majority became possible. The access to their genetic content opened new perspectives for biologists, as they contain a huge quantity of genes encoding proteins of unknown function.

Amylases were the first enzymes to be discovered and described⁵ and are among the most important enzymes used for biotechnological purposes, from food to paper industries⁶. Numerous studies were focused on the discovery of new amylases originating from cultured bacteria, and more recently from metagenomic DNA. These investigations allowed the detection of amylases with interesting characteristics, such as amylases active in various conditions such as low⁶ or high⁷ temperature, low⁸ or high⁹ pH. Amylases belong to glycoside hydrolases (GH-)¹⁰ and are clustered into several families, mainly GH-13, GH-14, GH-15 and GH-57^{7,11}, based on similarities in primary and tertiary structures together with conservation of the catalytic residues.

In previous investigations, amylases were found in many different extreme environments^{7,9,12}. Nevertheless, no study reported the screening of metagenomic DNA derived from Acid Mine Drainages (AMDs) for any polymer degradation activity. The AMD located in Carnoulès (France) is, as most AMDs, considered to be an oligotrophic environment¹³. Furthermore, this site is characterized by very acidic conditions (pH 2.7–3.4) and is highly contaminated by heavy metals such as iron (up to 2,700 mg/L) and arsenic (up to 350 mg/L)¹⁴. A recent metagenomic dataset allowed the reconstruction of 7 genomes corresponding to the 7 dominant bacteria in the sediment of Carnoulès, called CARN1 to CARN7, five of which corresponded to uncultured bacteria¹⁵. The authors proposed a functioning model for the community, based principally on *in silico* analysis of the genomes but also on experimental data obtained by RT-PCR and proteomic. Those genomes contained between 36.3% and 53.7% of genes that could not be assigned to any function¹⁵. So, this model eluded roughly half of the information carried by the genomes.



AMDs are studied since decades, especially toward the inorganic compartment. Because metagenomic DNA from AMDs were never screened for polymer-degrading enzymes and because of the extreme conditions found in such environments –giving the possibility to discover enzymes with interesting properties–, we decided to perform a function-based screening for the well-known amylases, using standard techniques. This strategy allowed the isolation of 28 positive clones, 2 of them being subcloned, the proteins purified and characterized *in vitro*. *In silico* analyses based on the nucleotide sequence and both the primary and the predicted tertiary structures revealed that they are completely different from other known hydrolases as both genes encode a « protein of unknown function » and display no known conserved amylolytic domain. Nevertheless, *in vitro* tests confirmed the amylolytic activity of these 2 enzymes. Thus, the present work showed the possibility to assign functions to genes encoding previously uncharacterized proteins. With regards to the extreme conditions found in such ecosystems, AMDs can therefore represent an unexpected reservoir for new proteins.

Results

Roughly 80,000 clones were screened on LB plates supplemented with 1% wheat starch and 20 mg/L chloramphenicol. Among them, 28 (0.035%) revealed an amylolytic activity after a 48 hours exposure with starch and both extremities of the corresponding inserts (3–5 kb) were sequenced. Nucleotide sequences of 10 inserts corresponded to sequences of the CARNs genomes (CARN1, CARN2, CARN4 and CARN7)¹³. Thanks to the genome reconstructions, the complete nucleotide sequences of the 10 inserts could be obtained. Furthermore, the coverage obtained (see Figure S1 from¹³) for the reconstruction of the CARN genomes allowed us to rule out any point mutations. The 18 other positive clones –not belonging to any CARN genome– were discarded.

Among the 10 sequences, none contained an ORF automatically annotated in Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/carnoulescopes>) as an “amylase”. Moreover, numerous ORFs were not automatically assigned to any known function, and were classified as “uncharacterized protein”. Inserts containing more than one unknown ORF and ORFs lacking either the 5′ or the 3′ region were discarded for further analysis. Finally, two ORFs corresponding to 2 clones (CARN4_1025 and CARN7_2759) were subcloned into the pUC19 vector to confirm the amylolytic activity conferred to the recipient DH5 α cells. After 48 hours incubation on plates supplemented with 1% starch, both sub-clones expressed the ability to degrade the polysaccharide, confirming the amylolytic activities of the corresponding proteins. To further rule out any point mutation after subcloning, both ORFs were re-sequenced. The 5 kb-sequences of the 8 remaining clones are given in supplementary data S1.

The local alignment of amino acid sequences of CARN7_2759 and CARN4_1025 with the default options of the water program (EMBOSS package¹⁵) implementing the Smith & Waterman algorithm¹⁶ did not show any convincing sequence similarity between the two sequences, supporting the non-homologous character of those proteins.

The amino acid sequence of CARN4_1025 (479 amino acids, 47.45 kDa, pI 4.10) presented no sequence similarity with any entry in the nucleotide and protein databases (NCBI-nr and Uniprot), as no significant hit could be found when searching these databases with tBlastN and BlastP algorithms. It is noteworthy though that this gene has an ortholog in the genome of CARN1 (CARN1_1051, emb|CBH75884.1|). CARN1 and CARN4 represent a new species within a new uncultured phylum detected in Carnoules and other AMDs, for which the name *Candidatus Fodinabacter communificans* was given. This protein was predicted by InterProScan to contain a prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site but no conserved domain from the Conserved Domain Database could be

identified by the NCBI web server. Furthermore, it was not possible to identify any known amylolytic domain in this protein which could therefore not be assigned to any Glycosyl Hydrolase (GH-) family.

Five 3D structure models were obtained by the I-TASSER platform. However, the C-score obtained for all those models was –2.84, which is below the –1.5 cut off value for high confidence 3D structure prediction¹⁷.

Blast database similarity searches show that the sequence of CARN7_2759 (843 amino acids, 95.18 kDa, pI 6.14) is similar to the type-IV secretion system protein TraC of various bacteria both at the protein (up to 38% identity) and nucleotide levels. However, no known amylolytic domain was found in this sequence and the protein could not be assigned to any GH- family. The predictions in CARN7_2759 of domains and signatures by InterProScan yielded hits with TraC signature (PFam: PF11130) and a AAA domain (PFam: PF12846) corresponding in TraC and other conjugative transfer proteins to the P-loop NTPase domain (Fig. 1). Interestingly, the conservation profile and the PipeAlign multiple sequence alignment showed that both the NTPase conserved motifs¹⁸ Walker A (GxxGxGK[S/T]) and Walker B (hhhhDE where h is a hydrophobic aminoacid) could be found in CARN7_2759, with the exception of the first glycine residue in Walker B which is replaced by an alanine (Supplementary data S1 online).

These results are in agreement with the fact that, among the top 10 templates used by the I-TASSER platform for the 3D structure prediction, the most significant ones (Z-score above 3.8) corresponded to the structure of the ATPase subunit of TrwB conjugative transfer protein.

Out of the 5 models obtained with I-TASSER platform¹⁷ for CARN4_2759, 3 reached a C-score above –1.5, the most significant model having a C-score of –1.32. All 3 models are quite similar in shape and are characterized by numerous α -helices but lack the beta sheets that are characteristics of AAA domain. No EC-score for I-TASSER enzyme assignment reached the default 1.1 threshold. Some GO-terms were predicted with a score higher than the 0.5 default threshold: “protein transporter activity” (GO:0008565, GO-Score 0.70), “protein binding site” (GO:0005515, GO-Score 0.65), “nucleus cellular location” (GO:0005634, GO-Score 0.60) and “cytoplasm location” (GO:0005737, GO-Score 0.59). There was no prediction related to polymer degradation though.

Submitting the two potential domains (TraC and AAA) separately did not yield any significant model at all, suggesting further that I-TASSER predictions on CARN_2759 are marginal and should be taken with caution.

Both proteins were then produced in *E. coli* and purified. First attempts to produce soluble proteins in *E. coli* strain BL 21 were unsuccessful, since they were produced in inclusion bodies as insoluble proteins. To overcome this problem, the proteins were produced in *E. coli* strain Arctic DE3, working at lower temperature. Using this strain, the proteins could be produced in the soluble fraction. The two proteins were purified and tested for their amylolytic activity using AZCL-amylose as substrate at different pH (pH5 in acetate buffer, pH6 and pH7 with phosphate buffer, and pH8 and pH9 with Tris buffer) and temperature (30, 35, 40, 45, 50 and 60°C). For both proteins, the optimum activity was obtained at pH 7 and 45°C (0.32 \pm 0.01 UDO/h.mg protein for CARN4_1025 and 0.026 \pm 0.001 UDO/h.mg for CARN7_2759). Therefore, all subsequent experiments were performed in these conditions. For both proteins, this activity was shown to be specific to starch degradation, as no activity was observed for AZCL-xylan, AZCL-xyloglucan nor AZCL-cellulose.

The purified amylases were tested also on natural substrates: starch from wheat and potato and on purified amylose. Despite several attempts with varying incubation time and protein concentration, no glucose could be measured after incubation of both enzymes with any polysaccharide. Two hypotheses could be made

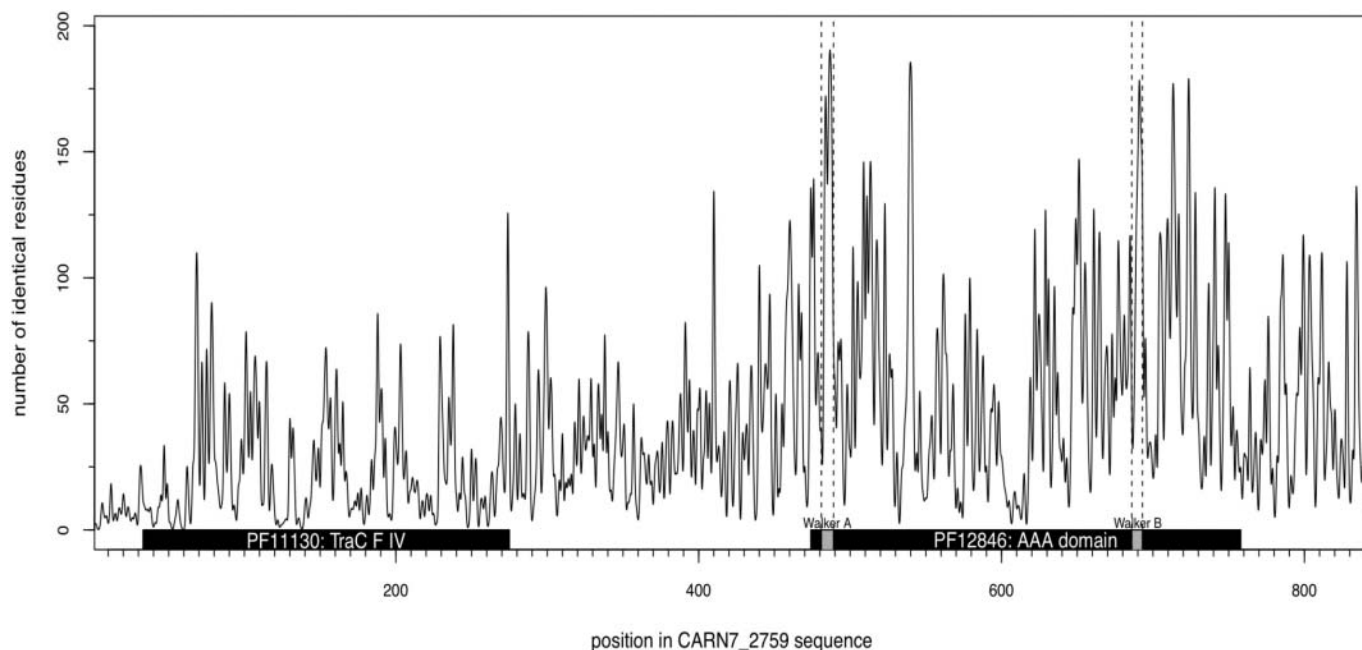


Figure 1 | Conservation profile and Pfam domain prediction of CARN7_2759. The graph displays the conservation profile deduced from the multiple alignment of 200 protein sequences obtained from PipeAlign using CARN7_2759 as a query. For each residue of CARN7_2759 protein sequence, this profile shows the number of identical amino-acids at the corresponding position of the multiple sequence alignment. The black boxes show the TrAC signature (Pfam:PF11130 from 33 to 275) and the AAA domain (Pfam:PF12846 from 474 to 758) predicted by InterProScan. Both Walker A and Walker B motifs (grey boxes) characteristic of AAA domains could be identified in this region (respectively from 481 to 489, and from 686 to 693) and correspond to peaks of conservation.

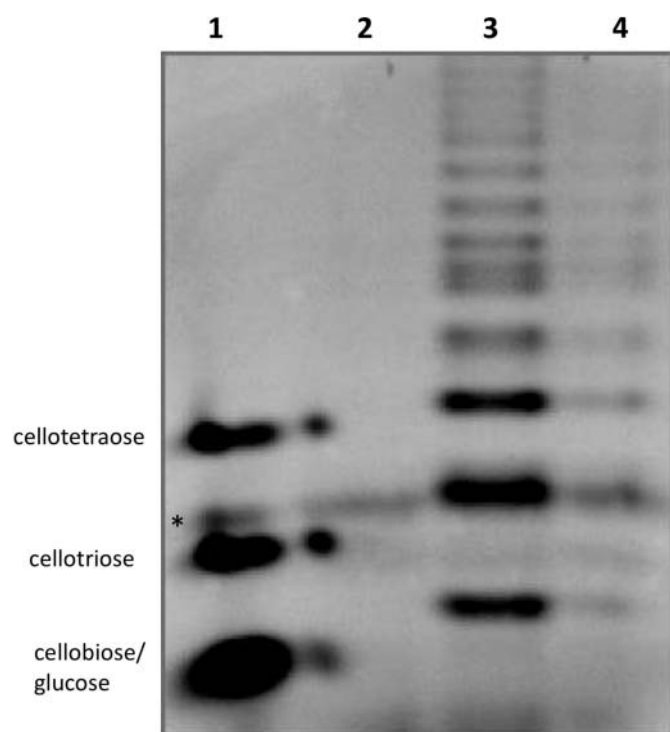


Figure 2 | PACE of the product formed by the purified amylases with amylose (1%) as substrate. Lane 1: from top to bottom, the standards cellotetraose, cellotriose and cellobiose-glucose (DP2 and DP1 comigrate), lane 2: amylose, 3: products formed by the action of CARN4_1025 on amylose and 4: products formed by the action of CARN7_2759 on amylose. Experiments were performed at 45°C and at pH 7 in 1 ml with 269 µg and 41.5 µg of CARN4_1025 and CARN7_2759, respectively. * denotes an aspecific signal found on each lanes.

assuming this result. First, both enzymes correspond to endo-amylases and therefore do not release significant quantities of glucose from polysaccharides. Second, the activity is too low for the glucose to be detected. Objectively, the activities found with AZCL-amylose as substrate were quite low. To decide between the two hypotheses and considering these sub-detectable values, more sensitive methods are required to further characterize the enzymes. This is the reason why Polysaccharide Analysis using Carbohydrate gel Electrophoresis (PACE) experiments were performed after incubation of the enzymes with AZCL-amylose, starch and amylose as substrate. When amylose was used as substrate, degradation products could be clearly seen on the gel (Fig. 2), with numerous bands corresponding to oligosaccharides of diverse lengths. From the fact that glucose (degree of polymerisation 1, DP1) and cellobiose (DP2) comigrated in these conditions (see the standard lane) and from the absence of glucose measured, it can be concluded that the smaller product formed was cellobiose (DP2). DP 2, 3 and 4 were the major products formed but many other products with higher DP were generated. This typically corresponded to a product pattern of endo-acting enzymes after long term hydrolyses. Product pattern were very similar with both potato and wheat starch and with AZCL-amylose (Fig. 3 and supplementary Fig. S1 online).

Discussion

Since their discovery in 1833⁵, many amylases have been characterized (for review see¹⁹). Moreover, this number has largely increased with the recent advances in molecular biology, especially with metagenomic approaches (both culture-based and sequence-based approaches) and with the accession of the genetic potentialities of yet-uncultured bacteria^{6,7,20,21}.

In the present study, function-based screening was done with metagenomic DNA obtained from an acid mine drainage enviro-

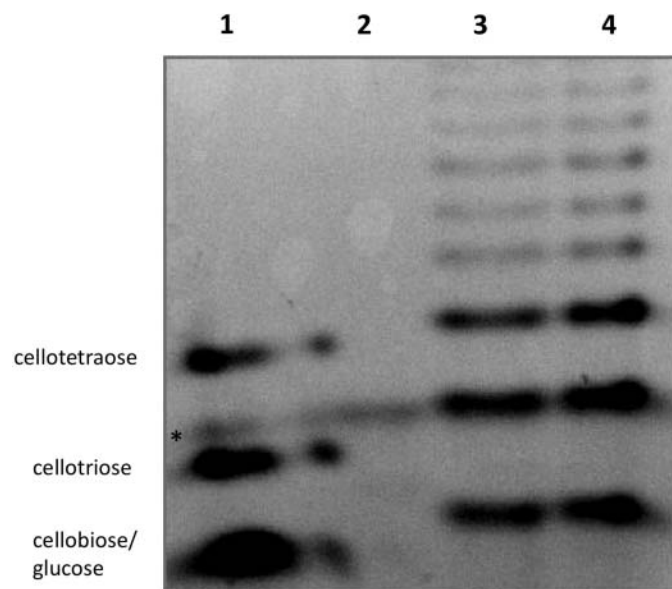


Figure 3 | PACE of the product formed by the purified amylases with AZCL-amylose (0.4%) as substrate. Lane 1: from top to bottom, the standards cellotetraose, cellotriose and cellobiose-glucose (DP2 and DP1 comigrate), lane 2: AZCL-amylose, 3: products formed by the action of CARN4_1025 on the substrate and 4: products formed by the action of CARN7_2759 on the substrate. Experiments were performed at 45°C and at pH 7 in 1 ml with 269 µg and 41.5 µg of CARN4_1025 and CARN7_2759, respectively. Loading volumes were adjusted in order to get quite similar band intensities. * denotes an aspecific signal found on each lanes.

onment. AMDs are considered as extreme environments, especially with regards to pH and metals concentrations. Such sites are also considered to harbour a low bacterial diversity, and the oligotrophic conditions^{13,22} would not encourage the screening of amylases or other polymer-degrading enzymes. However, despite the oligotrophic conditions found in AMDs, organic matter can be produced^{23,24} and polymer-degrading activities should be present²⁵. When performing this kind of experiment, 28 clones were positive for starch degradation among 80,000. Interestingly, 18 clones could not be affiliated to any of the 7 CARNs genomes previously reconstructed from the site¹³. In addition, among the 10 sequences left, none carried an ORF annotated as an amylase.

In order to precisely define the ORFs conferring the amylolytic activity of the CARN bacteria, two genes were chosen and subcloned and the corresponding proteins were expressed, purified and characterized. The two proteins allow the degradation of AZCL-amylose, amylase and starch, confirming the amylolytic activity. PACE experiment confirmed unambiguously the amylolytic potentialities and highlighted the endo-acting activity for both enzymes, as oligomers of sugars but not glucose were produced from amylose or starch (Fig. 2).

Notwithstanding the *in vitro* enzyme efficiency, biochemical experiments showed a specific amylolytic activity. The most significant advance in this study is that the nucleotidic and protein sequences of the new amylases are completely different to all the known amylases, and they share no known amylolytic domain with nor were assigned to Glycosyl Hydrolase (GH-) families. They were affiliated in previous annotations to “protein of unknown function” with few to no similarity with any other proteins. However, it should be noted that CARN7_2759 presented some similarity with TraC proteins and P-loop NTPase domains from conjugative proteins. TraC is essential for the type IV secretion system of many bacteria, but the exact role and the mechanism remain unclear^{26,27,28}. It has

been proposed that TraC functions as an adhesin that mediates host-cell targeting through binding to specific host receptors²⁶. Here, we showed the existence of a protein displaying an amylolytic function (CARN7_2759) and sharing up to 38% identity with TraC proteins.

Amylases are enzymes studied since two centuries and many sequences, structures and hydrolysis mechanisms have already been discovered. However, when screening in an AMD, we showed the possibility to obtain new amylases without homologues. Firstly, these results imply that function-based screening allows the assignation of a function to genes encoding proteins of previously unknown function. This is crucial for every (meta)genomic approach, since the assignation of a gene to a function needs functional experiments in addition to *in silico* analyses. Indeed, functional screening allowed the assignation of both CARN4_1025 and CARN7_2759 to “amylases”, although the former one shows no similarity with any protein and the latter one is similar to TraC proteins, for which no hydrolytic function has been reported yet.

Secondly, it implies that sequence-based screening is not effective to discover non-homologous enzymes. This strategy is however frequently used for many enzymes such as amylases²⁹ and arsenite oxidase³⁰.

Thirdly, in terms of community function, the results imply that other bacteria than the ones which carry known “amylase” genes are able to degrade starch, and that those bacteria were previously missed out for this function. Here, we show that CARN1, CARN2, CARN4 and CARN7 as well as other bacteria that do not correspond to any of the CARN genomes (the 18 other clones) possess amylolytic functions that were previously not detected in the metagenomic study in this AMD¹³. This can be extended to any other function and (meta)genomes, as even the model species *E. coli* presents more than 30% of its genome encoding proteins of unknown function³¹. With the development of cheaper sequencing techniques, more and more raw data are injected in databases. However, without physiological experiments, no novel functional insight has to be expected from this tremendous quantity of sequences.

Lastly, the discovery of completely new amylases in AMDs should encourage researchers to screen for other interesting molecules, of biotechnological (*e.g.* cellulase, protease) as well as for medicinal (*e.g.* antibiotics) interest. Obviously, AMDs can be considered as unexpected new reservoirs for biological molecules with interesting properties especially with regards to the extreme *in situ* conditions.

To summarize, we reported the discovery and partial characterization of two novel amylases sharing no sequence similarity with any other amylase or glycoside hydrolase, nor possessing any known amylolytic domain. Metagenomic screening of DNA from AMDs would therefore provide other new sequences to fill the gap between genes of unknown functions and functions assignation. This work points out that screening for microorganisms or biomolecules in *a priori* incongruous environments, such as amylases in AMDs or thermophilic bacteria in Antarctic, could provide unconventional and new exciting ways for bioprospecting.

Methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. *Escherichia coli* DH10β and the plasmid pCNS were previously used respectively as host cell and cloning vector for the construction of the metagenomic DNA library¹³. The bacteria *E. coli* DH5α and TOP10 (Invitrogen) and the plasmid pUC19 (Invitrogen) were used as cell host and cloning vector for the subcloning of the putative amylase genes. Proteins were expressed in *E. coli* Arctic DE3 (Stratagene) by using the expressing vector pET30a+.

The strain *E. coli* DH10β harbouring pCNS was routinely grown on LB agar (MP Biomedicals) plates supplemented with 20 mg/L chloramphenicol. The strain *E. coli* DH5α [pUC19] was grown on LB plates supplemented with 100 mg/L ampicillin and *E. coli* TOP10 [pET30a+] was maintained by addition of 50 mg/L kanamycin. Strain *E. coli* Arctic DE3 carrying the vector pET30a+ was grown on LB plates supplemented with 20 mg/L gentamycin and 30 mg/L kanamycin.

Screening for amylolytic activity in the metagenomic library. The previously constructed metagenomic library¹³ was used for amylolytic activity screening. Clones were inoculated using a 384 pin-replicator and were allowed to grow on LB plates



Table 1 | Primers used in this work

Primer	Sequence (5'→3')	RS*
AHM	CAATTCACACAGGAAACAGC	-
FM	TGAAAACGACGGCCAGT	-
1025-HindIII	<u>ccc</u> aa gcttgggCGCTTCCGTTCTCAATAG	HindIII
1025-XbaI	<u>gct</u> ct agagcGCTCGACGCCGCTTTG	XbaI
2759-HindIII	<u>ccc</u> aa gcttgggCCCAATATCGAGGTCACGT	HindIII
2759-XbaI	<u>gct</u> ct agagcCGCCGCACCGATCAATAAG	XbaI
1025-NcoI	cat <u>gcc</u> at gctATGTTTACTCCGGACGAGAATATAAAG	NcoI
1025-XhoI	<u>ccg</u> ct cgagcggTTACGGGGAGACGCCGGTAAC	XhoI
2759-5	atc <u>ggg</u> t ctccATGTCATTGCTCCACGCTAAAAAAG	BsaI
2759-3	atc <u>ggg</u> t ctcgaaTTATTACGTTGGTTAAGCATC	BsaI

Underlined, the added oligosequence flanking the hybridization site.
*RS, restriction site (in bold).

supplemented with 20 mg/L chloramphenicol and 1% starch (Sigma) for 2 days. Plates were then overlaid with lugol solution (Sigma) and scored for clear halo zone around the colonies. Positive clones were streaked again on the same solid medium to confirm their amylolytic activities.

Sequencing and subcloning of the DNA sequences. Plasmid DNAs were extracted using the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and the inserts were sequenced (Millegen) using the primers AHM and FM (Table 1). Subcloning was performed for two genes, CARN4_1025 and CARN7_2759. DNA was amplified for CARN4_1025 using the primers 1025-HindIII and 1025-XbaI, whereas CARN7_2759 was amplified using the primers 2759-HindIII and 2759-XbaI (Table 1). PCRs were performed using the iProof DNA polymerase (Biorad) with the following conditions: 35 amplification cycles of 98°C for 10 s, 68°C for 30 s, 72°C for 3 min, followed by a final elongation cycle (72°C for 10 min). Amplicons and purified pUC19 were digested with HindIII and XbaI primers (Fermentas), ligated and transformed into electrocompetent DH5 α cells (Invitrogen). Amylolytic activities were confirmed for the subclones after inoculation on LB plates supplemented with 1% starch and 100 mg/L ampicillin.

Full CDS were amplified using the following primers: 1025-NcoI and 1025-XhoI for CARN4_1025 (479aa) and 2759-5 and 2759-3 for CARN7_2759 (843aa) using iProof DNA polymerase (BioRad) with the following conditions: 30 amplification cycles of 98°C for 10 s, 70°C for 30 s, 72°C for 50 sec, followed by a final elongation cycle (72°C for 10 min) for CARN4_1025; 30 amplification cycles of 98°C for 10 s, 57°C for 30 s, 72°C for 2 min, followed by a final elongation cycle (72°C for 10 min) for CARN7_2759. The amplicon and the expression vector pET30a+ were digested with XhoI and NcoI for CARN4_1025 and ligated together. For CARN7_2759, the amplicon was digested with BsaI and ligated into the XhoI and NcoI sites of pET30a+. Plasmids were used to transform *E. coli* Top10 and inserts of several recombinants were sequenced. Plasmids with the correct sequences were introduced into the *E. coli* Arctic DE3 strain.

The sequences of CARN7_2759 (named *amy7c*) and CARN4_1025 (named *amy4c*) were submitted to the EMBL databases under the accession numbers HE617176 and HE617177, respectively.

Preparation of cell-free extracts and purification of the enzymes. Transformed *E. coli* Arctic DE3 strains were incubated in LB medium supplemented with 20 mg/L gentamycin and 30 mg/L kanamycin at 30°C until OD₆₀₀ reached 0.6 to 0.7. 500 μ L of cultures were then kept at 12°C for 20 min followed by induction of protein expression with 1 mM IPTG. Following a 16 h incubation time, cells were harvested by centrifugation (5,000 g, 20 min at 4°C) and lysed using the cell Lytic B solution (Sigma). Crude extracts were loaded onto Hi-Trap chelating columns to purify CARN4_1025 and CARN7_2749.

In vitro characterization of the purified enzymes. During elution, fractions of 500 μ L were collected and protein concentrations were evaluated using the Bradford reagent (BioRad) with BSA as a standard. Fractions were analysed by SDS-PAGE and those corresponding to the pure proteins were pooled. Except when otherwise stated, the activities of the enzymes on polysaccharides were tested by incubating 50 μ L of pure protein with a 1 mL solution of each substrate (1% potato starch, wheat starch and amylase, all from Sigma; 0.4% of AZCL-substrates from Megazyme) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0. Incubations were performed under agitation at 45°C. For natural substrates, 100 μ L samples were taken regularly and subsequently boiled for 10 min to stop enzymatic reaction. Glucose content was estimated using the chromogen 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonate). For AZCL-substrates, OD₅₉₅ was recorded periodically after a mild centrifugation. For each determination, controls were performed without protein in the reaction mixture (blank corresponding to the substrate response) and also with the eluates of the *E. coli* Arctic DE3 strain bearing the empty plasmid pET30a+ (corresponding to the blank linked to the production and the purification processes).

To visualize the oligosaccharides produced during hydrolyses, Polysaccharide Analysis using Carbohydrate Electrophoresis (PACE)³² was performed. Briefly, after

48 hours of incubation in the same conditions than described below, 50 μ L of the reaction mixture were dried, the products labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid, dried again, resuspended in 6 M urea, thereafter separated by polyacrylamide electrophoresis and finally visualized under UV.

Bioinformatic analyses of the sequences. Domain and family signature prediction. Pfam³³ putative domains and family signatures were predicted for both CARN4_1025 and CARN7_2759 protein sequences using the InterProScan³⁴ on-line server.

Database similarity search. The NCBI-nr database was searched for similarity to nucleotide sequences of CARN4_1025 and CARN7_2759 on the NCBI Blast web server³⁵ using the BlastN (nucleotide vs nucleotide), tBlastN (protein vs translated nucleotide) and tBlastX (translated nucleotide vs translated nucleotide) algorithms. BlastP and PSI-BLAST (protein vs protein) database similarity searches were also performed with protein sequences of CARN4_1025 and CARN7_2759 against the NCBI-nr protein database and Uniprot³⁶. The NCBI Blast server also predicted putative conserved domains by comparison with the Conserved Domain Database³⁷.

3D Structure prediction. CARN4_1025 and CARN7_2759 protein sequences were submitted to the I-TASSER web server (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)^{17,38} in an attempt to predict their structural characteristics by iterative threading assembly refinement. This platform allows the prediction of structure and calculates the statistical significance of the result. It also allows the prediction of the Enzyme Commission (EC) number and GO terms (molecular function, biological process and cellular location) of the protein, based on the 3D model obtained.

Multiple sequence alignment. The protein sequence of CARN7_2759 was submitted to the PipeAlign server³⁹ with CARN7_2759 as the reference sequence. The pipeline was configured to align a sample of 200 similar sequences identified by Blast and Ballast.

- Jeon, C. O. *et al.* Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for in situ biodegradation in contaminated sediment. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* **100** (23), 13591 (2003).
- Hwang, I. T. *et al.* Cloning and characterization of a xylanase, KRICT PX1 from the strain *Paenibacillus* sp. HPL-001. *Biotechnol Adv* **28** (5), 594 (2010).
- Ballestrero, F. *et al.* Identification of compounds with bioactivity against the nematode *Caenorhabditis elegans* by a screen based on the functional genomics of the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* D2. *Appl Environ Microbiol* **76** (17), 5710 (2010).
- Staley, J. T. & Konopka, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**, 321 (1985).
- Payen, A. & Persoz, J. F. Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions, et leurs applications aux arts industriels. *Ann. Chim. Phys.* **53**, 73 (1833).
- Sharma, S., Khan, F. G. & Qazi, G. N. Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. *Appl Microbiol Biotechnol* **86** (6), 1821 (2010).
- Wang, H. *et al.* Identification and characterization of a novel thermostable gh-57 gene from metagenomic fosmid library of the Juan De Fuca ridge hydrothermal vent. *Appl Biochem Biotechnol* **164** (8), 1323 (2011).
- Castro, G. R., Santopietro, L. M. D. & Siñeriz, F. Acid pullulanase from *Bacillus polymyxa* MIR-23. *Appl Biochem Biotechnol* **37** (3), 227 (1992).
- Ballschmitter, M., Fütterer, O. & Liebl, W. Identification and characterization of a novel intracellular alkaline α -amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl Environ Microbiol* **72** (3), 2206 (2006).
- Cantarel, B. I. *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res* **37** (SUPPL. 1), D233 (2009).



11. Bijttebier, A., Goesaert, H. & Delcour, J. A. Amylase action pattern on starch polymers. *Biologia* **63** (6), 989 (2008).
12. Zhang, J. & Zeng, R., Molecular cloning and expression of an extracellular α -amylase gene from an Antarctic deep sea psychrotolerant *Pseudomonas stutzeri* strain 7193. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27** (4), 841 (2011).
13. Bertin, P. N. *et al.* Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *ISME J* **5** (11), 1735 (2011).
14. LeBlanc, M., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F. & Personné, C. Arsenic removal by oxidizing bacteria in a heavily arsenic-contaminated acid mine drainage system (Carnoulès, France). *J Geol Soc* **198**, 267 (2002).
15. Rice, P., Longden, L. & Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* **16** (6), 276 (2000).
16. Smith, T. F. & Waterman, M. S. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147** (1), 195 (1981).
17. Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protocol* **5** (4), 725 (2010).
18. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1** (8), 945 (1982).
19. Vihinen, M. & Mäntsälä, P. Microbial amylolytic enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **24** (4), 329 (1989).
20. Lämmle, K. *et al.* Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *J Biotechnol* **127** (4), 575 (2007).
21. Yun, J. *et al.* Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl Environ Microbiol* **70** (12), 7229 (2004).
22. Hao, C. *et al.* Microbial diversity in acid mine drainage of Xiang Mountain sulfide mine, Anhui Province, China. *Extremophiles* **14** (5), 465 (2010).
23. Jiao, Y. *et al.* Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms. *Appl Environ Microbiol* **76** (9), 2916 (2010).
24. Halter, D. *et al.* In situ proteo-metabolomics reveals metabolite secretion by the acid mine drainage bio-indicator. *Euglena mutabilis*. *ISME J* (2012) in press.
25. Delavat, F. *et al.* Deciphering the role of *Paenibacillus* strain Q8 in the organic matter recycling in the acid mine drainage of Carnoules. *Microbial Cell Factories* **11**, art. 16 (2012).
26. Backert, S., Fronzes, R. & Waksman, G. VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol* **16** (9), 409 (2008).
27. Fronzes, R., Christie, P. J. & Waksman, G. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **7** (10), 703 (2009).
28. Yeo, H. J. *et al.* Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* **100** (26), 15947 (2003).
29. Amylase, T. *et al.* A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable α -amylase. *J Biol Chem* **277** (29), 26501 (2002).
30. Quéméneur, M. *et al.* Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* **74** (14), 4567 (2008).
31. Hanson, A. D., Pribat, A. & de Crécy-Lagard, V. 'Unknown' proteins and 'orphans' enzymes: The missing half of the engineering part list - And how to find it. *Biochem J* **425** (1), 1 (2010).
32. Carapito, R., Carapito, C., Jeltsch, J. M. & Phalip, V. Efficient hydrolysis of hemicellulose by a *Fusarium graminearum* xylanase blend produced at high levels in *Escherichia coli*. *Biores Technol* **100** (2), 845 (2009).
33. Finn, R. D. *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38** (SUPPL.1), D211 (2010).
34. Quevillon, E. *et al.* InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* **33** (SUPPL. 2), W116 (2005).
35. Johnson, M. *et al.* NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* **36** (Web Server issue), W5 (2008).
36. Apweiler, R. *et al.* Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Res* **39** (SUPPL. 1), D214 (2011).
37. Marchler-Bauer, A. *et al.* CDD: A Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39** (SUPPL. 1), D225 (2011).
38. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9** (2008).
39. Plewniak, F. *et al.* PipeAlign: A new toolkit for protein family analysis. *Nucleic Acids Res* **31** (13), 3829 (2003).

Acknowledgments

FD was supported by a grant from the French Ministry of Education. This work was performed as part of the program of the «Groupement de Recherche - Métabolisme de l'Arsenic chez les Microorganismes (GDR2909-CNRS)» (<http://gdr2909.alsace.cnrs.fr/>) in the frame of the RARE project.

Author contributions

F.D., V.P., M-C.L. and D.L. conceived, supervised and coordinated this study. F.D. carried out the cloning, screening and sequencing steps. V.P. and A.F. carried out all *in vitro* biochemical experiments. F.P. carried out all bioinformatic analyses. F.D. F.P. and V.P. performed the data interpretations. F.D. wrote the manuscript and V.P., F.P., M-C.L. and D.L. critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

License: This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

How to cite this article: Delavat, F. *et al.* Amylases without known homologues discovered in an acid mine drainage: significance and impact. *Sci. Rep.* **2**, 354; DOI:10.1038/srep00354 (2012).

c. *Discussion et conclusions*

Cette approche a permis la caractérisation partielle de 2 amylases provenant de CARN4 et CARN7 et ne présentant aucune similarité avec toute autre amylase ou hydrolase. Pourtant, les activités amylolytiques ont été démontrées avec des tests standards, c'est-à-dire d'une part sur des cellules en croissance (test sur boîtes de la souche d'*E. coli* possédant le gène testé) mais aussi avec la protéine purifiée. Il n'est pas impossible que ces amylases aient également une autre fonction, mais chacune de ces 2 amylases a également été testée pour ses capacités à dégrader d'autres polymères, comme les substrats AZCL-xylane, AZCL-xyloglucane et AZCL-cellulose, et il s'avère que les enzymes sont spécifiques de la dégradation de l'amidon.

La découverte de ces nouvelles amylases a plusieurs conséquences. La première concerne la redondance fonctionnelle pour cette activité. En effet, les gènes codant des protéines permettant la dégradation de l'amidon avaient été retrouvés uniquement chez CARN3, CARN5 et CARN6, et aucune donnée ne pouvait laisser supposer que CARN4 et CARN7 puissent porter ces fonctions. Or les protéines purifiées sont issues des génomes de CARN4 et CARN7. Cette étude permet donc de montrer que l'activité de dégradation de l'amidon est portée également par d'autres CARNs que celles suspectées précédemment. Cette conclusion est rendue possible par l'attribution d'une fonction à des gènes annotés comme codant des protéines de fonctions inconnues. Ce travail illustre donc l'importance de l'approche fonctionnelle et sa complémentarité avec l'analyse purement *in silico* de séquences déjà annotées. En effet, toute analyse

bioinformatique d'une protéine repose sur des annotations qui ont déjà été faites sur celle-ci, la fonction associée à la protéine ayant nécessairement été démontrée expérimentalement, au moins une fois, sur une protéine homologue à la protéine étudiée. Dans le cadre de l'approche métagénomique menée à Carnoulès, les génomes des CARNs présentent 50% de gènes de fonctions inconnues, signifiant ainsi que 50% des gènes n'ont pas pu être pris en compte dans l'élaboration d'un modèle de fonctionnement de la communauté. L'attribution de fonctions à ces gènes permet de réduire cette proportion, permettant ainsi d'affiner ce modèle.

De plus, nous montrons qu'il est intéressant de sortir des « sentiers battus », d'aller prospecter dans des environnements incongrus, pour réaliser des découvertes intéressantes, que ce soit dans le domaine fondamental ou appliqué. Pourquoi ne pas rechercher des bactéries psychrophiles dans des cheminées hydrothermales par exemple ? Notre étude menée sur la diversité cultivée de Carnoulès a par exemple permis d'isoler des bactéries sur des milieux à pH jusqu'à 9,8, donc très alcalins, alors même que le pH *in situ* est d'environ 3,5

Partie 4 :
Conclusions
et
perspectives

Le Drainage Minier Acide (DMA) de Carnoulès (Gard, France) est caractérisé par un pH très acide et par de fortes concentrations en métaux. Des approches de « métagénomique 16S » menées précédemment concluaient à la présence d'une communauté bactérienne faiblement diversifiée. Afin de comprendre le fonctionnement de cette communauté « simple », une approche de métagénomique globale avait également été menée. La faible diversité retrouvée avait permis de discriminer plus facilement les séquences obtenues, permettant la reconstruction quasi complète de 7 génomes de bactéries « majoritaires ». Parmi celles-ci, 5 appartiennent à des micro-organismes non-cultivés. L'analyse de ces 7 génomes, ainsi que les données de métaprotéomique de ces mêmes échantillons avaient permis l'élaboration d'un modèle de fonctionnement de la communauté. Parce que les approches métagénomiques ne sont pas dénuées de biais, le modèle présenté constitue une base de travail très intéressante, mais il est possible de l'affiner en combinant la force des approches moléculaires – omiques avec celle des approches culturelles et fonctionnelles.

Durant ce travail de doctorat, nous nous sommes d'abord intéressés à la diversité bactérienne cultivée. Afin d'accéder à la plus grande diversité possible, différents milieux ont été mis au point en faisant varier plusieurs paramètres, comme le pH ou la concentration en nutriments. Cette stratégie a permis par exemple l'isolement de bactéries poussant sur des milieux alcalins, malgré un pH *in situ* acide, mais aussi des bactéries poussant sur des milieux riches (LB) malgré les conditions oligotrophes. Cette stratégie d'approches combinées a permis d'augmenter la diversité « totale » à Carnoulès de 70%, par rapport à la diversité détectée par les approches moléculaires

précédentes, montrant clairement l'intérêt d'associer les approches moléculaires et culturelles. Cette étude fait l'objet d'une publication acceptée dans *Biology Direct* (Delavat et al., 2012b).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la nature et aux rôles de ces bactéries nouvellement isolées au sein de la communauté.

Parmi nos isolats, 2 ont fait l'objet d'une étude plus approfondie. Le premier isolat correspond à un nouveau genre (et donc à une nouvelle espèce), que nous avons caractérisé taxonomiquement. Celui-ci a été nommé *Acidiminas carnoulesii* et correspond à des micro-organismes non-cultivés dont beaucoup de représentants ont été détectés par approches moléculaires dans différents DMA et environnements acides. Cette souche semble donc inféodée à ces milieux extrêmes, et la caractérisation taxonomique de ce nouveau genre est la première étape dans la compréhension de son rôle au sein de l'écosystème. Cette étude fait l'objet d'un manuscrit en préparation pour soumission dans *Systematic and Applied Microbiology*.

Le second isolat appartient au genre *Paenibacillus*, genre qui n'a jamais été détecté précédemment dans aucun DMA. Cette souche a été testée pour sa capacité à dégrader différents polymères en fonction des conditions physico-chimiques. Il a ainsi été montré d'une part que la souche était capable de se développer dans une large gamme de pH et de concentrations en éléments toxiques comme l'arsenic. Cette souche était donc capable de résister à d'importants changements environnementaux. D'autre

part, il a également été montré que sa capacité à dégrader l'amidon et le xylane n'est que très légèrement affectée par ces changements environnementaux, suggérant que la souche est capable d'être active lorsque les conditions *in situ* changent, alors même que certaines bactéries « majoritaires » peuvent disparaître ou devenir minoritaires. Ainsi, *Paenibacillus* permettrait de maintenir au sein de la communauté les fonctions de dégradation, et jouerait donc un rôle dans la résilience de la communauté par la redondance fonctionnelle qu'il apporte. De plus, un criblage fonctionnel de l'ADN de *Paenibacillus* dans *E. coli* sur base de ces activités a permis de découvrir l'existence d'un gène conférant une activité amylolytique mais dont la séquence protéique ne présente aucune similarité avec aucune amylase ou glycoside hydrolase connues. Cette étude fait l'objet d'une publication dans *Microbial Cell Factories* (Delavat et al., 2012c).

Pour compléter ce travail, un criblage fonctionnel de l'ADN métagénomique utilisé pour la reconstruction des génomes sur base de l'activité amylolytique a permis la découverte, puis la purification et la caractérisation de 2 protéines non homologues et ne ressemblant pas à des amylases. Cette approche a permis d'une part d'attribuer des fonctions amylolytiques à CARN4 et CARN7, mais aussi d'annoter 2 gènes qui codaient jusqu'à présent des protéines de fonctions inconnues. En ce sens, cette approche a permis d'affiner le modèle de fonctionnement de la communauté. Mais les résultats de ce criblage trouvent une résonance plus générale. Ils montrent en effet qu'aller prospecter dans des endroits incongrus, comme les DMAs pour rechercher des amylases, permet de découvrir des protéines, des micro-organismes complètement nouveaux et pouvant avoir un intérêt certain, que ce soit dans le domaine fondamental ou industriel. Sortir

des sentiers battus permet d'ouvrir de nouvelles perspectives insoupçonnées ; ainsi, considérer désormais les DMAs comme un nouveau réservoir de gènes. Cette étude fait l'objet d'une publication dans Scientific Reports. (Delavat et al., 2012d).

À l'issue de ce travail, la composition de la communauté de Carnoulès a été affinée, de même que son fonctionnement. La compréhension de son fonctionnement présente un intérêt d'un point de vue fondamental afin de comprendre le fonctionnement d'une communauté préalablement considérée comme « simple », mais aussi appliqué, dans l'élaboration de nouvelles stratégies de dépollution de sites contaminés par l'arsenic. En effet, il pourrait être possible d'envisager différentes stratégies pour dépolluer un site contaminé, en utilisant les bactéries présentes *in situ*. Ainsi, connaître les espèces présentes et comprendre leur(s) rôle(s) est une première étape pour envisager une telle stratégie. L'arsenic étant un contaminant majeur sur Terre, différents essais, en laboratoire ou sous forme de pilote dans un site pollué, ont en ce sens été testés pour vérifier/permètre la dépollution de sites. Un chapitre d'un ouvrage, regroupant ces différentes stratégies de bio-remédiation de l'arsénite dans les sites contaminés, est présenté en annexe (Delavat et al., 2012a).

Néanmoins, la compréhension du fonctionnement de cet écosystème reste malgré tout partielle. La première question qui se pose est de savoir si les genres isolés par culture font partie de la biosphère rare, ou/et si l'absence de détection par les approches moléculaires s'expliquent par leurs biais. Il aurait été intéressant de réaliser un comptage précis au microscope de la charge bactérienne au sein de l'échantillon, et

de corrélérer ce résultat à la dilution étalée sur boîte pour isoler chaque genre. Il est admis qu'un taxon représentant moins de 1% de la diversité totale appartient à la biosphère rare.

D'autre part, sur les 7 CARNs du modèle de fonctionnement, 5 sont non-cultivées. Durant ces 3 années de thèse, nous avons essayé de cultiver CARN1/4 appartenant à un nouveau phylum. Malgré des efforts importants et soutenus, CARN1/4 n'a pas pu être isolée. Pourtant, son isolement, ainsi que l'isolement des autres CARNs non-cultivées, permettraient de vérifier expérimentalement le fonctionnement de chaque voie métabolique, permettant de confirmer ou d'infirmer le modèle de fonctionnement de la communauté. C'est donc un point clef, qu'il faudrait réussir à dépasser. La diversité cultivée obtenue au cours de ce travail l'a été par culture en aérobiose. Il pourrait être intéressant de tester ces mêmes milieux en anaérobiose. C'est en effet une piste supplémentaire pour tenter d'isoler CARN1/4 (et les autres CARNs ?) mais, plus généralement, cela permettrait d'augmenter là encore la diversité, pour se rapprocher de la « diversité réelle ». D'autre part, sur les 19 genres isolés, seuls 2 ont été étudiés en détail. Les autres peuvent également être étudiés pour leur rôle dans la communauté, en particulier dans les réactions d'oxydo-réduction liées au métabolisme du fer et de l'arsenic. Dans l'étude consacrée à la diversité (Delavat et al., 2012b) nous avons pu montrer que le seul isolat capable d'oxyder l'arsénite appartenait au genre *Thiomonas*, genre connu pour ses capacités à oxyder l'As(III). Néanmoins, bien que l'oxydation de l'As(III) semble prépondérante *in situ* (diminution progressive du ratio As(III)/As(V)), la réduction de l'As(V) en As(III) existe. Cette réduction peut jouer un

rôle à Carnoulès, notamment en remettant en solution l'arsenic sous forme As(III) plus mobile. Les bactéries réduisant l'As(V) peuvent donc avoir un rôle non négligeable au sein de la communauté de Carnoulès. De la même façon, seule CARN5, affiliée au genre *Acidithiobacillus*, serait capable d'oxyder le fer. Il pourrait être intéressant de tester si les souches isolées sont capables d'une telle réaction, permettant là aussi d'apporter une redondance pour cette fonction. De plus chaque souche ne vit pas isolée mais au contraire est en contact permanent avec le reste de la communauté. Des interactions positives, comme négatives, peuvent donc être présentes. Il pourrait donc être intéressant de tester la croissance de chacune de ces souches, par pair, entre elles, et observer leurs réactions afin d'intégrer ces interactions au modèle de fonctionnement. Il serait également intéressant d'inclure dans ces interactions une souche d'*Acidithiobacillus* –un des 3 seuls genres isolés dans une étude précédente à la nôtre à Carnoulès–, mais aussi *Euglena mutabilis*, pour vérifier les interactions inter-règnes. Par exemple, il est montré que cette euglène est auxotrophe pour la cobalamine, alors que 12 des 19 genres bactériens isolés de Carnoulès poussent sur un milieu sans cobalamine et pourrait donc en synthétiser et en faire profiter l'euglène. En « échange », il a été montré que cette euglène est capable de sécréter différents acides aminés et sucres simples, qui pourraient donc être ensuite utilisés par les bactéries.

Ces perspectives sont loin d'être exhaustives, puisqu'il est possible de rajouter des approches –omiques pour avoir une vision intégrée du rôle de chaque genre bactérien à Carnoulès.

Les résultats de ce travail de thèse conduisent également à une réflexion générale. En effet, depuis plus d'une décennie maintenant, les approches moléculaires constituent l'essentiel de l'étude de communautés, alors que les approches plus « traditionnelles » sont délaissées. Cependant, et à l'instar de nombreux auteurs cités dans ce manuscrit, les différentes publications issues de nos travaux montrent que la culture constitue toujours un outil majeur de l'étude des communautés bactériennes, apportant une complémentarité indispensable aux approches -omiques.

Il apparaît enfin que les communautés bactériennes décrites et considérées comme *a priori* simples, révèlent progressivement une complexité importante, et des efforts redoublés seront nécessaires avant de se dire : « nous avons compris ».

Partie 5 :

Annexes

A. PROTOCOLE DE FISH UTILISÉ

Protocole FISH

1) Conditionnement

Préparation des culots bactériens d'*E. coli* :

- 1 ml de milieu de culture liquide d'*E. coli* centrifugé 8 min à 8000 rpm et lavé avec du tampon phosphate (PBS)

Préparation des culots bactériens issus du sédiment de Carnoulès :

- Mélanger 10 g de sédiment à 10 ml d'une base saline (x1) et mettre à agiter pendant 24 heures à 4°C
- Ajouter 7,5 ml du mélange à 17,5 ml de Nycodenz 65%, avant centrifugation pendant 1h30 à 4°C
- Récupérer l'anneau bactérien, laver avec 3 volumes d'eau physiologique

Manipulation :

1. Resuspendre le culot dans 1 ml de solution A.
2. Vortexer, garder 2 h à 4°C.
3. Centrifuger à 5000 rpm pendant 5 min, éliminer le surnageant.
4. Ajouter 1 ml de tampon PBS, vortexer et centrifuger à 5000 rpm pendant 5 min, éliminer le surnageant.
5. Répéter l'opération 4 une seconde fois.
6. Ajouter 1 ml de la solution B, remettre le culot en suspension, vortexer.
7. Conserver à -20°C.

2) Protocole

Dilution

1. Décongeler sur glace.
2. Diluer 30 à 100 µl dans 10 ml de PBS

Filtration

1. Poser sur un porte-filtre un filtre en nitrate de cellulose puis un filtre GTTP (0,2 µm)
2. Filtrer l'échantillon sous vide
3. Récupérer le filtre GTTP, mettre à sécher sur papier Whatman et garder à -20°C dans une boîte de Petri jusqu'à utilisation

Traitement enzymatique (non utilisé ici)

1. Immerger les filtres dans une solution de lysozyme (10 mg/ml) (0,05 M EDTA (pH=8) ; 0,1 M trisHCl (pH=7,4))
2. Maintenir 15 min à 37°C.
3. Laver les filtres à l'eau distillée
4. Sécher sur papier

Hybridation

1. Préparer 2 ml de la solution d'hybridation (Solution C) par test.
2. Mélanger la solution d'hybridation (Solution C = 13,5 µl) et la solution sonde (1,5 µm de 50 ng/µl de sonde) = Solution H
3. Mettre les filtres sur une lame
4. Ajouter 15 µl de la solution H sur chaque filtre
5. Mettre les lames dans des tubes Falcon (50 ml) contenant une feuille de papier humidifiée avec le reste de la solution C
6. Placer les tubes à 46°C pendant 2 h.

Lavage

1. Préparer la solution de lavage dans un tube Falcon 50 ml (Solution D)
2. Mettre ces tubes à 48°C à l'avance
3. Transvaser les lames du tube d'hybridation dans les tubes de lavage
4. Mettre à 48°C pendant 15 à 20 min

Coloration au DAPI

1. Récupérer les filtres et les mettre à sécher sur papier Whatman
2. Mettre les filtres sur une lame
3. Ajouter 10 µl de DAPI (1 µg/ml) pendant 5 à 10 min
4. Laver les filtres à l'eau puis à l'éthanol 80%
5. Laisser sécher sur papier 10 à 15 min

Montage des lames

1. Mettre les filtres sur des lames
2. Ajouter une goutte de Citifluor, mettre une lamelle
3. Garder à -20°C ou visualiser.

Solutions à préparer

Base saline (x50) : 7,5 g/l Na₂SO₄, 10 H₂O
22,5 g/l (NH₄)₂SO₄
2,5 g/l KCl
25 g/l MgSO₄, 7 H₂O

2,5 g/l KH_2PO_4
0,7 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

Solution A : formaldéhyde dans PBS (2%)

Solution B : mélange PBS/Ethanol (1/1)

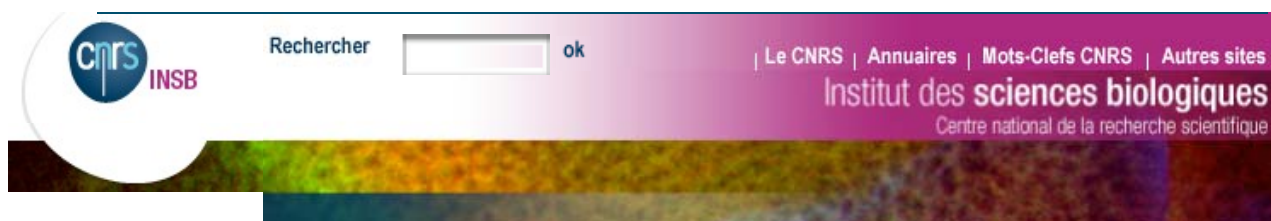
Solution C : solution d'hybridation

NaCl (5 M)	360 μl
Tris HCl (1 M)	40 μl
Formamide	entre 10 et 50%
Eau milliQ	qsp 2 ml
SDS (10%)	2 μl

Solution D : solution de lavage

NaCl (5M)	dépend du % de formamide (ex : 10% : 4,5 ml, 30% ; 1,12 ml ; 40% : 0,56 ml)
Tris HCl (1M)	1 ml
EDTA (0,5M)	500 μl si formamide > 20%
Eau milliQ	qsp 50 ml
SDS (10%)	50 μl

B. UN NOUVEAU FOURNISSEUR DE MATIÈRE ORGANIQUE DANS LES MILIEUX EXTRÊMES



Accueil > La recherche en sciences du vivant > Parutions > Un nouveau fournisseur de matière organique dans les milieux extrêmes

Parutions

Liens utiles et partenaires

Rechercher sur ce site :

Un nouveau fournisseur de matière organique dans les milieux extrêmes

Une équipe du laboratoire Génétique moléculaire, génomique et microbiologie (GMGM, CNRS/Université de Strasbourg) a isolé une nouvelle souche bactérienne, du genre *Paenibacillus*, capable de recycler la matière organique complexe dans des environnements aux conditions extrêmes, tels que les drainages miniers acides. Ce travail, publié dans *Microbial Cell Factories*, a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire d'ingénierie des polymères pour les hautes technologies (LiPHT, Ecole européenne de chimie polymères et matériaux de l'Université de Strasbourg).

Le recyclage de la matière organique complexe est une fonction majeure pour tout écosystème, en particulier dans des environnements oligotrophes extrêmes comme les drainages miniers acides, où la quantité de matière organique est moindre. Les bactéries indigènes capables de dégrader des polymères peuvent donc jouer un rôle important dans le fonctionnement de leurs communautés, en fournissant des sources carbonées simples et facilement assimilables. Cette fonction doit pouvoir être conservée lorsque les conditions environnementales changent, c'est à dire lorsque la structure de la communauté varie.

Les chercheurs du laboratoire GMGM ont isolé une souche appartenant au genre *Paenibacillus* dans le drainage minier acide de Carnoulès dans le Gard. Avec l'aide du LiPHT, ils ont montré que cette souche est capable de résister à d'importantes variations de pH (de 3 à 9) ou de concentration en arsenic (de 0 à 1 800 mg/L). Une approche fonctionnelle leur a ensuite permis de mettre en évidence son aptitude à dégrader efficacement deux types de polymères, l'amidon et le xylane, dans une large gamme de pH (de 4 à 10) et de concentration en arsenic (de 0 à 750 mg/L).

Grâce à une analyse des produits de dégradation sur les extraits bruts par PACE (Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis), les chercheurs ont également démontré le caractère constitutif de l'expression des gènes de dégradation de l'amidon et le caractère inductible des gènes de dégradation du xylane. Enfin, le criblage fonctionnel d'une banque d'ADN de la souche nouvellement isolée leur a permis de caractériser certains des gènes responsables de ces dégradations. De façon inattendue, l'un d'entre eux code pour une protéine de fonction inconnue, qui ne possède aucun domaine catalytique connu.

Cette étude illustre pour la première fois le rôle central d'une bactérie cultivée dans la dégradation de la matière organique complexe au sein d'un drainage minier acide. Les métabolites résultants de la dégradation sont utilisés par la communauté bactérienne afin d'assurer son bon fonctionnement et d'augmenter sa résilience. La souche de *Paenibacillus* qui a été identifiée semble donc cruciale dans l'équilibre de cette communauté, non seulement parce qu'elle apporte des éléments nutritifs simples, mais aussi et surtout parce qu'elle conserve sa capacité à dégrader les polymères suite à des changements considérables de son environnement.

Plus globalement, ces travaux suggèrent l'importance du rôle assuré par les bactéries polymères- dégradantes dans des sites oligotrophes. Ils ouvrent également à un écosystème inexploré, le champ d'étude d'enzymes d'intérêt industriel et/ou médical aux propriétés insoupçonnées, les drainages miniers acides pouvant maintenant être considérés comme un nouveau réservoir de gènes.



Figure : Dégradation par *Paenibacillus* de l'amidon (en haut, à gauche et à droite) et du xylane (en haut, au centre) sur le site de Carnoulès dans le Gard (en bas). © GMGM, François Delavat

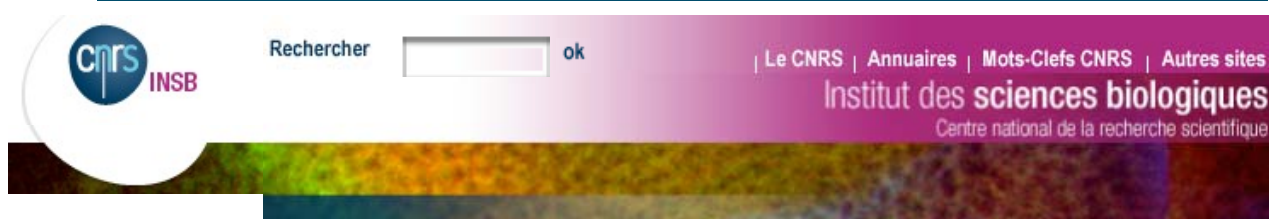
 En savoir plus

- Deciphering the role of *Paenibacillus* strain Q8 in the organic matter recycling in the acid mine drainage of Carnoulès, François Delavat, Vincent Phalip, Anne Forster, Marie-Claire Lett, Didier Lièremont, *Microbial Cell Factories* (2012), doi:10.1186/1475-2859-11-16.

 Contact chercheur

- **Didier Lièremont**
Génétique moléculaire, génomique et microbiologie
(GMGM) UMR 7156 CNRS/Université de Strasbourg
Université de Strasbourg - Institut de Botanique
28 Rue Goethe
67083 Strasbourg Cedex

C. DÉCOUVERTE DE NOUVELLES AMYLASES DANS UN MILIEU EXTRÊME



Accueil > La recherche en sciences du vivant > Parutions > Découverte de nouvelles amylases dans un milieu extrême

Parutions

Liens utiles et partenaires

Rechercher
sur ce site :

Découverte de nouvelles amylases dans un milieu extrême

Des chercheurs du laboratoire Génétique moléculaire, génomique et microbiologie (GMGM, CNRS/Université de Strasbourg) ont identifié, dans un drainage minier acide situé dans le sud de la France, des protéines capables de dégrader l'amidon qui n'ont encore aucun homologue enzymatique connu à ce jour. Ces résultats, publiés dans la revue *Scientific Reports*, confirment que les milieux oligotrophes, tels que les drainages miniers acides, constituent des réservoirs de gènes de première importance.

Depuis de nombreuses décennies, la recherche d'enzymes ou de bactéries d'intérêt industriel ou fondamental se fait généralement via une prospection orientée. Ainsi, si le but est de détecter et de caractériser une cellulase qui fonctionne à des températures élevées, les criblages se font dans des environnements extrêmement chauds comme les cheminées hydrothermales. Pourtant, la bioprospection dans des sites *a priori* incongrus permet de faire des découvertes intéressantes, tant sur le plan fondamental qu'industriel.

Les drainages miniers acides sont des environnements extrêmes caractérisés par une forte acidité, des concentrations en métaux importantes et une faible concentration en carbone organique, ce qui se traduit par une faible diversité microbienne. Ces écosystèmes sont étudiés depuis de nombreuses années, mais ces études sont plutôt focalisées sur des aspects géochimiques. Ainsi, peu de travaux ont porté sur la recherche et la caractérisation d'enzymes de dégradation de la matière organique complexe dans ces sites oligotrophes.

En collaboration avec le Laboratoire d'ingénierie des polymères pour les hautes technologies (Ecole européenne de chimie polymères et matériaux de l'Université de Strasbourg), les chercheurs de l'équipe « Ecophysologie moléculaire des micro-organismes » au laboratoire GMGM ont criblé une banque d'ADN métagénomique, provenant du drainage minier acide de Carnoulès dans le Gard et construite dans l'espèce bactérienne *Escherichia coli*, pour identifier des enzymes qui dégradent l'amidon. Le criblage de 80 000 clones bactériens a permis d'en détecter 28 possédant une activité amylolytique. L'analyse par séquençage de dix inserts a ensuite montré qu'aucun d'entre eux ne présente de gènes qui codent pour une protéine annotée « amylase » dans les banques de données.

Les chercheurs ont conduit un sous-clonage de deux gènes candidats, suivi de la purification et de la caractérisation partielle des protéines correspondantes. Une analyse par PACE, ou « Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis », couplée à l'utilisation de substrats chromogènes a alors permis de confirmer, *in vitro*, l'activité amylolytique de ces protéines. Pourtant, l'analyse complète *in silico* des séquences protéiques obtenues montrent que ces protéines, non-homologues entre elles, ne présentent de similarité de séquence avec aucune des amylases ou des hydrolases actuellement répertoriées. Cette absence de similarité avec les glycosidases connues a également été mise en évidence par l'impossibilité de prédire une structure tridimensionnelle statistiquement robuste en utilisant le logiciel I-TASSER. La première protéine identifiée ne ressemble d'ailleurs à aucune autre protéine connue. La seconde en revanche, présente une identité non négligeable avec une protéine du système de sécrétion de type IV, dont la fonction n'a pas encore été définie.

Outre le fait que cette étude permette ici d'annoter des gènes codant pour des protéines de fonctions inconnues, ce criblage des activités amylolytiques dans un milieu oligotrophe extrême comme le drainage minier acide de Carnoulès, montre que la bioprospection dans des environnements *a priori* incongrus ouvre un autre pan fort intéressant de la microbiologie. Cette étude permet également d'envisager le site de Carnoulès et plus généralement les drainages miniers acides comme de nouveaux réservoirs de gènes.



Figure : Drainage minier acide de Carnoulès dans le Gard. © GMGM, François Delavat

🔍 En savoir plus

- Amylases without known homologues discovered in an acid mine drainage : significance and impact, François Delavat, Vincent Phalip, Anne Forster, Frédéric Plewniak, Marie-Claire Lett, Didier Lièvreumont, *Scientific Reports* (2012), 2(354), doi:10.38/srep00354.

✉ Contact chercheur

- **Didier Lièvreumont**
Génétique moléculaire, génomique et microbiologie
(GMGM) UMR 7156 CNRS/Université de Strasbourg
Université de Strasbourg - Institut de Botanique
28 Rue Goethe
67083 Strasbourg Cedex

D. BOOK CHAPTER: "REMEDICATION USING ARSENITE-OXIDIZING
BACTERIA" (CRC PRESS 2012)

CHAPTER 11

Remediation using arsenite-oxidizing bacteria

François Delavat, Marie-Claire Lett & Didier
Lièvreumont

dans "The metabolism of arsenite", Santini, J.M. & Ward,
S.A. (eds), CRC Press, ISBN 978-0-415-69719-4 (2012)

CHAPTER 11

Remediation using arsenite-oxidizing bacteria

François Delavat, Marie-Claire Lett & Didier Lièvremont

11.1 INTRODUCTION

Arsenic (As) is present in water worldwide. Populations in developing countries in various parts of the world are particularly at risk, with chronic exposure to this element resulting in a range of cancers and other diseases. The World Health Organisation recommended Maximum Contaminant Level (MCL) for arsenic in water is $10 \mu\text{g L}^{-1}$, but drinking water supplies in many countries contain much higher levels than this, so there is an urgent need for efficient methods of removing As.

Arsenic is present in the environment in both organic and inorganic forms in four oxidation states (-3, 0, +3, +5). Inorganic species are the most toxic, especially arsenite, As(III). This reduced trivalent form dominates under anoxic conditions, e.g. in groundwater, while the oxidized form arsenate [As(V)] is generally dominant in oxygenated or surface waters over the pH range typically encountered in water treatment (Jiang, 2001).

As(III) is much more mobile than As(V), which is readily adsorbed to solid materials such as Fe oxides and hydroxides, clays, or alumina. Thus, oxidation of As(III) to As(V) results in As(V) immobilization in environmental compartments e.g. soils. In water, methods like coagulation/coprecipitation, sorption/ion-exchange, precipitation, or filtration are more effective at removing As(V) than As(III). To remove As(III) from contaminated environments it must first be oxidized. This oxidation can be performed abiotically using oxygen, but the reaction rate is very low. In oxygenated water, conversion of As(III) to As(V) is thermodynamically favoured, but adequate conversion may take days, weeks or months, depending on the specific conditions (Jiang, 2001). Usually, in remediation processes, this As(III) oxidation is carried out by the addition of strong oxidants such as ozone, hydrogen peroxide or chlorine (Kim and Nriagu, 2000), but because of undesirable byproducts, the use of chemical reagents is not recommended, especially in drinking water.

A large number of autotrophic and heterotrophic As(III)-oxidizing bacteria have been isolated from various environments in the last two decades (Cullen and Reimer, 1989; Weeger *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 2000; Battaglia-Brunet *et al.*, 2002; Oremland *et al.*, 2002; Rhine *et al.*, 2006; Stolz *et al.*, 2006; Inskeep *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2010c) and a first psychrotolerant As(III) oxidizer has been recently isolated by Osborne *et al.* (2010). Bacterial As(III) oxidation may offer a safe alternative to chemical methods of oxidation, but to date, most As(III) biological oxidation studies have been conducted using small-scale or pilot-scale bioreactors; the literature contains no data on full- or industrial-scale applications. Perhaps owing to the stigma associated with bacterial contamination, microbial treatments of drinking water are not yet widely accepted, although this may change as they become more practical (Brown, 2007; Lytle *et al.*, 2007). Moreover, the cost-effectiveness and ease of implementation of biological treatment processes depend on numerous factors, e.g. the choice of reactor design and operational conditions. Bespoke systems, tailored for one set of conditions, are subject to strict constraints. Nevertheless, these active systems are promising and will certainly work in the near future, at least in combination with passive systems designed to enhance naturally occurring physical, chemical and biological processes.

11.2 ARSENITE OXIDATION-BASED REMEDIATION BIOPROCESSES

Arsenic treatment processes need to be diverse since they must target waters, soils or sediments, with different geochemical conditions and As concentrations. Usually, two major steps are involved (Fig. 11.1): oxidation of As(III); and the subsequent removal of the As(V) produced.

In section 11.2.1 we review active systems for exploiting the biological oxidation of As(III). Passive remediation, which needs no energy input, is discussed in section 11.2.2. This natural attenuation (NA) of As may represent a cost-effective alternative if appropriate conditions can be combined.

11.2.1 Active remediation systems

The implementation of active systems requires an understanding of bacterial physiology and metabolism. In these systems, all of which require continuous energy input, arsenic speciation is controlled by microbial processes, so a first step is to choose a suitable pure culture of a previously isolated arsenite-oxidizing bacterial strain, or a naturally occurring arsenite-oxidizing bacterial consortium. The design of the system must then depend on whether As(III) oxidation occurs under oxic or anoxic conditions. To date, the use of pure cultures has been investigated mainly at the bench scale, while bacterial consortia have been studied at the pilot scale.

11.2.1.1 Anoxic As(III) oxidation-based processes

In anoxic environments, microorganisms play important roles in the mobilization of adsorbed As (Oremland *et al.*, 2005), in particular, through microbial reduction of As(V) and Fe(III) (Smedley and Kinniburgh, 2002). As(III) is the predominant species in these reducing environments; it is less strongly adsorbed than As(V) on minerals such as Fe, Mn or Al (hydr)oxides (Bhumbla and Keefer, 1994; Manning and Goldberg, 1997; Lin and Wu, 2001; Goldberg, 2002). Therefore, oxidation of As(III) to As(V) could contribute to an improved immobilization of As and thus help to mitigate As contamination in groundwater. This anoxic oxidation may use one of three electron acceptors: nitrate, chlorate and selenate.

Several authors have shown that under anaerobic conditions, nitrate (NO_3^-) acts as an electron acceptor in the oxidation of As(III) to As(V) by denitrifying bacteria, in lakes (Oremland *et al.*, 2002; Hoefl *et al.*, 2007) or soil (Rhine *et al.*, 2006). In these studies, bacteria were isolated from sites containing high concentrations of As ($225\text{--}375\text{ mg L}^{-1}$). Sun *et al.* (2008) inoculated sludges and sediments, never exposed to As contamination, in batch bioassays supplied with a basal mineral medium, As(III) ($37.5\text{--}375\text{ mg L}^{-1}$) and nitrate (620 mg L^{-1}). They reported the anoxic biological oxidation of As(III) ($37.5\text{--}375\text{ mg L}^{-1}$) by denitrifying microorganisms.

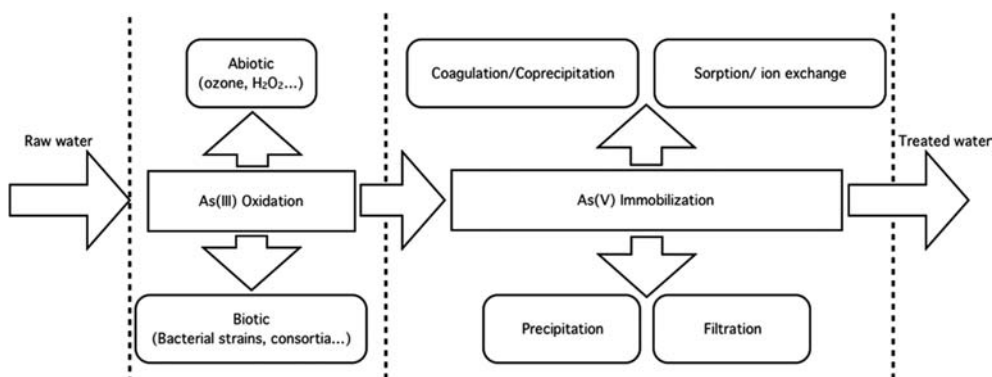


Figure 11.1. Synopsis of the mechanisms involved in As treatment processes.

The same authors (Sun *et al.*, 2009a) used enrichment cultures from diverse anaerobic environmental samples. They isolated strains of *Azoarcus*, known for their ability to oxidize aromatic substrates under anaerobic conditions (Kasai *et al.*, 2006; Reinhold-Hurek and Hurek, 2006; Szalaniec *et al.*, 2007), and strains of *Diaphorobacter*. These strains were able to perform nitrate-dependent As(III) oxidation. These experiments demonstrated that in the water-saturated subsurface, NO_3^- could be used to oxidize As(III) to As(V), leading to As immobilization. Sun *et al.* (2009b) then examined the controlled reoxidation of As(III) and Fe(II) in anoxic environments. They injected nitrate ($150 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ supplied as KNO_3) into continuous flow columns packed with sand and inoculated with volatile suspended solids from anaerobic sludge, simulating a natural anaerobic groundwater-sediment system, with co-occurring As(III) ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) and Fe(II). Microbial nitrate-dependent oxidation of Fe(II) and As(III) enhanced the adsorption of As on the newly biologically formed solid-phase Fe(III) (hydr)oxides. The efficiency of the system allowed the effluents not to exceed the MCL of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of As.

Sun *et al.* (2010b) then showed the anoxic biological oxidation of As(III) linked to chemolithotrophic denitrification in continuous bioreactors – a process that remained stable throughout a period of operation of over three years. The bioreactors were fed with a chemolithotrophic denitrifying granular sludge and a basal mineral medium containing As(III) (up to 610 mg L^{-1}) nitrate (155 and 397 mg L^{-1}) and bicarbonate. The process had a high conversion efficiency of As(III) to As(V) (92%) even with high loadings of As(III) (265 – $384 \text{ mg As L}^{-1}_{\text{reactor}} \text{ d}^{-1}$). The microbial population tolerated As(III)-inflow concentrations up to 390 mg L^{-1} , but was greatly inhibited with As concentrations of 570 – 610 mg L^{-1} . The molar stoichiometric ratio of As(V) formed to nitrate removed indicated complete denitrification of NO_3^- to N_2 gas in the reactor with an As(III)-inflow concentration of 265 mg L^{-1} and a nitrate-inflow concentration of 397 mg L^{-1} .

Using the same granular sludge, the same authors carried out experiments in upflow columns, packed with a non-Fe metal (hydr)oxide, i.e. activated alumina (Sun *et al.*, 2010a). The bioreactors were fed with As(III) (265 mg L^{-1}) as electron donor, NO_3^- (403 mg L^{-1}) as electron acceptor and NaHCO_3 (672 mg L^{-1}) as major carbon source. As(III) was oxidized and the As(V) produced was immobilized on the activated alumina by adsorption.

All of these experiments showed that in reducing or anoxic environments, where As(III) is the dominant species, the biologically nitrate-dependent oxidation of As(III) can greatly enhance the immobilization of As. The strong sorption of As on metal (hydr)oxides generally observed in natural environments such as soils or sediments (Lin and Wu, 2001; Dixit and Hering, 2003) is always counterbalanced by the opposite process, i.e. desorption. In the case of Al (hydr)oxides, As desorption importance decreased as sorption ageing time increased (Lin and Puls, 2000). Thus, injecting NO_3^- into the subsurface (e.g. in anaerobic groundwaters) as a means to immobilize As on Al (hydr)oxides or biogenic Fe (hydr)oxides represents a potential bioremediation strategy.

Having demonstrated that nitrate boosted biological As(III) oxidation (see above), Sun *et al.* (2011) developed an As(III) oxidation process, using a bench-scale upflow anaerobic sludge bed reactor, with chlorate (ClO_3^-) as an alternative electron acceptor. The bioreactor inoculum was an anaerobically digested sewage sludge obtained from a municipal wastewater treatment plant, fed with a basal mineral medium supplied with As(III) as the sole energy source, ClO_3^- as the sole electron acceptor, and NaHCO_3 as an additional carbon source. As(III) loadings varied according to operation periods (from 33 to $144 \text{ mg L}^{-1}_{\text{reactor}} \text{ d}^{-1}$). Over a 550 days of operation, 98% of As(III) was converted to As(V). This As(III) oxidation was demonstrated to be linked to the complete reduction of ClO_3^- to Cl^- and H_2O . An autotrophic enrichment culture sampled on day 530 was established from the bioreactor biofilm and a 16S rRNA gene clone library was constructed. The Betaproteobacteria accounted for the majority of all the clones (genera *Dechloromonas*, *Acidovorax* and *Alicyclophilus*). Gammaproteobacteria (*Stenotrophomonas*) and Alphaproteobacteria (*Rhodobacter*) were also represented. By exploring the potential use of ClO_3^- as terminal electron acceptor by anaerobic bacteria for As(III) oxidation, the same authors had showed that sludge samples from different sources, enrichment cultures and pure autotrophic microbial cultures (*Dechloromonas* sp. strain ECC1-pb1, and *Azospira* sp. strain ECC1-pb2)

oxidized As(III) to As(V) while reducing chlorate under anaerobic conditions (Sun *et al.*, 2010c); the biological oxidation of As(III) to As(V) in absence of exogenous O₂ was dependent on the presence of chlorate.

These works show that the addition of the highly water soluble chlorate may open interesting perspectives to remediate As contamination e.g. in groundwater. However, we have to keep in mind that chlorate and chlorite induced oxidative damage to red blood cells in humans (WHO 2005).

Finally, a third electron acceptor, selenate (SeO₄²⁻), can be used as an electron acceptor for As(III) oxidation. To date, its use has been demonstrated only in a Mono Lake water sample (Fisher and Hollibaugh, 2008): under anaerobic conditions, As(V) was produced when nitrate or selenate were supplied. In the experimental conditions used, selenate (286 mg L⁻¹) supported the same As(III) oxidation rate as nitrate (310 mg L⁻¹). Fisher and Hollibaugh (2008) went on to isolate a pure culture (strain ML-SRAO belonging to the *Bacillus* genera) which was shown, in a defined-salts medium (amended with 715 mg L⁻¹ selenate, 375 mg L⁻¹ As(III) and 450 mg L⁻¹ lactate), to be responsible for the anaerobic As(III) oxidation. No As(III) oxidation occurred with nitrate or oxygen, indicating that the process was selenite-dependent. Selenate has not received as much attention as chlorate or nitrate but the potential to use it to accelerate the As(III) oxidation and the subsequent As(V) immobilization exists.

These experiments on anaerobic As(III) oxidation, carried out at the bench-scale in small bioreactors, showed an unusual way to partially remediate arsenic. Experiments in oxic conditions are generally preferred as they are less demanding. Air sparging techniques are tried and tested techniques for *in-situ* organic contaminants bioremediation principally, even if supplying oxygen is often technically difficult. Thus, why not envisage bioremediation systems taking advantages of anaerobic As(III) oxidation?

11.2.1.2 Oxic As(III) oxidation-based processes

In oxic environments, As(III) can be converted abiotically to As(V), in a slow reaction that may take days or weeks depending on the conditions. Numerous As(III) bacterial oxidizers have been isolated from these environments and have been used in the development of remediation processes. Two major approaches are taken: a pure culture-based approach, mainly at the bench-scale, and a consortium-based approach at bench- or pilot-scale. This biological As(III)-oxidation must be combined with the removal of the As(V) produced, on an efficient adsorbent.

11.2.1.3 As(III) oxidation using bacterial pure cultures

A wide range of bacteria have been involved in As(III)-oxidation systems: *Herminiimonas arsenic-oxidans* (Weeger *et al.*, 1999; Lièvreumont *et al.*, 2003; Simeonova *et al.*, 2005), *Haemophilus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. (Ike *et al.*, 2008), *Microbacterium lacticum* (Mokashi and Paknikar, 2002), *Alcaligenes faecalis* (Suttigarn and Wang, 2005; Wang and Suttigarn, 2007; Wang *et al.*, 2009), *Pseudomonas putida* (Yang *et al.*, 2010), *Ralstonia eutropha* MTCC 2487 (Mondal *et al.*, 2008). All of these bacteria are heterotrophic. Only two chemoautotrophic bacteria have been used in pure culture systems: *Thiomonas arsenivorans* B6 (Dastidar and Wang, 2009, 2010; Wan *et al.*, 2010) and SDB1 bacteria which showed 100% identity with *Ensifer adhaerens* or *Sinorhizobium* sp. CAF63 (Lugtu *et al.*, 2010). These heterotrophic and chemoautotrophic bacteria are all reported to be efficient As(III) oxidizers.

All but one of these bacteria were isolated from As-containing environments. The exception was Yang *et al.*'s (2010) construction of a more efficient As(III)-oxidizing *Pseudomonas putida*, isolated from the wastewater of an electronic factory, by cloning the genes of the As(III) oxidase of *Thermus thermophilus* HB8. Its As(III) oxidative ability was good but the recombinant plasmid was unstable. In any case, it is questionable whether this method is really promising owing to strict regulations and the need for contained use of these bacteria.

The As(III) oxidation efficiency of strains in bioreactors depends on a number of parameters, such as the quality of influent, the cell-immobilizing material, and the initial As(III) concentration.

The second step, consisting of the As(V) chemical adsorption, requires a careful choice of the adsorbent.

Different technical options have been implemented: up-flow fixed bed reactors (Mondal *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2010), fluidized bed reactors (Wang *et al.*, 2009), stirred tank reactors (Lièvreumont *et al.*, 2003; Simeonova *et al.*, 2005; Wang and Suttigarn, 2007; Dastidar and Wang, 2009, 2010; Lugtu *et al.*, 2010) and small glass columns (Mokashi and Paknikar, 2002). Batch operation mode (Lièvreumont *et al.*, 2003; Simeonova *et al.*, 2005; Dastidar and Wang, 2009), in which reactors are fed once, is usually the preferred mode of operation when the systems are in a development phase. Continuous operation (Wang and Suttigarn, 2007; Wang *et al.*, 2009; Dastidar and Wang, 2010; Sun *et al.*, 2010b) increases the risks of contamination or cell washouts, as bioreactors are continuously fed.

All of these above studies were conducted in small bench-scale bioreactors, up to a few liters. They treated As(III)-contaminated influents in concentrations ranging from 0.5 (Mokashi and Paknikar, 2002) to 4,000 mg L⁻¹ (Dastidar and Wang, 2010). Numerous experiments were carried out with a 10–100 mg L⁻¹ As(III) concentration (Lièvreumont *et al.*, 2003; Simeonova *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2010). These initial concentrations are often arbitrarily chosen either to illustrate the high oxidation capacity of the strain or to simulate *in-situ* environmental concentrations such as in Acid Mine Drainages (AMDs). However, they are all far higher than the MCL recommended for arsenic in water (10 µg L⁻¹).

Since surface or groundwaters were targeted in these systems, the influents to which As(III) was added were synthetic calcareous water (Wan *et al.*, 2010), simulated groundwater (Mokashi and Paknikar, 2002) or nutrient media (Lièvreumont *et al.*, 2003; Simeonova *et al.*, 2005; Wang and Suttigarn, 2007) (Simulated water means that compositions were chosen according to the representative composition of the As-contaminated water of interest).

A carbon supplement was provided for heterotrophic bacteria, e.g. citrate (Wang and Suttigarn, 2007), lactate (Lièvreumont *et al.*, 2003), sauerkraut brine (Simeonova *et al.*, 2005); while Mokashi and Paknikar (2002) investigated several carbon sources (acetate, lactate, citrate, methanol, sucrose, glucose). The work of Simeonova *et al.* (2005) showed that free or low-cost organic “wastes” could replace more commonly used carbon sources.

Operating conditions – pH and temperature – also varied among studies. They were set at the estimated optimum for each strain – near neutrality (Lièvreumont *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009), slightly acid (Mondal *et al.*, 2008; Dastidar and Wang 2009, 2010) – or to values that reflected the *in-situ* conditions. Some authors examined the effects of changing pH and temperature, e.g. Mokashi and Paknikar (2002), Simeonova *et al.* (2005) and Ike *et al.* (2008) chose respectively pH ranges of 5.5–10, 7–8, 7–10, and temperature ranges of 20–45°C, 4–25°C and 25–35°C. In the experimental conditions of their systems, Simeonova *et al.* (2005) demonstrated that temperature was the most important parameter while Mokashi and Paknikar (2002) reported an optimum pH of 7.5 and an optimum temperature of 30°C for As(III) oxidation. Ike *et al.* (2008) observed similar As(III) oxidation rates over the pH and temperature ranges studied.

In all reactors i.e. packed bed, fixed bed, fluidized bed, continuously operated or not, As(III) is oxidized by immobilized cells. Thus, carriers that can maintain high cell densities are of crucial importance. The supports used in these studies included sieved sand (Wan *et al.*, 2010), granular activated carbon (Mondal *et al.*, 2008), aluminosilicate zeolite (Lièvreumont *et al.*, 2003), Ca-alginate beads (Simeonova *et al.*, 2005; Lugtu *et al.*, 2010), carragenan gel beads (Wang *et al.*, 2009), glass beads (Dastidar and Wang, 2010), and brick pieces (Mokashi and Paknikar, 2002). Once As(III) has been transformed into As(V) by the encapsulated or fixed cells, the As(V) must be adsorbed to prevent the release of As in the effluent. Various As(III) and As(V) adsorbents have been tested for their efficiency, e.g. biological materials, mineral oxides, activated carbons, polymer resins, by-products and industrial wastes (Mohan and Pittman, 2007). Minerals and mineral oxides are also widely used in these studies: e.g. zero-valent Fe (Mokashi and Paknikar, 2002), activated alumina (Ike *et al.*, 2008; Dastidar and Wang, 2010; Wan *et al.*, 2010) and carbonates such as kutnahorite (Lièvreumont *et al.*, 2003).

In addition to immobilizing the cells it is important to maintain the As(III) efficiency of the strain used over long periods of operation time. But cell density is difficult to stabilize and, depending on the immobilization material, cells can leach out in reactor effluent. Moreover, reactors are fed with an As-contaminated influent whose condition may fluctuate.

The As(III) oxidation efficiency in these different systems varies considerably. *H. arsenicoxydans* was able to oxidize $30 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of As(III) as free cells (Weeger *et al.*, 1999). Simeonova *et al.* (2005) observed an As(III) oxidation rate of $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ when *H. arsenicoxydans* was entrapped in Ca-alginate beads. Mokashi *et al.* (2002) reported $600 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of As(III) oxidized with *M. lacticum* immobilized on brick pieces in the reactor operated in continuous mode. Depending on the residence time of the influent in the reactor, Wan *et al.* (2010) showed that $2.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of As(III) loading was completely oxidized after 15 days of operation. In a continuous stirred-tank reactor, 99% of high inputs of As(III) ($2,000\text{--}4,000 \text{ mg L}^{-1}$) was oxidized under optimal growth conditions for *Tm. arsenivorans* after 42 days of operation (Dastidar and Wang, 2010).

These systems require that the As(III)-oxidizing strain remains active whatever the composition of the influents. The challenge is then to control the bacterial population.

11.2.1.4 As(III) oxidation using bacterial consortia

Studies using bacterial consortia to remediate As(III) have taken two approaches. In the first, As(III) oxidizers were isolated from As-contaminated environments and then inoculated into bioreactors. The second approach relied on the natural formation of a biofilm containing As(III) oxidizers from the influents; this was then inoculated into the bioreactors. Thus, the bacterial community performing the oxidation could be specific to the As-contaminated materials. The use of biofilms instead of pure cultures has been reported to provide bacteria with an increased resistance to environmental stress (Stoodley *et al.*, 2002; Teitzel and Parsek, 2003), making them interesting for As bioremediation (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002).

In mining environments, inorganic forms of As (i-As) are widespread, particularly in effluents (Acid Mine Drainages) resulting from the bioleaching of arsenic-bearing minerals. In these liquors, As concentrations are often very high ($>1 \text{ g L}^{-1}$), with a significant proportion of As(III), while pH is low (<2). Most of the As(III) oxidizers from these environments are acid-tolerant, i.e. with an optimum growth pH near neutrality but able to survive at low pH, except for *Thiomonas* strains (Duquesne 2004; Battaglia-Brunet *et al.*, 2006b), which grow at an optimum of around pH 5.

CAsO1 is a bacterial consortium originally isolated from a disused gold mine situated in Saint-Yrieix, France (Dictor *et al.*, 2003). It is a mixed community of mesophilic bacteria containing the As(III)-oxidizing chemolithoautotroph *Tm. arsenivorans*, as well as a strain close to *Ralstonia pickettii* (identified by the 16S rDNA). The consortium (i.e. *Tm. arsenivorans*) was able to oxidize As(III) with CO_2 as carbon source, As(III) as electron donor and O_2 as terminal electron acceptor. *R. pickettii*, a ubiquitous bacterium found in water and soil, was able to survive in low nutrient conditions but was not autotrophic (Ryan *et al.*, 2007).

This CAsO1 consortium was shown to be resistant to As(III) concentrations of up to 13.5 g L^{-1} in As-rich liquors (Battaglia-Brunet *et al.*, 2011) and its ability to oxidize As(III) was conserved even in low As(III) concentrations, i.e. $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Challan Belval *et al.*, 2009), and between pH 3 and pH 8 (Dictor *et al.*, 2003). These low As(III) concentrations reflect those measured in various waters. Except for the As-rich mine drainage effluents (Battaglia-Brunet *et al.*, 2011), operating As(III) concentrations were in the order of micrograms. A system effective at such low As concentrations might be useful for treating not only industrial waters but also drinking water. The CAsO1 consortium was used in different bioreactor designs included bench-scale stirred bioreactors to treat As(III)-rich liquors (Battaglia-Brunet *et al.*, 2011), bench-scale fixed-bed bioreactors fed with synthetic effluents supplemented with As (Dictor *et al.*, 2003), and pilot-scale fixed-bed bioreactors fed with unprocessed As contaminated water (Michon, 2006; Michon *et al.*, 2010).

In the work of Michon (2006), bioreactors were supplied with unprocessed contaminated water containing $100 \mu\text{g L}^{-1}$ As(III). Oxidic conditions were maintained and a 90% As(III) oxidation rate was obtained within 3-h after a 5-day adaptation phase. The same author (Michon *et al.*, 2010) fed fixed-bed reactors with synthetic water spiked with As(III) ($25\text{--}100 \mu\text{g L}^{-1}$). They demonstrated a crucial point, i.e. the persistence of the consortium in the pilot unit during operation, meaning that the efficiency of the system is conserved. This point is essential as As-contaminated influents contained bacteria, which could affect the life and activity of a biofilm.

Using fixed-bed reactors, Michel *et al.* (2007) compared the formation and activity of biofilms of CAsO1 with those of a pure *Tm. arsenivorans* culture, in order to optimize the process. When a support medium was added, e.g. polystyrene microplates or pozzolana (a volcanic basaltic ash material), the rate of As(III) oxidation by the pure culture declined relative to that of planktonic cells. The biofilm seemed to be a physical barrier limiting the diffusion of As(III) to the cells. In contrast, results obtained with CAsO1 during a six-weeks period showed that pozzolana enhanced bacterial colonization, and improved As(III) oxidation at low As(III) concentration ($<100 \mu\text{g L}^{-1}$) (Challan Belval *et al.*, 2009). In all assays, pozzolana was a suitable material to immobilize CAsO1 or *Tm. arsenivorans* (Dictor *et al.*, 2003; Michon, 2006; Michel *et al.*, 2007; Challan Belval *et al.*, 2009; Michon *et al.*, 2010), as it did not interfere with As(V) adsorption and As(III) oxidation.

CAsO1 proved to be efficient at As(III) oxidation, even at low As concentrations; the consortium persisted for a long time in a continuously run bioreactor fed with As-contaminated influents.

The efficiency of this consortium was also tested by Battaglia-Brunet *et al.* (2011), using stirred reactors fed with As-rich liquors originating from a disused gold mine in Salsigne (France). An abiotic treatment with lime was followed by inoculation of CAsO1, which resulted in a decrease of the total As (t-As) concentration in the liquid phase. The As(V) produced by the biological As(III) oxidation was immediately adsorbed onto solids resulting from the lime treatment. The rate of As leaching from the solids was reduced relative to that in the abiotic treatment. Not only could the consortium be used to treat As-contaminated effluents, it could also reduce further As leaching from As-containing wastes. In Lopérec (France), Battaglia-Brunet *et al.* (2006a) sampled indigenous bacterial consortia along an As-containing mine drainage-water stream in which As(III) oxidation was observed. Laboratory experiments carried out in column reactors fed with synthetic mine water showed that the bacterial consortia oxidized As(III) and Fe(II). The As(III) removal rate reached $1900 \mu\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$. As(III)-oxidizing strains *Variovorax paradoxus* and *Leptothrix choldonii* were isolated from the bioreactor and site sludges.

Since As-contaminated influents contain indigenous bacteria, the development of a natural biofilm in the bioreactors may represent an elegant solution for As remediation. One way of using this natural biofilm – fixed on a support medium – is to use Biologically active filters (BAFs).

A BAF process was developed to treat groundwater containing Fe and Mn and supplemented with As(III). The fixed-bed filtration unit consisted of two columns filled with a filtration medium i.e. polystyrene beads (Katsoyiannis *et al.*, 2002; Katsoyiannis *et al.*, 2004). The natural biofilm, coating the filtration medium, was observed to contain Fe-oxidizing and Mn-oxidizing bacteria. The mechanism of combining Fe or Mn oxidation with chemical As(III) oxidation, allowing As to be adsorbed on the insoluble oxides formed, is widely documented (Oscarson *et al.*, 1983; Edwards, 1994; Driehaus *et al.*, 1995; Manning *et al.*, 2002). Thus, ingeniously, Katsoyiannis *et al.* (2004) transformed the abiotic reaction into a biotic mechanism. The polystyrene beads contained entrapped bacteria i.e. *Gallionella ferruginea*, *Leptothrix ochracea* – common inhabitants of freshwater iron seeps and iron-rich wetlands. In this system, which required stringently controlled dissolved-oxygen conditions, As(III) oxidation ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) was almost complete in a few minutes, suggesting that bacteria played an important role in both the oxidation of As(III) and the generation of the Mn oxides that adsorbed As(III) and As(V).

A similar fixed-bed biological filtration unit was set up in the village of Ambacourt (France) (Casiot *et al.*, 2006). In this pilot scale study, the low-oxygen ($0.4\text{--}1.4 \text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$) underground water was contaminated with Fe(II) and low As(III) concentrations ($10\text{--}40 \mu\text{g L}^{-1}$). These two elements were removed efficiently (100% for Fe, 70–90% for As) from the solution. The high-Fe oxide natural biofilm that had developed in the fixed-bed filter was sampled for As(III) oxidation

ability. The B2 bacterial strain was isolated and was able to oxidize As(III). Based on its 16S rDNA sequence, B2 belonged to a new genus showing only 95% sequence identity to *Leptothrix*. Katsoyiannis and Zouboulis (2004) suggested that *Leptothrix* strains, responsible for Fe oxidation, were also involved in As(III) oxidation.

Interestingly, Lytle *et al.* (2007) also reported, in an Ohio water treatment plant, oxidation of As(III) by naturally occurring bacteria that were concentrated in filters. Thus, natural bacterial consortia that develop in municipal and industrial wastewater treatment units, i.e. sludges, could be potential As(III)-oxidizing consortia. Andrianisa *et al.* (2006, 2008) decided to investigate the potential of activated sludges to catalyse the oxidation of As(III) in batch laboratory experiments. (In this process air or oxygen is forced into a sewage liquor to develop a biological floc.) They showed that As(III) was readily transformed to As(V) with no organic carbon source supplied and under aerobic conditions at pH 7 and 25°C. Various aerobic As(III)-oxidizing strains and one chemoautotrophic As(III)-oxidizing strain were isolated, though none was identified. Andrianisa *et al.* showed that As(III) was completely oxidized to As(V) when oxygen was supplied by an aerator in a full-scale oxidation ditch plant receiving As-contaminated water. The oxidized As(V) was then co-precipitated in a second step with Fe hydroxide. The system was efficient enough to reduce the residual As concentration in the supernatant from 200 µg L⁻¹ to less than 5 µg L⁻¹. Thus, this activated sludge-based treatment proved to be very efficient in oxidizing As(III) under the recommended MCL. Stasinakis and Thomaidis (2010) came to the same conclusion: Biological Wastewater Treatment Systems (BWTS) i.e. systems involving microorganisms, globally used to treat municipal and industrial wastewater, could be a reliable technology for the oxidation of As(III) to As(V) and its removal.

Studies of As(III)-oxidizing approaches based on pure cultures or consortia demonstrate that both are efficient. The research showed that biological As(III) oxidation systems can be performed on a wide range of As(III) concentrations. Work has been done principally on bench-scale systems and, to our knowledge, full-scale systems have not yet been implemented. Arsenic-contaminated influents can be quantitatively and qualitatively extremely variable, even for a given effluent over a short period of time, and this means that universal systems are unlikely to be feasible. Nevertheless, data collected from these experiments conducted under different operating conditions will help to develop treatment systems appropriate to local conditions.

11.2.2 *Passive remediation*

“Passive treatments” are processes with minimal human intervention and maintenance. They employ natural construction materials, promote the growth of natural vegetation and utilize naturally available energy sources e.g. microbial metabolic energy, photosynthesis and chemical energy (Pulles *et al.*, 2004). All such treatments rely on natural attenuation (NA): the combination of *in-situ* “physical, chemical, and biological processes that, under favorable conditions, act without human intervention to reduce the mass, toxicity, mobility, volume, or concentration of contaminants in soil or groundwater” (EPA, 1999). Here, we distinguish three types of NA in passive systems: “abiotic” remediation, phytoaccumulation and microbial remediation.

11.2.2.1 *“Abiotic” remediation*

Passive treatments, generally involving wetlands and oxidation ponds, are commonly used to treat mine drainage waters to remove high concentrations of metals, principally at low flow rates (less than 1000 m³ d⁻¹) and in acid conditions. They are attractive in the post-closure phase of mining, since they require only intermittent supervision, maintenance and monitoring of self-sustaining processes. They function without an external supply of power, but the treated water quality can be variable. The efficiency of pollutant removal depends on abiotic conditions, e.g. dissolved-oxygen content, pH, and the retention time of the water in the wetland. Mechanisms of removal of metals are diverse and include oxidation, precipitation, complexing, adsorption, ion exchange and uptake by plants (see next section). In aerobic wetlands, metal oxidation and hydrolysis are promoted, causing precipitation and physical retention of Fe, Al and Mn oxyhydroxides.

In the case of As, Chang *et al.* (2010) showed that bacteria isolated from wetlands could oxidize As(III) to As(V). Thus, it is reasonable to think that biological oxidation occurs *in situ* even if no direct evidence has been found. Several authors have reported t-As retention in such systems (Rahman *et al.*, 2011), i.e. the pollutant is held on adsorbent materials and not released; no information is available on the speciation of the element. In a disused gold mine in New Zealand, where no rehabilitation was undertaken after mine closure, Haffert and Craw (2010) identified As mineral phases downstream in Skippers Creek. They used these results to predict As mobility and to estimate the overall impact of the mine on the catchment water quality. Unfortunately, biological reactions were not taken into account. To date, there is little evidence to support the idea that abiotic remediation has played a significant role in remediation of any As-contaminated sites.

11.2.2.2 *Phytoaccumulation*

Phytoaccumulation of As offers a good alternative for As removal. The discovery of As accumulation by the chinese fern *Pteris vittata* (Ma *et al.*, 2001) has opened a new field for bioremediation. Various plants, including other ferns like *P. cretica*, *P. longifolia*, and *Pityrogramma calomelanos*, as well as aquatic macrophytes (Rahman and Hasegawa, 2011) have proven to be efficient at As uptake, suggesting that phytoaccumulation may be a useful component in the remediation of As-contaminated soil or water (Wang and Mulligan, 2006; Camacho, *et al.*, 2011).

The role of microorganisms in phytoaccumulation is poorly understood. A recent study (Mathews *et al.*, 2010), conducted in hydroponic conditions, showed that *P. vittata* can take up both As(III) and As(V). Regardless of which form was supplied, As(V) was dominant in the roots while As(III) was dominant in the rhizome and fronds. This study demonstrated that As(III) oxidation occurred in the growth medium, i.e. the rhizosphere, as well as in the roots of the plant: it must involve both microflora in the rhizosphere and As(III)-oxidizing enzymes directly associated with the plant.

Control of As uptake by these plants needs to be further studied. On the microbiological side, the rhizosphere bacterial community associated with these ferns certainly plays an important role in the uptake of As(III) and As(V). However, more investigations are needed to evaluate the relative importance of the As(III)-oxidizing and As(V)-reducing bacteria in the immobilization of As *via* phytoaccumulation.

11.2.2.3 *Microbial As(III) oxidation and natural attenuation*

As already mentioned, the two inorganic As species, As(III) and As(V), are the most abundant in water and soil, being released naturally from As-enriched minerals or from anthropogenic sources, including mining and smelting industries and agriculture. Depending on pH and redox conditions (Eh), oxidation of As(III) to As(V) reduces As bioavailability and thus participates in NA. As(V) can then be immobilized *via* sorption to solids such as organic matter (Grafe *et al.*, 2002; Redman *et al.*, 2002), clay minerals (Manning and Goldberg, 1996, 1997), and (hydr)oxides of Fe (Bowell, 1994; Driehaus *et al.*, 1998), Mn (Ouvrard *et al.*, 2002; Katsoyiannis *et al.*, 2004) or Al (Anderson *et al.*, 1976; Lin and Wu, 2001), and by precipitation-coagulation (Cheng *et al.*, 1994; Hering *et al.*, 1997) or phytoaccumulation (Zhao *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2009). In addition to abiotic or microbially driven indirect oxidation of As(III) by Fe(III), direct oxidation of As(III) to As(V) depends on the activity of arsenite-oxidizing bacteria and has been described for As NA in acid mine drainages (AMDs) in Japan (Wakao *et al.*, 1988) and California (Wilkie and Hering, 1998). In the latter case, colonies on the surface of the aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* (Salmassi *et al.*, 2002) contained As(III)-oxidizing bacteria, including *Agrobacterium albertimagni* AOL15 (Salmassi *et al.*, 2002) and three strains of *Hydrogenophaga* (Salmassi *et al.*, 2006).

The French site of Carnoulès (Gard, South of France), represents another good example of As NA, and has been intensely investigated using various approaches. The creek of Carnoulès drains acid mine tailings, which emerge at the surface forming the Reigous acid spring (Casiot *et al.*, 2003). The acid water (pH 2.7–3.4) is contaminated with As (100–350 mg L⁻¹), and also contains Pb and FeS₂. At the mine outlet, As(III) is the predominant form, and Fe occurs as

Fe(II). The concentration of As rapidly declines by about 95% between the source of the Reigous creek and its confluence with the river Amous, 1.5 km downstream. Linked to Fe(II) oxidation, As is co-precipitated as either As(III)-Fe(III) (mainly during the wet season) or As(V)-Fe(III) oxyhydroxysulfates (during the dry season) (Duquesne *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2003). Casiot *et al.* (2003) clearly demonstrated the active role of bacteria in this NA process. Bruneel *et al.* (2003) showed that two strains of *Thiomonas* strains from the site oxidized As(III) present in the acid mine drainage. The importance of *Thiomonas* strains in NA was confirmed by recent *in-situ* investigations (Bruneel *et al.*, 2011). A metagenomic and proteomic study (Bertin *et al.*, 2011) showed that the bacterial flora of the Carnoulès AMD is dominated by a group of seven bacterial strains, named CARN1 to CARN7. Only one (CARN2), a *Thiomonas*, had the arsenite oxidase genes *aoxA* and *aoxB* (Muller *et al.*, 2003; Lett *et al.*, 2011). The reconstruction of these strains' genomes highlighted their metabolic specificity, but also pointed towards "partnerships" among the different members of the community – several bacteria being able to fix inorganic carbon and nitrogen while others can metabolize heterotrophically. The As NA processes, including As(III)-oxidation, and As(V) immobilization by Fe and/or S co-precipitation, may be related to the As(III) oxidase activity detected in the *Thiomonas* strain (CARN2), coupled with Fe(II) oxidation and S oxidation by *Acidithiobacillus* sp. (CARN5) and the *Gallionella*-related strain (CARN7) respectively (Bertin *et al.*, 2011).

Various passive treatment systems have been used, with some success, to remove or immobilize As. They are low-cost, low-maintenance options. Current technologies for their use may be further developed in the light of knowledge gained from studies of active treatments.

11.3 CONCLUSION

All the biological water treatment systems developed to remove As take advantage of As(III) oxidation as a first step, since the As(V) formed is much more easily removed by a range of methods. In most of the As-remediation processes used at present, this oxidation step is performed with strong chemical oxidants.

Since the discovery of the first As(III)-oxidizing bacteria almost a century ago, many more such bacteria have been isolated from diverse environments, whether As-contaminated or not. We have reviewed here the systems in which the chemical oxidation step has been replaced with biological oxidation. Different biological agents have been used in different systems. Some studies have involved the use of pure bacterial cultures. These unnatural systems are normally very efficient over a wide range of As concentrations. In lab experiments, the As(III) concentrations chosen were usually high ($>1\text{--}10\text{ mg L}^{-1}$) to examine the maximum As(III) transformation rates. The oxidation was performed by free cells or by bacteria immobilized on various support media. Other laboratory studies have used consortia of bacteria from As-contaminated environments, rather than pure cultures. These consortia too are very efficient for As removal, and they are easier to scale up and transpose to field conditions than pure cultures. Moreover, studies of consortia have been able to use As(III) concentrations set at lower levels ($<1\text{ mg L}^{-1}$) to mimic conditions in streams or groundwater. So far, no work has been done directly on drinking waters containing low As concentrations. What is clear is that no single treatment process will work in all environments, so processes must be tailored to specific environmental conditions.

Emerging "natural" technologies such as wetland passive systems are specifically designed to use natural attenuation, capitalizing on ecological and geochemical reactions. Many of these systems are new and experimental but they appear particularly appropriate for the treatment of water discharged from abandoned mines. Again, however, it is difficult to predict their efficiency with a high level of confidence, since these systems are influenced by site-specific environmental conditions – water chemistry, or seasonal variability. Only limited information is available on long-term full-scale treatment processes; in fact little is known of biotic processes at all, since in most of these systems only abiotic reactions have been studied. Indeed, no bacterial community has even been described from As-contaminated passive wetland system. Promising as it seems,

the value of As(III)-oxidizing bacteria in such systems has yet to be established. In AMDs, the central role of bacteria-driven As(III) transformation has been demonstrated but only a few studies have explained the successive abiotic and biotic mechanisms resulting in the decrease of t-As. Finally, we may be sure that the As MCL of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ in drinking water will require upgrades for existing water treatment plants. The most recent As(III)-oxidizing bacteria-based remediation systems are promising at the bench scale or the pilot scale and now need to scale up to integrate existing water-supply systems. It is also important to determine the long-term performance of experimental passive treatments. Finally, these biological As remediation systems will be adopted only if we are able to demonstrate their economical viability.

ACKNOWLEDGEMENTS

FD was supported by a grant from the French Ministry of Education and Research. Financial support came from the Université de Strasbourg (Unistra), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR). This work was done in the frame of the “Groupement de Recherche—Métabolisme de l’Arsenic chez les Microorganismes (GDR2909-CNRS)” (<http://gdr2909.alsace.cnrs.fr/>).

REFERENCES

- Anderson, M.A., Ferguson, J.F. & Gavis, J.: Arsenate adsorption on amorphous aluminum hydroxide. *J. Colloid Interface Sci.* 54:3 (1976), pp. 391–399.
- Andrianisa, H.A., Ito, A., Sasaki, A., Ikeda, M., Aizawa, J. & Umita, T.: Behaviour of arsenic species in batch activated sludge process: Biotransformation and removal. *Water Sci. Technol.* 54:8 (2006), pp. 121–128.
- Andrianisa, H.A., Ito, A., Sasaki, A., Aizawa, J. & Umita, T.: Biotransformation of arsenic species by activated sludge and removal of bio-oxidised arsenate from wastewater by coagulation with ferric chloride. *Water Res.* 42:19 (2008), pp. 4809–4817.
- Battaglia-Brunet, F., Dictor, M.C., Garrido, F., Crouzet, C., Morin, D., Dekeyser, K., Clarens, M. & Baranger, P.: An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: Selection, characterization, and performance in reactors. *J. Appl. Microbiol.* 93:4 (2002), pp. 656–667.
- Battaglia-Brunet, F., Itard, Y., Garrido, F., Delorme, F., Crouzet, C., Greffie, C. & Joulian, C.: A simple biogeochemical process removing arsenic from a mine drainage water. *Geomicrobiol. J.* 23:3–4 (2006a), pp. 201–211.
- Battaglia-Brunet, F., Joulian, C., Garrido, F., Dictor, M.C., Morin, D., Coupland, K., Barrie Johnson, D., Hallberg, K.B. & Baranger, P.: Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Leeuwenhoek* 89:1 (2006b), pp. 99–108.
- Battaglia-Brunet, F., Crouzet, C., Breeze, D., Tris, H. & Morin, D.: Decreased leachability of arsenic linked to biological oxidation of As(III) in solid wastes from bioleaching liquors. *Hydrometallurgy* 107:1–2 (2011), pp. 34–39.
- Bertin, P.N., Heinrich-Salmeron, A., Pelletier, E., Goulhen-Chollet, F., Arsène-Ploetze, F., Gallien, S., Lauga, B., Casiot, C., Calteau, A., Vallenet, D., Bonnefoy, V., Bruneel, O., Chane-Woon-Ming, B., Cleiss-Arnold, J., Duran, R., Elbaz-Poulichet, F., Fonknechten, N., Giloteaux, L., Halter, D., Koechler, S., Marchal, M., Mornico, D., Schaeffer, C., Smith, A.A.T., Van Dorsseleer, A., Weissenbach, J., Médigue, C. & Le Paslier, D.: Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *ISME J.* (2011).
- Bhumbla, D.K. & Keefer, R.F. (1994) *Arsenic in the environment Part I: Cycling and characterization*. Nriagu J.O. (ed), pp. 51–82, Wiley-Interscience, New York.
- Bowell, R.J.: Sorption of arsenic by iron oxides and oxyhydroxides in soils. *Appl. Geochem.* 9:3 (1994), pp. 279–286.
- Brown, J.C.: Biological treatments of drinking water. *The bridge* 37:4 (2007), pp. 30–36.
- Bruneel, O., Personné, J.C., Casiot, C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., Mahler, B.J., Le Flèche, A. & Grimont, P.A.D.: Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoulès, France). *J. Appl. Microbiol.* 95:3 (2003), pp. 492–499.

- Bruneel, O., Volant, A., Gallien, S., Chaumande, B., Casiot, C., Carapito, C., Bardil, A., Morin, G., Brown Jr., G.E., Personné, C.J., Le Paslier, D., Schaeffer, C., van Dorsselaer, A., Bertin, P.N., Elbaz-Poulichet, F. & Arsène-Ploetze, F.: Characterization of the active bacterial community involved in natural attenuation processes in arsenic-rich creek sediments. *Microb. Ecol.* 61:4 (2011), pp. 793–810.
- Camacho, L.M., Gutiérrez, M., Alarcon-Herrera, M.T., Villalba, M.D.L. & Deng, S.: Occurrence and treatment of arsenic in groundwater and soil in northern Mexico and southwestern USA. *Chemosphere* 83:3 (2011), pp. 211–225.
- Casiot, C., Morin, G., Juillot, F., Bruneel, O., Personné, J.C., Leblanc, M., Duquesne, K., Bonnefoy, V. & Elbaz-Poulichet, F.: Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France). *Water Res.* 37:12 (2003), pp. 2929–2936.
- Casiot, C., Pedron, V., Bruneel, O., Duran, R., Personné, J.C., Grapin, G., Drakidès, C. & Elbaz-Poulichet, F.: A new bacterial strain mediating As oxidation in the Fe-rich biofilm naturally growing in a groundwater Fe treatment pilot unit. *Chemosphere* 64:3 (2006), pp. 492–496.
- Challan Belval, S., Garnier, F., Michel, C., Chautard, S., Breeze, D. & Garrido, F.: Enhancing pozzolana colonization by As(III)-oxidizing bacteria for bioremediation purposes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:3 (2009), pp. 565–573.
- Chang, J.S., Yoon, I.H., Lee, J.H., Kim, K.R., An, J. & Kim, K.W.: Arsenic detoxification potential of aox genes in arsenite-oxidizing bacteria isolated from natural and constructed wetlands in the Republic of Korea. *Environ. Geochem. Health* 32:2 (2010), pp. 95–105.
- Cheng, R.C., Liang, S., Wang, H.-C. & Beuhler, M.D.: Enhanced coagulation for arsenic removal. *J. Am. Water Works Assoc.* 86:9 (1994), pp. 79–90.
- Cullen, W.R. & Reimer, K.J.: Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* 89:4 (1989), pp. 713–764.
- Dastidar, A. & Wang, Y.T.: Arsenite oxidation by batch cultures of *Thiomonas arsenivorans* strain b6. *J. Environ. Eng.* 135:8 (2009), pp. 708–715.
- Dastidar, A. & Wang, Y.T.: Kinetics of arsenite oxidation by chemoautotrophic *Thiomonas arsenivorans* strain b6 in a continuous stirred tank reactor. *J. Environ. Eng.* 136:10 (2010), pp. 1119–1127.
- Dictor, M.C., Battaglia-Brunet, F., Garrido, F. & Baranger, P.: Arsenic oxidation capabilities of a chemoautotrophic bacterial population: Use for the treatment of an arsenic contaminated wastewater. *J. Phys.* 107:1 (2003), pp. 377–380.
- Dixit, S. & Hering, J.G.: Comparison of arsenic(V) and arsenic(III) sorption onto iron oxide minerals: Implications for arsenic mobility. *Environ. Sci. Technol.* 37:18 (2003), pp. 4182–4189.
- Driehaus, W., Seith, R. & Jekel, M.: Oxidation of arsenate(III) with manganese oxides in water treatment. *Water Res.* 29:1 (1995), pp. 297–305.
- Driehaus, W., Jekel, M. & Hildebrandt, U.: Granular ferric hydroxide – A new adsorbent for the removal of arsenic from natural water. *J. Water Supply Res. Technol. AQUA* 47:1 (1998), pp. 30–35.
- Duquesne, K., Lebrun, S., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., Morin, G. & Bonnefoy, V.: Immobilization of arsenite and ferric Iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to Acid Mine Drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:10 (2003), pp. 6165–6173.
- Duquesne, K. *Rôle des bactéries dans la bioremédiation de l'arsenic dans les eaux acides de drainage de la mine de Carnoulès*. PhD Thesis, Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, Marseille, France, 2004.
- Edwards, M.: Chemistry of arsenic removal during coagulation and Fe-Mn oxidation. *J. Am. Water Works Assoc.* 86:9 (1994), pp. 64–78.
- EPA (1999) *Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites*. Office of Solid Waste and Emergency Response, Directive Number 9200, pp. 4–17.
- Fisher, J.C. & Hollibaugh, J.T.: Selenate-dependent anaerobic arsenite oxidation by a bacterium from Mono Lake, California. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:9 (2008), pp. 2588–2594.
- Goldberg, S.: Competitive adsorption of arsenate and arsenite on oxides and clay minerals. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66:2 (2002), pp. 413–421.
- Grafe, M., Eick, M.J., Grossl, P.R. & Saunders, A.M.: Adsorption of arsenate and arsenite on ferrihydrite in the presence and absence of dissolved organic carbon. *J. Environ. Qual.* 31:4 (2002), pp. 1115–1123.
- Haffert, L. & Craw, D.: Geochemical processes influencing arsenic mobility at Bullendale historic gold mine, Otago, New Zealand. *New Zeal. J. Geol. Geophys.* 53:2–3 (2010), pp. 129–142.
- Hering, J.G., Chen, P.Y., Wilkie, J.A. & Elimelech, M.: Arsenic removal from drinking water during coagulation. *J. Environ. Eng.* 123:8 (1997), pp. 800–807.
- Hoef, S.E., Blum, J.S., Stolz, J.F., Tabita, F.R., Witte, B., King, G.M., Santini, J.M. & Oremland, R.S.: *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arsenite-oxidizing haloalkaliphilic gammaproteobacterium capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:3 (2007), pp. 504–512.

- Ike, M., Miyazaki, T., Yamamoto, N., Sei, K. & Soda, S.: Removal of arsenic from groundwater by arsenite-oxidizing bacteria. *Water Sci. Technol.* 58:5 (2008), pp. 1095–1100.
- Inskip, W.P., Macur, R.E., Hamamura, N., Warelow, T.P., Ward, S.A. & Santini, J.M.: Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environ. Microbiol.* 9:4 (2007), pp. 934–943.
- Jiang, J.Q.: Removing arsenic from groundwater for the developing world – A review. *Water Sci. Technol.* 44:6 (2001), pp. 89–98.
- Kasai, Y., Takahata, Y., Manefield, M. & Watanabe, K.: RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5 (2006), pp. 3586–3592.
- Katsoyiannis, I., Zouboulis, A., Althoff, H. & Bartel, H.: As(III) removal from groundwaters using fixed-bed upflow bioreactors. *Chemosphere* 47:3 (2002), pp. 325–332.
- Katsoyiannis, I.A. & Zouboulis, A.I.: Biological treatment of Mn(II) and Fe(II) containing groundwater: kinetic considerations and product characterization. *Water Res.* 38:7 (2004), pp. 1922–1932.
- Katsoyiannis, I.A., Zouboulis, A.I. & Jekel, M.: Kinetics of bacterial As(III) oxidation and subsequent As(V) removal by sorption onto biogenic manganese oxides during groundwater treatment. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 43:2 (2004), pp. 486–493.
- Kim, M.J. & Nriagu, J.: Oxidation of arsenite in groundwater using ozone and oxygen. *Sci. Total Environ.* 247:1 (2000), pp. 71–79.
- Lett, M.-C., Muller, D., Lièvremon, D., Silver, S. & Santini, J.M.: Unified nomenclature for genes involved in prokaryotic aerobic arsenite oxidation. *J. Bacteriol.* (2011).
- Lièvremon, D., N'Negue, M.A., Behra, P. & Lett, M.C.: Biological oxidation of arsenite: Batch reactor experiments in presence of kutnahorite and chabazite. *Chemosphere* 51:5 (2003), pp. 419–428.
- Lin, T.F. & Wu, J.K.: Adsorption of arsenite and arsenate within activated alumina grains: Equilibrium and kinetics. *Water Res.* 35:8 (2001), pp. 2049–2057.
- Lin, Z. & Puls, R.W.: Adsorption, desorption and oxidation of arsenic affected by clay minerals and aging process. *Environ. Geol.* 39:7 (2000), pp. 753–759.
- Lugtu, R.T., Choi, S.C. & Oh, Y.S.: Arsenite oxidation by a facultative chemolithotrophic bacterium SDB1 isolated from mine tailing. *J. Microbiol.* 47:6 (2010), pp. 686–692.
- Lytle, D.A., Chen, A.S., Sorg, T.J., Phillips, S. & French, K.: Microbial As(III) oxidation in water treatment plant filters. *J. Am. Water Works Assoc.* 99:12 (2007), pp. 72–86.
- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y. & Kennelley, E.D.: A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409:6820 (2001), p. 579.
- Manning, B.A. & Goldberg, S.: Modeling arsenate competitive adsorption on kaolinite, montmorillonite and illite. *Clay. Clay Miner.* 44:5 (1996), pp. 609–623.
- Manning, B.A. & Goldberg, S.: Adsorption and stability of arsenic(III) at the clay mineral-water interface. *Environ. Sci. Technol.* 31:7 (1997), pp. 2005–2011.
- Manning, B.A., Fendorf, S.E., Bostick, B. & Suarez, D.L.: Arsenic(III) oxidation and arsenic(V) adsorption reactions on synthetic birnessite. *Environ. Sci. Technol.* 36:5 (2002), pp. 976–981.
- Mathews, S., Ma, L.Q., Rathinasabapathi, B., Natarajan, S. & Saha, U.K.: Arsenic transformation in the growth media and biomass of hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Bioresource Technology* 101:21 (2010), pp. 8024–8030.
- Michel, C., Jean, M., Coulon, S., Dictor, M.C., Delorme, F., Morin, D. & Garrido, F.: Biofilms of As(III)-oxidising bacteria: Formation and activity studies for bioremediation process development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:2 (2007), pp. 457–467.
- Michon, J. *Etude de l'oxydation biologique de l'arsenic As(III) par le consortium bactérien CAsO1: mise au point de méthodes de détection et application à la détoxification d'effluents*. PhD Thesis, Université de Limoges, Limoges, 2006.
- Michon, J., Dagot, C., Deluchat, V., Dictor, M.C., Battaglia-Brunet, F. & Baudu, M.: As(III) biological oxidation by CAsO1 consortium in fixed-bed reactors. *Process Biochem.* 45:2 (2010), pp. 171–178.
- Mohan, D. & Pittman, J.C.U.: Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents—A critical review. *J. Hazard. Mater.* 142:1–2 (2007), pp. 1–53.
- Mokashi, S.A. & Paknikar, K.M.: Arsenic (III) oxidizing *Microbacterium lacticum* and its use in the treatment of arsenic contaminated groundwater. *Lett. Appl. Microbiol.* 34:4 (2002), pp. 258–262.
- Mondal, P., Majumder, C.B. & Mohanty, B.: Treatment of arsenic contaminated water in a laboratory scale up-flow bio-column reactor. *J. Hazard. Mater.* 153:1–2 (2008), pp. 136–145.
- Morin, G., Juillot, F., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.C., Elbaz-Poulichet, F., Leblanc, M., Ildefonse, P. & Calas, G.: Bacterial formation of tooeleite and Mixed Arsenic(III) or Arsenic(V) – Iron(III) gels in the

- carnoulès acid mine drainage, France. A XANES, XRD, and SEM study. *Environ. Sci. Technol.* 37:9 (2003), pp. 1705–1712.
- Muller, D., Lièvreumont, D., Simeonova, D.D., Hubert, J.C. & Lett, M.C.: Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant β -proteobacterium. *J. Bacteriol.* 185:1 (2003), pp. 135–141.
- Oremland, R.S., Hoefl, S.E., Santini, J.M., Bano, N., Hollibaugh, R.A. & Hollibaugh, J.T.: Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:10 (2002), pp. 4795–4802.
- Oremland, R.S., Kulp, T.R., Blum, J.S., Hoefl, S.E., Baesman, S., Miller, L.G. & Stolz, J.F.: Microbiology: A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment. *Science* 308:5726 (2005), pp. 1305–1308.
- Osborne, T.H., Jamieson, H.E., Hudson-Edwards, K.A., Nordstrom, D.K., Walker, S.R., Ward, S.A. & Santini, J.M.: Microbial oxidation of arsenite in a subarctic environment: Diversity of arsenite oxidase genes and identification of a psychrotolerant arsenite oxidiser. *BMC Microbiol.* 10 (2010).
- Oscarson, D.W., Huang, P.M., Liaw, W.K. & Hammer, U.T.: Kinetics of oxidation of arsenite by various manganese dioxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47:4 (1983), pp. 644–648.
- Ouvrard, S., Simonnot, M.O., De Donato, P. & Sardin, M.: Diffusion-controlled adsorption of arsenate on a natural manganese oxide. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 41:24 (2002), pp. 6194–6199.
- Pulles, W., Rose, P., Coetsier, L. & Heath, R.: Development of integrated passive water treatment systems for the treatment of mine waters. *AusIMM Bulletin* (1) (2004), pp. 58–63.
- Rahman, K.Z., Wiessner, A., Kusch, P., van Afferden, M., Mattusch, J. & Muller, R.A.: Fate and distribution of arsenic in laboratory-scale subsurface horizontal-flow constructed wetlands treating an artificial wastewater. *Ecol. Eng.* 37:8 (2011), pp. 1214–1224.
- Rahman, M.A. & Hasegawa, H.: Aquatic arsenic: Phytoremediation using floating macrophytes. *Chemosphere* 83:5 (2011), pp. 633–646.
- Redman, A.D., Macalady, D.L. & Ahmann, D.: Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. *Environ. Sci. Technol.* 36:13 (2002), pp. 2889–2896.
- Reinhold-Hurek, B. & Hurek, T.: The genera *Azoarcus*, *Azovibrio*, *Azospira* and *Azonexus*. *Prokaryotes* 5 (2006), pp. 873–891.
- Rhine, E.D., Phelps, C.D. & Young, L.Y.: Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. *Environ. Microbiol.* 8:5 (2006), pp. 899–908.
- Ryan, M.P., Pembroke, J.T. & Adley, C.C.: *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: Potential and applications. *J. Appl. Microbiol.* 103:4 (2007), pp. 754–764.
- Salmassi, T.M., Venkateswaren, K., Satomi, M., Nealson, K.H., Newman, D.K. & Hering, J.G.: Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiol. J.* 19:1 (2002), pp. 53–66.
- Salmassi, T.M., Walker, J.J., Newman, D.K., Leadbetter, J.R., Pace, N.R. & Hering, J.G.: Community and cultivation analysis of arsenite oxidizing biofilms at Hot Creek. *Environ. Microbiol.* 8:1 (2006), pp. 50–59.
- Santini, J.M., Sly, L.I., Schnagl, R.D. & Macy, J.M.: A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: Phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1 (2000), pp. 92–97.
- Simeonova, D.D., Micheva, K., Muller, D.A.E., Lagarde, F., Lett, M.C., Groudeva, V.I. & Lièvreumont, D.: Arsenite oxidation in batch reactors with alginate-immobilized ULPAs1 strain. *Biotechnol. Bioeng.* 91:4 (2005), pp. 441–446.
- Smedley, P.L. & Kinniburgh, D.G.: A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17:5 (2002), pp. 517–568.
- Stasinakis, A.S. & Thomaidis, N.S.: Fate and biotransformation of metal and metalloid species in biological wastewater treatment processes. *Crit. Rev. Environ. Sci. Tech.* 40:4 (2010), pp. 307–364.
- Stolz, J.F., Basu, P., Santini, J.M. & Oremland, R.S.: Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 60 (2006), pp. 107–130.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. & Costerton, J.W.: Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56 (2002), pp. 187–209.
- Sun, W., Sierra, R. & Field, J.A.: Anoxic oxidation of arsenite linked to denitrification in sludges and sediments. *Water Res.* 42:17 (2008), pp. 4569–4577.
- Sun, W., Sierra-Alvarez, R., Fernandez, N., Sanz, J.L., Amils, R., Legatzki, A., Maier, R.M. & Field, J.A.: Molecular characterization and *in situ* quantification of anoxic arsenite-oxidizing denitrifying enrichment cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68:1 (2009a), pp. 72–85.

- Sun, W., Sierra-Alvarez, R., Milner, L., Oremland, R. & Field, J.A.: Arsenite and ferrous iron oxidation linked to chemolithotrophic denitrification for the immobilization of arsenic in anoxic environments. *Environ. Sci. Technol.* 43:17 (2009b), pp. 6585–6591.
- Sun, W., Sierra-Alvarez, R. & Field, J.A.: The role of denitrification on arsenite oxidation and arsenic mobility in an anoxic sediment column model with activated alumina. *Biotechnol. Bioeng.* 107:5 (2010a), pp. 786–794.
- Sun, W., Sierra-Alvarez, R., Hsu, I., Rowlette, P. & Field, J.A.: Anoxic oxidation of arsenite linked to chemolithotrophic denitrification in continuous bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 105:5 (2010b), pp. 909–917.
- Sun, W., Sierra-Alvarez, R., Milner, L. & Field, J.A.: Anaerobic oxidation of arsenite linked to chlorate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:20 (2010c), pp. 6804–6811.
- Sun, W., Sierra-Alvarez, R. & Field, J.A.: Long term performance of an arsenite-oxidizing-chlorate-reducing microbial consortium in an upflow anaerobic sludge bed (UASB) bioreactor. *Bioresource Technology* 102:8 (2011), pp. 5010–5016.
- Suttigarn, A. & Wang, Y.T.: Arsenite oxidation by *Alcaligenes faecalis* strain O1201. *J. Environ. Eng.* 131:9 (2005), pp. 1293–1301.
- Szaleniec, M., Hagel, C., Menke, M., Nowak, P., Witko, M. & Heider, J.: Kinetics and mechanism of oxygen-independent hydrocarbon hydroxylation by ethylbenzene dehydrogenase. *Biochemistry* 46:25 (2007), pp. 7637–7646.
- Teitzel, G.M. & Parsek, M.R.: Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4 (2003), pp. 2313–2320.
- Wakao, N., Koyatsu, H., Komai, Y., Shimokawara, H., Sakurai, Y. & Shiota, H.: Microbial oxidation of arsenite and occurrence of arsenite-oxidizing bacteria in acid mine water from a sulfur-pyrite mine. *Geomicrobiol. J.* 6 (1988), pp. 11–24.
- Wan, J., Klein, J., Simon, S., Joulain, C., Dictor, M.C., Deluchat, V. & Dagot, C.: As(III) oxidation by *Thiomonas arsenivorans* in up-flow fixed-bed reactors coupled to As sequestration onto zero-valent iron-coated sand. *Water Res.* 44:17 (2010), pp. 5098–5108.
- Wang, S. & Mulligan, C.N.: Natural attenuation processes for remediation of arsenic contaminated soils and groundwater. *J. Hazard. Mater.* 138:3 (2006), pp. 459–470.
- Wang, Y.T. & Suttigarn, A.: Arsenite oxidation by *Alcaligenes faecalis* strain O1201 in a continuous-flow bioreactor. *J. Environ. Eng.* 133:5 (2007), pp. 471–476.
- Wang, Y.T., Suttigarn, A. & Dastidar, A.: Arsenite oxidation by immobilized cells of *Alcaligenes faecalis* strain O1201 in a fluidized-bed reactor. *Water Environ. Res.* 81:2 (2009), pp. 173–177.
- Weeger, W., Lièvremon, D., Perret, M., Lagarde, F., Hubert, J.C., Leroy, M. & Lett, M.C.: Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *BioMetals* 12:2 (1999), pp. 141–149.
- WHO (2005) *Chlorate and chlorite in drinking water: Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality*. World Health Organisation, WHO/SDE/WSH/05.08/86, p. 23
- Wilkie, J.A. & Hering, J.G.: Rapid oxidation of geothermal arsenic(III) in streamwaters of the eastern Sierra Nevada. *Environ. Sci. Technol.* 32:5 (1998), pp. 657–662.
- Xie, Q.E., Yan, X.L., Liao, X.Y. & Li, X.: The arsenic hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. *Environ. Sci. Technol.* 43:22 (2009), pp. 8488–8495.
- Yang, C., Xu, L., Yan, L. & Xu, Y.: Construction of a genetically engineered microorganism with high tolerance to arsenite and strong arsenite oxidative ability. *J. Environ. Sci. Health – Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 45:6 (2010), pp. 732–737.
- Zhao, F.J., Dunham, S.J. & McGrath, S.P.: Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytologist* 156:1 (2002), pp. 27–31.

Partie 6 :

Bibliographie

A. RÉFÉRENCES

A

Abell, G.C.J., and Bowman, J.P. (2005) Colonization and community dynamics of class *Flavobacteria* on diatom detritus in experimental mesocosms based on Southern Ocean seawater. *FEMS Microbiology Ecology* **53**: 379-391.

Ackert Jr, L.T. (2007) The "cycle of life" in ecology: Sergei Vinogradskii's Soil Microbiology, 1885-1940. *Journal of the History of Biology* **40**: 109-145.

Amylase, T., Richardson, T.H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M. et al. (2002) A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable α -amylase. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 26501-26507.

Arsène-Ploetze, F., Koechler, S., Marchal, M., Coppée, J.Y., Chandler, M., Bonnefoy, V. et al. (2010) Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. genome. *PLoS Genetics* **6**: art. e1000859.

B

Baker, B.J., and Banfield, J.F. (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology* **44**: 139-152.

Baker, G.C., Smith, J.J., and Cowan, D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* **55**: 541-555.

Battaglia-Brunet, F., Joulain, C., Garrido, F., Dictor, M.C., Morin, D., Coupland, K. et al. (2006) Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **89**: 99-108.

Beijerinck, M.W. (1901) Über oligonitrophile Mikroben. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung II* **7**: 190-217.

Beijerinck, M.W. (1904) Phénomènes de réduction produits par les microbes. *Archiv für Néerland Science (Sect. 2)* **9**: 131-157.

Beja, O., Aravind, L., Koonin, E.V., Suzuki, M.T., Hadd, A., Nguyen, L.P. et al. (2000) Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**: 1902-1906.

Bertin, P.N., Heinrich-Salmeron, A., Pelletier, E., Goulhen-Chollet, F., Arsène-Ploetze, F., Gallien, S. et al. (2011) Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *ISME Journal* **5**: 1735-1747.

Böer, S.I., Hedtkamp, S.I.C., Van Beusekom, J.E.E., Fuhrman, J.A., Boetius, A., and Ramette, A. (2009) Time- and sediment depth-related variations in bacterial diversity and community structure in subtidal sands. *ISME Journal* **3**: 780-791.

Bollmann, A., Lewis, K., and Epstein, S.S. (2007) Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 6386-6390.

Bollmann, A., Palumbo, A.V., Lewis, K., and Epstein, S.S. (2010) Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 7413-7419.

Bomar, L., Maltz, M., Colston, S., and Graf, J. (2011) Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. *mBio* **2**: (2).

Bond, P.L., Druschel, G.K., and Banfield, J.F. (2000) Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4962-4971.

Bowen, J.L., Ward, B.B., Morrison, H.G., Hobbie, J.E., Valiela, I., Deegan, L.A., and Sogin, M.L. (2011) Microbial community composition in sediments resists perturbation by nutrient enrichment. *ISME Journal* **5**: 1540-1548.

Brazelton, W.J., Ludwig, K.A., Sogin, M.L., Andreishcheva, E.N., Kelley, D.S., Shen, C.C. et al. (2010) Archaea and bacteria with surprising microdiversity show shifts in dominance over 1,000-year time scales in hydrothermal chimneys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 1612-1617.

Brocks, J.J., Logan, G.A., Buick, R., and Summons, R.E. (1999) Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* **285**: 1033-1036.

Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Joyner, D.C., Baek, S.M., Larsen, J.T., Andersen, G.L. et al. (2006) Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 6288-6298.

Bruneel, O., Duran, R., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., and Personné, J.C. (2006) Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoulès, France. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 551-556.

- Bruneel, O., Duran, R., Koffi, K., Casiot, C., Fourçans, A., Elbaz-Poulichet, F., and Personné, J.C. (2005) Microbial diversity in a pyrite-rich tailings impoundment (Carnoulès, France). *Geomicrobiology Journal* **22**: 249-257.
- Bruneel, O., Personné, J.C., Casiot, C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., Mahler, B.J. et al. (2003) Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoulès, France). *Journal of Applied Microbiology* **95**: 492-499.
- Bruneel, O., Pascault, N., Egal, M., Bancon-Montigny, C., Goñi-Urriza, M.S., Elbaz-Poulichet, F. et al. (2008) Archaeal diversity in a Fe-As rich acid mine drainage at Carnoulès (France). *Extremophiles* **12**: 563-571.
- Bruneel, O., Volant, A., Gallien, S., Chaumande, B., Casiot, C., Carapito, C. et al. (2011) Characterization of the active bacterial community involved in natural attenuation processes in arsenic-rich creek sediments. *Microbial Ecology* **61**: 793-810.
- Bruns, A., Cypionka, H., and Overmann, J. (2002) Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3978-3987.
- Bruns, A., Nübel, U., Cypionka, H., and Overmann, J. (2003) Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1980-1989.
- Bryan, C.G., Marchal, M., Battaglia-Brunet, F., Kugler, V., Lemaitre-Guillier, C., Lièvremon, D. et al. (2009) Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: Differences revealed diverse adaptation processes. *BMC Microbiology* **9**: art. 127.
- Burke, C., Steinberg, P., Rusch, D., Kjelleberg, S., and Thomas, T. (2011) Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 14288-14293.
- Burmølle, M., Johnsen, K., Al-Soud, W.A., Hansen, L.H., and Sørensen, S.J. (2009) The presence of embedded bacterial pure cultures in agar plates stimulate the culturability of soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **79**: 166-173.
- Button, D.K. (1991) Biochemical basis for whole-cell uptake kinetics: Specific affinity, oligotrophic capacity, and the meaning of the Michaelis constant. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 2033-2038.

C

Campbell, B.J., Yu, L., Heidelberg, J.F., and Kirchman, D.L. (2011) Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 12776-12781.

Carlin, A., Shi, W., Dey, S., and Rosen, B.P. (1995) The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *Journal of Bacteriology* **177**: 981-986.

Carter, D.E., Aposhian, H.V., and Gandolfi, A.J. (2003) The metabolism of inorganic arsenic oxides, gallium arsenide, and arsine: A toxicochemical review. *Toxicology and Applied Pharmacology* **193**: 309-334.

Casiot, C., Morin, G., Juillot, F., Bruneel, O., Personné, J.C., Leblanc, M. et al. (2003) Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France). *Water Research* **37**: 2929-2936.

Charlet, L., and Polya, D.A. (2006) Arsenic in shallow, reducing groundwaters in Southern Asia: An environmental health disaster. *Elements* **2**: 91-96.

Chow, V., Nong, G., and Preston, J.F. (2007) Structure, function, and regulation of the aldouronate utilization gene cluster from *Paenibacillus* sp. strain JDR-2. *Journal of Bacteriology* **189**: 8863-8870.

Coleri, A., Cokmus, C., Ozcan, B., Akkoc, N., and Akcelik, M. (2009) Isolations of α -glucosidase-producing thermophilic bacilli from hot springs of Turkey. *Microbiology* **78**: 56-66.

Comeau, A.M., Li, W.K.W., Tremblay, J.É., Carmack, E.C., and Lovejoy, C. (2011) Arctic ocean microbial community structure before and after the 2007 record sea ice minimum. *PLoS ONE* **6**: art. e27492.

Conn, H.J. (1918) The microscopic study of bacteria and fungi in soil. *N. Y. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* **64**: 3-20.

Connon, S.A., and Giovannoni, S.J. (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3878-3885.

Curtis, T.P., and Sloan, W.T. (2005) Exploring microbial diversity - A vast below. *Science* **309**: 1331-1333.

D

D'Onofrio, A., Crawford, J.M., Stewart, E.J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S. et al. (2010) Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chemistry & Biology* **17**: 254-264.

Davis, K.E.R., Joseph, S.J., and Janssen, P.H. (2005) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 826-834.

Davis, K.E.R., Sangwan, P., and Janssen, P.H. (2011) *Acidobacteria*, *Rubrobacteridae* and *Chloroflexi* are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. *Environmental Microbiology* **13**: 798-805.

De Wit, R., and Bouvier, T. (2006) 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology* **8**: 755-758.

Delavat, F., Lett, M.C., and Lièvreumont, D. (2012a) Remediation using arsenite-oxidizing bacteria. In *The metabolism of arsenite*. Santini, J.M., and Ward, S.A. (eds): CRC Press, pp. 145-159.

Delavat, F., Lett, M.C., and Lièvreumont, D. (2012b) Novel and unexpected bacterial diversity in an arsenic-rich ecosystem revealed by culture-dependent approaches. *Biology Direct*. (accepté).

Delavat, F., Phalip, V., Forster, A., Lett, M.C., and Lièvreumont, D. (2012c) Deciphering the role of *Paenibacillus* strain Q8 in the organic matter recycling in the acid mine drainage of Carnoulès. *Microbial Cell Factories* **11**: art. 16.

Delavat, F., Phalip, V., Forster, A., Plewniak, F., Lett, M.C., and Lièvreumont, D. (2012d) Amylases without known homologues discovered in an acid mine drainage: Significance and impact. *Scientific Reports* **2**: art. 354.

Delmont, T.O., Robe, P., Cecillon, S., Clark, I.M., Constancias, F., Simonet, P. et al. (2011) Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 1315-1324.

Denef, V.J., Mueller, R.S., and Banfield, J.F. (2010) AMD biofilms: Using model communities to study microbial evolution and ecological complexity in nature. *ISME Journal* **4**: 599-610.

Dunn, G.A., and Jones, G.E. (2004) Cell motility under the microscope: Vorsprung durch technik. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 667-672.

Duquesne, K., Lieutaud, A., Ratouchniak, J., Yarzábal, A., and Bonnefoy, V. (2007) Mechanisms of arsenite elimination by *Thiomonas* sp. isolated from Carnoulès acid mine drainage. *European Journal of Soil Biology* **43**: 351-355.

Duquesne, K., Lieutaud, A., Ratouchniak, J., Muller, D., Lett, M.C., and Bonnefoy, V. (2008) Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: From the strain isolation to the gene study. *Environmental Microbiology* **10**: 228-237.

Duquesne, K., Lebrun, S., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.C., Leblanc, M. et al. (2003) Immobilization of arsenite and ferric iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6165-6173.

Dworkin, J., and Shah, I.M. (2010) Exit from dormancy in microbial organisms. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 890-896.

E

Egal, M., Casiot, C., Morin, G., Elbaz-Poulichet, F., Cordier, M.A., and Bruneel, O. (2010) An updated insight into the natural attenuation of As concentrations in Reigous Creek (southern France). *Applied Geochemistry* **25**: 1949-1957.

Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J., and Fry, J.C. (2003) Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3223-3230.

F

Falcón, L.I., Magallón, S., and Castillo, A. (2010) Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast. *ISME Journal* **4**: 777-783.

Farrelly, V., Rainey, F.A., and Stackebrandt, E. (1995) Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 2798-2801.

Farris, M.H., and Olson, J.B. (2007) Detection of *Actinobacteria* cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Letters in Applied Microbiology* **45**: 376-381.

Feinstein, L.M., Woo, J.S., and Blackwood, C.B. (2009) Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 5428-5433.

Fenchel, T., and Finlay, B.J. (2004) The ubiquity of small species: Patterns of local and global diversity. *BioScience* **54**: 777-784.

Ferrari, B.C., and Gillings, M.R. (2009) Cultivation of fastidious bacteria by viability staining and micromanipulation in a soil substrate membrane system. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3352-3354.

Ferrari, B.C., Binnerup, S.J., and Gillings, M. (2005) Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8714-8720.

Finlay, B.J. (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**: 1061-1063.

Fischer, S.G., and Lerman, L.S. (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* **16**: 191-200.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R. et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-521.

Frostegård, Å., Courtois, S., Ramière, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F. et al. (1999) Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5409-5420.

Fuhrman, J.A. (2009) Microbial community structure and its functional implications. *Nature* **459**: 193-199.

Fuhrman, J.A., Hewson, I., Schwalbach, M.S., Steele, J.A., Brown, M.V., and Naeem, S. (2006) Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 13104-13109.

G

Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J. (2005) Microbiology: Computational improvements reveal great bacterial diversity and high toxicity in soil. *Science* **309**: 1387-1390.

Gardères, J., Taupin, L., Saïdin, J.B., Dufour, A., and Le Pennec, G. (2012) N-acyl homoserine lactone production by bacteria within the sponge *Suberites domuncula* (Olivi, 1792) (*Porifera, Demospongiae*). *Marine Biology*: 1-8. (Sous presse).

Gest, H. (2004) The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes and Records of the Royal Society* **58**: 187-201.

Gilbert, J.A., Steele, J.A., Caporaso, J.G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B. et al. (2012) Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME Journal* **6**: 298-308.

Gobet, A., Böer, S.I., Huse, S.M., van Beusekom, J.E.E., Quince, C., Sogin, M.L. et al. (2011) Diversity and dynamics of rare and of resident bacterial populations in coastal sands. *ISME Journal* **6**: 542-553.

Graham, J.E., Clark, M.E., Nadler, D.C., Huffer, S., Chokhawala, H.A., Rowland, S.E. et al. (2011) Identification and characterization of a multidomain hyperthermophilic cellulase from an archaeal enrichment. *Nature Communications* **2**: art. 375.

H

Haas, L.F. (1991) Girolamo Fracastoro 1484-1553. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* **54**: 855.

Halter, D., Casiot, C., Heipieper, H.J., Plewniak, F., Marchal, M., Simon, S. et al. (2012a) Surface properties and intracellular speciation revealed an original adaptive mechanism to arsenic in the acid mine drainage bio-indicator *Euglena mutabilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**: 1735-1744.

Halter, D., Goulhen-Chollet, F., Gallien, S., Casiot, C., Hamelin, J., Gilard, F. et al. (2012b) *In situ* proteo-metabolomics reveals metabolite secretion by the acid mine drainage bio-indicator, *Euglena mutabilis*. *ISME Journal* **6**: 1391-1402.

Hamaki, T., Suzuki, M., Fudou, R., Jojima, Y., Kajiura, T., Tabuchi, A. et al. (2005) Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**: 485-492.

Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., and Goodman, R.M. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry and Biology* **5**: R245-R249.

Hansen, M.C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., and Molin, S. (1998) Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiology Ecology* **26**: 141-149.

Harada, K.M., Tanaka, K., Fukuda, Y., Hashimoto, W., and Murata, K. (2005) Degradation of rice bran hemicellulose by *Paenibacillus* sp. strain HC1: Gene cloning, characterization and function of β -D-glucosidase as an enzyme involved in degradation. *Archives of Microbiology* **184**: 215-224.

Healy, F.G., Ray, R.M., Aldrich, H.C., Wilkie, A.C., Ingram, L.O., and Shanmugam, K.T. (1995) Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial

consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**: 667-674.

Heath, C., Xiao, P.H., Cary, S.C., and Cowan, D. (2009) Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from antarctic desert soil. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 4657-4659.

Hill, J.E., Town, J.R., and Hemmingsen, S.M. (2006) Improved template representation in cpn 60 polymerase chain reaction (PCR) product libraries generated from complex templates by application of a specific mixture of PCR primers. *Environmental Microbiology* **8**: 741-746.

Hobel, C.F.V., Marteinson, V.T., Hauksdóttir, S., Fridjónsson, Ó.H., Skírnisdóttir, S., Hreggvidsson, G.Ó., and Kristjánsson, J.K. (2004) Use of low nutrient enrichments to access novel amylase genes in silent diversity of thermophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**: 801-809.

Hoeft, S.E., Blum, J.S., Stolz, J.F., Tabita, F.R., Witte, B., King, G.M. et al. (2007) *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arsenite-oxidizing haloalkaliphilic *gammaproteobacterium* capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 504-512.

Hong, S., Bunge, J., Leslin, C., Jeon, S., and Epstein, S.S. (2009) Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME Journal* **3**: 1365-1373.

Hopenhayn, C. (2006) Arsenic in drinking water: Impact on human health. *Elements* **2**: 103-107.

Hubert, C., Loy, A., Nickel, M., Arnosti, C., Baranyi, C., Brüchert, V. et al. (2009) A constant flux of diverse thermophilic bacteria into the cold arctic seabed. *Science* **325**: 1541-1544.

Hwang, I.T., Lim, H.K., Song, H.Y., Cho, S.J., Chang, J.S., and Park, N.J. (2010) Cloning and characterization of a xylanase, KRICT PX1 from the strain *Paenibacillus* sp. HPL-001. *Biotechnology Advances* **28**: 594-601.

I

Ingham, C.J., Sprenkels, A., Bomer, J., Molenaar, D., Van Den Berg, A., Van Hylckama Vlieg, J.E.T., and De Vos, W.M. (2007) The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18217-18222.

J

Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., and Sait, M. (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2391-2396.

Jeraldo, P., Sipos, M., Chia, N., Brulc, J.M., Dhillon, A.S., Konkel, M.E. et al. (2012) Quantification of the relative roles of niche and neutral processes in structuring gastrointestinal microbiomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 9692-9698.

Joseph, S.J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C.A., and Janssen, P.H. (2003) Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7210-7215.

K

Kaeberlein, T., Lewis, K., and Epstein, S.S. (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**: 1127-1129.

Kakirde, K.S., Parsley, L.C., and Liles, M.R. (2010) Size does matter: Application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 1911-1923.

Koch, A.L. (1971) The adaptive responses of *Escherichia coli* to a feast and famine existence. In *Advances in Microbial Physiology*, pp. 147-217.

L

Lamy, D., Obernosterer, I., Laghdass, M., Artigas, L.F., Breton, E., Grattepanche, J.D. et al. (2010) Temporal changes of major bacterial groups and bacterial heterotrophic activity during a *Phaeocystis globosa* bloom in the eastern English Channel. *Aquatic Microbial Ecology* **58**: 95-107.

LeBlanc, M., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., and Personné, C. (2002) Arsenic removal by oxidizing bacteria in a heavily arsenic-contaminated acid mine drainage system (Carnoulès, France). *Journal of Geological Society* **198**: 267-274.

Leblanc, M., Achard, B., Othman, D.B., Luck, J.M., Bertrand-Sarfati, J., and Personné, J.C. (1996) Accumulation of arsenic from acidic mine waters by ferruginous bacterial accretions (stromatolites). *Applied Geochemistry* **11**: 541-554.

Lebrun, E., Brugna, M., Baymann, F., Muller, D., Lièvreumont, D., Lett, M.C., and Nitschke, W. (2003) Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Molecular biology and evolution* **20**: 686-693.

Lennon, J.T., and Jones, S.E. (2011) Microbial seed banks: The ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews Microbiology* **9**: 119-130.

Lett, M.C., Muller, D., Lièvreumont, D., Silver, S., and Santini, J.M. (2012) Unified nomenclature for genes involved in prokaryotic aerobic arsenite oxidation. *Journal of Bacteriology* **194**: 207-208.

Lewis, K., Epstein, S., D'Onofrio, A., and Ling, L.L. (2010) Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *Journal of Antibiotics* **63**: 468-476.

Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., and Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4516-4522.

Liu, Z., Boles, E., and Rosen, B.P. (2004) Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 17312-17318.

M

Malasarn, D., Saltikov, C.W., Campbell, K.M., Santini, J.M., Hering, J.G., and Newman, D.K. (2004) *arrA* is a reliable marker for As(V) respiration. *Science* **306**: 455.

Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., and Catroux, G. (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity Analysis Methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2354-2359.

Martiny, J.B.H., Bohannan, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L. et al. (2006) Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 102-112.

Mayr, E. (1942) *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist*. New York: Columbia University Press.

Meng, Y.L., Liu, Z., and Rosen, B.P. (2004) As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 18334-18341.

Meyer-Dombard, D.R., Shock, E.L., and Amend, J.P. (2012) Effects of trace element concentrations on culturing thermophiles. *Extremophiles* **16**: 317-331.

Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., and Worm, B. (2011) How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biology* **9**: art. e1001127.

Morin, G., and Calas, G. (2006) Arsenic in soils, mine tailings, and former industrial sites. *Elements* **2**: 97-101.

Muller, D., Lièvreumont, D., Simeonova, D.D., Hubert, J.C., and Lett, M.C. (2003) Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant β -proteobacterium. *Journal of Bacteriology* **185**: 135-141.

Mylvaganam, S., and Dennis, P.P. (1992) Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Genetics* **130**: 399-410.

N

Nealson, K.H. (1997) Sediment bacteria: Who's there, what are they doing, and what's new? In *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, pp. 403-434.

Neufeld, J.D., Chen, Y., Dumont, M.G., and Murrell, J.C. (2008) Marine methylotrophs revealed by stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomics. *Environmental Microbiology* **10**: 1526-1535.

Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E.M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A. et al. (2010) Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable microbial species. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 2445-2450.

Nichols, D., Lewis, K., Orjala, J., Mo, S., Ortenberg, R., O'Connor, P. et al. (2008) Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4889-4897.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., and Antranikian, G. (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 711-729.

Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., Bensasson, D., and Daffonchio, D. (2007) Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research* **6**: 37-53.

Nübel, U., Engelen, B., Felsre, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I. et al. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* **178**: 5636-5643.

O

O'Day, P.A. (2006) Chemistry and mineralogy of arsenic. *Elements* **2**: 77-83.

Ofiteru, I.D., Lunn, M., Curtis, T.P., Wells, G.F., Criddle, C.S., Francis, C.A., and Sloan, W.T. (2010) Combined niche and neutral effects in a microbial wastewater treatment community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 15345-15350.

Olsen, R.A., and Bakken, L.R. (1987) Viability of soil bacteria: Optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microbial Ecology* **13**: 59-74.

P

Páez-Espino, D., Tamames, J., De Lorenzo, V., and Cánovas, D. (2009) Microbial responses to environmental arsenic. *BioMetals* **22**: 117-130.

Park, D.S., Jeong, W.J., Lee, K.H., Oh, H.W., Kim, B.C., Bae, K.S., and Park, H.Y. (2009) *Paenibacillus pectinilyticus* sp. nov., isolated from the gut of *Diestrammena apicalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**: 1342-1347.

Pedrós-Alió, C. (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* **14**: 257-263.

Pedrós-Alió, C. (2007) Dipping into the rare biosphere. *Science* **315**: 192-193.

Pester, M., Bittner, N., Deevong, P., Wagner, M., and Loy, A. (2010) A 'rare biosphere' microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland. *ISME Journal* **4**: 1-12.

Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., and Simonet, P. (1992) Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2717-2722.

Pope, P.B., Smith, W., Denman, S.E., Tringe, S.G., Barry, K., Hugenholtz, P. et al. (2011) Isolation of *Succinivibrionaceae* implicated in low methane emissions from Tammar wallabies. *Science* **333**: 1-5.

Portillo, M.C., Anderson, S.P., and Fierer, N. (2012) Temporal variability in the diversity and composition of stream bacterioplankton communities. *Environmental Microbiology*. (Sous presse).

R

Rasmussen, L.D., Zawadsky, C., Binnerup, S.J., Øregaard, G., Sørensen, S.J., and Kroer, N. (2008) Cultivation of hard-to-culture subsurface mercury-resistant bacteria and discovery of new *merA* gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3795-3803.

Razumov, A.S. (1932) *Mikrobiologija* **1**: 131-146.

Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S., and Pace, N.R. (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3417-3418.

Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2003) Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology* **39**: 183-190.

Rodriguez-Castellon, J.A. (1980) Selected items from the history of pathology -- Girolamo Fracastoro (1478-1553). *American Journal of Pathology* **101**: 62.

Rosen, B.P. (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters* **529**: 86-92.

Rosen, B.P., Ajees, A.A., and McDermott, T.R. (2011) Life and death with arsenic. *BioEssays* **33**: 350-357.

Ruijsenaars, H.J., Hartmans, S., and Verdoes, J.C. (2000) A novel gene encoding xanthan lyase of *Paenibacillus alginoliticus* strain XL-1. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3945-3950.

S

Sait, M., Hugenholtz, P., and Janssen, P.H. (2002) Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology* **4**: 654-666.

Sanger, F. (1975) The Croonian lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences* **191**: 317-333.

Sangwan, P., Kovac, S., Davis, K.E.R., Sait, M., and Janssen, P.H. (2005) Detection and cultivation of soil *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8402-8410.

Sawhney, V., and Nicholas, D.J.D. (1977) Sulphite and NADH dependent nitrate reductase from *Thiobacillus denitrificans*. *Journal of General Microbiology* **100**: 49-58.

Schmidt, T.M., DeLong, E.F., and Pace, N.R. (1991) Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology* **173**: 4371-4378.

Schopf, J.W. (2006) Fossil evidence of Archaean life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361**: 869-885.

Senoh, M., Ghosh-Banerjee, J., Ramamurthy, T., Hamabata, T., Kurakawa, T., Takeda, M. et al. (2010) Conversion of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to the culturable state by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiology and Immunology* **54**: 502-507.

Sharma, S., Khan, F.G., and Qazi, G.N. (2010) Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**: 1821-1828.

Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O. et al. (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 14440-14445.

Smith, A.H., Lingas, E.O., and Rahman, M. (2000) Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: A public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization* **78**: 1093-1103.

Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R. et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 12115-12120.

Sokal, R.R., and Sneath, P.H.A. (1963) *Principles of numerical taxonomy*. San Francisco: W. H. Freeman.

Staley, J.T., and Konopka, A. (1985) Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* **39**: 321-346.

Steinert, M., Emödy, L., Amann, R., and Hacker, J. (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2047-2053.

T

Tan, G.L., Shu, W.S., Hallberg, K.B., Li, F., Lan, C.Y., and Huang, L.N. (2007) Cultivation-dependent and cultivation-independent characterization of the microbial community in acid mine drainage associated with acidic Pb/Zn mine tailings at Lechang, Guangdong, China. *FEMS Microbiology Ecology* **59**: 118-126.

Teira, E., Lekunberri, I., Gasol, J.M., Nieto-Cid, M., Álvarez-Salgado, X.A., and Figueiras, F.G. (2007) Dynamics of the hydrocarbon-degrading *Cycloclasticus* bacteria during mesocosm-simulated oil spills. *Environmental Microbiology* **9**: 2551-2562.

Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.J., Ludwig, W., and Kämpfer, P. (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 249-266.

Tyson, G.W., Lo, I., Baker, B.J., Allen, E.E., Hugenholtz, P., and Banfield, J.F. (2005) Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 6319-6324.

Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M. et al. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**: 37-43.

V

Vaughan, D.J. (2006) Arsenic. *Elements* **2**: 71-75.

Vaz-Moreira, I., Egas, C., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2011) Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **100**: 245-257.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A. et al. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.

Vieira-Silva, S., and Rocha, E.P.C. (2010) The systemic imprint of growth and its uses in ecological (meta)genomics. *PLoS Genetics* **6**: art. e1000808.

Voget, S., Steele, H.L., and Streit, W.R. (2006) Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *Journal of Biotechnology* **126**: 26-36.

W

Wang, H., Gong, Y., Xie, W., Xiao, W., Wang, J., Zheng, Y. et al. (2011) Identification and characterization of a novel thermostable gh-57 gene from metagenomic fosmid library of the Juan De Fuca ridge hydrothermal vent. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **164**: 1323-1338.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.

Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Guillaumaud, N., and Le Roux, X. (2007) Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and

resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology* **9**: 2211-2219.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6578-6583.

Wilkins, M.R. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/Technology* **14**: 61-65.

Wilmes, P., and Bond, P.L. (2004) The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environmental Microbiology* **6**: 911-920.

Winogradsky, S. (1887) Über Schwefelbakterien. *Botanische Zeitung* **45**: 489-610.

Wintzingerode, F.V., Göbel, U.B., and Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 213-229.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**: 221-271.

Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5088-5090.

Z

Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., and Keller, M. (2002) Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 15681-15686.

Zhang, J., and Zeng, R. (2011) Molecular cloning and expression of an extracellular α -amylase gene from an Antarctic deep sea psychrotolerant *Pseudomonas stutzeri* strain 7193. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 841-850.

B. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications :

Novel and unexpected bacterial diversity in an arsenic-rich ecosystem revealed by culture-dependent approaches. François Delavat, Marie-Claire Lett and Didier Lièvreumont. *Biology Direct*. (sous presse). (*Facteur d'Impact à la soumission : 4,03*).

Deciphering the role of *Paenibacillus* strain Q8 in the organic matter recycling in the acid mine drainage of Carnoulès. François Delavat, Vincent Phalip, Anne Forster, Marie-Claire Lett and Didier Lièvreumont. *Microbial cell factories*. (2012). 11(1):16. DOI : 10.1186/1475-2859-11-16. (*Facteur d'Impact à la soumission : 4,54*).

Amylases without known homologues discovered in an acid mine drainage: significance and impact. François Delavat, Vincent Phalip, Anne Forster, Frédéric Plewniak, Marie-Claire Lett and Didier Lièvreumont. *Scientific reports*. (2012). 2 : 354 | DOI: 10.1038/srep00354. (*En attente d'un Facteur d'Impact*).

***Acidiminas carnoulesii* gen nov. sp. nov, a commonly detected but previously uncultured bacterium from acidic environments and acid mine drainages.** François Delavat, Marie-Claire Lett and Didier Lièvreumont. *Systematic and applied microbiology*. (En préparation). (*Facteur d'Impact en juillet 2012 : 3,36*).

Remediation using arsenite-oxidizing bacteria. François Delavat, Marie-Claire Lett, Didier Lièvreumont. In Series : Arsenic in the environment, Vol. 5 « The metabolism of arsenite », p145-159, J. M. Santini and S. A. Ward eds, *CRC Press*, (2012). isbn:978-0-415-69719-4 (Hbk) 978-0-203-12018-7 (eBook) issn: 1876-6218.

Communications :

Poster :

- **AMDs: reservoirs for new enzymes?** François Delavat, Vincent Phalip, Anne Forster, Marie-Claire Lett and Didier Lièvreumont. (Congrès FEMS à Genève, 2011).

- **Investigation of the microbial diversity in arsenic polluted environments by new cultivation methods.** François Delavat, Marie-Claire Lett and Didier Lièvreumont (Congrès IUMS à Sapporo, 2011).

Oral :

-**Nouvelle diversité détectée dans un Drainage Minier Acide par des approches culturelles.** François Delavat, Marie-Claire Lett and Didier Lièvreumont (Séminaire de Microbiologie, Strasbourg).

