

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ A

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

LYNDA LÉTOURNEAU

ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA CARBOXYLATION

DU PHÉNOL EN CONDITIONS MÉTHANOGENÈS

Novembre 1993

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.		ii
LISTE DES TABLEAUX.		vii
LISTE DES FIGURES.		viii
SOMMAIRE.		xii
INTRODUCTION		1
REVUE DE LA LITTÉRATURE		4
1.	LES COMPOSÉS AROMATIQUES	5
1.1	Sources dans l'environnement et problématiques	5
1.2	Les composés phénolés	6
1.3	Dégradation anaérobie	7
1.3.1	Métabolisme anaérobie	7
1.3.2	Fermentation méthanique	8
2.	DÉGRADATION ANAÉROBIE DU PHÉNOL EN CONDITIONS MÉTHANOGENÈS	12
2.1	Voie réductrice	12
2.2	Voie de carboxylation	15
3.	CARACTÉRISTIQUES DE LA CARBOXYLATION DU PHÉNOL EN ACIDE BENZOÏQUE	17
3.1	Position de la carboxylation	17
3.2	Produit intermédiaire de transformation	20
3.2.1	Acide p-hydroxybenzoïque	20
3.2.2	Coenzyme A ligase	23
3.3	Co-métabolisme	25
3.4	Syntrophie	27
3.5	Microorganismes carboxylants	28
4.	LES MICROORGANISMES SPORULÉS	31
4.1	Propriétés générales	31
4.1.1	Sporulation	31
4.1.2	Résistance	32
4.1.2.1	Chaleur	32
4.1.2.2	Éthanol	33
4.1.2.3	Antibiotiques	33
4.2	Clostridium	34
4.2.1	Métabolisme	35

4.2.2	Syntrophie	36
4.3	Transformation des composés aromatiques	37
4.3.1	Décarboxylations	38
4.3.2	Déshalogénations	39
4.3.3	Déméthylations.	40
4.3.4	Oxydations	42
MATÉRIEL ET MÉTHODES		44
1.	PROVENANCE DES MICROORGANISMES . .	45
2.	CROISSANCE DU CONSORTIUM ANAÉROBIE	45
2.1	Milieu de culture	45
2.2	Maintenance	46
3.	CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)	47
3.1	Extraction	47
3.2	Dosage	47
3.3	Quantification des composés	48
4.	MESURE DU VOLUME DE GAZ PRODUIT . .	48
5.	CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DU PHÉNOL PAR LE CONSORTIUM	49
6.	IMPLICATION D'UNE COENZYME A LIGASE	49
6.1	Sonde moléculaire	49
6.2	Hybridation	50
7.	BACTÉRIES ANAÉROBIES FACULTATIVES .	51
7.1	Sélection des microorganismes . . .	51
7.2	Dosage	51
7.3	Dénombrement bactérien	52
8.	BACTÉRIES SPORULÉES	52
8.1	Traitement à la chaleur	52
8.2	Traitement à la chaleur combiné à l'éthanol	54
8.3	Traitement à la chaleur plus intense	55
8.4	Observations	56
8.4.1	Macroscopiques	56
8.4.2	Microscopiques	57

9.	ÉTUDES DES BACTÉRIES SPORULÉES . . .	57
9.1	Isolement	57
9.2	Observations macroscopiques	58
9.3	Observations microscopiques	58
9.4	Identification	59
9.5	Capacité de dégradation	59
9.5.1	Carboxylation	59
9.5.2	Décarboxylation, oxydation et O- déméthylation	60
10.	CONSORTIUM TRAITÉ	61
10.1	Importance du surnageant de l'inoculum	61
10.2	Capacité de dégradation	62
10.3	Voie de transformation de l'acide p-hydroxybenzoïque	62
10.4	Sous-culture sur milieux solides .	63
10.5	Croissance des souches et dégradation du phénol	64
10.6	Éthanol comme additif	65
10.6.1	En milieu liquide	65
10.6.2	En milieu solide	66
10.6.3	Seule source de carbone	66
10.7	Sucres fermentescibles	67
10.8	Effet des antibiotiques	68
10.8.1	Antibiogramme	68
10.8.2	Milieu liquide	69
RÉSULTATS		71
1.	CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DU PHÉNOL PAR LE CONSORTIUM DE RÉFÉRENCE . . .	72
2.	ACTIVITÉ D'UNE COENZYME A LIGASE .	72
3.	BACTÉRIES ANAÉROBIES FACULTATIVES .	77
4.	IMPLICATION DE BACTÉRIES SPORULÉES	77
4.1	Traitement à la chaleur	77
4.2	Traitement à la chaleur combiné à l'éthanol	87
4.3	Traitement à la chaleur plus intense	90
4.4	Observations	92
4.4.1	Macroscopiques	92
4.4.2	Microscopie électronique à transmission	92

5.	ÉTUDE DES BACTÉRIES SPORULÉES . . .	97
5.1	Isolement et identification	97
5.2	Capacité de dégradation	99
6.0	CONSORTIUM TRAITÉ	109
6.1	Importance du surnageant de l'inoculum	109
6.2	Oxydation et O-déméthylation . . .	109
6.3	Décarboxylation de l'acide p- hydroxybenzoïque	112
6.3.1	Cinétique de dégradation	112
6.3.2	Confirmation des produits de transformation	112
6.4	Sous-culture sur milieux solides .	115
6.5	Croissance des souches et dégradation du phénol	120
6.6	Éthanol comme additif	120
6.6.1	En milieu liquide	120
6.6.2	En milieu solide	123
6.6.3	Seule source de carbone	128
6.7	Action des sucres fermentescibles .	128
6.8	Effet des antibiotiques	128
DISCUSSION	134
1.	COENZYME A LIGASE	135
2.	BACTÉRIES ANAÉROBIES FACULTATIVES .	136
3.	IMPLICATION DE BACTÉRIES SPORULÉES	137
3.1	Traitement à la chaleur	137
3.2	Traitement à la chaleur combiné à l'éthanol	138
3.3	Sous-cultures	138
3.4	Traitement plus intense à la chaleur	141
4.	BACTÉRIES SPORULÉES ISOLÉES	142
4.1	Clostridium	143
4.2	Capacité de dégradation	144
5.	ÉTUDE DU CONSORTIUM TRAITÉ	146
5.1	Importance du surnageant de l'inoculum	147
5.2	Oxydation, O-déméthylation et décarboxylation	147
5.3	Sous-culture sur milieux solides .	149

5.4	Croissance des souches et dégradation du phénol	149
5.5	Éthanol comme additif	150
5.6	Action des sucres fermentescibles .	152
5.7	Effet des antibiotiques	153
CONCLUSION	157
REMERCIEMENTS	160
BIBLIOGRAPHIE	163

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1:	Transformation du phénol (Ph) en acide benzoïque (B) dans des cultures inoculées avec différentes concentrations d'inoculum provenant d'une sous-culture d'une culture chauffée à 90°C.	91
TABLEAU 2:	Bâtonnets sporulants Gram positifs, anaérobies strictes, isolés sur géloses sang Columbia.	98
TABLEAU 3:	Estimation de la sensibilité à certains antibiotiques des cinq souches de bâtonnets sporulés.	129
TABLEAU 4:	Évolution de la transformation du phénol (mM) dans une culture traitée en présence de chloramphénicol	131

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1:	Groupes de microorganismes impliqués dans la dégradation anaérobie des polymères en méthane (Zinder, 1984). Bactéries fermentaires (1), bactéries acétogènes productrices d'hydrogène (2), bactéries acétogènes consommatrices d'hydrogène (3), bactéries méthanogènes réductrices de CO ₂ (4), bactéries méthanogènes acéticlastiques (5)	10
FIGURE 2:	Voies possibles de dégradation du phénol par fermentation méthanique, d'après Kobayashi <u>et al.</u> (1989).	13
FIGURE 3:	Étude de la réaction de carboxylation. Voies possibles de la transformation de monofluorophénols via la carboxylation en position <i>para</i> (Sharak Genthner <u>et al.</u> , 1989c)	18
FIGURE 4:	Voie métabolique possible pour la <i>para</i> -carboxylation du phénol en acide benzoïque.	21
FIGURE 5:	Cinétique de dégradation du phénol par le consortium de référence en conditions méthanogènes. Phénol (■), acide benzoïque (●), gaz (Δ).	73
FIGURE 6:	Hybridation positive du consortium de référence à l'aide d'une sonde moléculaire spécifique pour une région homologue de certaines coenzymes A ligases. A) consortium de référence, B) témoin positif, C) témoin négatif.	75
FIGURE 7:	Transformation du phénol par le consortium de référence en conditions aérobies (□) et anaérobies (●) en fonction du temps d'incubation.	78
FIGURE 8:	Cinétique de transformation du phénol (■, □) en acide benzoïque (●, °) par le consortium de bactéries anaérobies chauffé à 60°C/20 minutes (■, ●) et 80°C/15 minutes (□, °).	80

FIGURE 9:	Suivi du phénol (■, □) et de l'acide benzoïque (◆, ◊) suite à la réaddition de phénol à une culture inoculée avec le consortium chauffé à 80°C/15 min. (□, ◊) et à une culture non traité à la chaleur (■, ◆).	83
FIGURE 10:	Transformation du phénol (A) en acide benzoïque (B) dans des sous-cultures en série du consortium traité à la chaleur (80°C/15 min.). 1 ^{ère} sous-culture (◆), 3 ^e sous-culture (◊), 6 ^e sous-culture (■).	85
FIGURE 11:	Cinétique de transformation du phénol (A) en acide benzoïque (B) en fonction du temps d'incubation de cultures inoculées avec le consortium chauffé à 80°C pendant 15 minutes et traitées (■) ou non (◆, ◊) à l'éthanol. La culture (◊) a suivi les mêmes étapes que celle traitée à l'éthanol mais du milieu minimal frais a remplacé l'éthanol.	88
FIGURE 12:	Formes bactériennes retrouvées dans une culture non traitée du consortium de référence dégradant le phénol. La barre représente 1.0 μm.	93
FIGURE 13:	Formes bactériennes retrouvées après plusieurs sous-cultures du consortium traité (80°C/15 min. ou plus). La barre représente 1.0 μm.	95
FIGURE 14:	Microscopie électronique des souches de <i>Clostridium hastiforme</i> en coloration négative. Souche no 2 (A), souche no 3 (B), spore (C). La barre représente 1.0 μm.	100
FIGURE 15:	Microscopie électronique de la souche no 4, en coloration négative. La barre représente 1.0 μm.	102
FIGURE 16:	Microscopie électronique de la souche <i>Clostridium ghonii</i> (A) et de ses spores (B) en coloration négative. La barre représente 1.0 μm.	104

- FIGURE 17: Microscopie électronique de la souche *Clostridium glycolicum* (A) et de ses spores (B) en coloration négative. La barre représente 1.0 μm 106
- FIGURE 18: Transformation du phénol (A) en acide benzoïque (B) en fonction du temps d'incubation, dans une sous-culture d'une culture traitée où l'inoculum a été débarassé (\circ) ou non (\bullet) du surnageant. 110
- FIGURE 19: Cinétique de transformation de l'acide p-hydroxybenzoïque (\blacksquare) en phénol (\bullet) et en acide benzoïque (\circ) en fonction du temps d'incubation par le consortium de référence (A) et par un consortium traité (B). 113
- FIGURE 20: Spectre de masse de l' $[^{13}\text{C}]$ acide benzoïque résultant de la transformation de l' $[^{13}\text{COOH}]$ acide p-hydroxybenzoïque par un consortium de référence (A) et par un consortium traité (B). 116
- FIGURE 21: Transformation du phénol dans le milieu minimal liquide inoculé avec le consortium cultivé sur milieu solide Columbia (A) et minimal (B). Consortium de référence (\square), consortium traité (\bullet). 118
- FIGURE 22: Suivi des différentes espèces de *Clostridium* lors de la transformation du phénol en acide benzoïque par le consortium traité. A) Transformation du phénol (\blacksquare) en acide benzoïque (\bullet), et pH (\square); B) Croissance des souches *C. ghonii* (\blacksquare), *C. hastiforme* (\bullet), *C. glycolicum* (\square). 121
- FIGURE 23: Dégradation du phénol par le consortium traité dans des cultures contenant de l'éthanol en absence (A) ou en présence (B) d'acétate de sodium 50 mM. Cultures en présence d'éthanol: 0 mM (\circ), 50 mM (\blacktriangle), 150 mM (\square). 124

FIGURE 24: Dégradation du phénol par un consortium traité puis inoculé dans le milieu minimal en présence ou non d'éthanol 95%. Culture en présence d'éthanol: 0 mM (°), 100 mM (▲), 150 mM (□).	126
--	-----

SOMMAIRE

La connaissance est limitée concernant les microorganismes impliqués dans les premières étapes de dégradation des composés phénolés par fermentation méthanique. A partir d'un consortium méthanogène dégradant le phénol, une étude microbiologique a été effectuée afin d'isoler et de caractériser les bactéries impliquées dans la carboxylation du phénol.

Dans un premier temps, il a été démontré que les bactéries anaérobies facultatives ne sont pas responsables de cette activité. Le consortium de référence a été traité à la chaleur (80°C/15 min., 90°C/10 min.) combiné ou non à un traitement à l'éthanol, dans le but de montrer l'implication des bactéries sporulées. Les cultures résultantes ont conservé la capacité de carboxyler le phénol indiquant que les bactéries sporulées sont impliquées dans la transformation du phénol en acide benzoïque. Les observations au microscope électronique des consortiums traités ont montré des populations semblables entre elles et moins variées que celle retrouvée dans le consortium de référence, celles-ci étant composées seulement de bâtonnets Gram-positifs dont un de type filamenteux. D'après ces résultats, ces cultures ont par la suite été appelées consortium traité sans distinction du

traitement subi. Le consortium traité s'est révélé stable suite à des sous-cultures successives. Contrairement au consortium de référence, aucune production de gaz n'a été décelée et l'acide benzoïque s'accumulait.

Cinq souches dont quatre *Clostridium* ont été isolées à partir d'un consortium traité. Toutefois, aucun de ces bâtonnets Gram-positifs n'a réussi à carboxyler le phénol en culture pure et coculture. Contrairement au consortium de référence, ces souches ne possèdent pas la capacité d'effectuer des réactions de décarboxylation, d'oxydation et de O-déméthylation.

Il a été démontré que la vitesse de transformation du phénol n'était pas ralentie dans un consortium traité où l'inoculum a été lavé pour éliminer le surnageant de culture. Comme le consortium de référence, le consortium traité effectue la décarboxylation et la déhydroxylation de l'acide p-hydroxybenzoïque en phénol et en acide benzoïque, respectivement. Par contre, contrairement au consortium de référence, il ne peut effectuer des réactions d'oxydation et de O-déméthylation. Une sous-culture sur milieux solides du consortium traité suggère peu ou pas de croissance bactérienne des microorganismes carboxylants sous ces conditions. Pendant la transformation du phénol en acide benzoïque, aucune croissance significative des trois espèces de *Clostridium* n'a

été observée en milieu liquide. Sur les cinq souches isolées, deux ont été éliminées du consortium traité sans affecter la transformation du phénol: la souche no 4 semble avoir été éliminée par dilution lors des sous-cultures successives et la souche de *C. ghonii* a été éliminée après un traitement avec des antibiotiques. Selon les observations réalisées, le consortium traité dégradant le phénol présentement maintenu dans le laboratoire serait constitué de deux souches de *Clostridium hastiforme*, d'une souche de *Clostridium glycolicum*, d'un bâtonnet filamenteux et d'une souche sporulée non identifiée (souche no 6). De plus, les résultats obtenus portent à croire que la souche no 6 serait impliquée dans la dégradation du phénol en acide benzoïque puisque son élimination dans la culture à l'aide de tétracycline entraîne une perte d'activité du consortium.

Ces travaux ont permis de franchir un grand pas vers l'isolement des microorganismes responsables de la carboxylation du phénol en dépit du fait de la complexité du consortium de bactéries anaérobies.

INTRODUCTION

Plusieurs composés aromatiques sont des polluants d'importance dû à leur production en grande quantité, leur toxicité, leur résistance à la dégradation et à leur accumulation dans les sédiments. Les composés phénolés en sont un exemple et ils font partie des composés organiques les plus utilisés à travers le monde. Sous des conditions méthanogènes, certaines voies métaboliques ont été proposées pour la dégradation de ces composés mais les microorganismes impliqués plus particulièrement dans les premières étapes de la dégradation sont peu connus.

Kobayashi et al. (1989) ont fait une revue des voies métaboliques proposées pour la dégradation du phénol en conditions méthanogènes. Deux voies principales ont été observées. Dans l'une de ces voies, le phénol est premièrement carboxylé en acide benzoïque avant réduction et clivage du noyau aromatique (Béchar et al., 1990; Zhang et al., 1990; Sharak Genthner et al., 1989c; Knoll et Winter, 1989). Il a été démontré que la carboxylation s'effectue par l'introduction d'un groupe carboxyle par rapport au groupe hydroxyle du phénol (Bisaillon et al., 1991b; Gallert et al., 1991; Zhang et al., 1990; Sharak Genthner et al., 1989b) pour former l'acide p-hydroxybenzoïque comme intermédiaire de dégradation (Sharak Genthner et al., 1990; Bisaillon et al., communication personnelle).

Bécharé et al. (1990) comme Jeannin (1986), ont proposé que la carboxylation serait effectuée par co-métabolisme. Bécharé et al. (1990) ont également suggéré que les microorganismes carboxylants ne seraient pas des organismes syntrophes, c'est-à-dire qu'ils ne nécessitent pas la présence de bactéries consommatrices d'hydrogène pour croître. Bisailon et al. (1991a), Zhang et al. (1990), Sharak Genthner et al. (1989c) et Knoll et Winter (1987) ont évalué que leurs consortiums méthanogènes dégradant le phénol en acide benzoïque étaient constitués de 3 à 5 microorganismes différents. A notre connaissance, aucun n'a réussi à isoler le microorganisme carboxylant. Une meilleure connaissance des microorganismes et de ce qui gouverne et contrôle leur activité pourrait éventuellement être utilisée pour le développement de procédés efficaces pour la dépollution de sols et d'effluents contaminés.

Dans ce travail, une étude microbiologique du consortium de Beaudet et al. (1986) carboxylant le phénol en conditions méthanogènes a été effectuée avec comme objectif principal d'isoler et de caractériser les microorganismes importants impliqués dans cette réaction.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. LES COMPOSÉS AROMATIQUES

1.1 Sources dans l'environnement et problématiques

Dans la biosphère, les composés aromatiques d'origine naturelle dérivent du métabolisme secondaire des plantes (Schink et al., 1992; Gross, 1985), du clivage biologique et chimique de la lignine (Higuchi, 1985) et de la bioconversion des acides aminés aromatiques (Balba et Evans, 1980).

La lignine, polymère de haut poids moléculaire, constitue 20 à 30% du poids sec des végétaux et représente avec les dérivés des tanins et des pigments végétaux la principale source de composés aromatiques naturels (Sleat et Robinson, 1984).

Les activités humaines sont à l'origine de rejets de quantités croissantes de composés xénobiotiques dans l'environnement: industries de gazéification du charbon, fonderies, aciéries, plastiques, pâte et papiers, raffineries, colorants, antioxydants, explosifs, produits chimiques pour la photographie, biocides (herbicides, pesticides) (Jeannin, 1986; Young, 1984). Plusieurs de ces composés peuvent être néfastes sur le plan de la santé dû à leur toxicité alors que d'autres le sont à cause de leur carcinogénicité. De plus, certains sont résistants à la dégradation tel que les biphényles polychlorés (BPC) (Morris et al., 1992) et peuvent s'accumuler dans les sédiments.

Il existe une multitude de composés aromatiques homo et hétérocycliques qui causent des problèmes de pollution. Par exemple, les phénols, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le bromacil et l'atrazine.

1.2 Les composés phénolés

Les composés phénolés sont un exemple de composés aromatiques et ils font partie des composés organiques les plus utilisés à travers le monde. La production annuelle de phénol est près de 1,25 milliards Kg (Anonyme, 1980).

Le phénol est la structure de base d'une grande variété de composés organiques synthétiques dont plusieurs sont utilisés en agriculture. Certains pesticides et herbicides génèrent des composés phénolés lors de leur dégradation (Young, 1984). Les effluents des industries pétrochimiques, de préservation du bois au créosote et de pâtes et papiers, de même que ceux des raffineries et des cockerries sont fortement contaminés par des substances phénolés (Londry et Fedorak, 1992).

Plusieurs dérivés du phénol incluant les chlorophénols, les nitrophénols et les crésols ont été désignés comme polluants prioritaires par l'"U.S. Environmental Protection Agency" (Boyd et al., 1983). Comme groupe de composés, les phénols sont menaçants pour

l'environnement par leur toxicité et leur résistance à la dégradation (Londry et Fedorak, 1992). Il a été montré que le 2,4,6-trichlorophénol est carcinogène chez l'animal et il est probable que le p-chlorophénol soit carcinogène selon des tests de mutagénéicité (Anonyme, 1979).

1.3 Dégradation anaérobie

1.3.1 Métabolisme anaérobie

La dégradation des composés aromatiques en conditions aérobies a été amplement étudiée. Par contre, en conditions anaérobies la dégradation de ces composés a longtemps été ignorée. Cependant, des études sur la biodégradation anaérobie de composés aromatiques revue par Berry et al. (1987), Sleat et Robinson (1984) et Young (1984) ont clairement démontré l'importance des transformations microbiennes anaérobies de ces composés organiques dans des environnements anoxiques.

En conditions anaérobies, les composés aromatiques dont les phénols peuvent être dégradés par différents mécanismes: par photométabolisme (Khanna et al., 1992; Wittle et al., 1976); par un métabolisme lié à la réduction des nitrates (Khoury et al., 1992; Rudolphi et al., 1991; Tschach et Fuchs, 1987); ou lié à la réduction des sulfates (Ramanand et Sulfita, 1991; Häggblom et Young, 1990; Khoring et al., 1989); et par fermentation méthanique (Bécharde et al., 1990;

Knoll et Winter, 1987; Szewzyk et al., 1985; Young et Rivera, 1985).

1.3.2 Fermentation méthanique

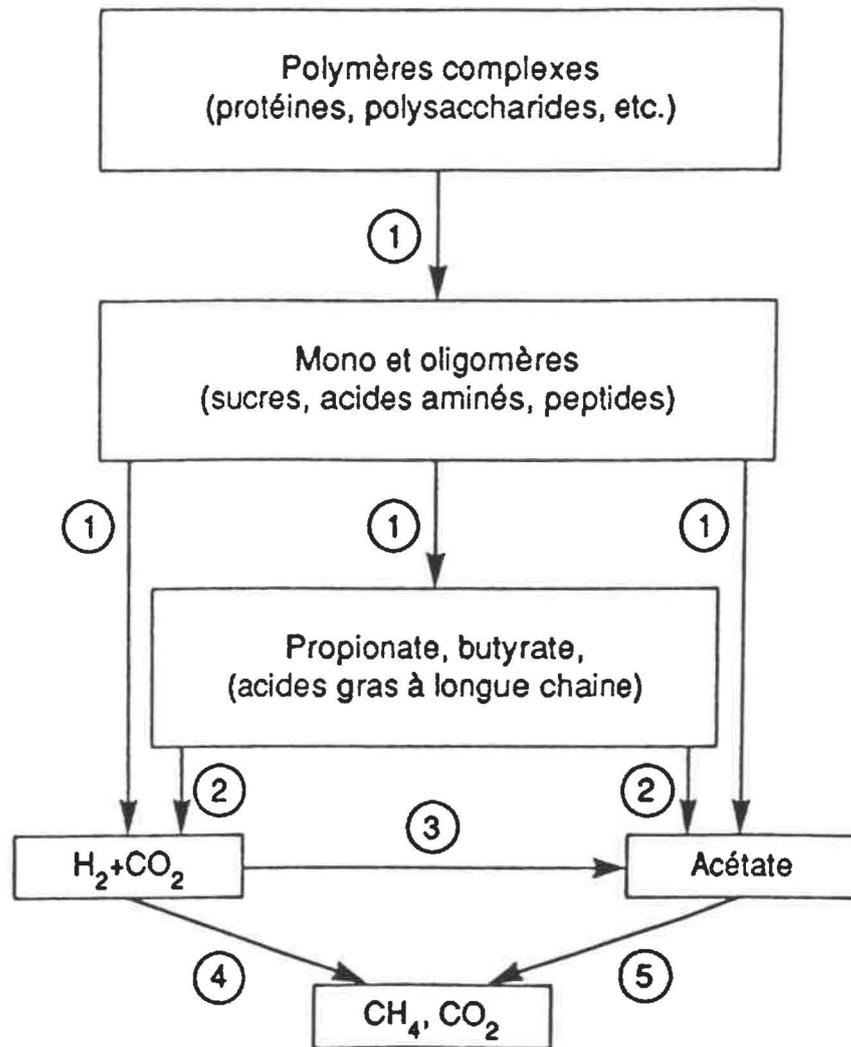
La fermentation méthanique se fait en absence de lumière, d'oxygène et d'accepteurs externes d'électrons (SO_4^{2-} , NO_3^-). Les accepteurs d'électrons sont générés par le substrat lui-même (Zeikus, 1979). Il est reconnu, qu'au niveau des fermentations, la source de carbone est dégradée par une série de réactions qui libèrent de l'énergie par phosphorylation au niveau du substrat (Evans, 1977). Les voies métaboliques peuvent se résumer en trois étapes principales: hydrolyse des composés complexes en substrats solubles plus simples, dégradation de ces substrats en acide acétique et minéralisation de celui-ci en méthane (Barlaz et al., 1989; Grainger et al., 1984; Henze et Harremoes, 1983). Le métabolisme des bactéries en conditions méthanogènes est beaucoup plus spécialisé que celui des bactéries aérobies de sorte que chacune de ces étapes est réalisée par un groupe microbien différent.

Les groupes bactériens impliqués sont les suivants: les bactéries fermentaires, les bactéries acétogènes et les bactéries méthanogènes. Dans un écosystème, ces différents groupes trophiques forment des associations complexes et stables couramment dénommées consortium de

bactéries où les rôles métaboliques de chacun se complètent pour former une chaîne alimentaire permettant la minéralisation du substrat. La nature des interactions dépend du composé à dégrader. Les étapes de la dégradation anaérobie en conditions méthanogènes et les groupes de microorganismes impliqués sont présentés à la Figure 1.

Concernant les bactéries fermentaires, relativement peu d'études ont été effectuées. Ces bactéries peuvent être anaérobie stricte ou facultative. De façon générale, elles vont dégrader les composés complexes (polymères) en fractions plus simples (monomères, acide gras, acétate). Il y a deux types de bactéries acétogènes: les acétogènes productrices d'hydrogène (bactéries dégradant les acides gras volatils) et les acétogènes consommatrices d'hydrogène. Ces dernières ne participent cependant que pour 5% de l'acétate formé (Zinder et al., 1984). Les acétogènes ont besoin d'une pression partielle en hydrogène très faible pour croître et elles vivent en association syntrophique avec les méthanogènes (Zehnder et al., 1982). La méthanogénèse par les bactéries méthanogènes est la mieux documentée. La production de méthane se fait à partir de l'acétate ou du CO_2 et H_2 produits par les bactéries fermentaires et/ou acétogènes, elles sont donc dépendantes de ces populations. Les méthanogènes réductrices de CO_2 participent aux réactions de transfert interspécifique d' H_2 et les méthanogènes

FIGURE 1: Groupes de microorganismes impliqués dans la dégradation anaérobie des polymères en méthane (Zinder, 1984). Bactéries fermentaires (1), bactéries acétogènes productrices d'hydrogène (2), bactéries acétogènes consommatrices d'hydrogène (3), bactéries méthanogènes réductrices de CO₂ (4), bactéries méthanogènes acéticlastiques (5)



acéticlastiques sont responsables de la transformation de l'acétate en CH_4 . Plusieurs articles de revue concernant les méthanogènes et leur rôle dans la fermentation anaérobie sont disponibles (Ferry, 1992; Jones et al., 1987; Sleat et Robinson, 1984; Zeikus, 1977).

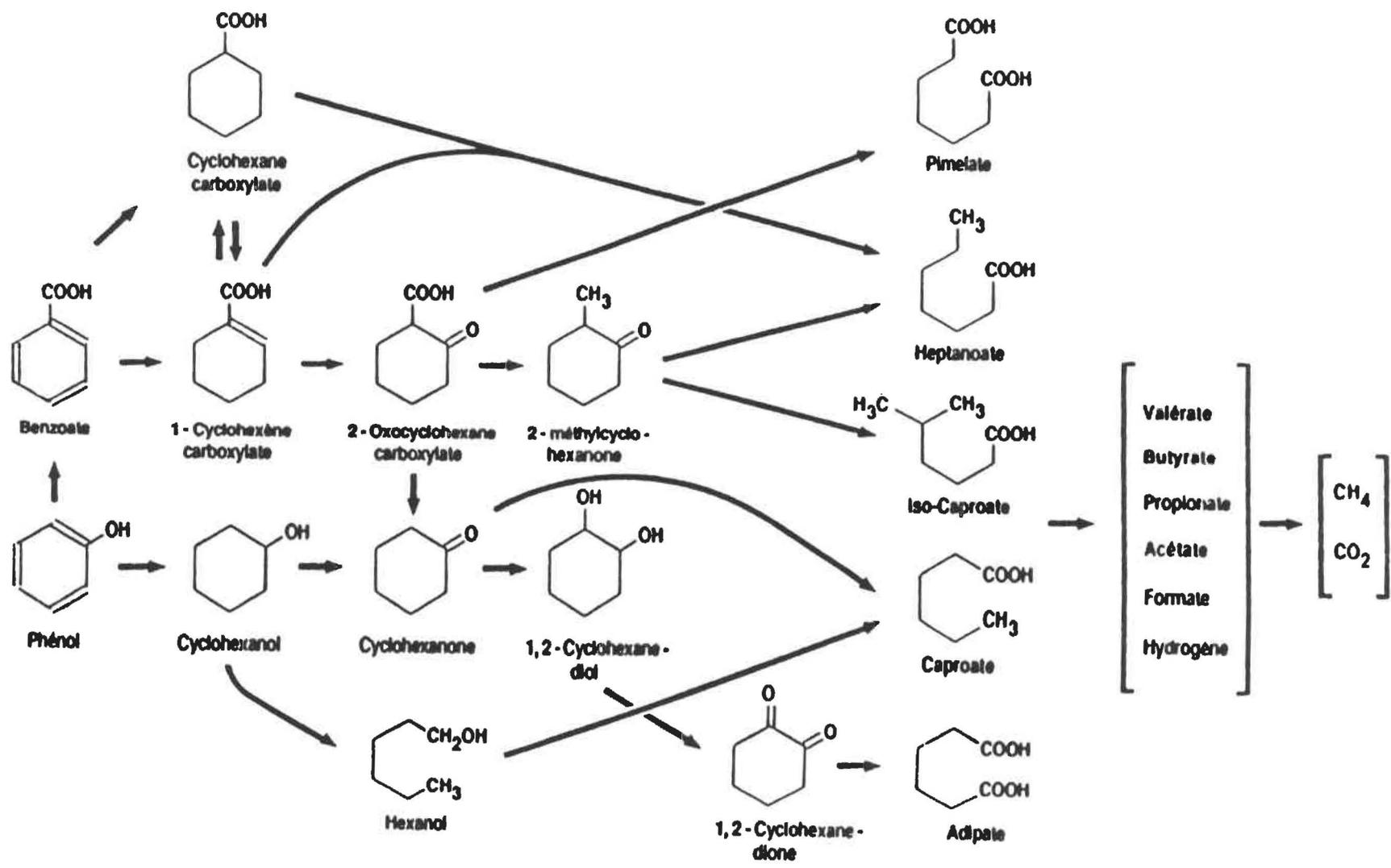
2. DÉGRADATION ANAÉROBIE DU PHÉNOL EN CONDITIONS MÉTHANOGÈNES

Le phénol qui correspond à une étape intermédiaire du métabolisme anaérobie de nombreux phénols substitués (Young et Rivera, 1985; Balba et Evans, 1980; Balba et al., 1979) peut être transformé en conditions méthanogènes par deux voies métaboliques différentes. Kobayashi et al. (1989) ont fait une revue des voies proposées (Figure 2).

2.1 Voie réductrice

Une voie réductrice a été suggérée par plusieurs auteurs (Grbic-Galic et Vogel, 1987; Barik et al., 1985; Balba et al., 1979; Evans, 1977). Le phénol est d'abord réduit en cyclohexanone puis le cycle est ouvert par hydrolyse et un acide aliphatique, le caproate ou l'adipate est obtenu. Ces composés sont par la suite dégradés en CH_4 et CO_2 . Tous ces intermédiaires ont été identifiés dans des cultures mixtes méthanogènes.

FIGURE 2: Voies possibles de dégradation du phénol par fermentation méthanique, d'après Kobayashi et al. (1989).



2.2 Voie de carboxylation

La seconde voie de dégradation a été rapportée pour la première fois par Neufeld et al. (1980) en se basant sur les travaux de Chmielowski (1965). Le phénol serait carboxylé en acide benzoïque puis dégradé en CH₄ et CO₂ par une voie réductrice (Figure 2).

Récemment, plusieurs études ont porté sur la réaction de carboxylation du phénol en conditions méthanogènes par des consortiums de bactéries anaérobies provenant de boues de digesteur urbain (Knoll et Winter, 1987; Jeannin, 1986), d'un mélange de boues, d'eau de marais, de lisier de porc et de sol (Beaudet et al., 1986) et également par des enrichissements effectués avec des sédiments aquatiques (Zhang et Wiegel, 1990a; Sharak Genthner et al., 1989a).

L'existence de la voie de carboxylation du phénol a été confirmée lors de l'étude d'intermédiaires de dégradation à partir d'un consortium dégradant le phénol en conditions méthanogènes. Knoll et Winter (1987) et Kobayashi et al. (1989) ont utilisé un atmosphère gazeux de 80% H₂ et 20% CO₂ et ont démontré l'accumulation de l'acide benzoïque comme produit de transformation du phénol. En modifiant l'atmosphère gazeux à 80% N₂ et 20% CO₂, l'acide benzoïque était faiblement observé et ne s'accumulait pas dans le milieu. Béchard et al. (1990) ont observé également

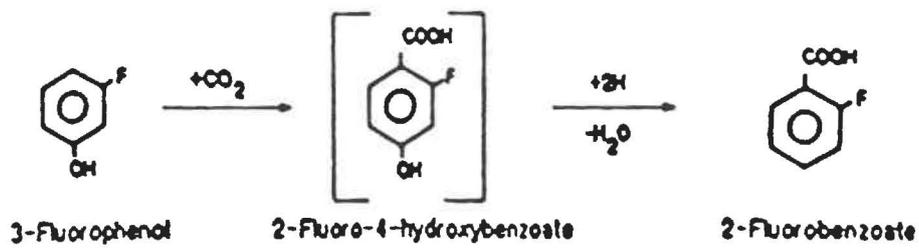
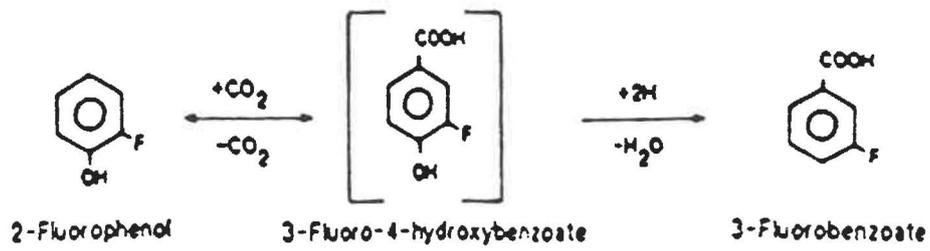
l'accumulation d'acide benzoïque proportionnellement à la dégradation du phénol en présence d' H_2 . Cependant, contrairement aux résultats des auteurs précédents, l'acide benzoïque s'accumulait même en absence d' H_2 puis était dégradé durant le prolongement de l'incubation. Knoll et Winter (1987) ont établi que la carboxylation du phénol est une réaction thermodynamiquement favorable, qui s'effectue à partir du CO ou du CO_2 . En effet, l'ajout de phénol non marqué avec du $^{14}CO_2$ ou du $NaH^{14}CO_3$ a permis de détecter de l'acide benzoïque marqué, suggérant la participation du CO_2 dans le métabolisme du phénol (Knoll et Winter, 1987, 1989). Kobayashi et al. (1989) ont testé l'habileté d'un consortium carboxylant le phénol et d'un consortium dégradant l'acide benzoïque, à transformer une variété d'intermédiaires possibles de dégradation et ont proposé le cyclohexane carboxylate, le 1-cyclohexène carboxylate et l'heptanoate en plus de l'acide benzoïque comme produit de dégradation du phénol sous conditions méthanogènes (Figure 2). Béchard et al. (1990) ont aussi étudié la voie métabolique de leur consortium méthanogène carboxylant le phénol et les intermédiaires de dégradation étaient semblables à ceux suggérés par Kobayashi et al. (1989) soit: phénol → acide benzoïque → 1-cyclohexène carboxylate → heptanoate → acétate → CH_4 et CO_2 .

3. CARACTÉRISTIQUES DE LA CARBOXYLATION DU PHÉNOL EN ACIDE BENZOÏQUE

3.1 Position de la carboxylation

En théorie, différents mécanismes de fixation du groupement carboxyle sont possibles: la carboxylation peut s'effectuer sur le site du groupement hydroxyle du phénol pour donner l'acide benzoïque, ou sur un site voisin dans lequel cas on obtiendrait un acide hydroxybenzoïque (Jeannin, 1986), suivi de la perte du groupement hydroxyle (déhydroxylation) pour obtenir de l'acide benzoïque. La réaction de carboxylation a été étudiée en détail par Sharak Genthner et al. (1989b; 1989c) en utilisant un analogue fluoré du phénol sous des conditions méthanogènes. Ils furent les premiers à conclure que l'introduction du groupe carboxyle était en position *para* par rapport au groupe hydroxyle du phénol en se basant sur les observations suivantes: le 2-fluorophénol était transformé en acide 3-fluorobenzoïque, le 3-fluorophénol en acide 2-fluorobenzoïque et finalement le 4-fluorophénol n'était pas transformé (Figure 3). Par analogie, ils présumèrent que le phénol était carboxylé de façon similaire. Zhang et al. (1990) ont également mis en évidence que la carboxylation s'effectuait en position *para* en ajoutant du [1-¹³C] phénol à leurs cultures et en détectant la formation de l'acide [4-¹³C] benzoïque comme produit de dégradation. Plus tard, Gallert et al. (1991) et Bisailon et al. (1991b) ont également confirmé en utilisant du phénol ou du 2-crésol

FIGURE 3: Étude de la réaction de carboxylation. Voies possibles de la transformation de monofluorophénols via la carboxylation en position *para* (Sharak Genthner et al., 1989c).



deuté, que la carboxylation s'effectuait exclusivement par l'introduction d'un groupe carboxyle en position para par rapport au groupe hydroxyle du phénol.

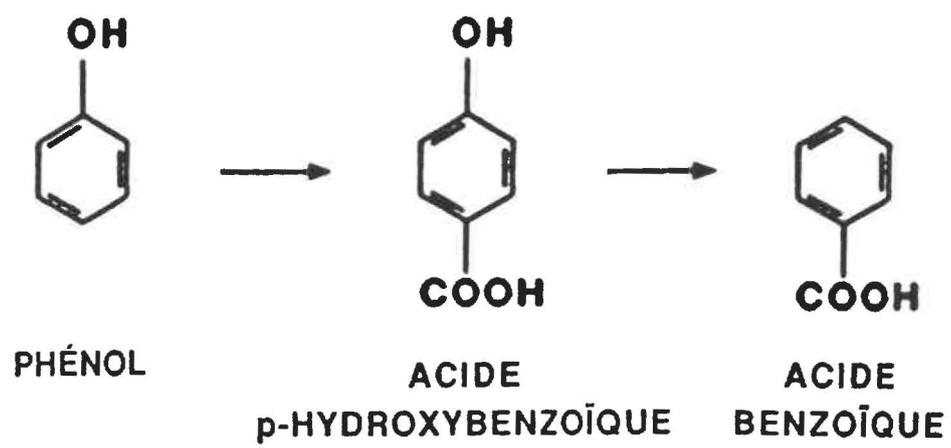
3.2 Produit intermédiaire de transformation

3.2.1 Acide p-hydroxybenzoïque

La réaction de carboxylation en position para implique donc l'acide p-hydroxybenzoïque comme produit intermédiaire entre le phénol et l'acide benzoïque (Figure 4). Cependant, aucune trace de l'acide p-hydroxybenzoïque n'a été détectée comme intermédiaire libre de dégradation par Zhang et al. (1990) et Knoll et Winter (1987; 1989). Par contre, l'acide p-hydroxybenzoïque était transformé par les cultures de ces auteurs premièrement en phénol et par la suite, le phénol était carboxylé en acide benzoïque suggérant que ce composé n'est pas un intermédiaire. Selon Zhang et Wiegel (1990a), ces réactions semblent être effectuées par des microorganismes différents.

Bisaillon et al. (communication personnelle) et Sharak Genthner et al. (1991) ont détecté l'acide p-hydroxybenzoïque comme intermédiaire de la dégradation du phénol en acide benzoïque. L'augmentation de la concentration du phénol (10,3 mM) dans le milieu par Sharak Genthner et al. (1991) a entre autre permis de confirmer sa carboxylation en acide p-hydroxybenzoïque et sa déhydroxylation en acide

FIGURE 4: Voie métabolique possible pour la para-carboxylation du phénol en acide benzoïque.



benzoïque comme l'avait déjà montré Glöckler et al. (1989) pour une souche de *Pseudomonas* sp. dénitrifiante dégradant le phénol.

Sharak Genthner et al. (1990) ont étudié la transformation de l'acide 3-fluoro-4-hydroxybenzoïque, le produit intermédiaire proposé pour la *para* carboxylation du 2-fluorophénol, à partir d'un consortium méthanogène. Deux produits ont été formés, le 2-fluorophénol résultant d'une décarboxylation et l'autre l'acide 3-fluorobenzoïque résultant d'une déhydroxylation. Si l'incubation était prolongé, le 2-fluorophénol était carboxylé en acide 3-fluorobenzoïque. Bisailon et al. (communication personnelle) ont obtenu des résultats similaires en utilisant du [COOH-¹³C] acide *p*-hydroxybenzoïque puisque ce dernier a été transformé en phénol et en [¹³C]-acide benzoïque. Ces résultats indiquent que l'acide *p*-hydroxybenzoïque peut être transformé directement en acide benzoïque sans être d'abord transformé en phénol.

3.2.2 Coenzyme A ligase

Les coenzymes A jouent un rôle clé dans les β -oxydations des acides gras et leur participation dans le métabolisme des composés benzoïques en conditions anaérobies est bien établie (Londry et Fedorak, 1972). En général, le métabolisme des composés benzoïques est initié par la formation d'une coenzyme A thioester sur la fonction acide du

composé aromatique (Dangel et al., 1991; Ziegler et al., 1989; Geissler et al., 1988). La formation de ces composés activés jouent un rôle majeur dans la réduction subséquente du noyau aromatique (Londry et Fedorak, 1992). De plus, il est devenu indéniable que la coenzyme A en plus d'activer l'acide benzoïque en benzoyl-CoA, intermédiaire majeur, peut également activer plusieurs autres composés aromatiques (Dangel et al., 1991; Altenschmidt et al., 1991; Merkel et al., 1989; Geissler et al., 1988) excepté ceux possédant deux groupements β -hydroxyle ou plus (Haddock et Ferry, 1989; Krumholz et al., 1987).

La majorité des études sur les coenzymes A ont été effectuées sur des bactéries anaérobies dénitrifiantes de type *Pseudomonas* et également sur une bactérie photosynthétique anaérobie, *Rhodopseudomonas palustris*.

La souche dénitrifiante *Pseudomonas* sp. K172, peut carboxyler le phénol en acide benzoïque via l'intermédiaire, acide p-hydroxybenzoïque. Cette souche a été étudiée pour sa capacité à dégrader le phénol via des coenzymes A (CoA): le phénol est carboxylé en acide p-hydroxybenzoïque. Cet intermédiaire est activé par une acide p-hydroxybenzoïque CoA ligase en p-hydroxybenzoyl-CoA (Tschech et Fuchs, 1989; Ziegler et al., 1989) qui est suivi par une déhydroxylation réductrice en benzoyl-CoA, catalysé par une p-hydroxybenzoyl-

CoA réductase (déhydroxylante) (Glöckler et al., 1989). Ces deux enzymes ont récemment été purifiées (Biegert et al., 1993; Brackmann et Fuchs, 1993). Selon Biegert et al. (1993), l'acide p-hydroxybenzoïque-CoA ligase est hautement spécifique pour son substrat, elle est induite durant la croissance en présence d'acide p-hydroxybenzoïque, de phénol ou de p-crésol mais elle n'est pas induite en présence d'acide benzoïque. Toujours selon ces auteurs, la fonction de cette enzyme dans le métabolisme de la souche dénitrifiante *Pseudomonas* sp. K172 doit également être la même chez d'autres types de bactéries anaérobies tel que fermentaire où les composés aromatiques sont transformés via l'acide p-hydroxybenzoïque. Auburger et Winter (1992) et Brackmann et Fuchs (1993) sont aussi d'avis que les systèmes enzymatiques étudiés chez les bactéries dénitrifiantes ou photosynthétiques sont probablement répandus et similaires. En effet, Auburger et Winter (1992) ont récemment purifié une benzoyl-CoA ligase à partir d'un consortium méthanogène dégradant l'acide benzoïque.

3.3 Co-métabolisme

Kobayashi et al. (1989) ont observé un effet stimulant du peptone, et Jeannin (1986) du glucose et de l'extrait de levure sur la carboxylation du phénol. Le phénol était transformé suivant la même voie en présence et en absence de glucose, mais l'étape de carboxylation du phénol se faisait plus rapidement avec le glucose. En absence de

glucose il y avait toujours une phase de latence. Jeannin (1986) a ainsi proposé que le glucose ou un de ses intermédiaires de dégradation servirait comme source de carbone et d'énergie aux bactéries effectuant la carboxylation, suggérant un processus de co-métabolisme. Contrairement à Jeannin (1986), Béchard et al. (1990) ont démontré que le glucose n'était pas impliqué dans la transformation du phénol mais que du protéose peptone devait être ajouté au milieu de culture pour conserver cette activité. Comme Jeannin (1986), Béchard et al. (1990) ont proposé que la carboxylation est effectuée par co-métabolisme. Dans un tel métabolisme, un composé peut être dégradé sans servir de source de carbone ou d'énergie en présence d'un substrat facilement assimilable. En culture mixte, comme c'est le cas pour un consortium méthanogène, les produits secondaires provenant du co-métabolisme peuvent être entièrement dégradés par d'autres bactéries incapables d'utiliser le composé initial.

Bisaillon et al. (1991a) ont observé que le glucose, le glycérol, le pyruvate, les acides gras: acétique, propionique et butyrique et le bicarbonate de sodium ne pouvaient remplacer le protéose peptone, seulement l'extrait de levure permettait de conserver l'activité de carboxylation du consortium de Béchard et al. (1990). L'ajout de différentes combinaisons d'acides aminés au lieu du protéose

peptone a indiqué que le tryptophane et la lysine sont les deux acides aminés indispensables pour obtenir la carboxylation complète du phénol. Par contre, après deux sous-cultures en présence de ces acides aminés, le phénol n'est plus complètement transformé, suggérant la dilution graduelle d'un facteur inconnu indispensable (Bisaillon et al., 1991a). Jusqu'à maintenant, ce facteur n'a pas été identifié. Toutefois, la nécessité d'acides aminés dans la transformation du phénol, permet de croire que les microorganismes carboxylants utilisent certains acides aminés comme accepteurs externes d'électrons. Ce type de métabolisme ou réaction de Stickland (Stickland, 1934) est connu chez diverses espèces de *Clostridium* qui fermentent des mélanges d'acides aminés par oxydation de l'un et réduction de l'autre (Gottshalk, 1979).

3.4 Syntrophie

Béchar et al. (1990) ont suggéré que les microorganismes carboxylants le phénol ne seraient pas des organismes syntrophes c'est à dire qu'ils ne doivent pas nécessairement croître en coculture obligatoirement avec des consommateurs d' H_2 . En effet, ils ont démontré en accord avec les résultats de Knoll et Winter (1987) et de Jeannin (1986) que l'inhibition des bactéries méthanogènes consommatrices d' H_2 , n'influençait pas la carboxylation du phénol. De plus, comme Kobayashi et al. (1989), ils ont montré une accumulation

d'acide benzoïque même à une forte concentration d'H₂ dans l'atmosphère gazeux.

3.5 Microorganismes carboxylants

Les microorganismes carboxylants le phénol dans les cultures de Béchard et al. (1990) et de Knoll et Winter (1989) ont été évalués à 1×10^8 - 8×10^9 et 10^6 - 10^7 cellules/mL, respectivement, indiquant que les bactéries carboxylantes font partie des microorganismes dominants des consortiums. Jeannin (1986) et Sharak Genthner (1989b) ont également estimé que les microorganismes carboxylants étaient dominants.

L'étude morphologique des cultures enrichies au phénol de Jeannin (1986) a révélé la présence de 6 morphotypes dominants dont 3 méthanogènes, 2 types de bâtonnets Gram-négatifs et un coque en chaînes, le plus souvent en paires. Lorsque du glucose a été ajouté comme substrat énergétique stimulant la dégradation du phénol, un bâtonnet Gram-positif sporulé jamais observé auparavant a été mis en évidence. Cependant, le rôle de ce bâtonnet, s'apparentant au genre *Clostridium*, dans la carboxylation du phénol n'a pas été démontré.

Après plusieurs sous-cultures d'un consortium méthanogène en présence de phénol et de CO₂ comme seule source

de carbone, Knoll et Winter (1989) ont observé que la culture était constituée d'un long et d'un court bâtonnet Gram-négatif, d'un faible nombre de *Desulfovibrio* sp. et d'une souche de méthanogène *Methanospirillum hungatei*. Aucun changement dans les formes morphologiques microbiennes n'a été noté lorsque le consortium croît en présence de phénol ou d'acide p-hydroxybenzoïque. Par contre, l'activité de dégradation du phénol et de l'acide p-hydroxybenzoïque a été perdue par l'élimination du long bâtonnet Gram-négatif non mobile lors de deux à trois transferts dans un milieu contenant de l'acide benzoïque comme source de carbone. Ce long bâtonnet semble donc impliqué dans la décarboxylation de l'acide p-hydroxybenzoïque en phénol et également dans la carboxylation du phénol en acide benzoïque. Pour sa part, le court bâtonnet toujours présent dans la culture en présence d'acide benzoïque, pourrait être impliqué dans la dégradation de ce composé en acide acétique, CO₂ et H₂ en syntrophie avec la souche de méthanogène. Une bactérie a été isolée et identifiée au genre *Desulfovibrio* sp. Compte tenu de sa présence en faible quantité, elle ne participerait pas à la dégradation du phénol ou de l'acide p-hydroxybenzoïque. Cette bactérie n'a pu être complètement éliminée du consortium (Knoll et Winter, 1989).

Sharak Genthner et al. (1989b) ont étudié également l'aspect microbiologique d'un consortium dégradant

le phénol par fermentation méthanique. Ils ont observé que la culture contenait cinq types de bactéries Gram-négatives: un coccobacille, des bâtonnets semblables à *Methanospirillum* sp. et *Methanothrix* sp., un petit bâtonnet aux bouts ronds et un large cocci ovoïde. Zhang et Wiegel (1990a) ont étudié la dégradation du 2,4-dichlorophénol via le 4-chlorophénol, phénol, acide benzoïque, acétate, méthane et CO₂ et ont montré la présence d'au moins cinq groupes de microorganismes agissant séquentiellement. Par enrichissement au phénol au lieu du 2,4-dichlorophénol, ils ont obtenu une culture carboxylant spécifiquement ce composé. L'acide benzoïque produit de la carboxylation du phénol s'accumulait et cette culture ne possédait plus la capacité de dégrader le 4-chlorophénol en phénol, étape antérieure de la dégradation du 2,4-dichlorophénol. Ce consortium a été caractérisé et il contenait deux types de bâtonnets et un organisme semblable à un *Methanospirillum hungatei*. Aucune souche sur les vingt-cinq isolées sur milieux solides n'avait la capacité de dégrader le phénol ou l'acide benzoïque (Zhang et Wiegel, 1990a).

Des observations en microscopie électronique effectuées par Bisailon et al. (1991a) sur le consortium de bactéries croissant en présence de phénol et de protéose peptone ont révélé sept types morphologiques différents. La croissance avec du tryptophane et de la lysine au lieu de

protéose peptone a permis de réduire le consortium à six formes différentes; une bactérie en forme de croissant a été éliminée. Lorsque le consortium a été cultivé en présence d'un inhibiteur spécifique des méthanogènes, l'acide 2-bromoéthanosulfonique, la bactérie ressemblant au genre *Methanothrix* a aussi été éliminée. Seulement cinq formes microbiologiques demeurent dans le consortium: un cocci, deux types de petits bâtonnets, un long bâtonnet et un bâtonnet à bouts effilés. Des spores sont également observées.

A notre connaissance, aucun des groupes de recherche (Bisailon et al., 1991a; Zhang et Wiegel, 1990a; Sharak Genthner et al., 1989b; Knoll et Winter, 1989) impliqué dans l'étude d'un consortium transformant le phénol en acide benzoïque n'a réussi jusqu'à maintenant à isoler en culture pure le microorganisme carboxylant le phénol.

4. LES MICROORGANISMES SPORULÉS

4.1 Propriétés générales

4.1.1 Sporulation

Certaines bactéries possèdent la propriété de former dans leur cytoplasme des endospores lorsque les éléments nutritifs du milieu s'épuisent. Les spores, dans des conditions physico-chimiques favorables, peuvent retourner à la forme végétative à l'aide d'au moins trois procédés séquentiels et distincts: l'activation, la germination et

l'excroissance (Anonyme, 1983). Même lorsqu'elle est placée dans un environnement idéal, la spore pour germer doit être "activée" par un agent capable de léser la tunique sporale. Les agents indispensables au développement du phénomène peuvent être mécaniques, physiques ou chimiques. L'activation thermique est particulièrement bien connue: le chauffage des spores entre 65°C et 95°C raccourcit le temps de germination (Leclerc et al., 1983). De plus, l'activation est souvent réversible, les spores germeront ou retourneront à l'état de dormance selon les conditions (Anonyme, 1983). La germination est la perte irréversible des propriétés des spores et l'excroissance est la transformation de la spore germée en une cellule végétative (Anonyme, 1983).

4.1.2 Résistance

4.1.2.1 **Chaleur**

Les propriétés physiques des spores sont remarquables. Leur faculté de résister à certains agents physiques ou chimiques est exceptionnelle. L'une des propriétés les plus remarquables est leur thermorésistance. La résistance à la chaleur varie considérablement d'une espèce à l'autre ou entre les souches d'une même espèce ou encore selon les conditions d'environnement (Leclerc et al., 1983; Roberts et Ingram, 1965). De façon générale, les spores survivent après un chauffage de 70 à 80°C durant dix minutes (Sneath, 1986; Leclerc et al., 1983). Certaines bactéries

sporulées résistent plus de huit heures à 100°C (*Plectridium caloritolerans*) et cinq minutes à 120°C (Leclerc et al., 1983) par contre certaines sont détruites à 80°C pour 10 à 15 minutes (Smith et Holdeman, 1968).

4.1.2.2 **Éthanol**

Les spores bactériens sont beaucoup moins sensibles aux agents antiseptiques, aux désinfectants que les formes végétatives correspondantes (Leclerc et al., 1983). L'alcool d'éthyle (éthanol) exerce peu d'effet sur les spores mais est létal pour les cellules végétatives (Morton, 1977). Comme la chaleur, l'utilisation d'éthanol comme moyen de sélection de bactéries sporulées est recommandée depuis plusieurs années (Dowell, 1970; Smith et Holdeman, 1968). Pour un traitement efficace, une concentration entre 50 et 70% d'éthanol et un contact d'au moins 45 minutes est nécessaire pour éliminer les cellules végétatives (Koransky et al., 1978).

4.1.2.3 **Antibiotiques**

La sensibilité versus la résistance de certaines bactéries envers les antibiotiques est bien connue et couramment utilisée en milieu clinique. Sur les microorganismes sporulés, les antibiotiques peuvent n'être que légèrement sporostatiques alors qu'ils manifestent un pouvoir bactéricide élevé sur les formes végétatives (Leclerc et al.,

1983). L'effet bactéricide ou bactériostatique des antibiotiques sur des microorganismes déterminés peut être utilisé à profit pour sélectionner certaines bactéries dans une culture mixte. Cette technique a entre autre été employée par Karnachow et al. (1992) qui à l'aide de vancomycine et d'ampicilline ont isolé des microorganismes méthanogènes à partir de sédiments d'une source d'eau chaude.

4.2 Clostridium

Bien que la formation d'endospores a été observée chez des actinomycètes (*Thermoactinomyces* et *Actinobifida*), des bactéries productrices d'acide lactique (*Sporolactobacillus*) et récemment chez des bactéries Gram-négatives (*Sporomusa* et *Sporohalobacter*) (Breznak, 1992), la littérature attribue généralement les endospores à deux principaux genres bactériens Gram-positifs soit *Bacillus* et *Clostridium* (Sneath, 1986; Anonyme, 1983; Leclerc et al. 1983; Frobisher et Fuerst, 1976).

Les bactéries Gram-positives du genre *Clostridium* partagent quelques caractéristiques avec les bactéries Gram-négatives du genre *Sporomusa*: elles sont sporulantes, anaérobies strictes et ne réduisent pas les sulfates et sulfites en H₂S. De plus, certaines espèces de *Sporomusa* sont des bactéries fermentaires. La tolérance à l'oxygène varie beaucoup d'une espèce de *Clostridium* à l'autre; certaines vont

croître mais ne sporuleront pas en présence d'air à pression atmosphérique. Certains *Clostridium* ne sont Gram-positifs qu'au cours de la phase exponentielle de leur croissance; ils ont ensuite tendance à se décolorer et à devenir Gram-négatifs. De plus, la spore chez certaines espèces est rarement observée. Les bactéries du genre *Clostridium* sont omniprésentes dans l'environnement. Elles sont communément retrouvées dans le sol, les eaux usées, les sédiments marins, les produits animal et végétal, chez l'humain et autres vertébrés, insectes et dans les tissus infectés de l'humain et des animaux (Sneath, 1986).

4.2.1 Métabolisme

Les bactéries du genre *Clostridium* ont un métabolisme généralement fermentaire, chimioorganotrophe. Par contre certaines espèces sont chimioautotrophes ou même chimiolithotrophes. Ces bactéries peuvent être saccharolytiques, protéolytiques, ni l'un ni l'autre ou les deux. Elles produisent habituellement un mélange d'acides organiques et d'alcools à partir d'hydrates de carbone ou de peptones. Elles peuvent aussi métaboliser les alcools, acides aminés, purines, stéroïdes et autres composés organiques (Sneath, 1986). Diverses espèces de *Clostridium* sont connues pour utiliser certains acides aminés comme accepteurs externes d'électrons (réaction de Stickland).

Finally, the nutritional needs, the metabolism and the metabolic pathways of bacteria of the genus *Clostridium* are very varied (Sneath, 1986).

4.2.2 Syntrophie

The requirements for growth of a microbial species can sometimes be satisfied by the presence of another species that precisely synthesizes the said factor. This metabolic interaction phenomenon is known as syntrophy although it is also sometimes called mutualism (Leclerc et al., 1983; Frobisher et Fuerst, 1976). The association of *Clostridium thermocellum* in coculture with *Clostridium thermosaccharolyticum* or *Clostridium thermohydrosulfuricum* has already been reported for its effectiveness in increasing the yield of ethanol produced comparatively to a pure culture (Ng et al., 1981; Wang et al., 1979). Later, Mori (1990) observed that the symbiotic relationship of *C. thermohydrosulfuricum* YM3 and *C. thermocellum* YM4, ethanol-producing bacteria, was probably a case of mutualism. In fact, these two microorganisms need yeast extract to grow in pure culture while in coculture they grow in the presence of cellulose without yeast extract and with a higher ethanol yield. Moreover, the supernatant of the culture of the strain YM3 can replace the yeast extract for the growth of the strain YM4.

Des associations syntrophiques basées sur le transfert d'hydrogène interspécifique ont également été observées chez certaines bactéries sporulées. Récemment, Friedrich et al. (1991) ont isolé un organisme sporulant nommé FlGly1, qui oxyde le glycolate en glyoxylate en syntrophie obligatoire avec une bactérie homoacétogène ou méthanogène consommatrice d'H₂. Cette souche extrêmement spécialisée oxyde seulement ce composé et ne croît sur aucun autre substrat. Les auteurs ont suggéré que cette bactérie appartiendrait soit au genre *Clostridium* ou au nouveau genre *Syntrophospora* (Zhao et al., 1990).

4.3 Transformation des composés aromatiques

Les réactions de transformations anaérobies au niveau des modifications et coupures des groupements de substitution du noyau aromatique constituent généralement l'étape initiale de la dégradation. En plus de la carboxylation, les premières étapes de dégradation incluent: la décarboxylation, la déméthylation, l'oxydation, la déshalogénation, l'hydroxylation, la déhydroxylation et la réduction (Grbic-Galic, 1986; Roberts et Fedorak, 1986; Balba et al., 1979). Bien que plusieurs consortiums méthanogènes possèdent la capacité d'effectuer ces réactions, les microorganismes impliqués ont été rarement isolés. Pour l'intérêt du présent travail, seulement quelques réactions seront traitées.

4.3.1 Décarboxylations

Zhang et al. (1990), Knoll et Winter (1989), Sharak Genthner et al. (1990) et Bisailon et al. (communication personnelle) ont démontré que l'acide p-hydroxybenzoïque était décarboxylé en phénol par un consortium méthanogène. Parmi ces auteurs, seulement Zhang et Wiegel (1990b) ont réussi à isoler à partir d'un tel consortium, une bactérie sporulée décarboxylant l'acide p-hydroxybenzoïque en phénol et l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque en catéchol. Cette souche nommée JW/Z-1 possède la capacité d'enlever des groupements carboxyles sur l'acide p-hydroxybenzoïque pour produire du phénol mais ne peut carboxyler ce composé. La souche JW/Z-1 qui requière de l'extrait de levure pour croître est un bâtonnet Gram-positif légèrement courbé formant une spore terminale, et serait classée parmi le genre *Clostridium*.

Une décarboxylation similaire avait déjà été observée récemment par Hsu et al. (1990) par un homoacétogène thermophile, *Clostridium thermoaceticum* ATCC 39073. Comme la souche JW/Z-1, cet organisme décarboxyle l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque. Hsu et al. (1990) et Zhang et Wiegel (1990b) ont observé que la décarboxylation ne favorisait pas la croissance. Cependant, Hsu et al. (1990) ont noté que *C. thermoaceticum* utilise le CO₂ et que sous des conditions limitantes de CO₂, la décarboxylation stimule la croissance. Hsu et al. (1990) ont

été les premiers à rapporter qu'une bactérie homoacétogène utilisait des groupements carboxyles pour sa croissance.

4.3.2 Déshalogénations

Ye et al. (1992) ont récemment observé qu'un consortium de bactéries anaérobies traité à la chaleur et/ou à l'éthanol (50%) avait conservé la capacité de déshalogéner l'Aroclor 1242, un biphenyl polychloré. Ces auteurs ont ainsi suggéré que des bactéries anaérobies sporulées seraient impliquées au niveau de la déchloruration réductrice des biphenyls polychlorés et que ces traitements étaient un important pas vers l'isolement des microorganismes déshalogénants. De façon similaire, Madsen et Aamand (1992) ont également suggéré qu'une bactérie sporulante participerait à la déchloruration du 2,4,6-trichlorophénol via le 2,4-dichlorophénol et le 4-chlorophénol.

Suite à un traitement à la chaleur d'un consortium méthanogène dégradant des composés chlorophénolés, Madsen et Licht (1992) ont isolé une bactérie anaérobie stricte pouvant transformer ces composés aromatiques chlorés. Cette souche nommée DCB-2 effectue des déshalogénations réductrices avec une préférence pour les chlorophénols substitués en position *ortho* par rapport au groupe OH du phénol. Cette souche est un bâtonnet légèrement courbé, Gram-positif formant des endospores et appartiendrait probablement au genre

Clostridium. La souche DCB-2 est la deuxième souche isolée capable d'effectuer des déhalogénations réductrices. DCB-2 diffère de *Desulfomonile tiedje* (DCB-1) la première isolée, par son aptitude à sporuler et par son incapacité à réduire le sulfate. Une autre différence a été aussi observée au niveau de la spécificité de la réaction de déshalogénéation. DCB-2 effectue des déhalogénations en position *ortho* et *meta* tandis que *D. tiedje* est limité par l'enlèvement des substitués halogénés en position *meta* (Mohn et Kennedy, 1992; Linkfield et Tiedje, 1990).

4.3.3 Déméthylations

La réaction de déméthylation permet l'enlèvement d'un groupe méthyle (CH_3) sur le composé dégradé. Sous des conditions anoxiques, la première étape de dégradation de plusieurs composés aromatiques méthoxylés est une déméthylation en position *ortho* (DeWeerd et al., 1988). Les O-déméthylations sont des réactions communes retrouvées chez les bactéries anaérobies (Frazer et Young, 1985). Cette réaction a été retrouvée dans une variété d'environnements anaérobies et est distribuée à travers divers groupes bactériens (Heijthuijsen et Hansen, 1990; Young et Frazer, 1987).

La majorité des souches en culture pure capable d'effectuer des déméthylations ont été isolées avant tout pour

accomplir d'autres types de réactions. C'est le cas pour la souche sporulée *Clostridium thermoaceticum* tel que mentionnée précédemment qui en plus d'effectuer des décarboxylations possède également la possibilité d'effectuer des O-déméthylations en présence de CO₂ sur des composés aromatiques tel que le syringate (Wu et al., 1988). D'autres souches ont été isolées et leur capacité à O-déméthylar des composés aromatiques a été démontrée (Liu et Sulfita, 1993; Dörner et Schink, 1991; Friedrich et al., 1991; Traunecker et al., 1991), par contre ces souches sont des bactéries fermentaires non sporulées. Par exemple, Liu et Sulfita (1993) ont récemment isolé à partir d'un consortium déméthylant le syringate, une bactérie nommée SS1, capable de O-déméthylar ce composé. La réaction de déméthylation est dépendante de la présence de l'H₂ et du CO₂ dans la phase gazeuse. Le syringate est premièrement métabolisé en méthylgallate comme intermédiaire et finalement en gallate. Cette souche est considérée comme mixotrophe obligatoire puisqu'elle utilise simultanément une source de carbone inorganique (CO₂) et organique (syringate).

De plus, dans certaines études, les souches n'ont pas été isolées et les bactéries responsables dans le consortium n'ont pas été caractérisées. Boyd et al. (1983) ont démontré qu'un consortium dégradant le phénol en conditions méthanogènes possédait en plus la capacité de

déméthyliser le o-, m- et p-méthoxyphénol en leur dihydroxybenzène correspondant. Kaminski et al. (1990) ont rapporté des O-déméthylations du 2-méthoxyphénol par un consortium acclimaté au 2- ou 3-crésol. Récemment, Bisailon et al. (1993) ont observé que leur consortium méthanogène en plus de carboxyler le phénol, pouvait effectuer la O-déméthylation du 2-méthoxyphénol en cathécol et de l'anisole en phénol, ces produits étant en suite carboxylés.

4.3.4 Oxydations

Des réactions d'oxydations ont déjà été démontrées en conditions méthanogènes. Par exemple, Grbic-Galic (1983) a observé l'oxydation de l'alcool coniféryl en acide férulique. Également, la dégradation de l'acide isobutyrique par un consortium méthanogène en acide butyrique et l'oxydation de ce dernier en acétate et méthane a été observée par Stieb et Schink (1989). Récemment, Bisailon et al. (1993) ont noté que leur consortium méthanogène carboxylant le phénol pouvait oxyder le 2-hydroxybenzyl alcool en acide 2-hydroxybenzoïque, composé classé persistant dans l'environnement par Horowitz et al. (1982).

Peu de microorganismes sporulés ont été isolés en culture pure pour leur capacité à oxyder des composés aromatiques sous des conditions anaérobies. Comme mentionné précédemment, Friedrich et al. (1991) ont isolé une bactérie

sporulée qui oxyde le glycolate en glyxolate mais en syntrophie obligatoire avec une bactérie consommatrice d'H₂. D'autres souches non sporulées ont été isolées par Dörner et Schink (1991) et Friedrich et Schink (1991). Ces dernières oxydent le D-mandelate en acide benzoïque et acétate et le glyoxylate en CO₂, H₂ et glycolate, respectivement.

Dans ce travail, une étude microbiologique du consortium de Beudet et al. (1986) carboxylant le phénol en conditions méthanogènes a été réalisée. Notre objectif principal a été d'isoler et de caractériser les microorganismes importants responsables impliqués dans cette réaction. Certaines tentatives ont été entreprises dans le but de démontrer l'implication d'une coenzyme A ligase dans la transformation du phénol en acide benzoïque. L'implication des bactéries anaérobies facultatives et sporulées a été vérifiée. L'isolement de souches sporulées a été réalisé et leur capacité à carboxyler le phénol ainsi qu'à effectuer des réactions de décarboxylation, de O-déméthylation et d'oxydation a été testée. Finalement, différentes études ont été accomplies à partir de sous-cultures d'un consortium ayant subi différents traitements à la chaleur combiné ou non à un traitement à l'éthanol.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. PROVENANCE DES MICROORGANISMES

Le consortium de bactéries anaérobies sélectionné par Beudet et al. (1986) a été utilisé dans cette étude pour sa capacité à dégrader des composés phénolés et plus particulièrement de carboxyler le phénol en acide benzoïque (Bécharde et al., 1990).

2. CROISSANCE DU CONSORTIUM ANAÉROBIE

2.1 Milieu de culture

Le milieu minimal de Boyd et al. (1983) a été utilisé pour cultiver le consortium de référence. Ce milieu contenait (g/L): KH_2PO_4 , 0.27; K_2HPO_4 , 0.35; NH_4Cl , 0.53; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.10; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.073; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02; résazurine, 0.001; et une solution de minéraux, 10 mL. Cette solution de minéraux était composée des éléments suivants (mg/L): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1; ZnCl_2 , 0.1; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1; H_3BO_3 , 0.1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1. Du protéose peptone no 3 (Difco Laboratories, Détroit, Michigan) a été ajouté au milieu à la concentration de 0,05% (p/v). Les produits suivants étaient stérilisés par filtration sur membrane de porosité 0,20 μm (Sarstedt Canada Inc., Montréal, Québec), barbotés avec un mélange de gaz 80% N_2 : 10% H_2 : 10% CO_2 et ajoutés au milieu après autoclavage (par litre): 10 mL d'une solution de vitamines (Wolin et al., 1963); 7,1 mL d'une solution de 7%(p/v) de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ comme agent réducteur; 14,3 mL d'une solution de 10% (p/v) de NaHCO_3 pour ajuster le pH à environ

7.3; 6,25 mL d'une solution de 2,4% (p/v) de phénol (Fluka Biochemika, Switzerland). La concentration finale de phénol dans le milieu de culture était de 150 mg/L soit 1,6 mM.

Des techniques d'anaérobiose stricte ont été employées. Le milieu était porté à ébullition afin de chasser l'oxygène, en présence d'un réfrigérant pour condenser la vapeur produite, et transféré dans des bouteilles sérologiques sous jet gazeux de $N_2:H_2:CO_2$ (80:10:10%). Les bouteilles étaient fermées avec un bouchon de butyl (Géo-microbial Technologies Inc., Oklahoma, USA) et le milieu autoclavé pendant 20 minutes à 121°C. Pour simplifier le texte ce milieu additionné des différents éléments présentés précédemment sera dorénavant appelé milieu minimal.

2.2 Maintenance

Un inoculum de 12,5% (v/v) d'une culture dégradant le phénol était transféré aseptiquement à l'aide d'une seringue jetable (Becton-Dickenson) introduite dans le bouchon d'une bouteille sérologique de 100 mL contenant 70 mL de milieu minimal frais. Les transferts ont été effectués lorsque le phénol était complètement dégradé, soit environ 10 jours d'incubation à 37°C en absence de lumière. Le consortium a été maintenu en répétant continuellement cette procédure.

3. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CG)

3.1 Extraction

Un volume de 1 mL de l'échantillon à analyser, additionné de m-crésol (150 mg/L) comme standard interne, a été acidifié par ajout de 0,2 mL de H₂SO₄ 50% (v/v). Par la suite, 0,4 g de NaCl et 1 mL d'éther froid ont été ajoutés. Après agitation et centrifugation (2000 rpm, 1 minute), la phase étherée a été recueillie et conservée sur glace.

3.2 Dosage

Un volume de 150 µL de la phase étherée a été déposé dans un vial conique (Hewlett Packard, USA) et évaporé sous jet d'azote gazeux puis l'ouverture du vial a été fermée hermétiquement. L'extrait a été dérivé par la technique de silylation avec le N,O-bis (triméthylsilyl)-trifluoroacélanide (BSTFA) (Pierce Chemicals, Rockford, Illinois): un volume de 150 µL de BSTFA:Acétonitrile (1:4) a été ajouté à l'extrait évaporé, puis le tout a été incubé à 70°C pour 30 minutes. Deux µL de cette solution ont été injectés dans le chromatographe en phase gazeuse (CG) modèle 5890 A (Hewlett-Packard) qui possédait une colonne capillaire de type phényl-méthyl-silicone de 25 mètres de longueur et de 0,2 mm de diamètre interne. Le chromatographe était muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'azote servait de gaz vecteur à un débit de 20 mL/min.. La programmation du four était comme suit: la température initiale était de 50°C pour une

minute puis augmentait à un taux de 11°C/min. pour atteindre 230°C, cette température finale était maintenue pendant 6 minutes. La température de l'injecteur était de 250°C et celle du détecteur de 300°C. Les composés observés ont été identifiés à l'aide de standards.

3.3 Quantification des composés

Des courbes standards ont été réalisées pour le phénol (Fluka Biochemika, Switzerland) et l'acide benzoïque (Baker Chemicals Co., Philipsburg, NJ, USA) dans le but de quantifier ces composés dans les cultures. Pour ce faire, les solutions suivantes ont été préparées pour chacun de ces composés: 25, 37.5, 50, 75, 100 et 150 mg/mL. Le ratio de l'aire sous la courbe obtenu au CG pour chacune des solutions par rapport au standard interne a été reporté sur un graphique en fonction de la concentration du composé.

4. MESURE DU VOLUME DE GAZ PRODUIT

Le volume réel de gaz produit par le consortium lors de la dégradation du phénol a été estimé par le volume de gaz produit dans une culture avec phénol moins le volume de gaz obtenu d'une culture sans phénol. Le volume de gaz a été mesuré à l'aide d'une seringue graduée jetable en propylène de 10 mL (Becton-Dickenson) introduite verticalement dans le bouchon d'une bouteille de culture.

5. CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DU PHÉNOL PAR LE CONSORTIUM

À partir d'une culture dégradant le phénol en conditions anaérobies, l'évolution de la concentration du phénol, de l'acide benzoïque et du volume total de gaz produit a été déterminée en fonction du temps.

Le consortium a été cultivé dans le milieu minimal et sous les conditions de culture utilisées pour son maintien (section 2.2). Le dosage du phénol, de l'acide benzoïque et du gaz a été effectué périodiquement tel que décrit précédemment.

6. IMPLICATION D'UNE COENZYME A LIGASE

L'étude concernant l'implication d'une coenzyme A ligase dans la transformation du phénol a été réalisée en collaboration avec M. Sylvestre, INRS-Santé, Pointe-Claire, Québec. Une sonde moléculaire spécifique pour une région homologue retrouvée chez différentes coenzymes A ligases (Babbitt et al., 1992; Scholten et al., 1991) a été utilisée afin de déterminer si le consortium de référence possédait les gènes codant pour la coenzyme A ligase.

6.1 Sonde moléculaire

Le plasmide pHUG 60 (Savard et al., 1992) a été utilisé pour préparer la sonde moléculaire car son génotype

possédait la région homologue des coenzymes A ligases. Les techniques pour la préparation de la sonde ont été puisées dans le manuel de Maniatis (1982). L'ADN du plasmide pHUG 60 a premièrement été digéré par l'enzyme de restriction EcoRI. La digestion a été effectuée à 37°C, pendant 24 heures dans le tampon 3 (BRL React Buffer Selection: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl).

Immédiatement après digestion, l'ADN plasmidique a été séparé par électrophorèse sur gel d'Agarose (Sigma Agarose Type V) contenant du bromure d'éthydium (0,5 µg/mL) dans un tampon TRIS-acétate (TAE): 0,04 M TRIS-acétate; 0,002 M EDTA. Un fragment d'environ 1,3 Kb a été récupéré sur le gel et l'ADN a été nettoyé par la méthode du Gene CleanTM (Kit Bio 101, Bio/Can Scientific Inc.).

L'ADN résultant a été marqué au ³²Phosphore et a servi comme sonde moléculaire lors de l'hybridation.

6.2 Hybridation

L'hybridation de colonies a été accomplie par transfert de bactéries sur un filtre de nitrocellulose tel que décrit par Maniatis (1982). Un culot de centrifugation du consortium de référence a été déposé sur le filtre puis lysés pour libérer l'ADN. L'ADN a par la suite été fixé par une cuisson au four. Après hybridation avec la sonde marquée au

^{32}P , le filtre a été exposé sur un film par autoradiographie. La lecture des résultats a été effectuée en recherchant les hybridations positives représentées par une tâche noire. Comme témoin positif, le plasmide pHUG 60 a été utilisé et une souche d'*Arthrobacter* sp. comme témoin négatif.

7. BACTÉRIES ANAÉROBIES FACULTATIVES

Cette approche consistait à sélectionner les bactéries anaérobies facultatives du consortium pour vérifier si elles étaient impliquées dans la carboxylation du phénol.

7.1 Sélection des microorganismes

Pour la sélection des microorganismes facultatifs, des cultures ont été inoculées comme précédemment mais incubées à 37°C en conditions aérobies sous agitation à 200 rpm sur un appareil modèle G24 (New Brunswick Co.) pendant 27 jours. L'agent réducteur du milieu minimal ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) a été omis dans ces cultures. Une culture témoin en conditions anaérobies a été effectuée tel que décrit précédemment (section 2.2).

7.2 Dosage

Pour chaque culture le phénol a été dosé périodiquement par chromatographie en phase gazeuse tel que décrit précédemment. Lors des dosages, un état frais a été

effectué sur chaque culture et observé à l'aide d'un microscope Leitz (Otto et Watzka Co., Montréal).

7.3 Dénombrement bactérien

Des comptages des bactéries anaérobies facultatives ont été effectués sur les cultures aérobies et anaérobies décrites précédemment. Un volume de 0,1 mL de ces cultures a été étalé sans dilution en triplicata sur le milieu solide BHI ("Brain Heart Infusion", Difco) contenant 1,2% (p/v) d'agar no 1 (Oxoid Limited, England) et du phénol (1,6 mM). Les géloses ont été incubées en conditions aérobies à 37°C. La lecture des résultats s'est effectuée après un et 20 jours d'incubation.

8. BACTÉRIES SPORULÉES

Comme l'étude des bactéries anaérobies facultatives, cette étude a été effectuée pour vérifier si les bactéries sporulées étaient impliquées au niveau de la carboxylation du phénol en acide benzoïque par le consortium.

8.1 Traitement à la chaleur

La chaleur a été utilisée pour éliminer les cellules végétatives tout en conservant les bactéries sporulées qui sont hautement thermorésistantes (Sneath, 1986; Leclerc et al., 1983).

Des cultures vieilles dégradant le phénol, soit incubées depuis plus de 19 jours pour assurer une formation de spores, ont été incubées dans un bain-marie à 60°C ou 80°C. La température a été mesurée avec un thermomètre placé dans une autre bouteille sérologique contenant le même volume de milieu. À partir du moment où le thermomètre indiquait la température désirée, les cultures ont été incubées pendant 20 minutes à 60°C ou 15 minutes à 80°C. À partir de ces cultures refroidies à la température de la pièce, des cultures ont été inoculées et incubées tel que décrit précédemment. Le phénol a été dosé à différents temps d'incubation pour vérifier si l'activité de dégradation était conservée. De plus, du phénol (1,6 mM) et du protéose peptone (0,05%) ont été réadditionnés, après 55 jours d'incubation, directement à la culture inoculée avec le consortium chauffée à 80°C/15 minutes.

Des sous-cultures successives, de la culture chauffée à 80°C/15 minutes ont été effectuées pour vérifier si l'activité de dégradation du phénol était maintenue et pour s'assurer que la population initiale avant traitement ne se reformerait pas suite à plusieurs sous-cultures. Les transferts ont été effectués lorsque le phénol était complètement transformé en utilisant une procédure semblable à celle décrite précédemment.

8.2 Traitement à la chaleur combiné à l'éthanol

Comme la chaleur, l'éthyl alcool (éthanol) affecte peu les spores bactériennes mais est létal pour les cellules végétatives (Sneath, 1986; Koranksy et al., 1978). Ce traitement combiné à celui de la chaleur a été utilisé pour éliminer toutes cellules végétatives y compris, s'il y a lieu, les bactéries non sporulantes thermorésistantes. Cette approche a été inspirée des travaux de Ye et al. (1992).

Une sous-culture, incubée depuis 19 jours, d'une culture chauffée (80°C/15 min.) a été traitée à nouveau à 80°C pendant 15 minutes puis inoculée et incubée comme déjà décrit (8.1). Le reste de cette culture a reçu, dans des conditions anaérobies, un volume égale d'éthanol 95% (stérilisé par filtration (0,2 µm; Gelman Sciences); barboté sous jet de gaz N₂:H₂:CO₂ (80:10:10%) et supplémenté de 0,71% (p/v) de Na₂S.9H₂O). Le mélange a été incubé à 20°C pendant 50 minutes et agité occasionnellement. Afin d'éliminer complètement l'éthanol, la culture traitée a subi trois centrifugations successives à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 20°C où chaque fois le surnageant a été jeté et le culot repris dans du milieu minimal frais sans phénol. Le temps total de contact avec l'éthanol a été d'environ une heure. Un inoculum de 12,5% (v/v) de la suspension de cellules lavées a été transféré dans du milieu minimal avec phénol (1,6 mM) puis la culture a été incubée et dosée tel que décrit précédemment.

Une culture témoin a également été effectuée, elle a subi les mêmes procédures mais a reçu un volume égal de milieu minimal au lieu de recevoir de l'éthanol. Toutes manipulations qui nécessitaient des conditions anaérobies strictes ont été effectuées dans une hotte anaérobie (Forma Scientific). Cet essai a été effectué en duplicata. Comme précédemment, des sous-cultures successives des cultures traitées à la chaleur et à l'éthanol ont été effectuées.

8.3 Traitement à la chaleur plus intense

Cette expérience a été réalisée pour connaître la limite de résistance des spores à la chaleur tout en conservant la capacité de dégrader le phénol. De plus, ces traitements plus intenses visaient l'élimination des bactéries sporulées non essentielles à la carboxylation du phénol. Cet essai a été inspiré des travaux de Ye et al. (1992).

Une sous-culture dégradant le phénol, inoculée avec un consortium traité à la chaleur (80°C/15 min.) et à l'éthanol (47,5%), a été incubée dans un bain-marie. L'augmentation de la température de la culture a été suivie tel que décrit précédemment (8.1). La culture a subi quatre traitements successifs, soit 80°C/15 minutes, 90°C/10 minutes, 95°C/10 minutes et 100°C/5 minutes. Un traitement à 110°C a également été effectué en autoclavant la culture pendant 5 minutes. Après chaque traitement, un inoculum de 12,5% (v/v)

de la culture a été transféré dans du milieu minimal contenant du phénol (1,6 mM) et ces cultures ont été incubées à 37°C. Le phénol a été dosé périodiquement pour chaque culture.

À partir d'une sous-culture provenant d'une culture chauffée à 90°C où la majorité du phénol avait été dégradée, cinq dilutions décimales en série ont été effectuées. Un inoculum de 12,5% (v/v) de chacune de ces dilutions a été transféré en duplicata dans le milieu minimal avec phénol (1,6 mM). Les cultures ont été incubées à 37°C. La concentration de phénol résiduel a été déterminée à des intervalles de temps régulier. Ces dilutions ont été effectuées dans le but d'éliminer des bactéries non essentielles à la carboxylation du phénol.

8.4 Observations

8.4.1 Macroscopiques

Des dilutions appropriées de sous-cultures des cultures traitées décrites précédemment ont été ensemencées en conditions anaérobies strictes sur milieu solide Columbia avec 5% de sang (no 1121, Laboratoires Quélab Inc., Montréal, Canada). Après 72 heures d'incubation, une description sommaire des colonies a été effectuée et les résultats ont été comparés pour vérifier l'efficacité de chaque traitement.

8.4.2 Microscopiques

Des observations en microscopie électronique à transmission EM300 (Philips Electronic Instrument, Mont Vermont, NY) ont été effectuées avec des cultures du consortium avant et après les traitements décrits précédemment. La morphologie des cellules (Gram positif et négatif) a également été observée pour la classification des microorganismes. Les microorganismes étaient d'abord fixés à la glutaraldéhyde (1 ou 2%) et colorés négativement avec une solution de phosphotungstate. Les observations ont été effectuées en collaboration avec Robert Alain, Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier.

9. ÉTUDES DES BACTÉRIES SPORULÉES

9.1 Isolement

L'inoculum choisi provenait d'une culture du consortium chauffé à 80°C/15 minutes. L'approche pour isoler les souches anaérobies sporulantes a été inspirée des travaux de Zhang et Wiegel (1990b). Deux types de milieux ont été utilisés. Le premier était le milieu de culture Columbia anaérobie avec 5% de sang (no 1121, Laboratoires Quélab Inc., Montréal, Canada). Le second était le milieu minimal avec de l'Agar no 1, 1,2% (p/v) (Oxoid Limited, England), du phénol (1,6 mM) et du HCl-Cystéine (0,5 g/L) (Baker, USA) comme agent réducteur. Pour obtenir des conditions anaérobies strictes, les géloses étaient réduites dans des jarres anaérobies

(Système BBL-Gaspak, Becton-Dickenson) au minimum 48 heures avant leur utilisation.

Dans une hotte anaérobie, des dilutions décimales de la culture ont été effectuées dans un tampon phosphate salin (PBS) réduit avec 0,7% (p/v) de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Un volume de 0,1 mL de chaque dilution (10^{-1} à 10^{-4}) a été inoculé sur le milieu solide minimal et Columbia. Chaque ensemencement a été effectué en duplicata. Les géloses ensemencées ont été incubées dans des jarres anaérobies à 37°C à la noirceur de 24 à 72 heures. Les colonies présentant des types macroscopiques différents ont été repiquées sur les milieux solides Columbia et minimal jusqu'à l'obtention de souches isolées en culture pure.

9.2 Observations macroscopiques

Une description sommaire des colonies des souches isolées sur milieu Columbia et sur milieu minimal solide a été effectuée. Les souches provenant du milieu minimal solide ont été inoculées sur milieu Columbia pour comparer ces souches avec celles isolées sur milieu Columbia.

9.3 Observations microscopiques

Une coloration de Gram a été effectuée sur chaque souche isolée. La morphologie des cel

lules a été observée à l'aide d'un microscope Leitz (Otto et Watzka Co., Montréal, Canada).

Les souches pures ont également été observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission comme décrit précédemment à la section 8.4.2.

9.4 Identification

L'identification sommaire des souches isolées a été effectuée à partir de la morphologie, la coloration de Gram et à l'aide du système API 20A (API Analytab Product, NY, USA). L'identification a été complétée avec des méthodes conventionnelles au "Laboratoire de lutte contre la maladie" (Santé et Bien-être social Canada, Ottawa).

9.5 Capacité de dégradation

9.5.1 Carboxylation

Les souches isolées sur milieu Columbia et sur milieu minimal solide ont été inoculées en duplicata sous conditions anaérobies en culture pure et coculture dans 70 mL de milieu minimal liquide (0,5% et 0,05% (p/v) de protéose peptone) contenant du phénol (1,6mM) pour vérifier si elles avaient la capacité de carboxyler le phénol en acide benzoïque. Toutes les cultures ont été incubées à 37°C. Le phénol a été dosé périodiquement pour chacune des cultures.

Considérant le fait que plusieurs bactéries portent une charge négative nette, nous avons utilisé dans certaines expériences une résine échangeuse d'anions comme dans les travaux de Kindzierski et al. (1992), afin de favoriser les échanges interbactériens et ainsi permettre une carboxylation du phénol à partir des souches isolées. La capacité de transformer le phénol à partir des souches isolées, a été vérifiée en les inoculant en coculture dans le milieu minimal avec phénol contenant du DEAE-Séphacryl 2,5% (v/v) (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden; taille des particules: 40-150 μm) comme échangeur d'anions. Un milieu non inoculé a servi de témoin négatif pour vérifier l'adsorption du phénol sur la résine. Toutes les cultures ont été incubées à 37°C et le phénol a été dosé régulièrement.

9.5.2 Décarboxylation, oxydation et O-déméthylation

Sachant que le consortium de référence en plus d'effectuer des carboxylations, pouvait accomplir des décarboxylations, oxydations et O-déméthylations (Bisaillon et al., 1993), les souches isolées ont été testées pour vérifier si elles possédaient la capacité d'effectuer ces autres réactions.

Les souches isolées sur milieu Columbia ont été inoculées en milieu minimal liquide, tel que décrit précédemment (9.5.1), contenant le composé à analyser. Les

produits testés étaient les suivants: l'acide p-hydroxybenzoïque (1,1 mM; Sigma Chemicals Company, MO, USA) pour les réactions de décarboxylation; le 2-hydroxybenzyl alcool (1,2 mM; Aldrich Chemicals Co., Inc.) pour les réactions d'oxydation; le 2-méthoxyphénol (1.2 mM; Aldrich Chemicals Co., Inc.) et l'anisole (1,4 mM; Aldrich Chemicals Co., Inc.) pour les réactions de O-déméthylation. Les cultures ont été incubées et les produits dosés tel que déjà décrit.

10. CONSORTIUM TRAITÉ

Différentes études ont été effectuées à partir de sous-cultures d'un consortium ayant subi différents traitements à la chaleur combiné ou non à l'éthanol. Pour simplifier le texte, nous référerons à ces cultures dorénavant en parlant de consortium traité car les populations et colonies observées sur milieux solides étaient similaires d'un traitement à l'autre.

10.1 Importance du surnageant de l'inoculum

L'importance du surnageant de l'inoculum pour la dégradation du phénol a été étudiée. Une sous-culture dégradant le phénol provenant d'une culture chauffée à 80°C/15 minutes a été centrifugée à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Sous une hotte anaérobie, le surnageant de culture a été jeté et le culot repris dans un volume égal de milieu minimal frais

sans phénol. Cette procédure a été répétée deux fois. Un volume de 10 mL de la suspension de cellules lavées a été transféré dans 70 mL de milieu minimal avec phénol (1,6 mM). La culture a été incubée à 37°C et le phénol dosé périodiquement. Une culture témoin a été effectuée, elle a subi les mêmes procédures sauf que le surnageant de culture récupéré après centrifugation n'a pas été jeté mais a servi à reprendre le culot. Ce test a été effectué en duplicata.

10.2 Capacité de dégradation

La capacité d'effectuer des réactions de décarboxylation, oxydation et O-déméthylation d'une culture dégradant le phénol inoculé avec un consortium traité a été effectuée comme décrit à la Section 9.5.2. Un inoculum de 12,5% (v/v) d'une culture du consortium traité a été transféré dans 70 mL de milieu minimal contenant l'un des produits à tester. Les cultures inoculées effectuées en duplicata ont été incubées et les produits dosés tel que décrit précédemment. Une culture témoin a également été effectuée en utilisant le consortium de référence comme inoculum.

10.3 Voie de transformation de l'acide p-hydroxybenzoïque

Cette étude a été effectuée afin de préciser les produits de transformation de l'acide p-hydroxybenzoïque par le consortium traité. L'utilisation de l'acide p-

hydroxybenzoïque marqué au [^{13}C] permettait de confirmer la formation d'acide benzoïque à partir de ce composé. Une culture témoin a aussi été effectuée avec le consortium anaérobie de référence.

Le milieu de culture était le milieu minimal contenant du [$\text{COOH-}^{13}\text{C}$] acide p-hydroxybenzoïque (1,1 mM; synthétisé par François Lépine, Institut Armand-Frappier). Un inoculum de 12,5% (v/v) a été utilisé et les cultures ont été incubées à 37°C. L'acide p-hydroxybenzoïque a été dosé régulièrement par CG. En collaboration avec F. Lépine, Centre de recherche en microbiologie appliquée, Institut Armand-Frappier, les produits de dégradation ont été confirmés par chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CG/SM). L'appareil utilisé comprenait un chromatographe semblable à celui décrit précédemment, couplé à un spectromètre de masse (SM) "Ion Trap 800" (Finnigan). Le spectre de masse a été mesuré par balayage répétitif de 70 à 400 unités de masse atomique. L'identification a été effectuée en recherchant la présence d'acide benzoïque ayant subi une augmentation d'une unité de masse atomique.

10.4 Sous-culture sur milieux solides

Cette approche a été inspirée des travaux de May et al. (1992), afin de vérifier si l'inoculation d'une culture dégradant le phénol sur un milieu solide conservait sa

capacité de carboxyler le phénol lorsque transféré à nouveau en milieu liquide.

Un consortium de référence et un consortium traité dégradant le phénol ont été utilisés comme inoculum. Dans une hotte anaérobie, un volume de 0,1 mL de chaque culture a étéensemencé en duplicata sur le milieu solide Columbia ou minimal avec phénol. Après une incubation à 37°C pendant 48 heures et 4 jours respectivement, les colonies sur les géloses ont été récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur recourbée et transférées dans du milieu minimal liquide contenant du phénol (1.6 mM). Le phénol a été dosé périodiquement pour chaque culture.

10.5 Croissance des souches et dégradation du phénol

La croissance des souches présentes dans un consortium traité a été suivie dans le temps et mise en relation avec la transformation du phénol. Une sous-culture d'un consortium traité dégradant le phénol a été utilisée. Après différents temps d'incubation, un volume de 0,1 mL de la dilution appropriée de la culture a été étalé sur le milieu solide Columbia. Les ensemencements ont été effectués en duplicata. Après une incubation de 72 heures dans des jarres anaérobies, les colonies ont été dénombrées sur les géloses où l'on pouvait différencier toutes les souches (<100 colonies pour chaque souche). A chaque dénombrement bactérien, un

dosage du phénol a été effectué. L'énumération des souches s'est poursuivie jusqu'à la transformation complète du phénol dans la culture. Une mesure de pH de la culture a également été effectuée périodiquement.

10.6 Éthanol comme additif

10.6.1 En milieu liquide

L'importance de l'éthanol pour la transformation du phénol a été vérifiée en transférant une sous-culture du consortium traité dans un milieu minimal avec phénol (1.6 mM) contenant de l'éthanol 95% (50 mM et 150 mM). Selon les travaux de Zeikus et al. (1980), les bactéries consommatrices d'éthanol nécessitent la présence d'acétate dans le milieu de culture. Dans cette optique, des cultures ont aussi été inoculées dans un milieu contenant de l'éthanol 95% (50 et 150 mM) et de l'acétate de sodium (50 mM). Des cultures témoins sans éthanol, avec et sans acétate de sodium ont également été inoculées. La vitesse de dégradation du phénol a été comparée avec celles des cultures témoins pour déterminer si l'éthanol favorisait une dégradation plus rapide.

Le consortium immédiatement après traitement a aussi été transféré dans du milieu minimal contenant du phénol (1.6 mM) avec ou sans éthanol 95% (100 et 150 mM). La vitesse de dégradation du phénol des cultures avec et sans éthanol a

été comparée afin de vérifier l'importance de l'éthanol au niveau de la germination des spores. Ces tests ont été effectués en duplicata.

10.6.2 En milieu solide

Cette approche consistait à rechercher de nouvelles souches sur un milieu solide contenant de l'éthanol 95%. Les milieux utilisés ont été le milieu minimal contenant 1,2% (p/v) d'agar, du HCl-cystéine (0,5 g/L) comme agent réducteur et de l'éthanol 95% (110 et 325 mM). Les mêmes milieux contenant en plus de l'acétate de sodium (25 mM) ont également été utilisés. L'inoculum provenait d'une sous-culture du consortium traité dégradant le phénol. Un volume de 0,1 mL de chaque dilution décimale (10^{-1} à 10^{-5}) a été inoculé en duplicata sur les milieux solides. Les géloses ont été incubées à 37°C pendant 9 jours avant d'être examinées.

10.6.3 Seule source de carbone

L'éthanol a été utilisé comme seule source de carbone dans un consortium traité dans le but de favoriser, si il y a lieu, la croissance de souches métabolisant l'éthanol et de déterminer si elles sont impliquées dans la carboxylation du phénol. Un inoculum de 12,5% (v/v) d'une culture du consortium traité a été transféré dans un milieu minimal sans protéose peptone avec phénol (1.6 mM) contenant 150 mM ou 750 mM d'éthanol 95%. Le phénol a été dosé après

différents temps d'incubation afin de vérifier la transformation du phénol sous ces conditions. Pendant l'incubation, des dilutions décimales appropriées de la culture ont été ensemencées sur milieu Columbia pour rechercher la présence de colonies dominantes.

10.7 Sucres fermentescibles

L'identification des souches isolées a permis de sélectionner des caractéristiques devant permettre seulement la croissance d'une ou deux souches du consortium traité. Une sous-culture d'un consortium traité dégradant le phénol a servi d'inoculum. Un volume de 10 mL de cette culture a été transféré dans 70 mL de milieu minimal liquide sans protéose peptone contenant du phénol (1.6 mM) et du glucose 0,05% ou 0,5% (p/v) (Baker Co.) ou du xylose 0,05% ou 0,5% (p/v) (Sigma Co.). Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 14 jours. Puis ces cultures ont été repiquées dans des milieux frais en présence des sucres pour les enrichir davantage en microorganismes qui fermentent le glucose ou le xylose. A partir de ces cultures, le phénol a été dosé périodiquement pour vérifier si les souches favorisées avaient un rôle à jouer dans la carboxylation du phénol. En parallèle, les cultures ont été ensemencées sur milieu solide Columbia afin de vérifier la croissance des souches devant être favorisées et l'absence des autres.

10.8 Effet des antibiotiques

Cette étude supposait que certaines bactéries du consortium traité étaient sensibles et d'autres résistantes à un antibiotique donné. Ainsi le rôle de certaines souches dans la carboxylation du phénol pouvait être déterminé en inhibant la croissance de certaines souches dans une sous-culture liquide du consortium traité.

10.8.1 Antibiogramme

Dans un premier temps, un antibiogramme par la méthode des disques a été effectué sur les souches isolées afin de connaître leur sensibilité à une gamme d'antibiotiques. Pendant l'incubation, l'antibiotique contenu dans chaque disque diffuse radialement dans la gélose autour du disque. Si la bactérie est sensible à un antibiotique donné, une zone d'inhibition dont le rayon est proportionnelle à la sensibilité du microorganisme apparaîtra autour du disque (Frobisher et Fuerst, 1976). Dans une hotte anaérobie, les souches ont été inoculées en triplicata sur milieu solide Columbia de façon à former un tapis uniforme de colonies. Avant incubation, une série de disques imprégnés de différents antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses à l'aide d'un distributeur automatique. Neuf antibiotiques (Becton and Dickenson Microbiology System, Maryland, USA) ont été testés: chloramphénicol (30 μg), érythromycine (15 μg),

gentamycine (10 μg), ampicilline (10 μg), tétracycline (5 μg), bacitracine (10 U), pénicilline (10 U), streptomycine (10 μg), néomycine (5 μg). Les géloses ont été incubées dans des jarres anaérobies à 37°C. La sensibilité des souches aux antibiotiques a été évaluée après 48 heures d'incubation.

10.8.2 Milieu liquide

Selon l'antibiogramme effectué sur les souches isolées, certains antibiotiques ont été testés sur des cultures en milieu liquide du consortium traité. Un volume de 10 mL d'une culture du consortium traité dégradant le phénol a été inoculé dans 70 mL de milieu minimal avec phénol (1,6 mM) contenant l'antibiotique choisi. Trois antibiotiques (Sigma Co.) ont été testés à quatre concentrations différentes: le chloramphénicol (5, 10, 100 et 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$); l'érythromycine (2.5, 5, 7.5 et 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et la tétracycline (0.31, 0.63, 0.84 et 1.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Une culture inoculée sans antibiotique a servi de culture témoin. Les cultures ont été incubées à 37°C et le phénol a été dosé régulièrement.

Pour vérifier l'action des antibiotiques sur les souches, des échantillons des cultures ont été inoculés sur milieu solide. Dans une hotte anaérobie, des dilutions décimales des cultures ont été effectuées dans un tampon phosphate salin. Un volume de 0,1 mL des cultures et de chaque dilution a été inoculé sur le milieu solide Columbia.

Les ensemencements ont été effectués en duplicata. Les géloses ont été incubées dans des jarres anaérobies à 37°C pendant 72 heures. L'analyse des résultats s'est faite par comparaison à la culture témoin.

Les cultures où des souches ont été éliminées et possédant toujours la capacité de dégrader le phénol ont été transférées une autre fois dans un milieu minimal avec phénol contenant la même concentration d'antibiotique. Par la suite, le maintien de ces cultures a été effectué tel que décrit pour le consortium de référence (2.2). Pour s'assurer de l'élimination de certaines souches, quelques échantillons des sous-cultures de maintenance ont été ensemencés sur géloses.

RÉSULTATS

1. CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DU PHÉNOL PAR LE CONSORTIUM DE RÉFÉRENCE

L'évolution de la concentration du phénol, de l'acide benzoïque et du volume total de gaz produit a été déterminée en fonction du temps d'incubation d'une culture du consortium de référence en conditions anaérobies (Figure 5). Plus de 80% du phénol a été transformé après 6 jours d'incubation et il l'était complètement après 12 jours. La disparition du phénol a été proportionnelle à l'apparition de l'acide benzoïque dans la culture. L'acide benzoïque s'est accumulé jusqu'au cinquième jour d'incubation puis a été dégradé par la suite. La production de gaz a débuté au deuxième jour d'incubation. Elle s'est avérée plus grande seulement dans les cinq derniers jours d'incubation.

2. ACTIVITÉ D'UNE COENZYME A LIGASE

Une hybridation a été effectuée sur le consortium de référence avec une sonde moléculaire spécifique pour une région homologue retrouvée chez différentes coenzymes A ligases. Certains résultats ont démontré que le consortium de référence semblait posséder une coenzyme A ligase étant donné que la sonde moléculaire hybridait positivement (Figure 6). Par contre, les résultats obtenus suite à d'autres hybridations sur le consortium de référence n'ont pas permis de confirmer ces résultats. D'autres études plus élaborées seraient nécessaires pour trancher la question. Compte tenu

FIGURE 5: Cinétique de dégradation du phénol par le consortium de référence en conditions méthanogènes. Phénol (■), acide benzoïque (●), gaz (Δ).

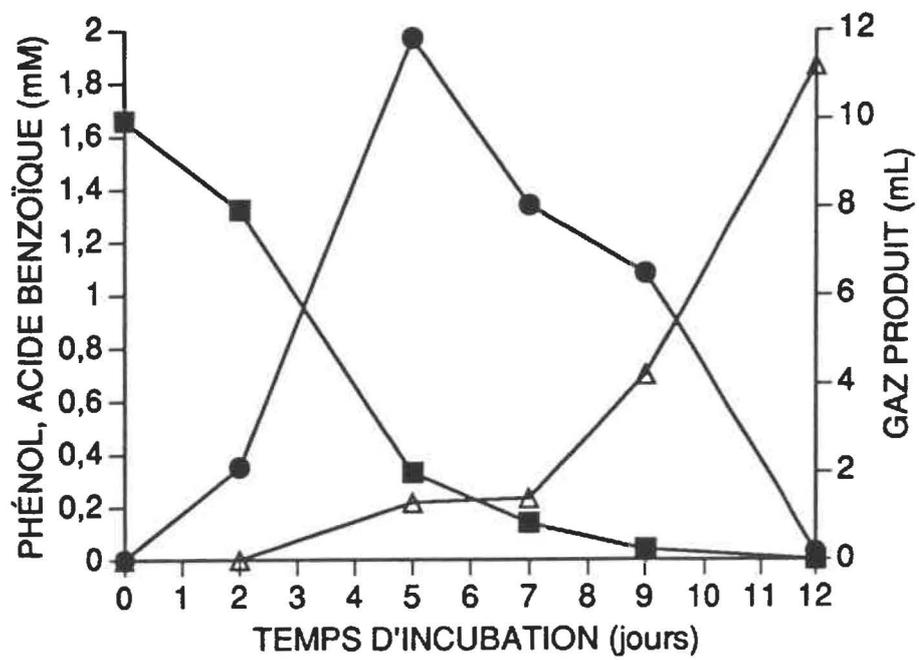
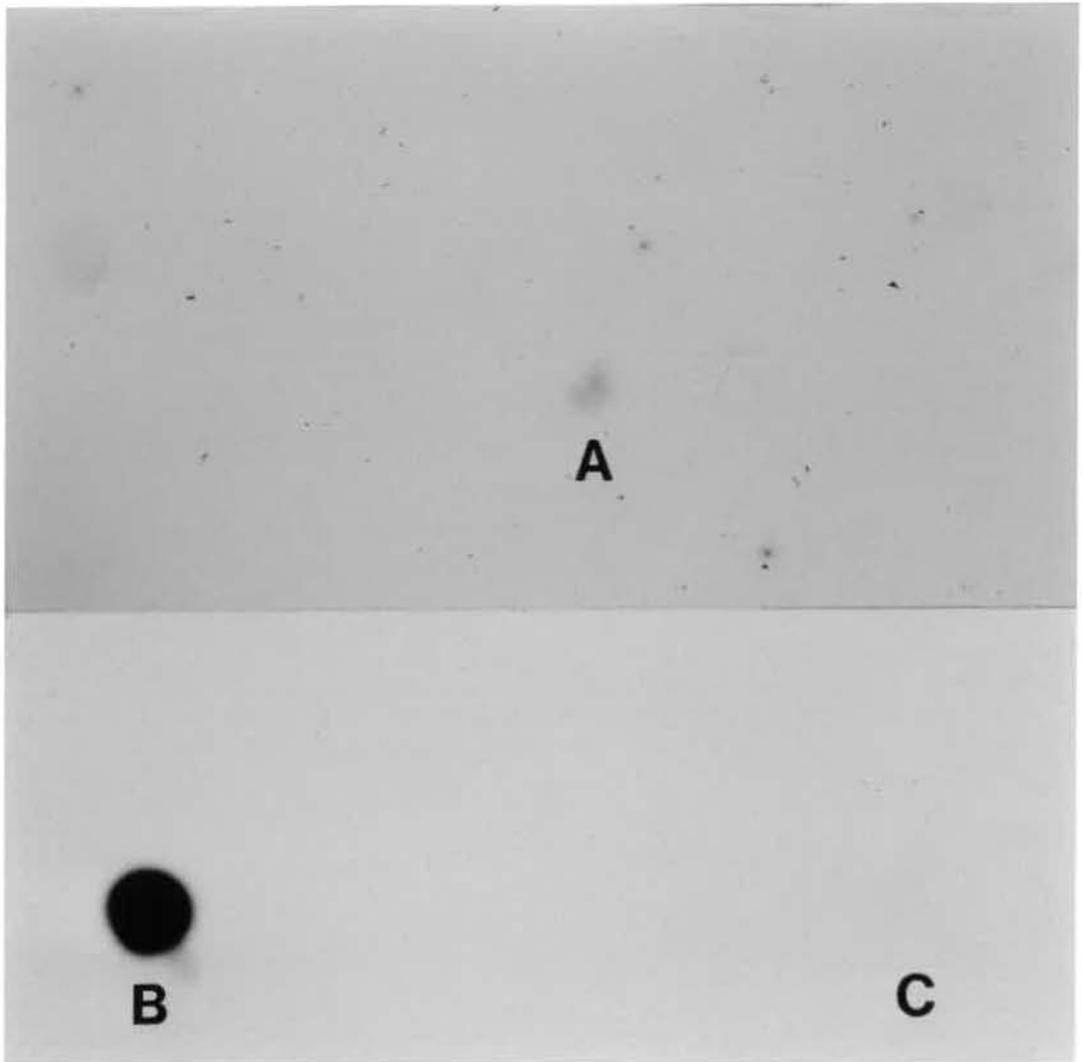


FIGURE 6: Hybridation positive du consortium de référence à l'aide d'une sonde moléculaire spécifique pour une région homologue de certaines coenzymes A ligases. A) consortium de référence, B) témoin positif, C) témoin négatif.



de la situation, cette recherche n'a pas été poursuivie et d'autres méthodes ont été utilisées pour tenter d'isoler le microorganisme carboxylant le phénol en acide benzoïque.

3. BACTÉRIES ANAÉROBIES FACULTATIVES

Des cultures du consortium de référence ont été incubées en aérobiose avec agitation sans changer les autres conditions. Aucune transformation du phénol ne s'est produite après 27 jours d'incubation comparativement à une culture témoin incubée en anaérobiose (Figure 7). Aucune cellule végétative n'a été observée au microscope optique dans les cultures incubées en conditions aérobies. Les cultures incubées en aérobiose et les cultures dégradant le phénol en anaérobiose ont servi à inoculer des milieux BHI solides, qui ont été incubés en conditions aérobies. Aucune croissance n'a été décelée sur ces milieux après 20 jours d'incubation.

4. IMPLICATION DE BACTÉRIES SPORULÉES

4.1 Traitement à la chaleur

Les cultures qui ont été chauffées avaient préalablement été incubées pendant 19 jours pour s'assurer d'une bonne formation de spores dans le milieu. L'évolution du phénol a été suivie dans les cultures inoculées avec les consortiums chauffés à 60°C/20 minutes et à 80°C/15 minutes (Figure 8). Après 30 jours d'incubation, la majorité du

FIGURE 7: Transformation du phénol par le consortium de référence en conditions aérobies (□) et anaérobies (●) en fonction du temps d'incubation.

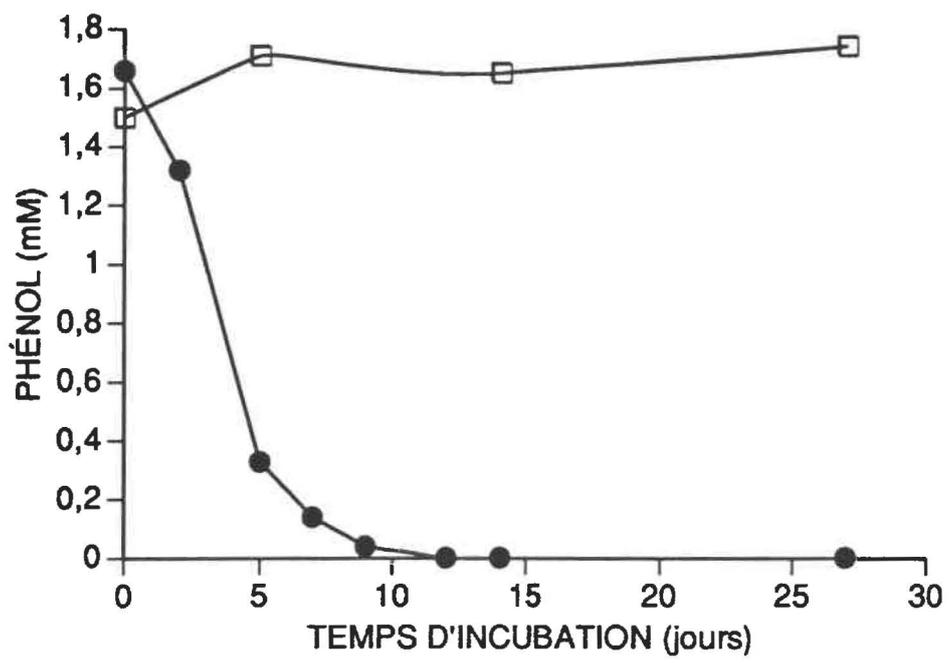
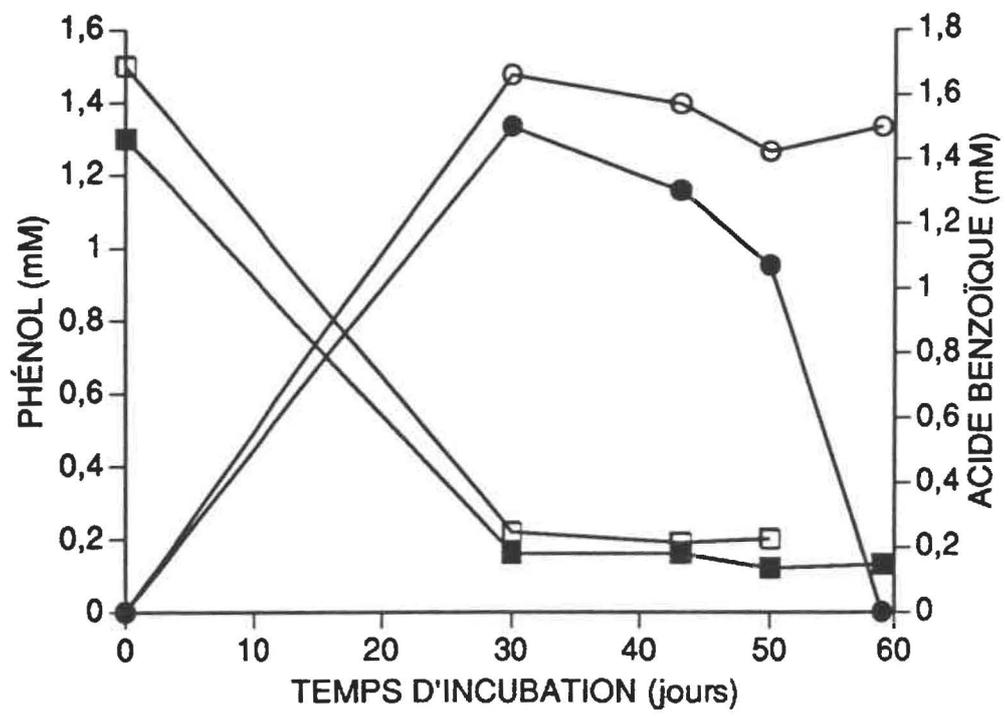


FIGURE 8: Cinétique de transformation du phénol (■, □) en acide benzoïque (●, ○) par le consortium de bactéries anaérobies chauffé à 60°C/20 minutes (■, ●) et 80°C/15 minutes (□, ○).



phénol a été dégradée dans ces cultures et la concentration de l'acide benzoïque dans le milieu a atteint un maximum.

Cependant contrairement à l'autre culture (60°C/20 minutes), l'acide benzoïque n'a pas été dégradé en prolongeant l'incubation de la culture inoculée avec le consortium chauffé à 80°C/15 minutes. Pour confirmer ce résultat, du phénol (1,6 mM) et du protéose peptone (0,05%) ont été ajoutés directement à cette culture (80°C/15 minutes) après 55 jours d'incubation. La transformation du phénol en acide benzoïque par cette culture de même que l'accumulation de l'acide benzoïque ont été confirmées (Figure 9). La culture témoin possède également la capacité de transformer le phénol réadditionné, mais aussi l'acide benzoïque formé puisqu'il n'y a eu aucune accumulation dans ces conditions.

Des transferts successifs des cultures chauffées à 80°C/15 min. ont été effectués lorsque le phénol était complètement transformé. L'évolution de la transformation du phénol en acide benzoïque a été suivie à chaque sous-culture (Figure 10). Le phénol a été transformé plus rapidement en fonction du nombre de sous-cultures effectuées. Par exemple, à la 3^e sous-culture comparativement à la première, 16 jours ont été nécessaire au lieu d'une trentaine pour obtenir la transformation de la majorité du phénol. Ceci était essentiellement imputable à une phase de latence observée dans

FIGURE 9: Suivi du phénol (■, □) et de l'acide benzoïque (●, ○) suite à la réaddition de phénol à une culture inoculée avec le consortium chauffé à 80°C/15 min. (□, ○) et à une culture non traité à la chaleur (■, ●).

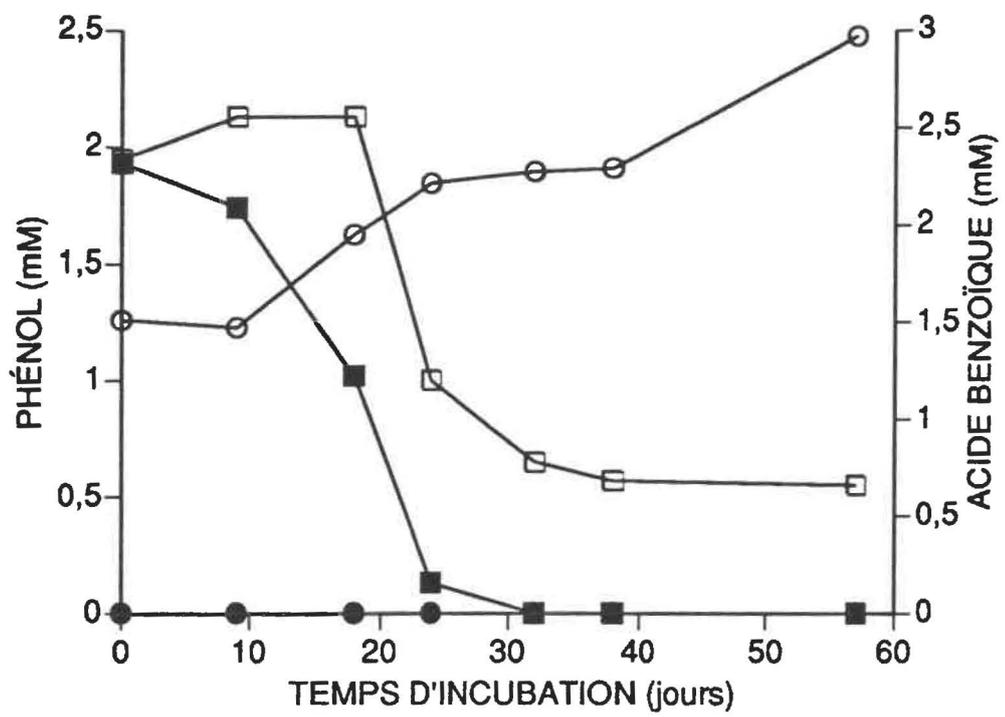
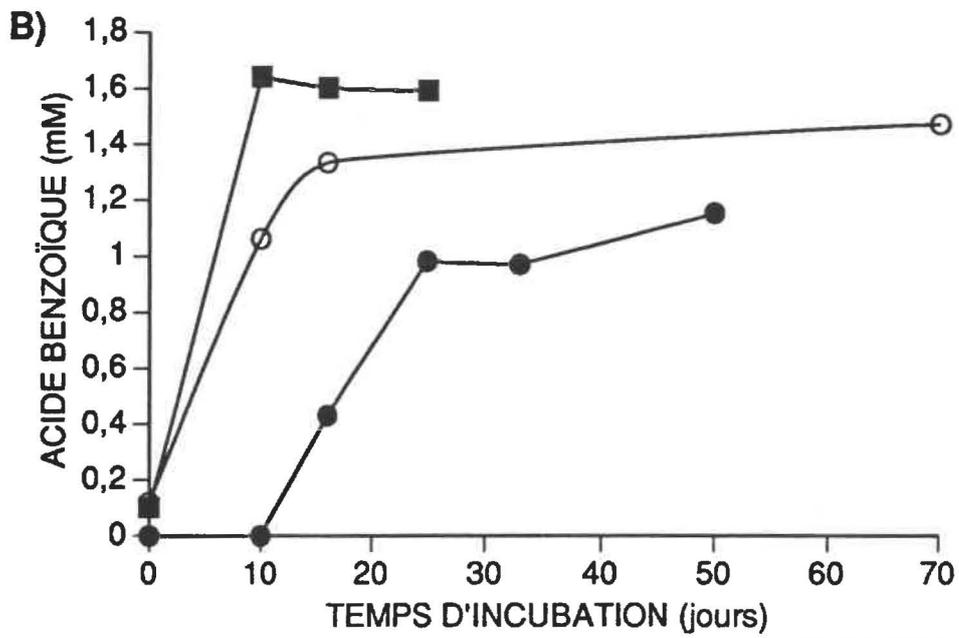
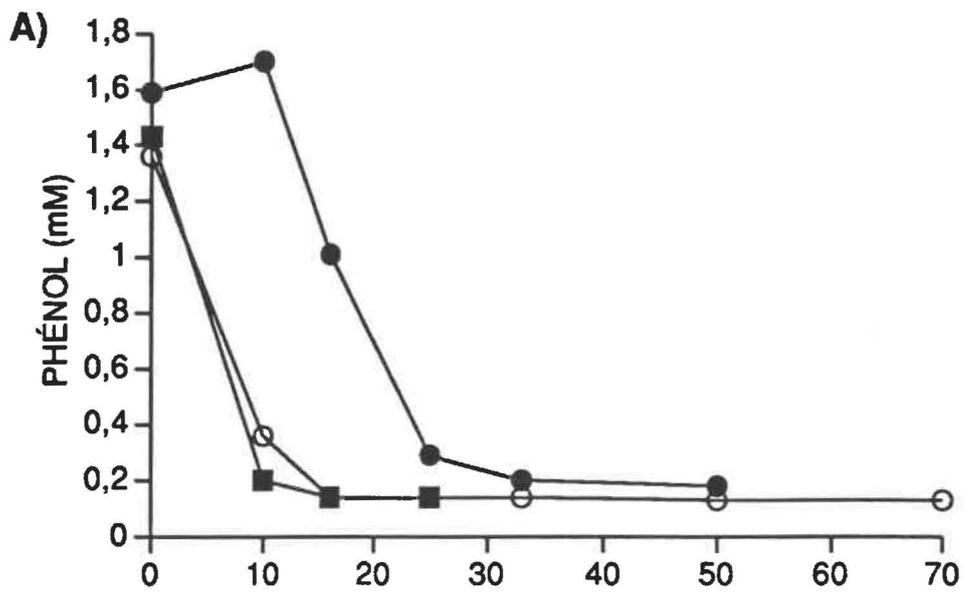


FIGURE 10: Transformation du phénol (A) en acide benzoïque (B) dans des sous-cultures en série du consortium traité à la chaleur (80°C/15 min.). 1^{ère} sous-culture (*), 3^e sous-culture (o), 6^e sous-culture (■).



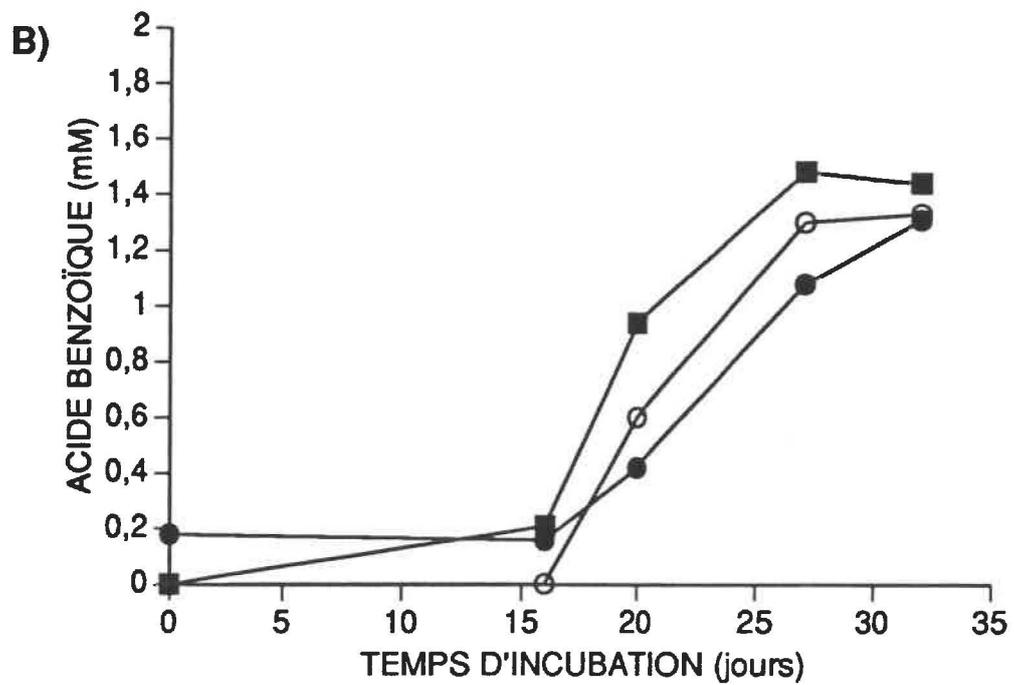
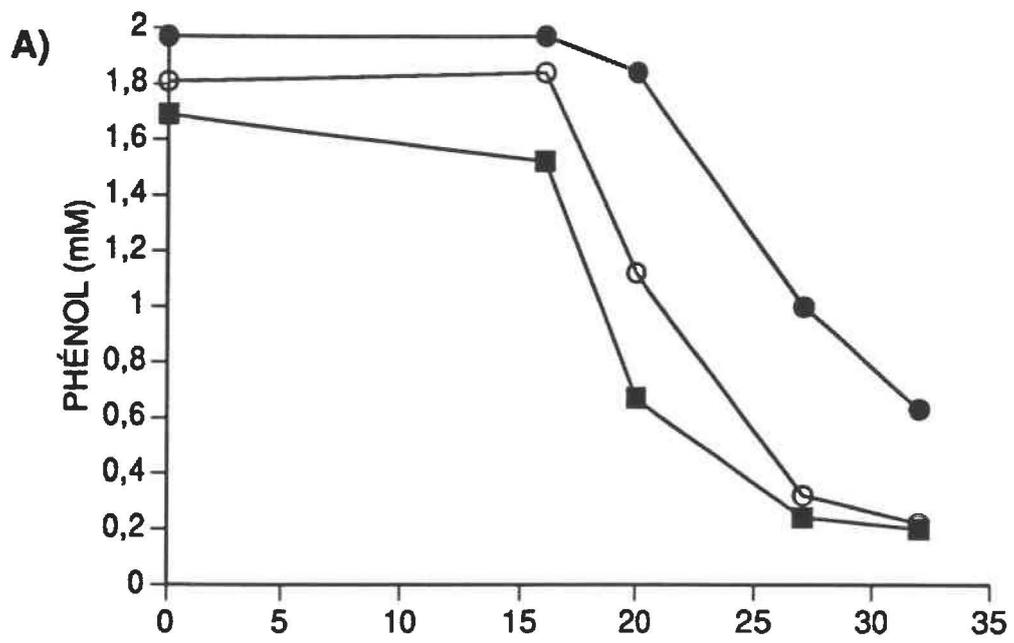
la première sous-culture. L'acide benzoïque s'est accumulé proportionnellement à la transformation du phénol. Aucune production de gaz n'a été décelée dans ces sous-cultures.

4.2 Traitement à la chaleur combiné à l'éthanol

Une sous-culture d'une culture traitée à la chaleur (80°C/15min.) a été chauffée à nouveau et mise en contact pendant 1 heure avec de l'éthanol 47,5% afin d'éliminer toutes cellules végétatives. La culture inoculée avec un consortium ainsi traité a réussi à transformer le phénol en acide benzoïque plus rapidement que les cultures inoculées avec un consortium non traité à l'éthanol (Figure 11A). Après 16 jours d'incubation, une phase de latence dans la dégradation du phénol a été observée seulement pour les cultures dont l'inoculum n'a pas subi le traitement à l'éthanol. Cette différence dans la vitesse de démarrage de la transformation du phénol a été confirmée par l'accumulation de l'acide benzoïque dans les cultures (Figure 11B). Cependant après 32 jours d'incubation, toutes les cultures ont montré une transformation importante du phénol en acide benzoïque.

Comme pour les cultures précédentes, le phénol était plus rapidement transformé en fonction du nombre de sous-culture effectuée. Aussi, aucune production de gaz n'a été décelée dans ces sous-cultures.

FIGURE 11: Cinétique de transformation du phénol (A) en acide benzoïque (B) en fonction du temps d'incubation de cultures inoculées avec le consortium chauffé à 80°C pendant 15 minutes et traitées (■) ou non (●,○) à l'éthanol. La culture (○) a suivi les mêmes étapes que celle traitée à l'éthanol mais du milieu minimal frais a remplacé l'éthanol.



4.3 Traitement à la chaleur plus intense

Une sous-culture d'une culture traitée à la chaleur et à l'éthanol ayant dégradé complètement le phénol depuis au moins 5 jours a été soumise à des traitements à la chaleur de plus en plus intense. Après traitement, un échantillon de la culture a été inoculé (12,5% v/v) dans du milieu minimal frais et la transformation du phénol en acide benzoïque a été suivie dans le temps. Après 102 jours d'incubation, seulement la culture inoculée avec le consortium traité à 90°C avait transformé complètement le phénol en acide benzoïque. Les cultures inoculées avec le consortium traité à 95°C, 100°C et 110°C ne montraient aucune transformation du phénol.

A partir de la culture inoculée avec le consortium traité à 90°C, différentes concentrations d'inoculum ont été utilisées pour ensemercer du milieu minimal frais. Pour les quatre premières dilutions, soit de 8^{-1} à 8^{-4} , la carboxylation du phénol en acide benzoïque a été presque complétée après 21 jours d'incubation. Par contre, pour la cinquième dilution, il a fallu plus de 37 jours pour transformer 75% du phénol (Tableau 1).

TABLEAU 1: Transformation du phénol (Ph) en acide benzoïque (B) dans des cultures inoculées avec différentes concentrations d'inoculum provenant d'une sous-culture d'une culture chauffée à 90°C.

Période d'incubation (jours)	CONCENTRATION DE L'INOCULUM									
	8 ⁻¹ *		8 ⁻²		8 ⁻³		8 ⁻⁴		8 ⁻⁵	
	Ph (mM)	B (mM)	Ph (mM)	B (mM)	Ph (mM)	B (mM)	Ph (mM)	B (mM)	Ph (mM)	B (mM)
8	1,16	0,65	1,96	0,05	2,1	0,008	1,82	<0,1	1,82	<0,1
21	0,13	1,73	0,15	1,62	0,13	1,93	0,15	1,78	0,84	1,04
30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,53	1,11
37	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,43	1,15

ND: non déterminé

* L'inoculum a été obtenu en faisant des dilutions en série de 1/8 dans le milieu minimal.

4.4 Observations

4.4.1 Macroscopiques

Bien que certaines variations mineures ont été notées, la population et les colonies observées sur milieux solides Columbia étaient similaires d'un traitement à l'autre.

4.4.2 Microscopie électronique à transmission

Le consortium de bactéries anaérobies a été observé en microscopie électronique avant et après traitement. Le consortium de référence avant traitement était constitué d'une grande variété de formes bactériennes. Une culture d'environ 5 jours où la moitié du phénol était dégradée a été observée (Figure 12).

Le consortium chauffé à 60°C pendant 20 minutes était similaire au consortium avant traitement. Par contre, une culture traitée à la chaleur (80°C/15 min. ou plus) combiné ou non à l'éthanol contenait moins de formes microbiologiques différentes. En effet, l'absence des bactéries Gram-négatives et des bactéries méthanogènes de type *Methanothrix* a été notée. Après plusieurs sous-cultures de ces cultures traitées, seulement la présence de bâtonnets Gram-positifs dont l'un de type filamenteux ont été observés (Figure 13). Ce bâtonnet filamenteux n'est pas observé en microscopie électronique lors des premières sous-cultures mais il est apparu après quelques transferts au moment où la

FIGURE 12: Formes bactériennes retrouvées dans une culture non traitée du consortium de référence dégradant le phénol. La barre représente 1.0 μm .

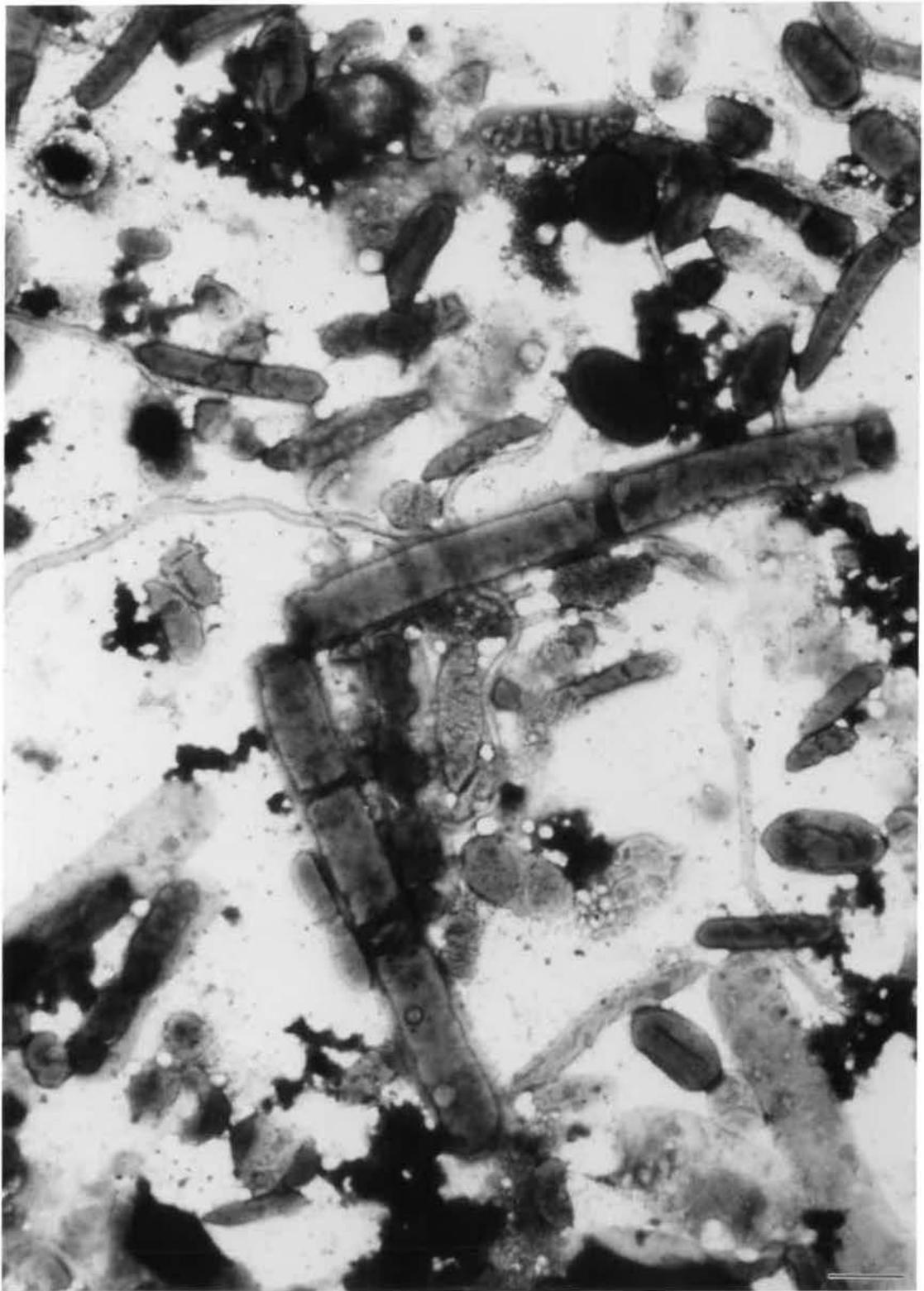
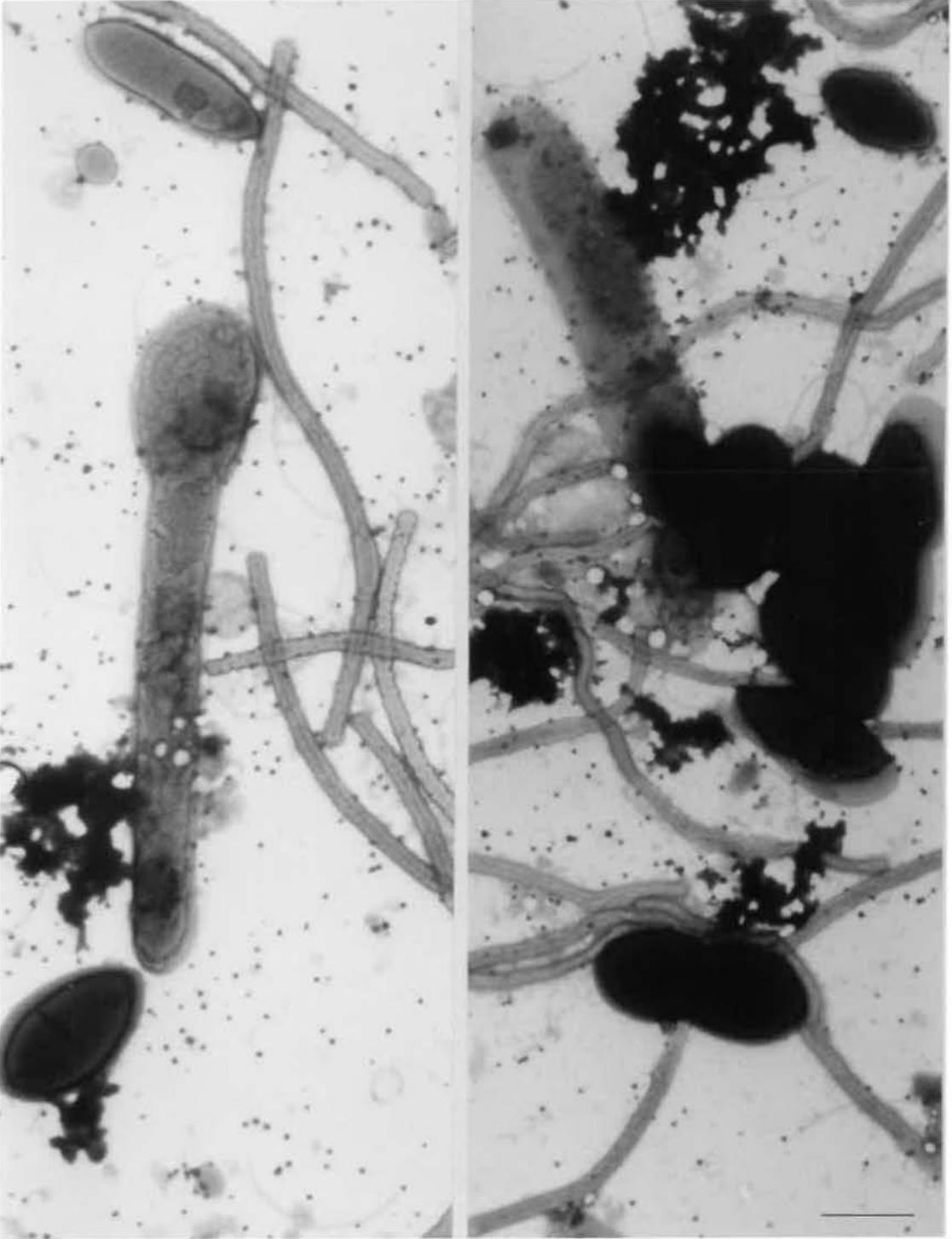


FIGURE 13: Formes bactériennes retrouvées après plusieurs sous-cultures du consortium traité (80°C/15 min. ou plus). La barre représente 1.0 μm .



transformation du phénol se fait plus rapidement. Des essais ont été effectués dans le but de confirmer à quel transfert précis la population du bâtonnet filamenteux pouvait être observée. Après sept sous-cultures d'un consortium traité, le phénol était dégradé rapidement soit après environ 13 jours d'incubation par contre aucun filament n'a été observé dans ces cultures.

5. ÉTUDE DES BACTÉRIES SPORULÉES

5.1 Isolement et identification

A partir de dilutions d'une culture chauffée à 80°C/15 min., des milieux solides Columbia et minimal avec phénol ont été inoculés. Cinq colonies macroscopiquement différentes ont été repiquées et des cultures pures ont été isolées. Les colonies retrouvées sur le milieu minimal correspondaient aux colonies retrouvées sur la gélose sang Columbia. Les cinq souches isolées ont été identifiées (Tableau 2).

L'examen de frottis des souches isolées après coloration de Gram a révélé la présence de bâtonnets Gram-positifs. Ces derniers pouvaient être effilés et minces, longs, courts et larges, seuls ou en chaînes. Beaucoup de polymorphisme a été observé au niveau des formes et grosseurs des bactéries et de certaines colonies.

TABLEAU 2: Bâtonnets sporulants Gram positifs, anaérobies strictes, isolés sur géloses sang Columbia.

SOUCHE	OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES	IDENTIFICATION ^a
1	Colonies blanches hémolytiques; contour crénelé	<i>Clostridium ghonii</i>
2	Colonies grises à blanches, parfois à centre plus foncé; contour régulier ou striation radiale	<i>Clostridium hastiforme</i>
3	Colonies grises à blanches; contour régulier	<i>Clostridium hastiforme</i>
4	Colonies grises, parfois à centre plus foncé; contour faiblement ondulé à régulier	n'a pu être identifié
5	Colonies grises envahissantes; contour arborescent	<i>Clostridium glycolicum</i>

a: Laboratoire de lutte contre la maladie, Santé et Bien-être Social Canada

Le système d'identification API 20A a révélé que les souches appartenaient au genre *Clostridium*. Toutefois comme ce système a été conçu pour des souches cliniques, l'identification des cultures a dû être confirmée par un laboratoire spécialisé. Quatre des souches isolées ont été confirmées appartenir au genre *Clostridium*. Deux de ces cultures ont reçu une identification identique au niveau de l'espèce. Une des cinq souches n'a pu être identifiée mais se rapprocherait du genre *Fusobacterium*.

Des observations en microscopie électronique à transmission ont révélé des morphologies semblables pour les deux souches identifiées comme *Clostridium hastiforme*, soit un bâtonnet avec une spore terminale déformante (Figure 14). La souche no 4 non identifiée avait également une morphologie similaire à ces dernières sauf que la présence de spores n'a pu être confirmée hors de tout doute (Figure 15). Les deux autres souches correspondaient à des bâtonnets plus courts et plus larges: *Clostridium ghonii* était formé de bâtonnets retrouvés régulièrement en chaîne avec peu de polymorphisme (Figure 16); *Clostridium glycolicum* pouvait se retrouver en paire, seule ou même en chaîne (Figure 17).

5.2 Capacité de dégradation

Plusieurs combinaisons de souches isolées sur gélose sang Columbia ont été testées en milieu minimal liquide

FIGURE 14: Microscopie électronique des souches de *Clostridium hastiforme* en coloration négative. Souche no 2 (A), souche no 3 (B), spore (C). La barre représente 1.0 μm .

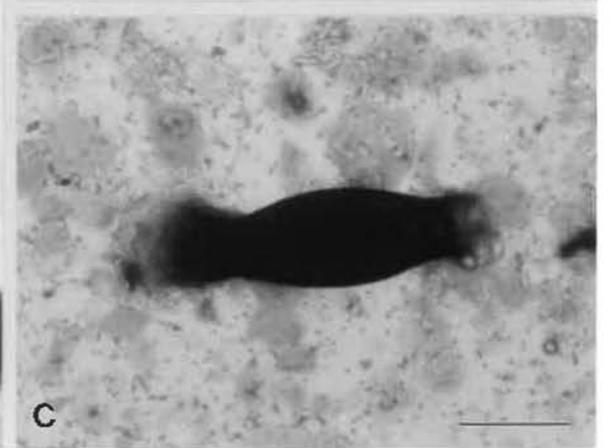
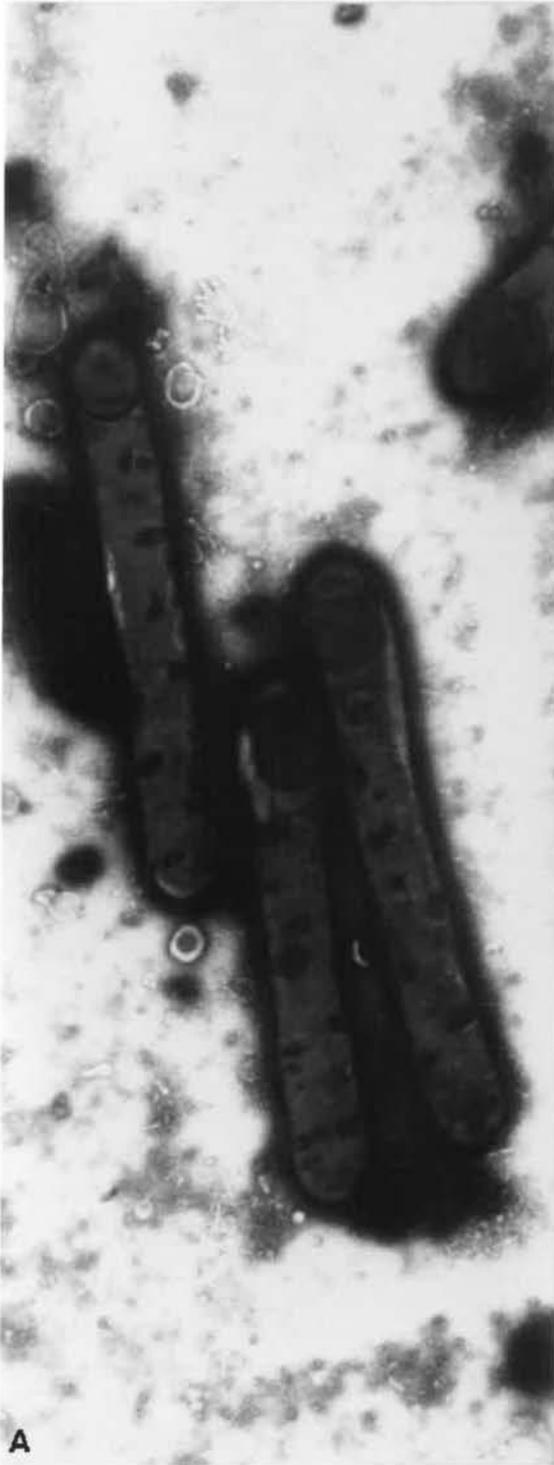


FIGURE 15: Microscopie électronique de la souche no 4, en coloration négative. La barre représente 1.0 μm .

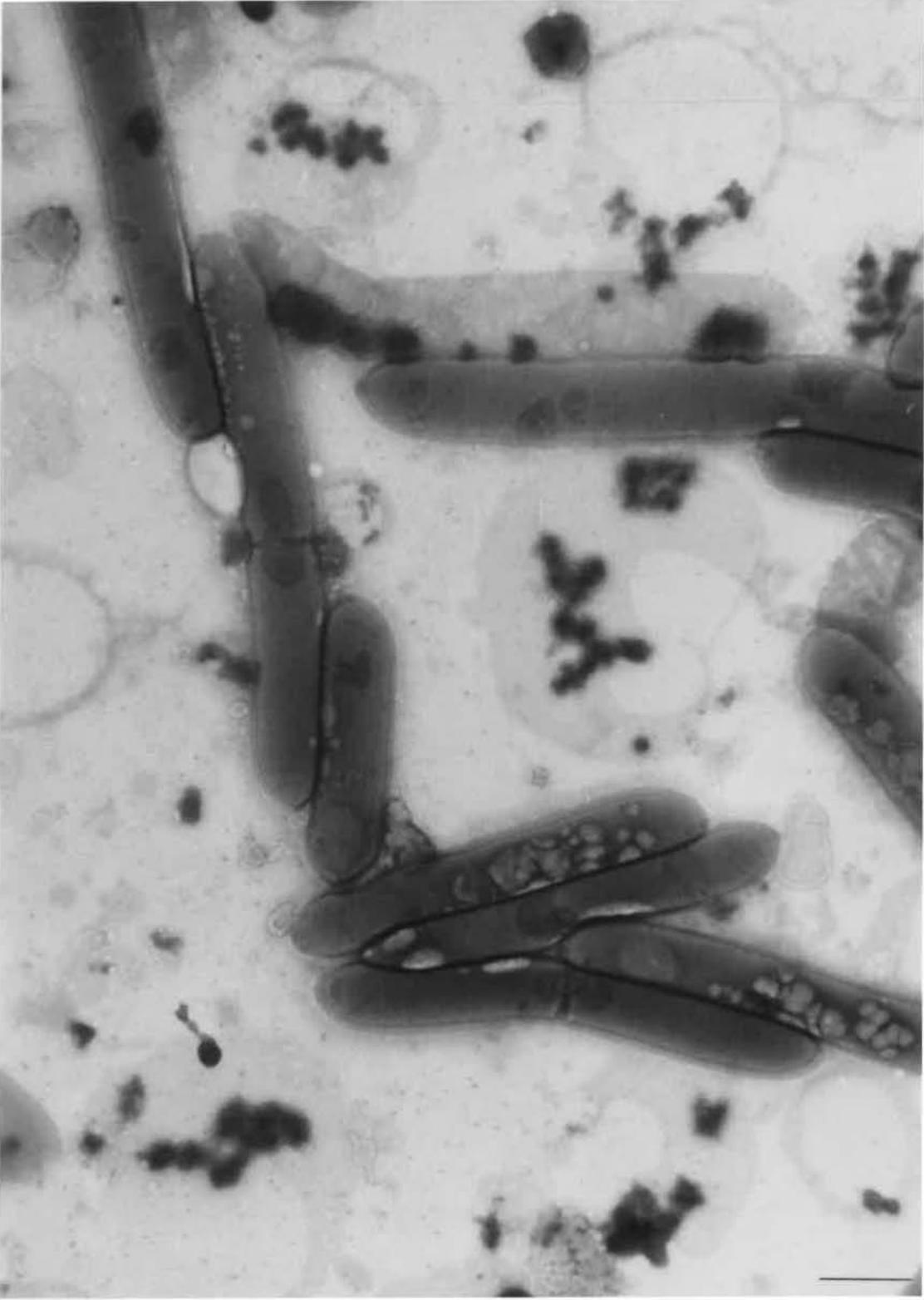


FIGURE 16: Microscopie électronique de la souche *Clostridium ghonii* (A) et de ses spores (B) en coloration négative. La barre représente 1.0 μm .

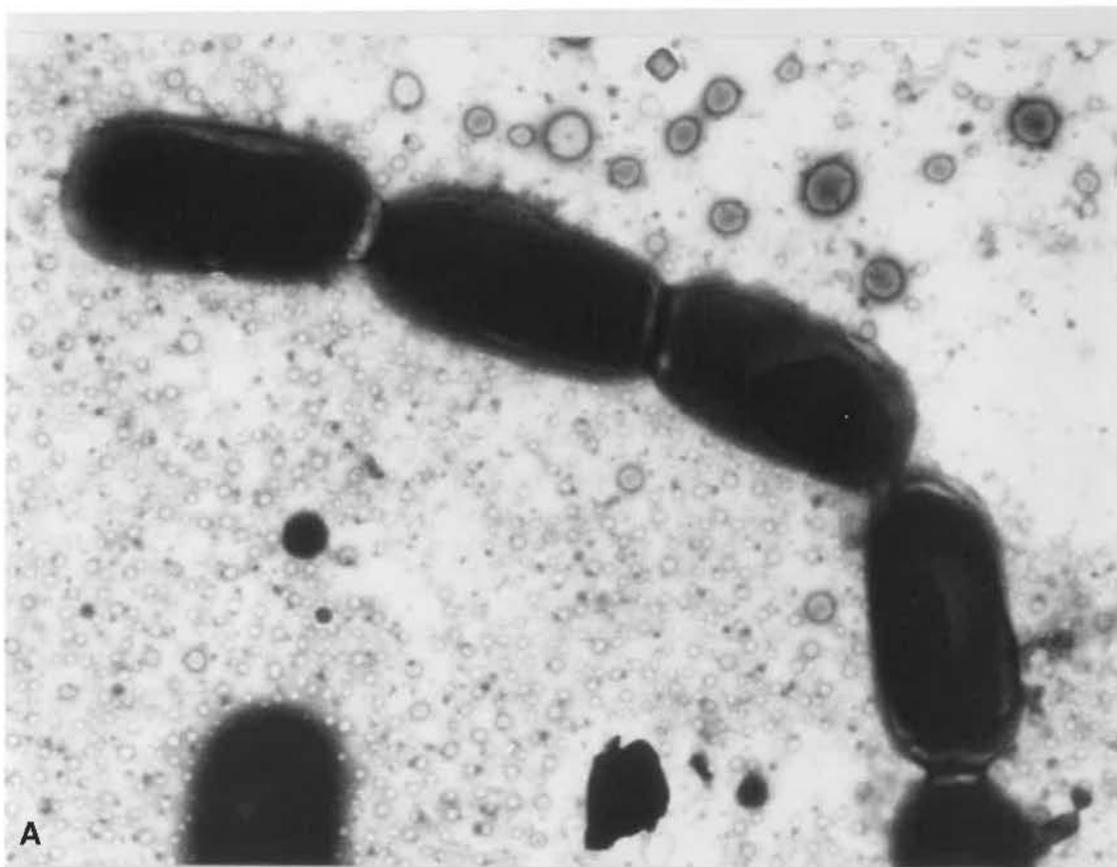
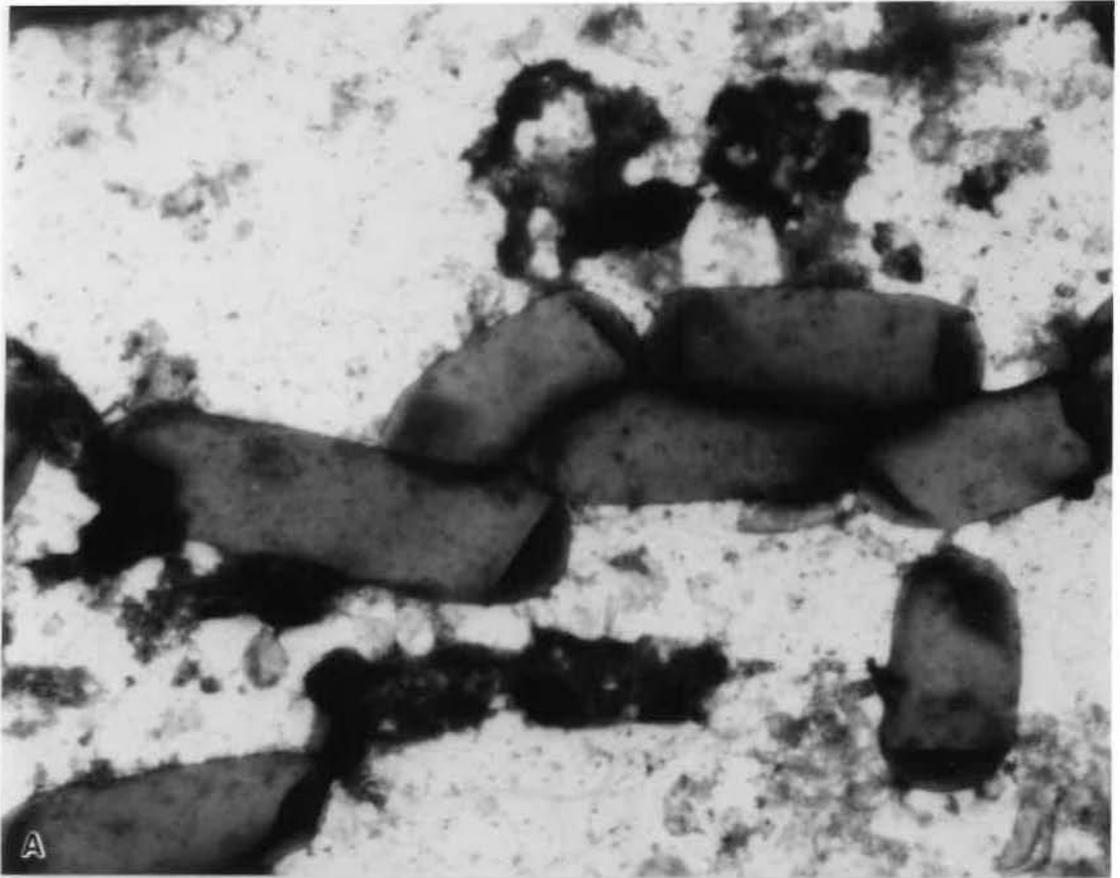


FIGURE 17: Microscopie électronique de la souche *Clostridium glycolicum* (A) et de ses spores (B) en coloration négative. La barre représente 1.0 μm .



pour leur capacité à dégrader différents composés. Aucune dégradation du phénol n'a été obtenue après 60 jours d'incubation pour les cultures pures et cocultures sur milieu minimal contenant 0,05% ou 0,5% (p/v) de protéose peptone. Un résultat semblable a été obtenu après 83 jours d'incubation des souches isolées sur milieu minimal solide. De même, aucune transformation du phénol n'a été observée pour les souches isolées sur gélose Columbia lorsque ensemencées en coculture en présence d'une résine échangeuse d'anions. Par ailleurs, les milieux solides Columbia inoculés à partir des différentes cultures liquides pour vérifier la viabilité des souches inoculées ont permis de démontrer une population de l'ordre de 10^5 unités formatrices de colonies (UFC)/mL, ce qui est comparable aux résultats obtenus pour les sous-cultures d'un consortium traité.

Concernant les autres produits testés, aucune dégradation de l'acide p-hydroxybenzoïque (décarboxylation), de l'anisole et 2-méthoxyphénol (O-déméthylation) et du 2-hydroxybenzyl alcool (oxydation) n'a été observée après respectivement 210, 65 et 67 jours d'incubation des cultures pures des souches isolées sur milieu Columbia. Également, aucune dégradation de ces composés n'a été obtenue après 38 jours d'incubation de ces souches en coculture.

6.0 CONSORTIUM TRAITÉE

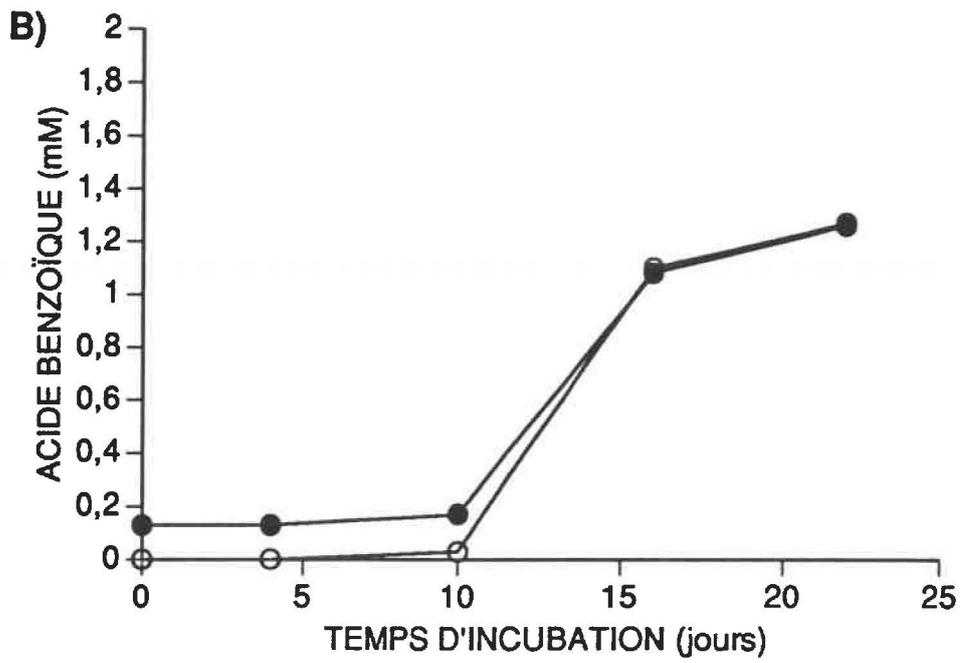
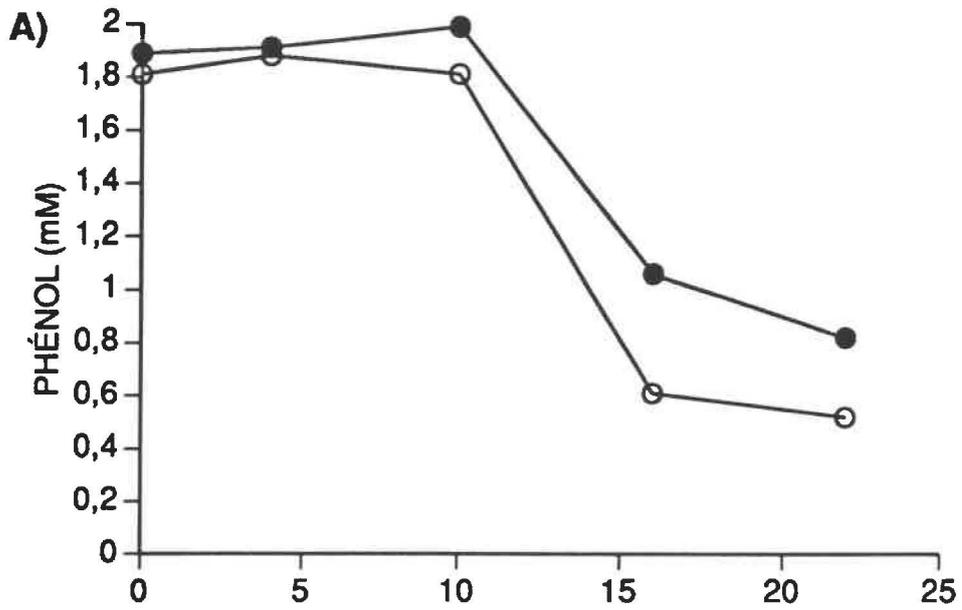
6.1 Importance du surnageant de l'inoculum

La transformation du phénol en acide benzoïque a été suivie dans des sous-cultures d'une culture traitée où l'inoculum a été lavé pour éliminer le surnageant de culture. La vitesse de transformation du phénol était semblable pour les cultures où l'inoculum avait été débarasser ou non du surnageant (Figure 18).

6.2 Oxydation et O-déméthylation

Le consortium traité a été testé afin de vérifier s'il avait conservé sa capacité à effectuer des oxydations et des O-déméthylations. L'anisole a été O-déméthylé en phénol après environ 20 jours d'incubation par le consortium de référence mais après plus de 147 jours le consortium traité a été incapable d'effectuer cette transformation. Le 2-méthoxyphénol en présence de phénol a été O-déméthylé en cathécol après environ 30 jours d'incubation par le consortium de référence alors que le consortium traité n'avait toujours pas effectué cette transformation après 122 jours d'incubation. Les oxydations testées avec le 2-hydroxybenzyl alcool révèlent des résultats semblables, ce produit n'est pas oxydé par le consortium traité suite à 122 jours d'incubation.

FIGURE 18: Transformation du phénol (A) en acide benzoïque (B) en fonction du temps d'incubation, dans une sous-culture d'une culture traitée où l'inoculum a été débarassé (o) ou non (•) du surnageant.



6.3 Décarboxylation de l'acide p-hydroxybenzoïque

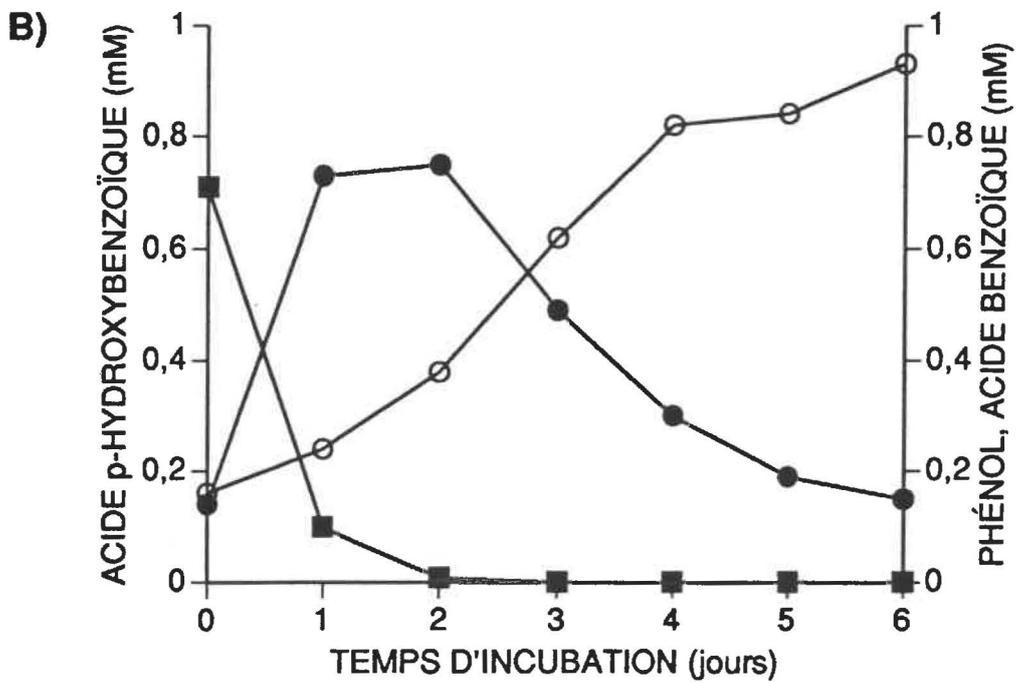
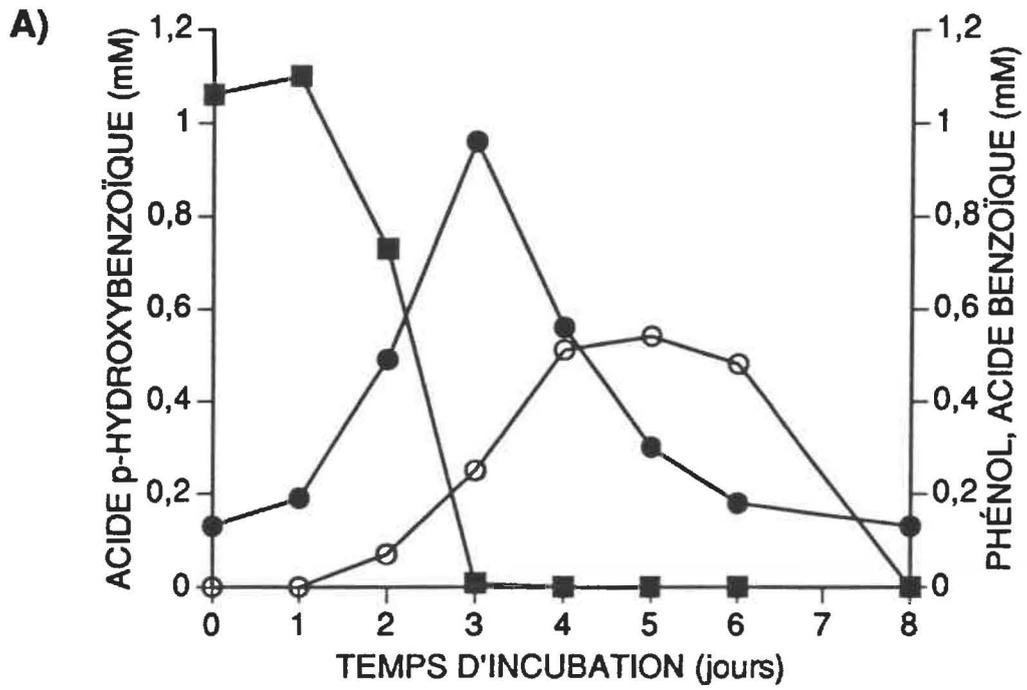
6.3.1 Cinétique de dégradation

Le consortium traité tout comme le consortium de référence a transformé l'acide p-hydroxybenzoïque en phénol et en acide benzoïque (Figure 19). La majorité de l'acide p-hydroxybenzoïque a d'abord été transformée par décarboxylation en phénol par le consortium traité (Figure 19B). Ainsi après 2 jours d'incubation, l'acide p-hydroxybenzoïque était présent à l'état de trace avec une production de 0,61 mM de phénol et 0,22 mM d'acide benzoïque. Par la suite, soit du 2^e au 6^e jour, le phénol a été presque entièrement transformé en acide benzoïque qui s'accumulait dans le milieu. Un scénario semblable a été observé pour le consortium de référence à l'exception que l'acide benzoïque a été complètement dégradé et qu'une phase de latence d'une journée a été observée dans ce cas pour la transformation de l'acide p-hydroxybenzoïque (Figure 19A).

6.3.2 Confirmation des produits de transformation

Le consortium de référence et le consortium traité ont été inoculés en présence de l'[COOH-¹³C] acide p-hydroxybenzoïque pour confirmer que ce composé pouvait être transformé directement en acide benzoïque par déhydroxylation. Les cultures du consortium traité et de référence ont été analysées au CG-SM après 1 et 3 jours d'incubation alors qu'il y avait apparition de l'acide benzoïque dans le milieu. Les

FIGURE 19: Cinétique de transformation de l'acide p-hydroxybenzoïque (■) en phénol (●) et en acide benzoïque (○) en fonction du temps d'incubation par le consortium de référence (A) et par un consortium traité (B).



spectres de masse des échantillons dérivés des deux cultures ont révélé la présence d'un ion moléculaire à m/z 195, ce qui est consistant avec un isomère dérivé au triméthylsilyl de l' [^{13}C] acide benzoïque (Figure 20). Les pics à m/z 180 et 106 correspondent à une perte d'un CH_3 et $\text{O-Si}(\text{CH}_3)_3$, respectivement.

La concentration plus élevée d'acide benzoïque non marqué dans la culture avec le consortium traité s'explique par le transfert d'environ 0,15 mM d'acide benzoïque lors de l'inoculation (12,5% v/v) car il y a accumulation de ce produit dans ces cultures.

6.4 Sous-culture sur milieux solides

La transformation du phénol a été suivie dans le milieu minimal liquide inoculé avec le consortium traité et non traité cultivé sur le milieu solide Columbia (Figure 21A) ou minimal (Figure 21B). Toutes les cultures ont conservé la capacité de dégrader le phénol suite à un passage sur un milieu solide. Par contre, après 10 jours d'incubation, le phénol n'avait pas encore été carboxylé en acide benzoïque dans aucune des cultures. Il a fallu plus de 30 jours d'incubation pour transformer presque complètement le phénol en acide benzoïque.

FIGURE 20: Spectre de masse de 1' [¹³C] acide benzoïque résultant de la transformation de 1' [¹³COOH] acide p-hydroxybenzoïque par un consortium de référence (A) et par un consortium traité (B).

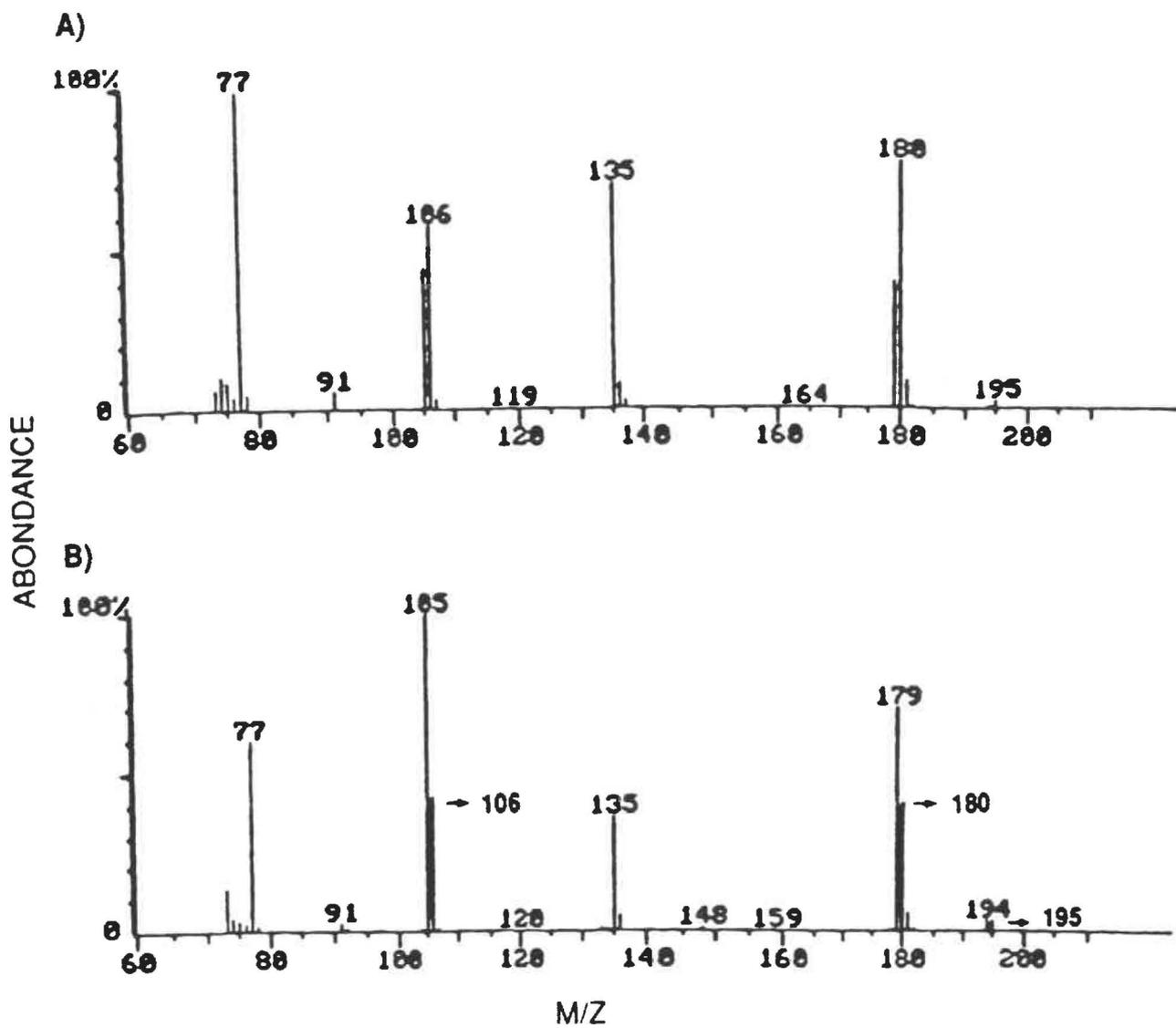
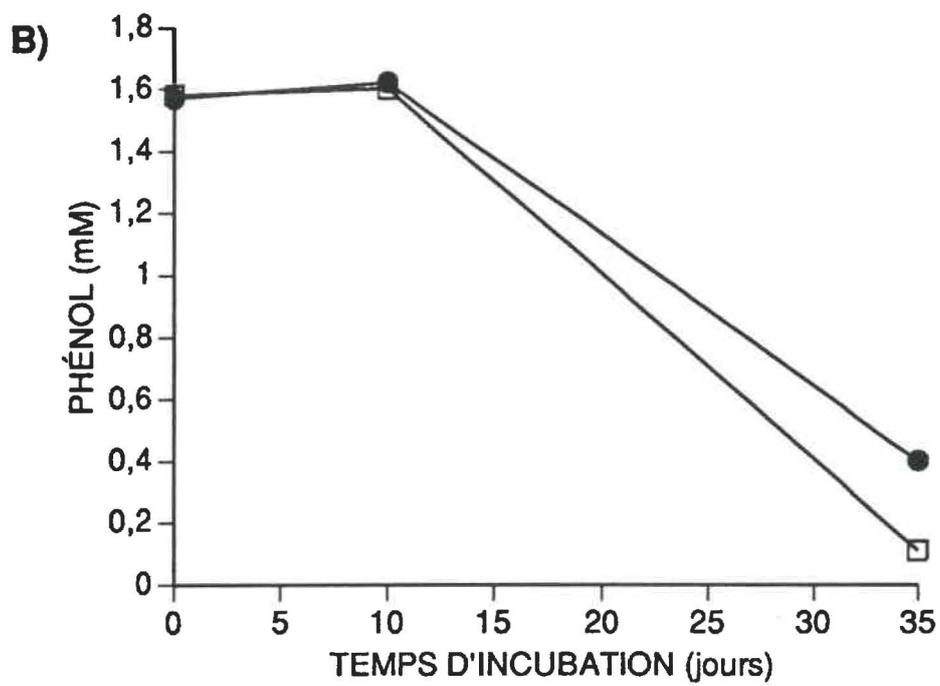
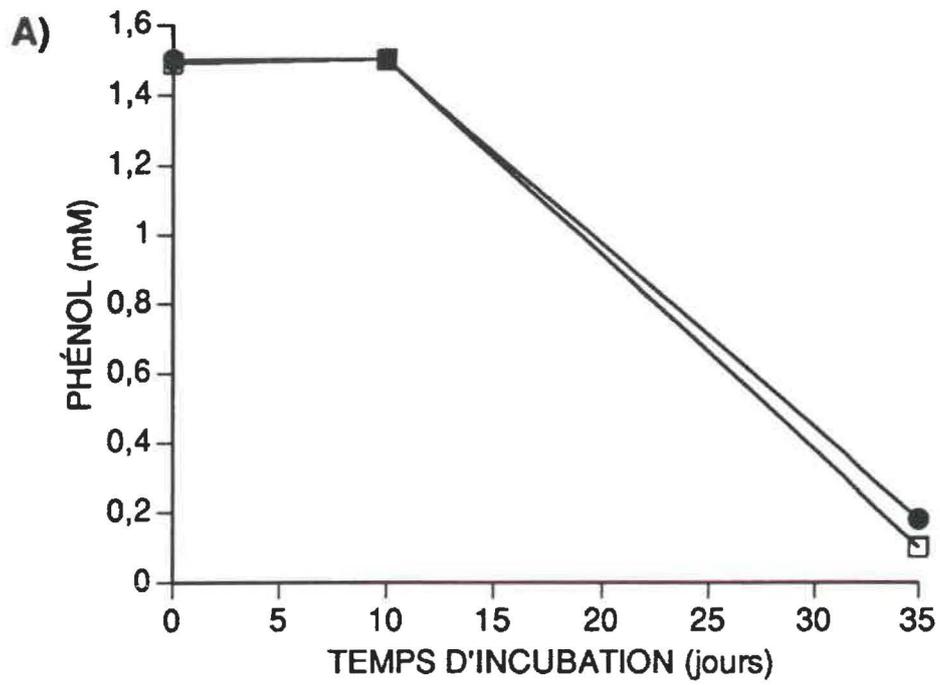


FIGURE 21: Transformation du phénol dans le milieu minimal liquide inoculé avec le consortium cultivé sur milieu solide Columbia (A) et minimal (B). Consortium de référence (□), consortium traité (•).



6.5 Croissance des souches et dégradation du phénol

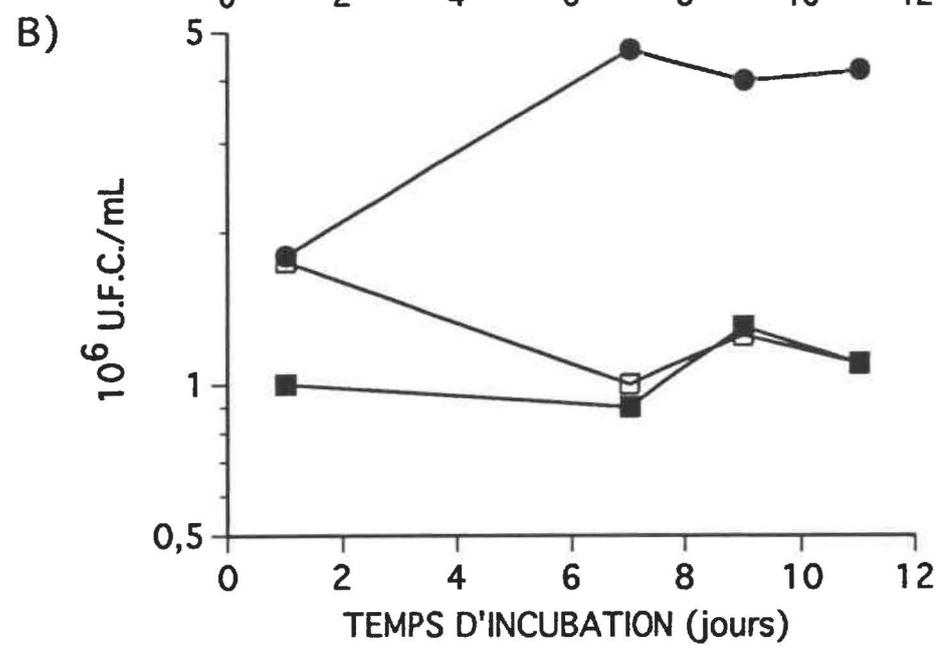
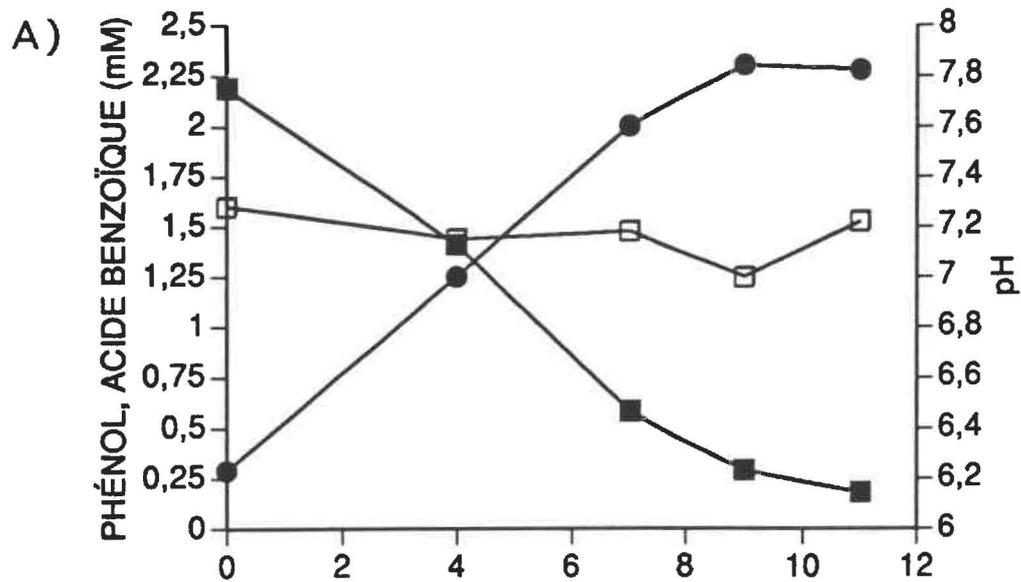
La croissance des trois espèces de *Clostridium* présentes dans le consortium traité pendant la transformation du phénol dans le milieu minimal liquide a été suivie par comptage sur milieux solides Columbia (Figure 22). A partir de cet essai, à cause du polymorphisme au niveau des colonies et également de sa population faible ($<10^3$ UFC/mL) et peut-être même absente dans le consortium traité, la souche no 4 n'a plus été suivie. Les souches *C. ghonii* et *C. glycolicum* se sont maintenues stables pendant la carboxylation du phénol en acide benzoïque. Pendant les sept premiers jours d'incubation, la population de *C. hastiforme* (souches no 2 et no 3) (Figure 22B) a progressé de 1,8 à $4,6 \times 10^6$ UFC/mL et 75% du phénol a été dégradé. Par la suite, le phénol a continué à être transformé même si la population de *C. hastiforme* a été stable. Au total, 2,25 mM d'acide benzoïque se sont accumulés durant la transformation. Le pH a également été déterminé durant l'incubation et une variation négligeable de 7,2 à 7,0 a été observée.

6.6 Éthanol comme additif

6.6.1 En milieu liquide

La vitesse de dégradation du phénol par le consortium traité dans des cultures contenant différentes concentrations d'éthanol avec et sans acétate de sodium a été comparée à des cultures témoins sans éthanol. En absence

FIGURE 22: Suivi des différentes espèces de Clostridium lors de la transformation du phénol en acide benzoïque par le consortium traité. A) Transformation du phénol (■) en acide benzoïque (*), et pH (□); B) Croissance des souches C. ghonii (■), C. hastiforme (*), C. glycolicum (□).



d'acétate de sodium, la vitesse de transformation du phénol des cultures en présence d'éthanol était comparable à celle de la culture témoin sans éthanol (Figure 23A). Cependant, la dégradation était ralentie en présence d'éthanol dans les cultures en présence d'acétate de sodium comparativement à la culture témoin sans éthanol (Figure 23B). En effet, après 9 jours d'incubation, la culture témoin sans éthanol avait transformé 1,51 mM de phénol tandis que les cultures avec 50 et 150 mM d'éthanol n'en avait transformé que 0,72 et 0,77 mM, respectivement.

L'effet de l'éthanol au niveau de la germination des spores a également été étudié à l'aide d'un consortium traité en l'inoculant en présence ou non d'éthanol. La transformation du phénol était semblable dans les cultures avec et sans éthanol (Figure 24).

6.6.2 En milieu solide

La croissance de nouvelles souches a été recherchée en inoculant un consortium traité sur un milieu minimal solide contenant de l'éthanol en présence ou non d'acétate de sodium. Après plus de 9 jours d'incubation, aucune colonie d'apparence différente de celles déjà isolées n'a été observée sur les milieux avec 110 et 325 mM d'éthanol en présence ou non d'acétate de sodium.

FIGURE 23: Dégradation du phénol par le consortium traité dans des cultures contenant de l'éthanol en absence (A) ou en présence (B) d'acétate de sodium 50 mM. Cultures en présence d'éthanol: 0 mM (○), 50 mM (▲), 150 mM (□).

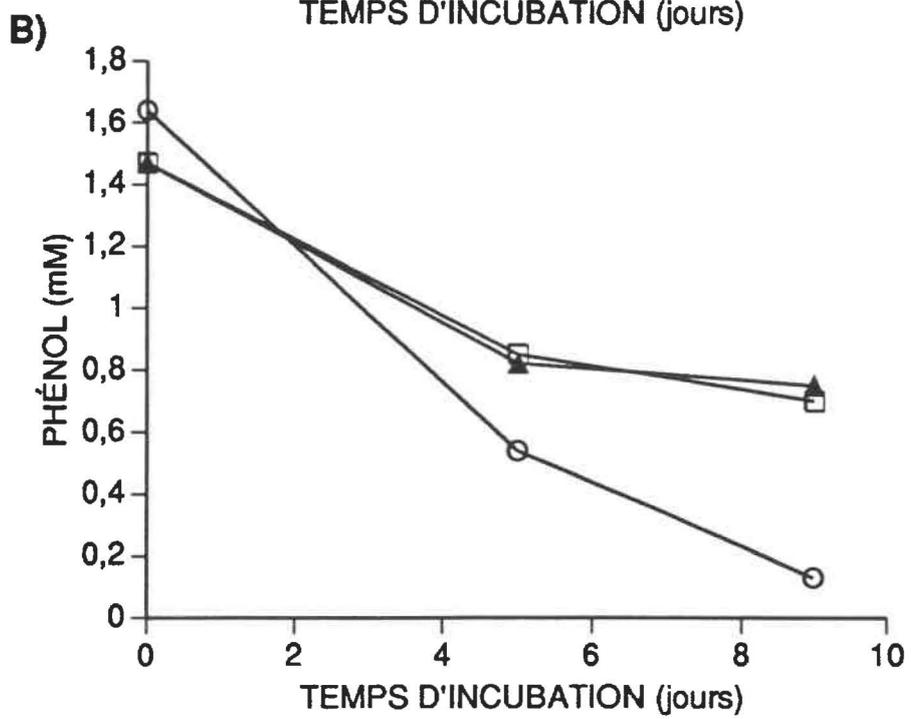
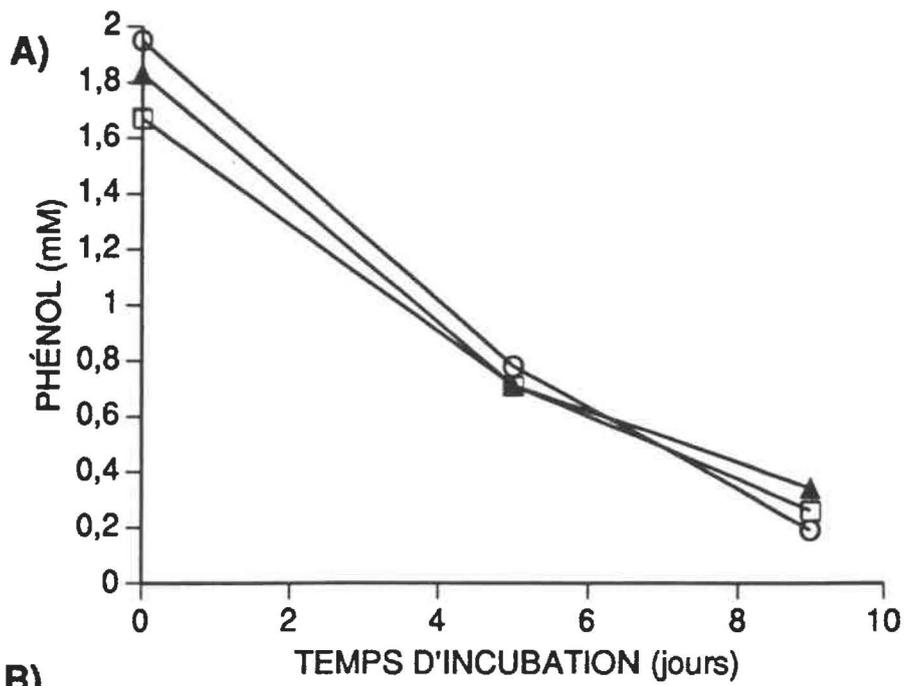
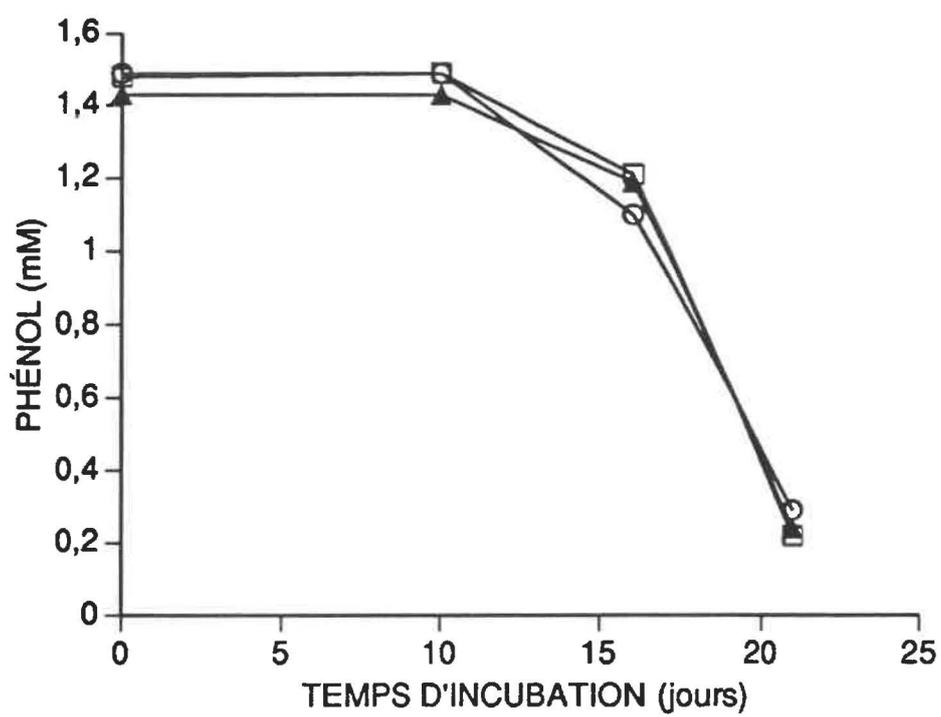


FIGURE 24: Dégradation du phénol par un consortium traité puis inoculé dans le milieu minimal en présence ou non d'éthanol 95%. Culture en présence d'éthanol: 0 mM (○), 100 mM (▲), 150 mM (□).



6.6.3 Seule source de carbone

L'utilisation d'éthanol (150 mM et 750 mM) comme seule source de carbone, n'a pas permis de favoriser des souches métabolisant ce composé. Au contraire, il y a eu une diminution égale de la population des souches de l'ordre de 10^2 UFC/mL. De plus, aucune dégradation du phénol n'a été observée.

6.7 Action des sucres fermentescibles

La présence de glucose devait favoriser les souches de *C. ghonii* et *C. glycolicum* et le xylose la souche *C. glycolicum* seulement. Cependant avec 0,05 et 0,5% (p/v) de ces sucres dans le milieu minimal exempt de protéose peptone, aucune de ces bactéries dominaient dans les cultures. Au premier transfert, la population bactérienne était de l'ordre de 10^6 UFC/mL et après deux sous-cultures en présence des sucres (0,05 et 0,5% (p/v)) une diminution proportionnelle de toutes les souches à 10^4 UFC/mL a été observée. Aucune de ces cultures ne possédait la capacité de dégrader le phénol.

6.8 Effet des antibiotiques

Dans un premier temps, un antibiogramme par la méthode des disques a été effectué sur les souches isolées afin de connaître leurs sensibilités à une gamme d'antibiotiques (Tableau 3). Aux concentrations testées, toutes les souches étaient résistantes à la streptomycine,

TABEAU 3: Estimation de la sensibilité à certains antibiotiques des cinq souches de bâtonnets sporulés.

ANTIBIOTIQUES concentration /disque	SOUCHES				
	<i>C. ghonii</i>	<i>C. hastiforme</i> (souche no 2)	<i>C. hastiforme</i> (souche no 3)	Souche no 4	<i>C. glycolicum</i>
Chloramphénicol (30 µg)	++++ ^a	++++	++++	++++	++++
Erythromycine (15 µg)	+	+++	-	-	++
Gentamycine (10 µg)	-	-	-	-	-
Ampicilline (10 µg)	+	++	-	-	++
Tétracycline (50 µg)	+++	-	+++	-	-
Bacitracine (10 U)	++++	++++	++++	++++	++++
Pénicilline (10 U)	++++	++++	-	+++	++++
Streptomycine (10 µg)	-	-	-	-	-
Néomycine (5 µg)	-	-	-	-	-

-: résistante (croissance non affectée dans la zone d'inhibition)

+: peu sensible

++: sensibilité moyenne

+++ : très sensible

++++: sensibilité totale (pas de croissance dans la zone d'inhibition).

^a: tous les résultats ont été obtenus à partir de triplicata

néomycine et gentamycine et sensibles au chloramphénicol et à la bacitracine. Par contre, des variations dans la sensibilité des souches ont été notées au niveau des autres antibiotiques. *C. ghonii*, *C. hastiforme* (souche no 2) et *C. glycolicum* possédaient des sensibilités différentes vis à vis l'érythromycine, l'ampicilline et la pénicilline. Seulement *C. ghonii* et *C. hastiforme* (souche no 3) étaient sensibles à la tétracycline.

D'après ces résultats, l'érythromycine, la tétracycline et le chloramphénicol ont été choisie et testés sur des cultures liquides du consortium traité afin d'éliminer certaines souches. Le chloramphénicol a été choisi à l'origine pour éliminer les cinq souches en espérant qu'il affecte peu ou pas le bâtonnet filamenteux observé en microscopie électronique.

En présence de 5 et 10 $\mu\text{g/mL}$ de chloramphénicol, l'activité de transformation a été conservée. En effet, une moyenne de 78% de phénol a été transformé dans ces cultures après 36 jours d'incubation (Tableau 4). L'inoculation de ces cultures sur milieu solide Columbia a révélé l'absence de *C. ghonii*. Après 37 jours d'incubation, les cultures ont été transférées à nouveau en présence de 5 et 10 $\mu\text{g/mL}$ de chloramphénicol. Après dégradation complète du phénol en 36 jours, les cultures ont été inoculées dans du milieu sans

TABLEAU 4: Évolution de la transformation du phénol (mM) dans une culture traitée en présence de chloramphénicol

Période d'incubation (jours)	CONCENTRATION DE CHLORAMPHÉNICOL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	5	10	100	200
0	1,73 ^{a,b}	1,94	ND	2,17
7	1,74	1,94	2,30	2,17
16	1,67	1,87	2,30	2,17
23	0,67	0,97	2,30	2,17
30	0,36	0,49	2,30	2,17
36	0,33	0,46	ND	ND

a: mM de phénol

b: Tous les résultats ont été obtenus à partir de duplicata

ND: non déterminé

antibiotiques et elles sont présentement maintenues dans le laboratoire. L'inoculation de ces cultures sur milieu solide a permis de confirmer l'absence de la souche *C. ghonii*.

Par contre, en présence de 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$ de chloramphénicol, aucune dégradation n'a été observée après 30 jours d'incubation. L'inoculation sur milieu solide a montré une population majoritaire de *C. hastiforme* (souches no 2 et no 3) et *C. glycolicum* de l'ordre de 10^5 à 10^6 UFC/mL.

L'utilisation de tétracycline à des concentrations de 1,66, 0,84 ou 0,63 $\mu\text{g/mL}$ a complètement inhibé la transformation du phénol. Par contre, la présence de 0,31 $\mu\text{g/mL}$ de cet antibiotique a permis la dégradation complète du phénol après 53 jours d'incubation. Comme pour le chloramphénicol, l'inoculation de la culture en présence de 0,31 $\mu\text{g/mL}$ de tétracycline sur milieu solide a permis de confirmer l'absence de la souche *C. ghonii*. Concernant les souches de *C. hastiforme* (souche no 2 et no 3) et de *C. glycolicum*, la population était semblable qu'il y ait dégradation ou non du phénol. L'utilisation d'antibiotiques a permis d'observer la présence d'une petite colonie grise qui jusqu'à maintenant n'avait pas été détectée sur milieu solide. De plus, cette colonie de bâtonnets sporulés, nommée souche no 6, est présente (10^6 UFC/mL) dans les cultures avec chloramphenicol (5 et 10 $\mu\text{g/mL}$) et avec tétracycline (0,31

$\mu\text{g/mL}$) qui possèdent toujours la capacité de transformer le phénol. Par contre dans les cultures en présence de chloramphénicol (100 et 200 $\mu\text{g/mL}$) et de tétracycline (0,63 $\mu\text{g/mL}$) dont la carboxylation est inhibée, cette souche semble absente ou en faible quantité ($<10^3$ UFC/mL).

En microscopie électronique, le bâtonnet filamenteux est présent dans les cultures avec antibiotiques dégradant le phénol mais ce bâtonnet n'est pas observé dans les cultures où la concentration de chloramphénicol et de tétracycline inhibe la dégradation du phénol. Par contre, lorsque la culture avec tétracycline (0,63 $\mu\text{g/mL}$) où la carboxylation est inhibée est transférée dans un milieu sans antibiotiques, le filament est observé après 6 jours d'incubation mais la transformation du phénol n'a pas été observée même après 16 jours d'incubation.

Des concentrations de 7,5 et 15 $\mu\text{g/mL}$ d'érythromycine dans des sous-cultures d'une culture traitée ont inhibé la transformation du phénol. Après 30 jours d'incubation, aucune transformation n'a été observée. Des concentrations plus faibles de 2,5 et 5 $\mu\text{g/mL}$ ont été testées et aucune transformation n'a été observée après 53 jours d'incubation. L'inoculation sur milieu solide des quatre cultures a permis de constater aucune croissance bactérienne lorsque ensemencées avec des dilutions de l'ordre de 10^{-2} .

DISCUSSION

La connaissance est limitée concernant les microorganismes impliqués dans la carboxylation du phénol en acide benzoïque. Cette étude microbiologique a permis d'acquérir plus d'informations sur ces microorganismes si peu connus.

1. COENZYME A LIGASE

Plusieurs auteurs (Biegert et al., 1993; Brackmann et Fuchs, 1993; Auburger et Winter, 1992) sont d'avis que les coenzymes A ligases sont répandues et que leur activité est similaire dans plusieurs groupes bactériens tel que les bactéries dénitrifiantes, photométaboliques et fermentaires. Auburger et Winter (1992) qui ont étudié un consortium dégradant l'acide benzoïque par fermentation méthanique ont même réussi à purifier une benzoyl-CoA ligase dans cette culture. Il est ainsi probable que le consortium de référence possède un tel système enzymatique au niveau de la transformation de l'acide p-hydroxybenzoïque et de l'acide benzoïque. L'utilisation d'une sonde moléculaire détectant la portion du gène codant pour une région homologue de l'enzyme sur le consortium de référence et par la suite sur différentes souches isolées, devrait permettre de cibler les souches possédant cette activité et peut-être ainsi faciliter l'isolement de souches impliquées dans la transformation du phénol en acide benzoïque via l'acide p-hydroxybenzoïque. Cependant, les résultats obtenus pour vérifier la présence de

cette activité dans le consortium de référence, n'ont pas permis de conclusion claire. Beaucoup de variations ont été observées lors de l'hybridation avec la sonde moléculaire. Ces variations dans les réponses peuvent provenir du fait que pour chacune des hybridations effectuées, le consortium n'avait pas nécessairement le même âge physiologique ou temps d'incubation. Enfin, il est également probable que les quantités d'ADN soient trop faibles pour être détectées nettement. Pour ces raisons, une amplification de l'ADN au niveau du consortium de référence à l'aide de la technique du PCR a été proposée. Étant donné les exigences de cette procédure, il a été décidé de ne pas poursuivre dans cette voie.

2. BACTÉRIES ANAÉROBIES FACULTATIVES

Aucune croissance de bactéries anaérobies facultatives n'a été décelée dans le consortium de référence. Cependant, Béchard (1988) avait dénombré la présence de bactéries anaérobies facultatives de l'ordre de 10^2 - 10^3 UFC/mL et ces bactéries ne possédaient pas la capacité de dégrader le phénol en conditions anaérobies et aérobies. L'élimination des bactéries anaérobies facultatives dans le consortium de référence s'explique par des transferts de cultures et des enrichissements effectués sur une longue période de temps en anaérobiose. Ces bactéries, n'étant pas favorisées sous les conditions de culture utilisées, ont été éliminées par

dilution lors des transferts successifs. Elles ne sont donc pas impliquées dans la carboxylation du phénol.

3. IMPLICATION DE BACTÉRIES SPORULÉES

Plusieurs traitements ont été effectués sur le consortium de référence dans le but de sélectionner les bactéries sporulées et de vérifier leur implication dans la dégradation du phénol.

3.1 Traitement à la chaleur

La cinétique de transformation du phénol par le consortium traité à 60°C est semblable à celle effectuée par le consortium de référence (Figure 5), elle est seulement plus lente. Des observations en microscopie électronique ont également révélées une diversité aussi élevée de formes morphologiques que celle retrouvée pour le consortium non traité. Un chauffage à 60°C/20 min. n'est donc pas suffisant pour éliminer totalement les cellules végétatives non sporulées, en effet Sneath (1986) a recommandé au moins 70°C pendant 10 minutes. Le chauffage du consortium à 80°C pendant 15 minutes a eu un effet plus marqué que le précédent. L'acide benzoïque s'est accumulé et n'a pas été dégradé dans la culture inoculée avec le consortium traité à cette température même lors d'une réaddition de phénol dans la culture (Figure 9). De plus, la présence de bactéries Gram-positives principalement sporulées observées en microscopie

électronique, suggèrent l'implication des bactéries sporulées au niveau de la carboxylation du phénol.

3.2 Traitement à la chaleur combiné à l'éthanol

Il est reconnu que certaines bactéries non sporulantes peuvent survivre à un chauffage de 80°C pendant 10 minutes (Smith et Holdeman, 1968). Dans cette optique et pour s'assurer de n'avoir que des bactéries anaérobies sporulées, un deuxième traitement à la chaleur (80°C/15 min.) suivi d'un traitement à l'éthanol durant 1 heure a été effectué. Le consortium ayant subi ce double traitement a conservé l'activité de transformer le phénol en acide benzoïque (Figure 11). Selon Koransky et al. (1978) un tel traitement à l'éthanol élimine les bactéries non sporulantes confirmant ainsi que les microorganismes impliqués dans la carboxylation du phénol dans le consortium de Beaudet et al. (1986) sont probablement des bactéries sporulées. Ye et al. (1992) ont démontré à l'aide d'un traitement semblable de sédiments aquatiques que les microorganismes sporulés étaient un des groupes physiologiques responsables pour la déshalogénéation réductrice de polychlorophénols (Aroclor 1242) en conditions méthanogènes.

3.3 Sous-cultures

Similairement aux résultats de Ye et al. (1992), l'activité de transformation n'est pas seulement résistante à

la chaleur et à l'éthanol mais également stable suite à des transferts successifs des consortiums traités (Figure 10). Une phase de latence est observée après le premier transfert mais la dégradation du phénol devient deux fois plus rapide après plusieurs sous-cultures ce qui reflète probablement une augmentation de la population des microorganismes carboxylants. Contrairement au consortium de référence, les sous-cultures montrent une accumulation constante d'acide benzoïque et aucune production de méthane indiquant que la population initiale ne s'est pas reformée. Comme Knoll et Winter (1987), Jeannin (1986) et Béchard et al. (1990) l'ont démontré avant nous, ces résultats suggèrent que les bactéries méthanogènes ne sont pas impliquées dans la carboxylation du phénol par fermentation méthanique. Jeannin (1986) a postulé que les microorganismes carboxylants coexisteraient avec des bactéries acétogènes effectuant la réduction et l'ouverture du cycle aromatique, les résultats obtenus concernant l'accumulation de l'acide benzoïque suggèrent que ces microorganismes acétogènes ne sont pas essentiels à la carboxylation du phénol.

Un autre résultat intéressant constaté lors des sous-cultures est l'observation en microscopie électronique d'un bâtonnet filamenteux Gram-positif. Ce dernier apparaît seulement après quelques transferts suite au traitement, soit lorsque le phénol est dégradé sans phase de latence après

environ 13 jours au lieu de 30 jours d'incubation. Ce bâtonnet semble être plus sensible à la chaleur que les autres bactéries présentes dans le consortium traité puisqu'il faut plusieurs sous-cultures pour atteindre une population assez élevée pour être visible en microscopie électronique. Ces résultats suggèrent également que le bâtonnet filamenteux serait impliqué dans la transformation du phénol étant donné que l'augmentation de sa population semble en relation avec la vitesse de dégradation du phénol. Par contre, dans le but de confirmer cette relation, un consortium de référence a été de nouveau traité à la chaleur. Le bâtonnet filamenteux n'a pas été observé même après sept sous-cultures successives alors que le phénol était transformé après 13 jours d'incubation sans phase de latence. Ces derniers résultats mettent en doute l'implication du bâtonnet filamenteux dans la carboxylation du phénol. Il est difficile de trancher définitivement cette question étant donné l'impossibilité d'isoler cette bactérie compte tenu qu'elle ne croît pas sur milieu solide.

Aucun des groupes de recherche (Zhang et Wiegel, 1990a; Sharak Genthner et al., 1989b; Knoll et Winter, 1989) ont retrouvé un tel bâtonnet dans leur consortium carboxylant le phénol en acide benzoïque par fermentation méthanique. Par contre, des bactéries filamenteuses ont déjà été observées dans des réacteurs anaérobies méthanogènes par d'autres

auteurs comme par exemple Frigon (1992) qui a étudié un réacteur anaérobie à film fixe traitant les eaux de lixiviat d'un site d'enfouissement sanitaire. La présence de ces bactéries filamenteuses dans le consortium et dans le réacteur de Frigon (1992) peut s'expliquer par le fait que des boues activées anaérobies ont été utilisées dans les deux cas.

3.4 Traitement plus intense à la chaleur

Sachant que certaines spores sont plus résistantes à la chaleur que d'autres (Leclerc et al., 1983), des traitements de plus en plus intenses ont été effectués dans le but d'éliminer certaines souches tout en conservant l'activité de carboxylation du phénol et de connaître la limite de thermorésistance des bactéries sporulées impliquées dans cette réaction.

L'activité de transformation du phénol, comme celle de déshalogénéation de l'Aroclor 1242 obtenu par Ye et al. (1992), a été conservée suite à un traitement à la chaleur de 80°C/15 minutes suivi d'un autre traitement à 90°C/10 minutes. Par contre, contrairement à certaines spores bactériennes qui peuvent survivre à 100°C et plus pour plusieurs heures (Johnston et al., 1964) et d'autres à 80°C pour 60 minutes (Madsen et Licht, 1992), un traitement plus intensif que 90°C/10 minutes du consortium a complètement inhibé sa capacité de transformer le phénol.

Aucune souche additionnelle n'a été éliminée par ces traitements à la chaleur plus intense comparativement aux autres traitements décrits précédemment.

Des populations similaires pour les consortiums traités à la chaleur (80°C/15 min.; 90°C/10 min.), combinés ou non à l'éthanol ont été observées suite à des examens en microscopie électronique et à des ensemencements sur milieu solide. Ces résultats indiquent qu'aucun traitement ne semble plus efficace qu'un autre pour réduire le nombre de souches constituant le consortium. Même des dilutions en série n'ont pas permis d'éliminer certaines des souches suggérant que leur concentration dans la population traitée est voisine. Toutefois, la souche no 4 semble avoir été éliminée par dilution lors des sous-cultures successives des consortiums traités.

Les résultats obtenus de ces divers traitements ont permis d'associer les bactéries sporulées à la réaction de carboxylation du phénol en acide benzoïque.

4. BACTÉRIES SPORULÉES ISOLÉES

L'objectif principal de ce travail étant d'isoler en culture pure le microorganisme carboxylant, l'isolement sur milieu solide de bactéries sporulées à partir d'un consortium

traité a été effectué. Cinq souches, dont quatre *Clostridium* ont été isolées.

4.1 Clostridium

Le genre *Clostridium* représente un des groupes fermentaires dominants dans les boues activées de réacteurs anaérobies. Il a même été démontré qu'il fait partie des genres dominants des bactéries hydrolytiques identifiées dans les réacteurs à boues activées traitant des boues d'égout ou du lisier de porc (Ueki et al., 1978; Holmes et Freischel, 1978; Hobson et Shaw, 1974). Le consortium de référence provient d'un mélange de boues, d'eau de marais, de lisier de porc et de sol (Beaudet et al., 1986), il n'est donc pas étonnant que des bactéries sporulées anaérobies du genre *Clostridium* aient été isolées. Les souches isolées *C. ghonii*, *C. hastiforme* et la souche saccharolytique *C. glycolicum* sont des bactéries retrouvées couramment dans le sol. Frigon (1992) a également identifié une souche de *C. glycolicum* dans un réacteur anaérobie enrichi avec des boues activées.

Jeannin (1986) a observé la présence de bactéries appartenant au genre *Clostridium* dans un consortium anaérobie carboxylant le phénol mais leur implication n'a jamais été démontrée. Bisailon et al. (1991a) ont suggéré la présence de bactéries du genre *Clostridium* impliquées dans la carboxylation du phénol dû à la nécessité d'au moins deux

acides aminés dans le milieu de culture, rappelant la réaction de Stickland effectuée par ce genre de bactéries. D'autres ont réussi à isoler des bactéries de types *Clostridium* impliquées dans la transformation de composés aromatiques tel que l'acide p-hydroxybenzoïque en phénol (Zhang et Wiegel, 1990b) ou de plusieurs chlorophénols (Madsen et Licht, 1992). Mais jusqu'à maintenant aucun n'a réussi à isoler le microorganisme carboxylant le phénol en acide benzoïque.

4.2 Capacité de dégradation

Malgré de nombreuses tentatives, les cinq souches isolées (Tableau 2) n'ont pas transformé le phénol en acide benzoïque lorsque cultivé en culture pure ou coculture. L'insuccès de ces tentatives peut premièrement provenir du fait que le microorganisme carboxylant ne croît pas sur milieu solide, il ne peut ainsi être isolé par cette technique. Comme l'ont avancé Jeannin (1986) et Béchard et al. (1990), la souche impliquée dans la carboxylation du phénol effectuerait cette réaction par co-métabolisme et sa source d'énergie et de carbone proviendrait d'un sous-produit de dégradation du protéose peptone. La souche recherchée ne pourrait alors possiblement pas se développer sur milieu solide pour former une colonie isolée, étant donné que les produits de dégradation du protéose peptone ne sont pas facilement disponibles sous ces conditions. Les souches qui croissent sur les milieux solides sont probablement celles qui peuvent

facilement utiliser le protéose peptone ou les nombreux éléments retrouvés dans le milieu Columbia.

Des associations entre *Clostridium* ont été rapportées dans la littérature (Mori, 1990; Ng et al., 1981; Wang et al., 1979). Bisailon et al. (1991a) ont récemment suggéré la présence d'un co-substrat inconnu indispensable à la carboxylation du phénol qui serait fourni lors d'interactions métaboliques entre les souches. Ce type de mutualisme, si présent entre les souches isolées, a pu être complètement entravé par un déséquilibre dans les proportions de chacune des souches créé lors de leur ensemencement en coculture en milieu liquide. L'inhabilité des souches à transformer le phénol peut donc provenir du fait que la proportion de chacune ne reflétait pas les conditions nécessaires, indispensables à une activité de carboxylation.

Considérant l'hypothèse des interactions métaboliques entre les souches, un essai a été effectué pour faciliter ces échanges entre les bactéries. Selon Fletcher et Marshall (1982), plusieurs bactéries portent une charge négative nette, il peut ainsi y avoir une répulsion significative empêchant les échanges, surtout si la concentration de chacune des souches n'est pas adéquate. Givens et Sack (1987) ont avancé qu'un support matériel pour l'attachement des microorganismes pouvait améliorer les

performances d'un traitement biologique. Kindzierski et al. (1992) ont démontré qu'une résine échangeuse d'anions permet une meilleure colonisation des bactéries d'un consortium dégradant le phénol en conditions méthanogènes rendant ainsi les échanges plus performants. Par contre, les cinq souches isolées lorsqu'inoculées en présence de cette résine, ne possèdent pas la capacité de transformer le phénol. Les échanges métaboliques entre les souches, impliquant possiblement un co-substrat inconnu pour la carboxylation, n'ont pas été facilités par la présence d'une résine échangeuse d'anions. Ces résultats peuvent indiquer que s'il y a un problème au niveau des échanges métaboliques, ce problème n'est peut-être pas seulement physique. Cependant, il se peut aussi que la concentration utilisée de résine était inadéquate pour favoriser les échanges.

5. ÉTUDE DU CONSORTIUM TRAITÉ

Compte tenu que les bactéries sporulées isolées n'ont pas transformé le phénol en acide benzoïque, lorsque cultivées en culture pure ou en coculture, l'étude s'est plutôt orienté vers le consortium traité. Le traitement du consortium représente une étape importante vers l'isolement du microorganisme carboxylant puisque beaucoup de microorganismes non essentiels ont été éliminés et que les bactéries sporulées résiduelles ont conservé la capacité de dégrader le phénol.

5.1 Importance du surnageant de l'inoculum

Bisaillon et al. (1991a) et Knoll et Winter (1989) croient qu'un facteur soluble ou co-substrat inconnu est nécessaire pour la croissance des microorganismes carboxylants. Il a été démontré que le surnageant de culture introduit lors de l'inoculation (12,5% v/v) n'est pas essentiel pour la transformation du phénol (Figure 18). Ces résultats suggèrent que les microorganismes du consortium traité ne nécessitent pas la présence d'un facteur soluble compris dans le surnageant au moment de l'inoculation. Toutefois, ceci ne signifie pas qu'il n'y a pas d'interactions métaboliques entre les microorganismes.

5.2 Oxydation, O-déméthylation et décarboxylation

Selon la littérature, certains microorganismes sporulés peuvent effectuer des réactions d'oxydation (Friedrich et al., 1991) et des réactions de O-déméthylation (Wu et al., 1988). Par contre, le consortium traité ne peut effectuer ce type de réactions contrairement au consortium de référence. Ces résultats suggèrent que les microorganismes impliqués dans ces deux réactions ne sont pas des microorganismes sporulés. Il n'est donc pas étonnant que les souches isolées n'effectuent pas ces réactions.

Cependant, le consortium traité, tout comme le consortium de référence, a conservé la capacité d'effectuer la

décarboxylation de l'acide p-hydroxybenzoïque en phénol (Figure 19) impliquant par le fait même les microorganismes sporulés dans cette réaction. Des microorganismes du genre *Clostridium* ont déjà été isolés pour leur capacité à effectuer des réactions de décarboxylation, entre autre de l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (Zhang et Wiegel, 1990b; Hsu et al., 1990). Cependant aucune des souches isolées dans le présent travail n'a été capable de transformer l'acide p-hydroxybenzoïque en phénol comme le font ces souches de *Clostridium*. Il se peut que la souche effectuant la décarboxylation de l'acide p-hydroxybenzoïque croît peu ou pas en milieu solide.

Sharak Genthner et al. (1990) ont démontré que l'acide p-hydroxybenzoïque pouvait être décarboxylé en phénol et également déhydroxylé en acide benzoïque en utilisant un analogue l'acide 3-fluoro-4-hydroxybenzoïque. Bisailon et al. (communication personnelle) ont fait des observations similaires en utilisant le consortium de référence et l' [$^{13}\text{COOH}$] acide p-hydroxybenzoïque. Dans ce travail, nous avons démontré que le consortium traité conservait la capacité d'effectuer ces deux réactions. Il aurait été plutôt inattendu que le consortium traité ne puisse déhydroxylé l'acide p-hydroxybenzoïque en acide benzoïque puisque ce dernier est l'intermédiaire de dégradation du phénol en acide

benzoïque (Sharak Genthner et al., 1991; Bisailon et al., communication personnelle).

5.3 Sous-culture sur milieux solides

Les résultats obtenus d'une sous-culture sur milieux solides des consortiums de référence et traité concordent avec l'hypothèse émise précédemment: le microorganisme carboxylant semble croître peu ou pas sur milieu solide. En effet, même si les cultures ont conservé la capacité de dégrader le phénol suite à un passage sur milieu solide comme dans les travaux de May et al. (1992) avec des biphényles polychlorés, il a fallu plus de 30 jours d'incubation pour le transformer complètement comparativement à environ 13 jours lors d'une sous-culture de maintenance (12,5% (v/v) d'inoculum) en milieu liquide. S'il y avait eu croissance abondante du microorganisme responsable sur milieu solide, la carboxylation du phénol aurait été aussi rapide que lors d'une sous-culture de maintenance.

5.4 Croissance des souches et dégradation du phénol

Il est difficile d'interpréter les résultats obtenus lorsque les trois espèces de *Clostridium* présentes dans le consortium traité ont été suivies à l'aide de milieux solides Columbia pendant la transformation du phénol dans le milieu minimal liquide (Figure 22). La progression de la population de *C. hastiforme* pendant la carboxylation du phénol

pourrait indiquer que cette souche est impliquée dans cette réaction. Cependant, le milieu de culture utilisé étant un milieu minimal ne favorisant pas une croissance bactérienne excessive, il devient délicat d'affirmer que cet accroissement de l'ordre de 1,8 à $4,6 \times 10^6$ UFC/mL est significatif. Concernant les deux autres souches de *Clostridium* suivies, soit *C. ghoni* et *C. glycolicum*, elles ne semblent que survivre dans le milieu de culture pendant la transformation du phénol. La faible croissance des souches lors de la transformation du phénol peut également s'expliquer par le fait que le phénol est transformé par co-métabolisme (Bécharé et al., 1990; Jeannin, 1986). C'est-à-dire qu'il n'y a pas nécessairement de lien entre la croissance des souches et la transformation du phénol étant donné que le phénol n'est pas la source de carbone et d'énergie du microorganisme carboxylant.

5.5 Éthanol comme additif

Lors du traitement à la chaleur combiné à l'éthanol, les résultats obtenus semblaient indiquer que l'éthanol favorisait le démarrage de la carboxylation du phénol (Figure 11). Suite à ces résultats, des expériences ont été effectuées afin d'élucider le rôle de l'éthanol.

Il est reconnu qu'un traitement à la chaleur des spores bactériens raccourcit le temps de germination (Leclerc et al., 1983). D'autres types d'agent activateur, tel que des

sels inorganiques et du L-alanine chez certains *Bacillus* sont également reconnus pour stimuler la germination de la spore (Anonyme, 1983). Les essais effectués avec le consortium traité ont démontré qu'en présence et en absence d'éthanol le phénol était transformé de façon similaire. C'est donc dire que l'éthanol ne serait pas un activateur de la germination. Afin de confirmer cette conclusion, d'autres expériences devront être effectuées en utilisant des concentrations différentes d'éthanol.

Fallon et al. (1991) ont rapporté que l'éthanol pouvait servir de source de carbone en conditions méthanogènes pour dégrader le cyanide. Distefano et al. (1992) et Holliger et al. (1992) ont observé que l'éthanol et le méthanol était de bons substrats pour une culture anaérobie mixte effectuant des déchlorurations. Ces derniers ont même énoncé que ces produits étaient des fournisseurs d' H_2 lors de la déhalogénéation. Sachant que les souches isolées *C. ghonii* et *C. glycolicum* peuvent produire de l'éthanol dans leur métabolisme (Sneath, 1986), il se pouvait que l'éthanol soit nécessaire à la croissance d'une souche impliquée dans la carboxylation. Si cela était le cas, la présence d'éthanol dans la culture devait accélérer la transformation du phénol car la souche n'avait pas à attendre la production de ce produit par une autre souche. L'ajout d'éthanol dans la culture devait ainsi nous renseigner à ce sujet. Cependant,

la dégradation du phénol dans toutes les cultures testées n'a pas été accélérée par rapport aux cultures témoins démontrant qu'aux concentrations testées, l'éthanol ne semble pas favoriser le microorganisme carboxylant. De plus, lorsque l'éthanol a été utilisé comme seule source d'énergie et de carbone, la population des souches de *Clostridium* ne réussissait pas à croître et aucune dégradation du phénol n'a été observée indiquant une autre fois que l'éthanol ne semble pas être nécessaire à la carboxylation du phénol. Ces résultats sont en accord avec Shelton et Tiedje (1984) qui ont observé qu'une bactérie sporulée impliquée dans la dégradation de l'acide 3-chlorobenzoïque en conditions méthanogènes ne pouvait croître en présence d'éthanol. Brune et Schink (1992) ont également constaté qu'une bactérie fermentaire anaérobie dégradant des composés hydroaromatiques ne pouvait croître en présence d'éthanol.

5.6 Action des sucres fermentescibles

L'utilisation de glucose et de xylose devait favoriser les souches de *C. ghonii* et *C. glycolicum* dans le but d'étudier leur rôle dans la carboxylation du phénol. Toutefois, aucune des deux souches n'a été favorisée et aucune dégradation du phénol n'a été observée. Le choix des deux sucres était basé sur les résultats obtenus des tests biochimiques par le Laboratoire de lutte contre la maladie lors de l'identification. Ces souches n'ont pas été

favorisées en dépit du fait qu'elles fermentent les deux sucres utilisés. Les tests de fermentation ont été réalisés avec des milieux de cultures contenant plus d'éléments nutritifs que le milieu minimal. Il se peut ainsi que le milieu minimal ne permettent pas la croissance de ces souches sous ces conditions. Enfin, ces résultats reconfirment le besoin essentiel de protéose peptone dans le milieu de culture pour conserver les cultures actives comme l'avait démontré Bisailon et al. (1991a).

5.7 Effet des antibiotiques

L'objectif principal étant d'isoler le microorganisme carboxylant, des essais ont été effectués afin d'éliminer les souches non essentielles pouvant être présentes dans le consortium traité mais cette fois-ci en demeurant toujours en milieu liquide. La stratégie utilisée était l'emploi d'inhibiteurs spécifiques comme les antibiotiques, qui sont capables d'agir que sur certaines souches et non sur l'ensemble des souches.

L'antibiogramme par la méthode des disques a permis de sélectionner trois antibiotiques qui inhibaient des souches différentes aux concentrations testées (Tableau 3). Lors des essais en milieu liquide en présence de ces antibiotiques, les résultats obtenus ont été différents. En effet, certaines souches qui devaient être sensibles à

l'antibiotique d'après l'antibiogramme se sont révélées résistantes. Ceci peut s'expliquer par les concentrations d'antibiotiques utilisées en milieu liquide qui étaient différentes de celles testées par la méthode des disques et également par le fait que dans les zones d'inhibition en milieu solide, il y avait souvent des colonies qui croissaient indiquant que certaines cellules de la population étaient résistantes. En effet, il est reconnu que toutes les cellules d'une population n'ont pas la même sensibilité à un antibiotique donné compte tenu de l'hétérogénéité de la population et des différentes conditions de culture utilisées. Par exemple, Sneath (1986) a testé 30 souches de *C. glycolicum* et a observé que 5 étaient résistantes à l'érythromycine, une au chloramphénicol et une à la tétracycline.

L'érythromycine, même à une concentration de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ a inhibé presque complètement toute croissance bactérienne de sorte qu'aucune sélection de bactéries n'a été possible. La population des souches *C. hastiforme* (souches no 2 et no 3) et *C. glycolicum* était similaire dans le consortium traité mis en présence de différentes concentrations de chloramphénicol ou de tétracycline qu'il y ait transformation du phénol ou non. Ces résultats suggèrent ainsi que ces souches ne semblent pas impliquées dans la réaction de carboxylation du phénol. Des observations en microscopie électronique démontrent l'absence du bâtonnet

filamenteux dans les cultures avec tétracycline où la carboxylation est inhibée contrairement aux cultures avec des concentrations moindre de tétracycline qui dégradent le phénol. Par contre lorsque les cultures inhibées sont transférées dans un milieu sans antibiotique, le filament est à nouveau observé mais il n'y a aucune dégradation, suggérant comme précédemment avec les sous-cultures du consortium traité que le bâtonnet filamenteux ne semble pas impliqué dans la carboxylation du phénol.

L'utilisation d'antibiotiques avec le consortium traité a permis d'éliminer complètement la souche *C. ghonii* sans affecter la carboxylation du phénol. Malgré la complexité à suivre les souches dû aux polymorphismes des colonies, cette conclusion a été possible grâce à l'activité hémolytique de *C. ghonii*. Cette souche n'est donc pas impliquée dans la dégradation du phénol. L'élimination de *C. ghonii* est en accord avec les travaux de Sneath (1986) qui a testé plusieurs souches de *C. ghonii* et a observé que toutes les souches étaient sensibles au chloramphénicol, à la tétracycline et à l'érythromycine. De plus, l'utilisation d'antibiotiques a permis de détecter une colonie, la souche no 6, qui n'avait jamais été observée auparavant. L'élimination d'une souche et l'inhibition de certaines autres a probablement favorisé cette dernière sur milieu solide. La souche no 6 semble impliquée dans la dégradation du phénol car

elle est présente dans les cultures dont les concentrations de chloramphénicol et de tétracycline ont permis de conserver la capacité de dégrader le phénol mais elle est absente ou en faible quantité dans les cultures avec des concentrations plus importantes d'antibiotiques ne permettant pas la transformation du phénol. En plus, pour la culture inhibée avec de la tétracycline qui a été transférée dans un milieu sans antibiotique, la souche no 6 n'a pas été observée et cette culture ne dégrade toujours pas le phénol. Afin de confirmer cette hypothèse, d'autres expériences avec la souche no 6 sont nécessaires.

Les travaux réalisés dans cette étude n'ont pas permis d'isoler les microorganismes carboxylants le phénol en acide benzoïque. Cependant, ils ont contribué à franchir un grand pas dans cette direction en dépit de la complexité du consortium. Il a été montré que les bactéries sporulées sont impliquées dans cette transformation. De plus, les souches de *C. hastiforme*, *C. ghonii*, *C. glycolicum*, ainsi que la souche no 4 et le bâtonnet filamenteux ne seraient pas essentiels à la carboxylation alors que la souche no 6 le serait. Cette hypothèse n'est pas en contradiction avec le fait que la bactérie carboxylante croît peu ou pas sur milieux solides étant donné que cette souche croît peu comparativement aux autres souches. Des travaux additionnels sont nécessaires afin de confirmer le rôle de cette dernière souche.

CONCLUSION

La présence d'une activité coenzyme A ligase dans le consortium de référence n'a pu être confirmée. Cet outil n'a donc pas été utilisé dans l'isolement de souches impliquées dans la transformation du phénol en acide benzoïque.

Les bactéries anaérobies facultatives ne sont pas impliquées dans la dégradation du phénol puisqu'elles ne sont plus présentes dans le consortium de référence.

Les bactéries sporulées sont impliquées dans la carboxylation du phénol en acide benzoïque. Par contre, les différents traitements à la chaleur combinés ou non à l'éthanol n'ont pas permis d'isoler les microorganismes responsables étant donné que plusieurs souches microbiennes Gram-positives résistent à ces traitements.

Des observations en microscopie électronique ont révélé la présence d'un bâtonnet filamenteux Gram-positif qui ne croît pas sur milieu solide.

Aucune des cinq souches isolées sur milieu solide à partir des consortiums traités ne possède la capacité de carboxyler le phénol en culture pure ou en coculture. D'ailleurs, la souche carboxylant le phénol semble croître peu ou pas sur milieu solide.

L'étude du consortium traité a révélé que les bactéries sporulées sont également responsables de la réaction de décarboxylation mais non des réactions de O-déméthylation et d'oxydation qu'effectue le consortium de référence. Cependant, les cinq souches isolées ne possèdent pas la capacité d'effectuer des réactions de décarboxylation.

Les souches no 4 et *C. ghonii* ont pu être éliminées du consortium traité sans affecter la carboxylation du phénol. L'ajout de différentes concentrations d'antibiotiques dans le consortium traité a permis de suggérer que les souches de *C. hastiforme*, *C. glycolicum* et le bâtonnet filamenteux ne seraient pas essentiels à cette réaction mais que la souche no 6 le serait puisque son absence dans la culture entraîne une perte d'activité du consortium. Des travaux additionnels sont nécessaires afin de confirmer le rôle de la souche no 6.

Cette étude n'a peut-être pas permis d'isoler les microorganismes responsables de la carboxylation du phénol, toutefois, des pas importants ont été effectués dans cette direction.

REMERCIEMENTS

Je désire remercier sincèrement:

Le docteur Jean-Guy Bisailon pour avoir accepté de diriger ce travail, pour sa constante disponibilité, sa compréhension ainsi que ses encouragements tout au long de ma maîtrise.

Louis Racine pour son assistance technique indispensable ainsi que pour ses conseils et son soutien moral.

Robert Alain pour son aide et ses commentaires pertinents en microscopie électronique.

Le docteur Michel Sylvestre pour sa collaboration dans l'analyse de la coenzyme A ligase et d'avoir permis que le travail se fasse dans ses locaux.

J'aimerais de plus exprimer ma gratitude à: François Lépine pour ses analyses en spectrométrie de masse et Guy McSween pour ses conseils pratiques et l'emprunt d'équipements de laboratoire.

Enfin, je suis reconnaissante au fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) qui,

par l'octroi d'une bourse d'étude, m'a permis de réaliser cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

ALTENSCHMIDT, U., B. OSWALD et G. FUCHS. 1991. Purification of benzoate-coenzyme A ligase and 2-aminobenzoate-coenzyme A ligases from a denitrifying *Pseudomonas* sp. *J. Bacteriol.* 173: 5494-5501.

ANONYME. 1979. National Cancer Institute. Bioassay of 2, 4, 6-trichlorophenol for possible carcinogenicity. NCI Carcinogenesis Technical Report Serv. no 155. DHEN Pub. No (NIH) 79-1711. U.S. Government Printing Office. Washington, D.C.

ANONYME. 1980. Chemical and Engineering news. Key chemicals and polymers, 34th ed. Vol. 58, American Soc. Washington, D.C.

ANONYME. 1983. The bacterial spore, Vol. 2. (éds) A. Hurst et G.W. Gould, Academic Press Inc., New York. 328 p.

AUBURGER, G. et J. WINTER. 1992. Purification and characterization of benzoyl-CoA ligase from a syntrophic, benzoate-degrading, anaerobic mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 789-795.

BABBITT, P.C., G.L. KENYON, B.M. MARTIN, H. CHAREST ET M. SYLVESTRE. 1992. Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: Analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochemistry.* 31: 5594-5604.

BALBA, M.T., N.A. CLARKE et W.C. EVANS. 1979. The methanogenic fermentation of plant phenolics. *Biochem. Soc. Trans.* 7: 1115-1116.

BALBA, M.T. et W.C. EVANS. 1980. Methanogenic fermentation of the naturally occurring aromatic amino acids by a microbial consortium. *Biochem. Soc. Trans.* 8: 625-627.

BARIK, S., W.J. BRULLA et M.P. BRYANT. 1985. PA-1, a versatile anaerobe obtained in pure culture, catabolizes benzenoids and other compounds in syntrophy with hydrogenotrophs, and P-2 plus *Wolinella* sp. degrades benzenoids. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 304-310.

BARLAZ, M.A., D.M. SCHAEFER et R.K. HAM. 1989. Bacterial population development and chemical characteristics of refuse decomposition in a simulated sanitary landfill. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 55-65.

BEAUDET, R., J.-G. BISAILLON, M. ISHAQUE et M. SYLVESTRE. 1986. Isolation of an anaerobic bacterial consortium degrading phenolic compounds-assay in swine waste. *Agric. Wastes* 17: 131-140.

- BÉCHARD, G. 1988. Étude d'un consortium de bactéries anaérobies dégradant le phénol et le p-crésol en conditions méthanogènes. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, Laval (Canada).
- BÉCHARD, G., J.-G. BISAILLON et R. BEAUDET. 1990. Degradation of phenol by a bacterial consortium under methanogenic conditions. *Can. J. Microbiol.* 36: 573-578.
- BERRY, D.F., A.J. FRANCIS et J.-M. BOLLAG. 1987. Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* 51: 43-59.
- BIEGERT, T., U. ALTENSCHMIDT, C. ECKERSKORN et G. FUCHS. 1993. Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-Hydroxybenzoyl-CoA ligase from a denitrifying *Pseudomonas* species. *Eur. J. Biochem.* 213: 555-561.
- BISAILLON, J.-G., F. LÉPINE et R. BEAUDET. 1991a. Study of the methanogenic degradation of phenol via carboxylation to benzoate. *Can. J. Microbiol.* 37: 573-576.
- BISAILLON, J.-G., F. LÉPINE, R. BEAUDET et M. SYLVESTRE. 1991b. Carboxylation of o-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2131-2134.
- BISAILLON, J.-G., F. LÉPINE, R. BEAUDET et M. SYLVESTRE. 1993. Carboxylation potential of an anaerobic consortium against phenolic and related compounds under methanogenic conditions. *Can. J. Microbiol.* 39: 642-648.
- BOYD, S.A., D.R. SHELTON, D. BERRY et J.M. TIEDJE. 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 50-54.
- BRACKMANN, R. et G. FUCHS. 1993. Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from a denitrifying *Pseudomonas* species. *Eur. J. Biochem.* 213: 563-571.
- BREZNAK, J.A. 1992. The genus *Sporomusa*. dans: *The Prokaryotes*, 2e édition, (éds) Balows *et al.*, Springer Verlag, pp.2014-2021.
- BRUNE, A. et B. SCHINK. 1992. Anaerobic degradation of hydro-aromatic compounds by newly isolated fermenting bacteria. *Arch. Microbiol.* 158: 320-327.
- CHMIELOWSKI, J. 1965. Biochemical degradation of some phenols during methane fermentation. *Zesk. Nauk. Politech. Salska, Inz. (Pol)* 8: 97.

- CROSS, T. 1970. The diversity of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 95-102.
- DANGEL, W., R. BRACKMANN, A. LACK, M. MOHAMMED, J. KOCH, B. OSWALD, B. SEYFRIED, A. TSCHECH et G. FUCHS. 1991. Differential expression of enzyme activities initiating anoxic metabolism of various aromatic compounds via benzoyl-CoA. *Arch. Microbiol.* 155: 256-262.
- DEWEERD, K.A., A. SAXENA, D.P. NAGLE, Jr. et J.M. SULFITA. 1988. Metabolism of the ¹⁸O-methoxy substituent of 3-methoxybenzoic acid and other unlabeled methoxybenzoic acids by anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1237-1242.
- DISTEFANO, T.D., J.M. GOSSET et S.H. ZINDER. 1992. Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3622-3629.
- DOWELL, V.R. Jr. 1970. Anaerobic infections. dans: *Diagnostic procedures for bacterial, mycotic and parasitic infections*, 5th ed. American Public Health Association, Inc., New York, pp. 494-543.
- DÖRNER, C. et B. SCHINK. 1991. Fermentation of mandelate to benzoate and acetate by a homoacetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 302-306.
- EVANS, C.W. 1977. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature* 270: 17-22.
- FALLON, R.D., D.A. COOPER, R. SPEECE et M. HENSON. 1991. Anaerobic biodegradation of cyanide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1656-1662.
- FERRY, J.G. 1992. Minireview. Methane from acetate. *J. Bacteriol.* 174: 5489-5495.
- FRAZER, A.C. et L.Y. YOUNG. 1985. A gram-negative anaerobic bacterium that utilizes o-methyl substituents of aromatic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1345-1347.
- FLETCHER, M. et K.C. MARSHALL. 1982. Are solide surfaces of ecological significance to aquatic bacteria? dans: *Advances in microbial ecology*. Vol.6. (éd) K.C. Marshall. Plenum Press, New York. p. 199.
- FRIEDRICH, M., U. LADERER et B. SCHINK. 1991. Fermentative degradation of glycolic acid by defined syntrophic cocultures. *Arch. Microbiol.* 156: 398-404.

- FRIEDRICH, M. et B. SCHINK. 1991. Fermentative degradation of glyoxylate by a new strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 392-397.
- FRIGON, J.-C. 1992. Caractérisation et traitement anaérobie du lixiviat d'un lieu d'enfouissement sanitaire. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, Laval (Canada).
- FROBISHER, M. et FUERST, R. 1976. *Microbiologie clinique*. Les Éditions HRW Ltée. Anjou, Québec. 507 p.
- GALLERT, C., G. KNOLL et J. WINTER. 1991. Anaerobic carboxylation of phenol to benzoate: use of denterated phenols revealed carboxylation exclusively in the C4-position. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 124-129.
- GEISSLER, J.F., C.S. HARWOOD et J. GIBSON. 1988. Purification and properties of benzoate-coenzyme A ligase, a *Rhodopseudomonas palustris* involved.
- GIVENS, S.W. et W.A. SACK. 1987. Evaluation of carbon impregnated polyurethane foam media for biological removal of carbon and nitrogen from chemical industry waste water. *Proc. 42nd Ind. Waste Conf.*, Purdue Univ. West Lafayette, Ind., p. 93.
- GLÖCKLER, R., A. TSHECH et G. FUCHS. 1989. Reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA to benzoyl-CoA in a denitrifying phenol degrading *Pseudomonas* species. *FEBS Lett.* 251: 237-240.
- GOTTSCHALK, G. 1979. *Bacterial metabolism*. (éd.), Mortimer P. Starr, Springer-Verlag, New York. 281 p.
- GRAINGER, J.M., K.L. JONES, P.M. HOTTEN et J.F. REES. 1984. Estimation and control of microbial activity in landfill. dans: *Microbiological Methods for Environmental Biotechnology*. Academic Press, London. pp. 259-273.
- GRBIC-GALIC, D. 1983. Anaerobic degradation of coniferyl alcohol by methanogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1442-1446.
- GRBIC-GALIC, D. 1986. Anaerobic production and transformation of aromatic hydrocarbons and substituted phenols by ferulic acid-degrading BESA-inhibited methanogenic consortia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 161-169.
- GRBIC-GALIC, D. et T.M. VOGEL. 1987. Transformation of toluence and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 254-260.

GROSS, G.G. 1985. Biosynthesis and metabolism of phenolic acids and mono-lignols. dans: Biosynthesis and biodegradation of wood components. (éd) T. Higuchi. Academic Press, New York. pp. 161-179.

HADDOCK, J.D. et J.G. FERRY. 1989. Purification and properties of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxidoreducens* G-41. J. Biol. Chem. 264: 4423-4427.

HÄGGBLUM, M.M. et L.Y. YOUNG. 1990. Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3255-3260.

HEIJTHUIJSEN, J.H.F.G. et T.A. HANSEN. 1990. C₁-metabolism in anaerobic non-methanogenic bacteria. dans: Autotrophic microbiology and one-carbon metabolism, (éds) G.A. Codd, L.Dijkhizen et F.R. Tabita, Kluwer Academic Publishers, Boston. pp. 163-191.

HENZE, M. et P. HARREMOES. 1983. Anaerobic treatment of wastewater in fixed-film reactors - a litterature review. Water Science and Technology. 15: 1-101.

HIGUCHI, T. 1985. Biosynthesis of lignin. dans: Biosynthesis and biodegradation of wood components, (ed) T. Higuchi. Academic Press, New York. pp. 141-160.

HOBSON, P.N. et B.G. SHAW. 1974. The bacterial population of piggery waste anaerobic digestors. Water Res. 8: 505-516.

HOLLIGER, C., G. SCHRAA, A.J.M. STAMS et A.J.B. ZEHNDER. 1992. Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1636-1644.

HOLMES, P. et M.R. FREISCHEL. 1978. H₂-producing bacteria in digesting sewage sludge isolated on simple, defined media. Appl. Environ. Microbiol. 36: 394-395.

HOROWITZ, A., D.R. SHELTON, C.P. CORWELL et J.M. TIEDJE. 1982. Anaerobic degradation of aromatic compounds in sediments and digested sludge. Dev. Ind. Microbiol. 23: 435-444.

HSU, T., S.L. DANIEL, M.F. LUX et H.L. DRAKE. 1990. Biotransformations of carboxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: generation of growth-supportive CO₂ equivalents under CO₂-limited conditions. J. Bacteriol. 172: 212-217.

JEANNIN, P. 1986. Dégradation du phénol en conditions méthanogènes. Aspects microbiologiques et biochimiques.

Thèse de doctorat, Université Claude Bernard - Lyon I et Ecole Vétérinaire de Lyon, Lyon (France).

JOHNSTON, R., S. HARMON et D. KAUTTER. 1964. Method to facilitate the isolation of *Clostridium botulinum* type E. J. Bacteriol. 88: 1521-1522.

JONES, W.J., D.P. NAGLE, Jr. et W.B. WHITMAN. 1987. Methanogens and the diversity of archaebacteria. Microbiol. Rev. 51: 135-177.

KAMINSKI, U., P. KUSCHK et D. JANKE. 1990. Degradation of different aromatic compounds by methanogenic consortia from Scale river sediment acclimated to either o-, m- or p-cresol. J. Basic Microbiol. 30: 259-265.

KARNAUCHOW, T.M., S.F. KOVAL et K.F. JARRELL. 1992. Isolation and characterization of three thermophilic anaerobes from a St-Lucia hot spring. System. Appl. Microbiol. 15: 296-310.

KHANNA, P., B. RAJKUMAR et N. JOTHIKUMAR. 1992. Anoxygenic degradation of aromatic substances by *Rhodopseudomonas palustris*. Curr. Microbiol. 25: 63-67.

KHOURY, N., W. DOTT et P. KÄMPFER. 1992. Anaerobic degradation of phenol in batch and continuous cultures by a denitrifying bacterial consortium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 524-528.

KINDZIERSKI, W.B., M.R. GRAY, P.M. FEDORACK et S.E. HRUDEY. 1992. Activated carbon and synthetic resins as support material for methanogenic phenol-degrading consortia-comparison of surface characteristics and initial colonization. Water Environn. Res. 64: 766-775.

KNOLL, G. et J. WINTER. 1987. Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge. Benzoate formation from phenol and CO₂ in the presence of hydrogen. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 384-391.

KNOLL, G. et J. WINTER. 1989. Degradation of phenol via carboxylation to benzoate by a defined, obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria. Appl. Biotechnol. 30: 318-324.

KOBAYASHI, T., T. HASHINAGA, E. MIKAMI et T. SUZUKI. 1989. Methanogenic degradation of phenol and benzoate in acclimated sludges. Water Sci. Technol. 21: 55-65.

KOHRING, G.-W., X. ZHANG et J. WIEGEL. 1989. Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments

in the presence of sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2735-2737.

KORANSKY, J.R., S.D. ALLEN et V.R. DOWELL, Jr. 1978. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 762-765.

KRUMHOLZ, L.R., R.L. CRAWFORD, M.E. HEMLING et M.P. BRYANT. 1987. Metabolism of gallate and phloroglucinol in *Eubacterium oxidoreducens* via 3-hydroxy-5-oxohexanoate. *J. Bacteriol.* 169: 1886-1890.

LECLERC, H., D. IZARD, M.-O. HUSSON, P. WATTRE et E. JAKUBCZAK. 1983. *Microbiologie générale*. Doin éditeurs. Paris. 369 p.

LINKFIELD, T.G. et J.M. TIEDJE. 1990. Characterization of the requirements and substrates for reductive dehalogenation by strain DCB-1. *J. Ind. Microbiol.* 5: 9-15.

LIU, S. et J.M. SULFITA. 1993. H₂-CO₂-dependent anaerobic O-demethylation activity in subsurface sediments and by an isolated bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1325-1331.

LONDY, K.L. et P.M. FEDORAK. 1992. Benzoic acid intermediates in the anaerobic biodegradation of phenols. *Can. J. Microbiol.* 38: 1-11.

MADSEN, T. et J. AAMAND. 1992. Anaerobic transformation and toxicity of trichlorophenols in a stable enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 557-561.

MADSEN, T. et D. LICHT. 1992. Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2874-2878.

MANIATIS, T., E.F. FRITSCH et J. SHAMBROOK. 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 98-328.

MAY, H.D., A.W. BOYLE, W.A. PRICE II ET C.K. BLAKE. 1992. Subculturing of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating anaerobic enrichment on solid media. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 4051-4054.

MERKEL, S.M., A.E. EBERHARD, J. GIBSON et C.S. HARWOOD. 1989. Coenzyme A thioesters are involved in the anaerobic metabolism of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* 171: 1-7.

- MOHN, W.W. et K.J. KENNEDY. 1992. Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedje* DCB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1367-1370.
- MORI, Y. 1990. Characterization of a symbiotic coculture of *Clostridium thermohydrosulfuricum* YM3 and *Clostridium thermocellum* YM4. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 37-42.
- MORRIS, P.J., W.W. MOHN, J.F. QUENSEN III, J.M. TIEDJE et S.A. BOYD. 1992. Establishment of a polychlorinated biphenyl-degrading enrichment culture with predominantly meta dechlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3088-3094.
- MORTON, H.E. 1977. Alcohols. dans: *Disinfection, sterilization and preservation*, 2nd ed, (éd) S. Block, Lea and Febiger, Philadelphia. pp. 301-318.
- NEUFELD, R.D., J.D. MACK et J.P. STRAKEY. 1980. Anaerobic phenol biokinetics. *Journal WPCF* 52: 2367-2377.
- NG, T.K., A. BEN-BASSAT et J.G. ZEIKUS. 1981. Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulolytic substrates by coculture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1337-1343.
- RAMANAND, R. et J.M. SULFITA. 1991. Anaerobic degradation of m-cresol in anoxic aquifer slurries: carboxylation reactions in a sulfate-reducing bacterial enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1689-1695.
- ROBERTS, T.A. et I.M. INGRAM. 1965. The resistance of spores of *Clostridium botulinum* type E to heat and radiation. *J. Appl. Bacteriol.* 28: 125-138.
- ROBERTS, D.J. et P.M. FEDORAK. 1986. Comparison of the fates of the methyl carbons of m-cresol and p-cresol in the methanogenic consortia. *Can. J. Microbiol.* 33: 335-338.
- RUDOLPHI, A., A. TSCHECH et G. FUCHS. 1991. Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 155: 238-248.
- SAVARD, P., H. CHAREST, F. SHARECK, M. SYLVESTRE, J.D. SCHOLTEN et D. DUNAWAY-MARIONO. 1992. Expression of the 4-chlorobenzoate dehalogenase genes from *Pseudomonas* sp. CBS-3 in *Escherichia coli* and identification of the gene translation products. *Can. J. Microbiol.* 38: 1074-1083.
- SCHINK, B., A. BRUNE et S. SCHNELL. 1992. Anaerobic degradation of aromatic compounds. dans: *Microbial*

degradation of natural products. (éds) G. Winkelman. V.C.H. Verlagsgesellschaft Publisher. pp. 220-242.

SCHOLTEN, J.D., K.-H. CHANG, P.C. BABBITT, H. CHAREST, M. SYLVESTRE et D. DUNAWAY-MARIANO. 1991. Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of a chlorinated aromatic. *Science* 253: 182-185.

SHARAK GENTHNER, B.R., W.A. PRICE III et P.H. PRITCHARD. 1989a. Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1466-1471.

SHARAK GENTHNER, B.R., W.A. PRICE III et P.H. PRITCHARD. 1989b. Characterization of anaerobic dechlorinating consortia derived from aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1471-1476.

SHARAK GENTHNER, B.R., G.T. TOWNSEND et P.J. CHAPMAN. 1989c. Anaerobic transformation of phenol to benzoate via para-carboxylation: use of fluorinated analogues to elucidate the mechanism of transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 945-951.

SHARAK GENTHNER, B.R., G.T. TOWNSEND et P.J. CHAPMAN. 1990. Effect of fluorinated analogues of phenol and hydroxybenzoates on the anaerobic transformation of phenol to benzoate. *Biodegradation.* 1: 65-74.

SHARAK GENTHNER, B.R., G.T. TOWNSEND et P.J. CHAPMAN. 1991. *para*-Hydroxybenzoate as an intermediate in the anaerobic transformation of phenol to benzoate. *FEMS. Microbiol. Lett.* 78: 265-270.

SHELTON, D.R. et J.M. TIEDJE. 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 840-848.

SLEAT, R. et J.P. ROBINSON. 1984. The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 381-394.

SMITH, L.D.S. et L.V. HOLDEMAN. 1968. The pathogenic anaerobic bacteria, C.C. Thomas Publisher, Springfield, Ill. pp. 40-41.

SNEATH, P.H.A. 1986. Endospore forming Gram positive rods and cocci. dans: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, vol. 2 (éds) N.R. Krieg et J.G. Holt. Williams et Wilkins, Baltimore, pp. 1104-1105.

STICKLAND, L.H. 1934. The chemical reactions by which *Clostridium sporogenes* obtains its energy. *Biochem. J.* 28: 1746-1759.

STIEB, M. et B. SCHINK. 1989. Anaerobic degradation of isobutyrate by methanogenic enrichment cultures and by a *Desulfococcus multivorans* strain. *Arch. Microbiol.* 151: 126-132.

SZEWZYK, U., R. SZEWZYK et B. SCHINK. 1985. Methanogenic degradation of hydroquinone and catechol via reductive dehydroxylation to phenol. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 31: 79-87.

TRAUNECKER, J., A. PREUB et G. DIEKERT. 1991. Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 416-421.

TSCHECH, A. et G. FUCHS. 1987. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch. Microbiol.* 148: 213-217.

TSCHECH, A. et G. FUCHS. 1989. Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxybenzoate: in vitro study of isotope exchange between $^{14}\text{CO}_2$ and 4-hydroxybenzoate. *Arch. Microbiol.* 152: 594-599.

UEKI, A., E. MIYAGAMA, H. MINATO, R. AZUMA et T. SUTO. 1978. Enumeration and isolation of anaerobic bacteria in sewage digester fluids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24: 317-332.

WANG, D.I.C., I. BIOSIC, H.Y. FANG et J.D. WANG. 1979. Direct microbiological conversion of cellulosic biomass to ethanol. dans: Proceedings of the 3rd annual biomass energy systems conference. National Technical Information Service, Springfield, Va. pp. 61-67.

WITTLE, P.J., D.O. LUNT et W.C. EVANS. 1976. Anaerobic photometabolism of aromatic compounds by *Rhodospseudomonas* sp. *Biochem. Soc. Trans.* 4: 490-491.

WOLIN, E.A., M.J. WOLIN et R.S. WOLFE. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 238: 2882-2886.

WU, Z., S.L. DANIEL et H.L. DRAKE. 1988. Characterization of a CO-dependent O-demethylating enzyme system from the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 170: 5747-5750.

YE, D., J.F. QUENSEN III, J.M. TIEDJE et S.A. BOYD. 1992. Anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls (Aroclor 1242) by pasteurized and ethanol-treated microorganisms from sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1110-1114.

- YOUNG, L.Y. 1984. Anaerobic degradation of aromatic compounds. dans: Microbial degradation of organic compounds, vol. 13 (éds) D.T. Gibson. Marcel Dekker Inc., New York. pp. 487-518.
- YOUNG, L.Y. et M.D. RIVERA. 1985. Methanogenic degradation of four phenolic compounds. Water Res. 19: 1325-1332.
- YOUNG, L.Y. et A.E. FRAZER. 1987. The fate of lignin and lignin-derived compounds in anaerobic environments. Geomicrobiol. J. 5: 261-293.
- ZEHNDER, A.J.B., K. INGVOSEN et T. MADI. 1982. Microbiology of methane bacteria. dans: Anaerobic digestion 1981, (éds) Hugue et al., Elsevier Biomedical Press, New York. pp. 45-66.
- ZEIKUS, J.G. 1977. The biology of methanogenic bacteria. Bacteriol. Rev. 41: 514-541.
- ZEIKUS, J.G. 1979. Microbial populations in anaerobic digestors. 1st international symposium on anaerobic digestion. Cardiff.
- ZEIKUS, J.G., L.H. LYND, T.E. THOMPSON, J.A. KRZYCHI, P.J. WEIMER et P.W. HEGG. 1980. Isolation and characterization of a new, methylotrophic, acidogenic anaerobe, the Marburg strain. Cur. Microbiol. 3: 381-386.
- ZHANG, X., V. MORGAN et J. WIEGEL. 1990. Conversion of ^{13}C -1 phenol to ^{13}C -4 benzoate, an intermediaire step in the anaerobic degradation of chlorophenols. FEMS. Microbiol. Lett. 67: 63-66.
- ZHANG, X. et J. WIEGEL. 1990a. Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1119-1127.
- ZHANG, X. et J. WIEGEL. 1990b. Isolation and partial characterization of a *Clostridium* species transforming para-hydroxybenzoate and 3,4-dihydroxybenzoate and producing phenols as the final transformation products. Microb. Ecol. 20: 103-121.
- ZHAO, H., D. YANG, C.R. WOESE et M.P. BRYANT. 1990. Assignment of *Clostridium bryantti* to *Syntrophosphora bryantti* gen. nov., com. nov., on the basis of a 16S rRNA sequence analysis of its crotonate-grown pure culture. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 40-44.
- ZIEGLER, K., R. BUDER, J. WINTER et G. FUCHS. 1989. Activation of aromatic acids and aerobic 2-aminobenzoate metabolism in a

denitrifying *Pseudomonas* strain. Arch. Microbiol. 151: 171-176.

ZINDER, S.H. 1984. Microbiology of anaerobic conversion of organic waste to methane: recent developments. American Society for Microbiology News. 50(7): 294-299.

ZINDER, S.H., S.C. CARDWELL, T. ANGUISH, M. LEE et M. KOCH. 1984. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotrix* sp. as an important aceticlastic methanogen. Appl. Environ. Microbiol. 47: 796-802.