Université du Québec
INRS–Institut Armand-Frappier–Microbiologie et Biotechnologie

ÉTUDE D'UNE SOUCHE BACTÉRIENNE ANAÉROBIE CAPABLE DE TRANSFORMER LE PHÉNOL ET L'ACIDE 4-HYDROXYBENZOÏQUE EN ACIDE BENZOÏQUE

Par

Marie-France Duckett

Mémoire présenté

pour l'obtention

du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Examinateur externe	Marc Lavoie Groupe de recherche en Écologie buccale, Université Laval
Examinateur interne	Rolf Morosoli Centre de Microbiologie et Biotechnologie, INRS-IAF
Directeur de recherche	Jean-Guy Bisaillon Centre de Microbiologie et Biotechnologie, INRS-IAF
Codirecteur de recherche	Pierre Juteau Centre de Microbiologie et Biotechnologie, INRS-IAF

© droits réservés de Marie-France Duckett, 2000

RÉSUMÉ

La souche 7 est une bactérie anaérobie stricte isolée originellement d'un consortium méthanogène par des méthodes non conventionnelles (gradient de Percoll, dilutions) étant donné qu'elle ne croissait pas sur milieu solide. Cette souche est capable de transformer le phénol et l'acide 4-hydroxybenzoïque. Ainsi, elle carboxyle le phénol en acide 4-hydroxybenzoïque puis déhydroxyle ce dernier en acide benzoïque (PHE → 4OHB → BZ). Cette activité de transformation ne peut toutefois être maintenue qu'en présence d'une autre bactérie (souche 6) ou d'un surnageant d'une culture de cette dernière. La souche 7 est également capable de décarboxyler l'acide 4-hydroxybenzoïque en phénol pour mener, par la suite, la transformation jusqu'à l'acide benzoïque (4-OHB → PHE → 4-OHB → BZ). Dans ce cas, elle peut être active seule. Par contre, la souche 7 maintenue en absence de la souche 6 demeure une souche à croissance faible et le maintien de son activité est difficile. L'objectif du présent projet était donc de caractériser cette souche ainsi que d'identifier ses besoins spécifiques de manière à optimiser sa croissance et son activité de transformation.

Il a d'abord été démontré que le maintien de l'activité au fil des repiquages était plus facile lorsque l'acide 4-hydroxybenzoïque était fourni initialement dans les cultures plutôt que le phénol. Toutefois, la variation de la concentration de cet acide n'a pas eu d'impact sur la densité de la population de la souche 7. Cultivée en milieu très riche, la souche n'a présenté aucune activité de transformation de l'acide 4-hydroxybenzoïque ou encore une activité ralentie par rapport aux conditions standards de culture (milieu Boyd modifié (BM)). Une importante stabilisation de la culture de la souche 7 ainsi qu'une stimulation de son activité ont été obtenues lors de l'ajout de 36% (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 ou de *Clostridium butyricum* au milieu BM. Il a été démontré que le (ou les) facteur favorable à la souche 7 et fourni par la souche 6 et par *Clostridium butyricum* est un facteur thermostable et qui résiste à l'oxygène. Également, il a été déterminé qu'il est de faible poids moléculaire (< 1000 Da). L'acide 3-phénylpropionique a été retrouvé et identifié par GC-SM dans le surnageant de *C. butyricum*. La

consommation de ce composé par la souche 7 a été démontrée mais ce dernier ne s'est pas avéré être, à lui seul, responsable de l'effet positif procuré par le surnageant. D'autres cultures de la souche 7 ont été faites en présence de coenzyme A ajouté au milieu. Ce dernier a engendré un effet positif mais seulement lorsque ajouté au milieu BM additionné de surnageants de cultures autoclavées de la souche 6 ou de *C. butyricum*. Ainsi, il n'est pas, lui non plus, le seul élément responsable de l'effet positif. L'ajout de sulfites, en faible concentration, a eu un effet stimulant pour la souche 7 alors qu'à plus forte concentration (5 mM), cette dernière a été complètement inhibée. Les résultats ont indiqué qu'une concentration de sulfites légèrement supérieure à celle trouvée dans le milieu BM standard pourrait être à l'origine de l'effet positif du surnageant de la culture autoclavée de la souche 6. L'ajout de sulfates n'a engendré, pour sa part, aucun effet.

Après plusieurs essais, des micro-colonies de la souche 7 ont été obtenues grâce à l'addition du surnageant de la culture autoclavée de la souche 6 au milieu BM semi-solide (0,3% (p/v) d'agar) contenu dans des tubes de culture allongés (Veillon) afin de bien conserver l'anaérobiose. Les bactéries constituant les colonies ont été observées par microscopie et se sont avérées être identiques à la forme de la souche 7 observée précédemment en culture liquide. La souche isolée en culture pure, nommée LR7.2, a été testée en culture liquide et elle a été capable de transformer le phénol en acide benzoïque. Par contre, elle ne montrait désormais aucune décarboxylation de l'acide 4-hydroxybenzoïque. Donc, la souche LR7.2 isolée en culture pure sur milieu semi-solide par une méthode conventionnelle présente une activité légèrement différente de l'activité de la souche 7 isolée en milieu liquide.

REMERCIEMENTS

Je désire remercier chaleureusement mon directeur de recherche, le docteur Jean-Guy Bisaillon, pour son aide, son appui, ses encouragements et ses excellents conseils.

Je remercie également mon codirecteur de recherche, le docteur Pierre Juteau, pour sa constante disponibilité et son écoute, son support, ses judicieux conseils et ses encouragements. Merci de m'avoir fait bénéficier de son excellente expertise dans tant de domaines, aussi variés soient-ils.

Un remerciement tout particulier à monsieur Louis Racine pour m'avoir fait bénéficier de ses nombreuses connaissances et de sa précieuse aide technique. Merci pour tous les bons conseils prodigués.

Merci à monsieur Jarek Letowski pour toute l'aide apportée.

Merci à tous les autres professeurs, techniciens et étudiants du groupe de microbiologie de l'environnement de l'INRS-IAF.

Finalement, je désire remercier mes parents et Frédéric pour leur support continuel ainsi que le Fonds FCAR pour son soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ii
REMERCIEMENTS iv
TABLE DES MATIÈRES v
LISTE DES FIGURES ix
LISTE DES TABLEAUX xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS xiii
INTRODUCTION 1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4
1.1 LES COMPOSÉS AROMATIQUES 4
1.1.1 Structure et importance dans l'environnement 4
1.1.2 Le phénol 5
1.1.2.1 Historique et propriétés physico-chimiques 5
1.1.2.2 Sources 6
1.2 BIODÉGRADATION DES COMPOSÉS AROMATIQUES EN CONDITIONS AÉROBIES 6
1.3 BIODÉGRADATION DES COMPOSÉS AROMATIQUES EN CONDITIONS ANAÉROBIES 7
1.3.1 Condition anaérobie 7
1.3.2 Stratégie générale de dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies 7
1.4 DIFFÉRENTS MÉTABOLISMES DANS LA DÉGRADATION ANAÉROBIE DES COMPOSÉS AROMATIQUES 12
1.4.1 Mécanismes biochimiques du métabolisme anaérobie 12
1.4.2 Photométabolisme 14
1.4.3 Réduction des nitrates 14
1.4.4 Réduction du fer 15
1.4.5 Réduction des sulfates 16
1.4.6 Fermentation méthanique 17
1.4.6.1 Généralités 17
1.4.6.2 Dynamique microbienne dans un consortium méthanogène 18
1.4.6.3 Exemples de transformations méthanogènes de composés aromatiques 20
1.4.7 Voies métaboliques mineures 21
1.5 DÉGRADATION DU PHÉNOL 21
1.5.1 Voie de phosphorylation 21
1.5.2 Voie de carboxylation directe 21
1.5.4 Différents microorganismes impliqués 25
1.5.5 Enzymes impliquées dans la transformation du phénol 34
1.5.6 Interrelations microbiennes 35
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES 37
2.1 PROVENANCE DE LA SOUCHE 7 37
2.2 AUTRES MICRO-ORGANISMES UTILISÉS 37
2.2.1 Coculture des souches 6 et 7 37
2.2.2 Souche 6 37
2.2.3 *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 38
2.2.4 *Enterococcus faecalis* 38
2.2.5 *Clostridium butyricum* M-55 38
2.3 CONDITIONS STANDARDS DE CULTURE 39
2.3.1 Milieu de culture liquide BM 39
2.3.2 Conditions de culture de la souche 7 40
2.3.3 Culture de la souche 6 et de la coculture 41
2.3.4 Culture de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 41
2.3.5 Culture d'*Enterococcus faecalis* et de *Clostridium butyricum* 41
2.4 CULTURE EN MILIEUX PROTÉIQUES RICHES 41
2.4.1 Milieu à base de viande hachée 41
2.4.2 Milieu à base de foie de boeuf 42

2.4.3 Milieu "Luria Broth" (LB) 43
2.4.4 Milieu "Brain Heart Infusion" (BHI) 43
2.5 CULTURE EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS SUPPLÉMENTS PROVENANT D'ENVIRONNEMENTS COMPLEXES 44
2.5.1 Lisier de porc 44
2.5.2 Liquide du rumen 45
2.5.3 Boue d'un digesteur anaérobie 45
2.5.4 Extrait de terre 45
2.6 CULTURE DE LA SOUCHE 7 EN PRÉSENCE DE LA SOUCHE 6 VIVANTE OU MORTE OU DANS UN SURNAGEANT DE CULTURE DE LA SOUCHE 6 46
2.6.1 Reconstitution de la coculture des souches 6 et 7 46
2.6.2 Préparation du surnageant d'une culture de la souche 6 46
2.6.3 Utilisation de la culture autoclavée de la souche 6 47
2.6.3.1 Culture complète 47
2.6.3.2 Surnageant ou culot de la culture 48
2.7 CULTURE AVEC DES SURNAGEANTS DE CULTURES AUTOCLAVÉES DE DIFFÉRENTES SOUCHES BACTÉRIENNES 48
2.8 AUTRES CONDITIONS DE CULTURE 49
2.8.1 Sources de carbone 49
2.8.2 Température d'incubation 49
2.8.3 Augmentation de la concentration du fer et des minéraux en trace 49
2.8.4 Variation de la concentration de l'acide 4-hydroxybenzoïque 50
2.8.5 Ajout de coenzyme A dans les milieux de culture 50
2.8.6 Ajout de sulfites et de sulfates aux milieux de culture 51
2.9 SENSIBILITÉ À L'OXYGÈNE DU SURNAGEANT D'UNE CULTURE AUTOCLAVÉE DE LA SOUCHE 6 51
2.9.1 Oxygénation du surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 51
2.9.2 Témoin de traitement 52
2.10. EXTRACTIONS DE SURNAGEANTS DE CULTURES AUTOCLAVÉES DE LA SOUCHE 6 OU DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* 52
2.10.1 Extraction du surnageant 52
2.10.2 Milieux de culture 53
2.10.3 Autres essais d'extraction 54
2.11 FRACTIONNEMENT DU SURNAGEANT D'UNE CULTURE AUTOCLAVÉE DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* 54
2.11.1 Préparation de la membrane 54
2.11.2 Préparation des fractions 55
2.11.3 Milieux de culture 55
2.12 ESSAIS RELIÉS À LA VOIE MÉTABOLIQUE MINEURE DE TRANSFORMATION DU PHÉNOL EN PHÉNYLALANINE 55
2.13 MICRO-COLONIES DE LA SOUCHE 7 EN MILIEU SEMI-SOLIDE 0,3 % (P/V) D'AGAR 56
2.13.1 Préparation des milieux semi-solides 56
2.13.2 Repiquage des micro-colonies 57
2.14 MÉTHODES ANALYTIQUES 58
2.14.1 Évaluation de la concentration des composés aromatiques 58
2.14.1.1 Extractions 58
2.14.1.2 Analyses 58
2.14.1.3 Détermination de la concentration 59
2.14.2 Identification du composé inconnu par spectrométrie de masse 59
2.14.3 Dosage des sulfites SO_3^{2-} 60
2.14.4 Dénombrement bactérien en milieu liquide 60
2.14.5 Observations en microscopie électronique 60
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS 62
3.1 MISE EN SITUATION 62
3.2 IMPLICATION DE L'ACIDE 4-HYDROXYBENZOÏQUE 63
3.2.1 Remplacement du phénol par l'acide 4-hydroxybenzoïque 63

3.2.2 Variation de la concentration de l'acide 4-hydroxybenzoïque 65
3.3 TEMPÉRATURE OPTIMALE D'INCUBATION 65
3.4 CULTURES EN MILIEUX PROTÉIQUES RICHES 65
3.5 AJOUT DE SUPPLÉMENTS D'ENVIRONNEMENTS COMPLEXES 69
3.6 RELATION ENTRE LA SOUCHE 6 ET LA SOUCHE 7 69
3.6.1 Reconstitution de la coculture des souches 6 et 7 69
3.6.2 Ajout de surnageant d'une culture de la souche 6 72
3.6.3 Culture de la souche 7 avec le surnageant ou le culot d'une culture autoclavée de la souche 6.72
3.7 SENSIBILITÉ À L'OXYGÈNE DU SURNAGEANT D'UNE CULTURE AUTOCLAVÉE DE LA SOUCHE 6 72
3.8 CULTURE AVEC DES SURNAGEANTS DE CULTURES AUTOCLAVÉES DE DIFFÉRENTES SOUCHES BACTÉRIENNES 75
3.9 COMPOSÉ INCONNU RETROUVÉ DANS LE SURNAGEANT D'UNE CULTURE AUTOCLAVÉE DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* 78
3.9.1 Consommation au fil du temps par la souche 7 78
3.9.2 Identification du composé inconnu 78
3.10 ESSAIS RELIÉS À LA VOIE DE SYNTHÈSE DE LA PHÉNYLALANINE 81
3.11 AUTRES CONDITIONS DE CULTURE 81
3.11.1 Ajout de coenzyme A dans les milieux de culture 81
3.11.2 Modification de la source de carbone 81
3.11.3 Ajout de sulfites et de sulfates aux milieux de culture 84
3.11.3.1 Essais en milieu BM avec 0,5 % (p/v) d'extrait de levure 84
3.11.3.2 Essais en milieu constitué de 36% (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 et de milieu BM 84
3.11.3.3 Dosage des sulfites dans le surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 et dans le milieu BM 87
3.12 EXTRACTIONS DE SURNAGEANTS DE CULTURES AUTOCLAVÉES DE LA SOUCHE 6 OU DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* 87
3.13 FRACTIONNEMENT DU SURNAGEANT D'UNE CULTURE AUTOCLAVÉE DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* 89
3.14 OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DE LA SOUCHE 7 89
3.15 OBTENTION DE MICRO-COLONIES DE LA SOUCHE 7 EN MILIEU SEMI-SOLIDE 93
3.15.1 Observations par microscopie des bactéries constituant les micro-colonies et suivi de leur activité 93
CHAPITRE 4 : DISCUSSION 97
4.1 UTILISATION DE L'ACIDE 4-HYDROXYBENZOÏQUE VERSUS L'UTILISATION DU PHÉNOL DANS LES CULTURES DE LA SOUCHE 7 97
4.2 CROISSANCE DE LA SOUCHE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX 98
4.2.1 Température optimale d'incubation de la souche 7 98
4.2.2 Milieux protéiques riches 99
4.2.3 Milieux avec suppléments d'environnements complexes 99
4.2.4 Effet de différentes souches bactériennes 100
4.2.4.1 Relation entre la souche 6 et la souche 7 100
4.2.4.2 Relation avec des souches autres que la souche 6 102
4.3 NATURE DU OU DES FACTEURS FAVORABLES À LA SOUCHE 7 103
4.3.1 Sensibilité à l'oxygène du surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 103
4.3.2 Cultures avec des composés reliés à la voie de synthèse de la phénylalanine 104
4.3.3 Cultures avec le coenzyme A 105
4.3.4 Cultures avec l'ajout de sulfites ou de sulfates 105
4.3.5 Fractionnement des surnageants de culture 108
4.3.5.1 Extractions de surnageants de cultures autoclavées de la souche 6 ou de *Clostridium butyricum* 108
4.3.5.2 Séparation à l'aide de la cellule Amicon sur la base du poids moléculaire 108
4.4 OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DE LA SOUCHE 7 109
4.5 ISOLEMENT EN MILIEU SEMI-SOLIDE 109
CONCLUSION 111

LISTE DE RÉFÉRENCES 114

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Structure chimique du phénol..... **5**

FIGURE 2 : Intermédiaires centraux de la dégradation aérobie des composés aromatiques **8**

FIGURE 3 : Intermédiaire centraux de la dégradation anaérobie des composés aromatiques **10**

FIGURE 4 : Stratégie générale de biodégradation des composés aromatiques en anaérobiose..... **11**

FIGURE 5 : Différents groupes microbiens impliqués dans la dégradation de molécules organiques complexes par fermentation méthanique..... **19**

FIGURE 6 : Voie métabolique de dégradation du phénol via une phosphorylation..... **22**

FIGURE 7 : Voie métabolique de transformation du phénol en acide benzoïque via une carboxylation directe sans phosphorylation et avec implication du coenzyme A..... **24**

FIGURE 8 : Dégradation du phénol par la voie métabolique réductrice..... **26**

FIGURE 9 : Dégradation du phénol par *Clostridium hydroxybenzoicum*, par la souche GS-15 et par la souche 7..... **28**

FIGURE 10 : Intermédiaires potentiels lors de la minéralisation du phénol par la voie métabolique impliquant la carboxylation chez le consortium méthanogène de Beaudet *et al*..... **31**

FIGURE 11 : Transformation du phénol et de l'acide 4-hydroxybenzoïque..... **64**

FIGURE 12 : Effet de la variation de la concentration de l'acide 4-hydroxybenzoïque...**66**

FIGURE 13 : Température optimale d'incubation de la souche 7.....**67**

FIGURE 14 : Culture de la souche 7 en milieux riches à base de viande.....**68**

FIGURE 15 : Culture de la souche 7 en présence de suppléments.....**70**

FIGURE 16 : Effet de la variation de l'inoculum de la souche 7 au sein de la coculture avec la souche 6.....**71**

FIGURE 17 : Culture de la souche 7 en présence de surnageant d'une culture de la souche 6.....**73**

FIGURE 18 : Effet du culot ou du surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 ajouté dans le milieu de culture de la souche 7.....**74**

FIGURE 19 : Effet de l'oxygénation du surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6.....**76**

FIGURE 20 : Essais avec des surnageants de cultures autoclavées de différentes souches bactériennes anaérobies.....**77**

FIGURE 21 : Utilisation par la souche 7 d'un composé inconnu retrouvé dans le surnageant de la culture autoclavée de *Clostridium butyricum*.....**79**

FIGURE 22 : Spectres de masse du dérivé triméthylsilyl d'un composé inconnu retrouvé dans le surnageant de la culture autoclavée de *Clostridium butyricum* et du dérivé triméthylsilyl de l'acide 3-phénylpropionique pur.....**80**

FIGURE 23 : Effet de l'ajout au milieu BM de différents composés reliés à la voie de synthèse de la phénylalanine....**81**

FIGURE 24 : Effet de l'ajout de coenzyme A dans les milieux de culture....**83**

FIGURE 25 : Effet de l'ajout de sulfites au milieu de culture BM....**85**

FIGURE 26 : Effet de l'ajout de sulfites aux milieux constitués avec 36% (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6....**86**

FIGURE 27 : Extractions de surnageants de cultures autoclavées des souches 6 et *Clostridium butyricum*....**88**

FIGURE 28 : Essais avec des fractions du surnageant d'une culture autoclavée de *Clostridium butyricum*....**90**

FIGURE 29 : Observation de la souche 7 en microscopie électronique....**91**

FIGURE 30 : Observation de la souche 7 en microscopie électronique....**92**

FIGURE 31 : Micro-colonies de la souche 7 en milieu semi-solide....**94**

FIGURE 32 : Suivi de l'activité d'une micro-colonie remise en culture en milieu liquide contenant l'acide 4-hydroxybenzoïque au départ....**95**

FIGURE 33 : Suivi de l'activité d'une micro-colonie remise en culture en milieu liquide contenant du phénol au départ....**96**

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Hiérarchie de la succession des principaux régimes d'accepteurs d'électrons dans les habitats naturels, selon l'ordre de leur efficacité énergétique.....**13**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACIDE 4-OHB: Acide 4-hydroxybenzoïque

APP: Acide phénylpropionique

ATP: Adénosisne triphosphate

BESA: Acide 2-bromoéthano-sulfonique

BHI: Brain heart infusion

BM: Boyd modifié

BSR: Bactéries sulfatoréductrices

BSTFA: N,O-bis (triméthylsilyl)-trifluoroacélanide

CB: *Clostridium butyricum*

CG: Chromatographie en phase gazeuse

CG/SM: Chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse

CI: Composé inconnu

CoA: Coenzyme A

Da: Daltons

EDTA: Acide éthylènediaminetétraacétique

EPA: Environmental protection agency

FID: Détecteur à ionisation par flamme

INF.: Inférieure

LB: Luria broth

PA: Phase aqueuse

STD. INT.: Standard interne

SUP: Supérieure

SURN.: Surnageant

SURN C.B: Surnageant d'une culture autoclavée de *Clostridium butyricum*

SURN. S6: Surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6

S6: Souche 6

S6 autoclavée: Culture de la souche 6 autoclavée après incubation

S7: Souche 7

INTRODUCTION

Un grand nombre de composés polluants, aussi bien xénobiotiques que naturels, sont présents dans l'environnement. Ils se retrouvent au niveau du sol, de l'eau et de l'air. Cette situation est en bonne partie due à l'activité humaine et industrielle. Parmi les différents polluants, le phénol occupe une place importante en tant que composé toxique et dangereux et son émission dans l'environnement est légiférée. Il est un des composés organiques le plus utilisé à travers le monde (Londry et Fedorak, 1992) et est un intermédiaire de dégradation important puisqu'il constitue la structure de base de plusieurs composés naturels et synthétiques.

Les problèmes de pollution incitent à contrôler les émissions de même qu'à détruire les polluants déjà présents dans la nature. Les technologies physiques et chimiques utilisées pour se débarasser des polluants sont très coûteuses. De plus, souvent ces approches ne détruisent pas les contaminants mais plutôt les concentrent et les isolent de l'environnement. Depuis plusieurs années, un intérêt accru a été accordé aux traitements biologiques qui utilisent les microorganismes comme ouvrier principal pour la dépollution. Ce type de procédé est une solution très avantageuse et efficace qui peut même être moins coûteuse dans certains cas. De plus, lorsqu'un composé organique est biodisponible et biodégradable, ce dernier est complètement minéralisé et ainsi complètement éliminé de l'environnement. Parmi les procédés biologiques disponibles, ceux utilisant des microorganismes anaérobies offrent un potentiel avantageux. Il a été clairement démontré qu'une très vaste gamme de composés peuvent être entièrement dégradés par des bactéries en absence complète d'oxygène. Aussi, plusieurs des environnements pollués présentent déjà des conditions anaérobies.

Bien que plus complexes au niveau microbiologique, les traitements anaérobies possèdent des avantages économiques non négligeables en comparaison avec les procédés aérobies. En effet, la quantité de boues (biomasse) produite est moindre et la demande énergétique est plus faible, l'oxygénation n'étant pas nécessaire. Le méthane

produit, lors de certains traitements, peut être récupéré et représente un combustible à haute valeur énergétique.

Par rapport aux mécanismes microbiens impliqués dans la dégradation des composés aromatiques en aérobie, les mécanismes microbiens en conditions anaérobies sont moins connus. Les microorganismes sont généralement plus spécialisés en anaérobiose et agissent fréquemment en regroupements complexes. La faible connaissance des exigences physiologiques et l'étroite interdépendance des espèces impliquées expliquent les difficultés rencontrées par les chercheurs à isoler des souches pures et à les étudier. Toutefois, l'étude des différents intervenants impliqués dans les bioprocédés en anaérobiose est essentielle afin de permettre l'optimisation des biotraitements de même qu'un meilleur suivi tout au long des traitements. De façon plus fondamentale, il est essentiel de s'attarder à la diversité microbienne et de caractériser les différents microorganismes dans une optique de compréhension globale de notre environnement, notre biosphère.

La biodégradation du phénol sous des conditions anaérobies a été souvent observée. Notamment, la dégradation en conditions méthaniques a été grandement étudiée. Toutefois, dans ce dernier cas, les mécanismes sont encore mal compris. La minéralisation du phénol en conditions méthaniques est effectuée par des regroupements de bactéries interdépendantes appelés consortia. Ainsi, chacun des organismes assure une partie de la dégradation. L'organisme responsable de la première étape, c'est-à-dire la carboxylation du phénol, n'a pas encore été isolé. Une exception possible est *Clostridium hydroxybenzoicum*, isolé à partir de sédiments d'un lac d'eau douce. Cette bactérie exerce une légère activité de carboxylation du phénol en conditions de laboratoire (dose massive de phénol et de CO_2) et pourrait être responsable de cette première étape. Cependant, la preuve en conditions réelles n'a jamais été faite.

Li *et al.* (1996) ont revendiqué l'isolement d'une souche pure, la souche 6, capable de transformer le phénol en acide benzoïque sous des conditions anaérobies. Cette dernière a été isolée à partir d'un consortium dégradant le phénol en conditions méthaniques

(Beaudet et al., 1986). Toutefois, il a été démontré que cette culture n'était pas pure. En effet, il s'agissait d'une coculture. Cette coculture débarassée de la souche 6 a permis de mettre en évidence une autre souche, la souche 7, qui est une bactérie Gram + anaérobie stricte. Elle a été isolée en milieu liquide par des méthodes non conventionnelles (gradient de Percoll, dilutions) étant donné qu'elle ne croissait pas sur milieu solide. Letowski (2000) a montré que c'est elle, et non la souche 6, qui est responsable de la carboxylation du phénol. La souche 7 est donc capable de carboxyler le phénol et de déhydroxyler ce dernier en acide benzoïque (PHE → 4OHB → BZ). Cette dernière est aussi capable de décarboxyler l'acide 4-hydroxybenzoïque en phénol puis de le transformer en acide benzoïque (4OHB → PHE → 4-OHB → BZ). Toutefois, la souche 7 cultivée en absence de la souche 6 est un système instable à moyen terme et difficile à contrôler. La croissance de la souche 7 est très faible ce qui est un facteur limitant pour les différentes étapes nécessaires à la caractérisation de cette souche et l'activité de transformation du phénol est imprévisible.

L'étude de la souche 7 représente un intérêt en soi puisqu'elle serait la première souche métaboliquement active capable de carboxyler le phénol en acide benzoïque qui aurait été isolée d'un consortium méthanogène. De plus, selon la caractérisation initiale, cette souche appartiendrait à une nouvelle espèce bactérienne et fort probablement à un nouveau genre. L'objectif du présent projet était donc de caractériser la souche 7 et d'identifier ses besoins spécifiques de manière à optimiser sa croissance et son activité de transformation.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 LES COMPOSÉS AROMATIQUES

1.1.1 Structure et importance dans l'environnement

Les composés aromatiques sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques. La nature aromatique de ces composés leur confère une très grande stabilité chimique (Elder et Kelly, 1994; Evans, 1977). Dans la biosphère, les composés aromatiques sont fréquemment rencontrés comme constituants de la lignine, des tanins végétaux ou encore des acides aminés (Villemur, 1995). La lignine, polymère de haut poids moléculaire, constitue environ 20 à 30 % du poids sec des végétaux et représente, après la cellulose, la source de carbone naturelle la plus abondante dans la biosphère (Colberg et Young, 1982; Sleat et Robinson, 1984). Un nombre restreint d'organismes est capable de dégrader ce polymère. Les champignons filamenteux représentent les principaux dégradeurs de ce composé et leur action a pour effet net de relâcher dans l'environnement une multitude de composés monoaromatiques (Orth, Denny et Tien, 1991).

Les activités humaines sont responsables du rejet de quantités sans cesse croissantes de composés aromatiques xénobiotiques dans l'environnement (Elder et Kelly, 1994). Ces derniers proviennent de différentes activités agricoles (pesticides, insecticides, herbicides), industrielles (solvants, détergents, agents de préservation du bois, huiles, plastiques) et domestiques (eaux usées). Plusieurs de ces xénobiotiques sont produits en grandes quantités et peuvent être néfastes à la santé dû à leur toxicité, à leur persistence et à leur accumulation dans les sédiments (Villemur, 1995). Certains sont considérés comme des agents potentiellement mutagènes, tératogènes et carcinogènes (Cerniglia, 1984; Horowitz et al., 1982). Les composés phénolés, les hydrocarbures aromatiques

polycliques (HAP) ou encore les biphényles polychlorés (BPC) sont quelques exemples de composés aromatiques qui causent des problèmes de pollution et qui, pour cette raison, sont considérés comme polluants prioritaires légiférés (EPA, 1998).

1.1.2 Le phénol

1.1.2.1 Historique et propriétés physico-chimiques

Le phénol est un composé aromatique (Fig. 1). Il est le plus simple constituant de la famille des composés phénolés et a été découvert en 1834 dans le goudron de houille. Sa composition chimique ainsi que son poids moléculaire de 94,11 g/mol ont été trouvés par le chimiste français Auguste Laurent en 1842. Il se présente sous la forme d'un solide cristallin blanc dont le point de fusion est 43°C. Il est soluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques (Babich et Davis, 1981; Montizaan, 1994). L'exposition humaine au phénol par les voies cutanée, buccale ou intraveineuse engendre des effets indésirables très divers, tout dépendant de la concentration et du mode d'exposition. Les effets observés peuvent aller de sévères irritations, brulûres, inflammations, nausées et vomissements à des dommages cardio-vasculaires, neurotoxiques, au foie ou aux reins (Montizaan, 1994). Le phénol, en tant que membre de la famille des polluants phénolés, est un composé hautement légiféré soumis à des normes environnementales très strictes (EPA, 1998).

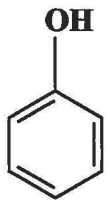


Figure 1: Structure chimique du phénol.

1.1.2.2 Sources

Le phénol est un constituant du goudron de houille et se forme au cours de la décomposition naturelle de substances organiques (Davi et Gnudi, 1999). Plusieurs milliers de composés phénolés provenant des plantes ont été décrits (Londry et Fedorak, 1992). Toutefois, la majeure partie du phénol présent dans l'environnement provient de l'activité humaine. Il est parmi les 50 composés chimiques les plus produits aux États-Unis et est considéré comme un des plus importants contaminants des eaux souterraines (Lack et al., 1991; Young et Rivera, 1985). Il est utilisé, par exemple, dans la fabrication d'antioxydants, de résines synthétiques pour les matériaux de construction et de développeurs de photos (Zhou et Fang, 1997). Les effluents des usines de raffinage du pétrole, de traitement et combustion du charbon, de pâtes et papiers et de l'industrie métallurgique contiennent également des quantités considérables de phénol (Londry et Fedorak, 1992; Van Schie et Young, 1998; Yap, Lee et Poh, 1999). En agriculture, les composés phénolés sont utilisés dans les herbicides et les insecticides (Davi et Gnudi, 1999). Finalement, d'autres sources potentielles sont la fumée de cigarette, les gaz d'échappement, la combustion du bois, le purin et la photo-dégradation atmosphérique du benzène (Montizaan, 1994). Le phénol est considéré comme un composé carrefour puisqu'il est un important intermédiaire dans la dégradation de plusieurs composés aromatiques simples ou complexes tel le pentachlorophénol en conditions anaérobies (Van Schie et Young, 1998; Zhang et Wiegel, 1994).

1.2 BIODÉGRADATION DES COMPOSÉS AROMATIQUES EN CONDITIONS AÉROBIES

Étant donné la grande disponibilité de l'oxygène dans l'atmosphère et dans la biosphère mais surtout pour des raisons énergétiques, la dégradation microbienne des composés aromatiques est principalement effectuée en conditions aérobies (Schink et Muller, 2000). Dans ces conditions, la dégradation est initiée par la déstabilisation du cycle aromatique suite à l'incorporation de l'oxygène directement dans la molécule attaquée (Allende et al., 2000). Cette incorporation de l'oxygène, suivie par la fission du cycle, est assurée par les

enzymes mono- et dioxygénases. L'action de ces enzymes réduit la diversité des composés aromatiques simples à quelques intermédiaires centraux, les plus importants étant le catéchol, le protocatéchuate et le gentisate (Fuchs et al, 1994; Schink et Muller, 2000; Young et Rivera, 1985) (Fig. 2). Plusieurs espèces de *Pseudomonas* sont capables de dégrader les composés aromatiques dans ces conditions .

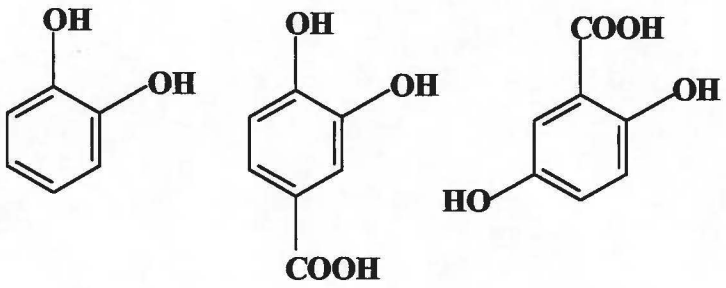
1.3 BIODÉGRADATION DES COMPOSÉS AROMATIQUES EN CONDITIONS ANAÉROBIES

1.3.1 Condition anaérobie

Une condition anaérobie est créée lorsque le taux de consommation de l'oxygène excède le taux d'entrée de ce dernier dans un environnement donné (Londry et Fedorak, 1992). Cette condition est retrouvée dans plusieurs environnements naturels comme par exemple dans les sédiments marins ou d'eau douce, les sols inondés, les sites d'enfouissement, ou les lagunes (Berry, Francis et Bollag, 1987; Evans et Fuchs, 1988). Dans de tels habitats, les microorganismes doivent employer des mécanismes différents de ceux décrits à la section 1.2 pour dégrader les composés aromatiques puisque l'oxygène n'est pas disponible. De façon générale, la spécialisation métabolique chez les microorganismes anaérobies est plus grande que chez les microorganismes aérobies. Également, la biodégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies est généralement plus lente en comparaison à la biodégradation en conditions aérobies (Zinder, 1984).

1.3.2 Stratégie générale de dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies

En anaérobiose, les bactéries sont capables de métaboliser une diversité impressionnante de composés aromatiques. Par souci d'économie d'énergie, les bactéries ont développé une stratégie permettant d'utiliser un grand nombre de composés sans avoir à produire une très grande diversité d'enzymes (Fuchs et al., 1994). Cette stratégie vise à diminuer



a) b) c)

Figure 2 : Intermédiaires centraux de la dégradation aérobie des composés aromatiques. (a) Catéchol, (b) Protocatéchuate et (c) Gentisate.

la diversité moléculaire par la canalisation ("chanelling") vers un nombre réduit de composés intermédiaires centraux. Les intermédaires centraux les plus retrouvés jusqu'à ce jour sont le benzoyl-CoA, le résorcinol et le phloroglucinol (Fig. 3) mais il est possible que d'autres composés puissent jouer ce rôle et que d'autres voies métaboliques existent (Koch et al., 1993). Il est à noter que la plupart des travaux portant sur l'élucidation des modèles métaboliques en anaérobiose ont été faits sur des bactéries qui réduisent le nitrate et des bactéries phototrophes, ces dernières étant plus faciles à maintenir et ayant des conditions de croissance moins exigeantes que les bactéries sulfatoréductrices ou méthanogènes (Fuchs et al., 1994).

La biodégradation avec la stratégie de "canalisation" moléculaire peut-être divisée en trois phases: la phase d'activation et de diminution de la diversité moléculaire, la phase de réduction et finalement la phase d'hydrolyse (Fig. 4).

En premier lieu, les molécules aromatiques inertes doivent être activées pour déstabiliser le noyau aromatique et faciliter sa transformation subséquente. Les réactions caractéristiques de cette activation sont la formation de CoA thioesters, la carboxylation et l'hydroxylation. Par la suite, la diminution de la diversité moléculaire vers les intermédiaires centraux peut être obtenue par différents mécanismes tels que la déshydroxylation réductrice ou encore la transhydroxylation, ces derniers étant couramment retrouvés. Les intermédiaires centraux subissent utlérieurement l'attaque des enzymes réductases et les composés alicycliques qui en résultent sont à leur tour oxydés par des β-oxydations et clivés hydrolytiquement. Finalement, les composés aliphatiques sont transformés en métabolites centraux tels que l'acétyle-CoA (Fuchs et al., 1994).

Récemment, une toute nouvelle voie métabolique a été découverte. En effet, cette voie a été élucidée lors de la dégradation de certains composés phénoliques et de certains acides benzoïques hydroxylés par des bactéries qui réduisent les nitrates. Dans cette voie, l'hydroxyhydroquinone joue le rôle de l'intermédiaire central (Philipp et Schink, 2000; Schink et Muller, 2000).

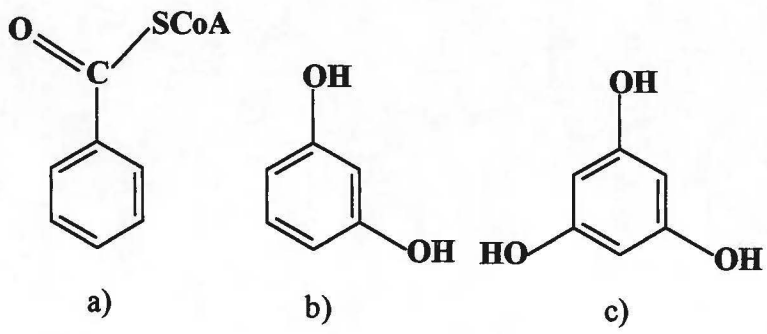


Figure 3: Intermédiaires centraux de la dégradation anaérobie des composés aromatiques. (a) Benzoyl-CoA, (b) Résorcinol, (c) Phloroglucinol

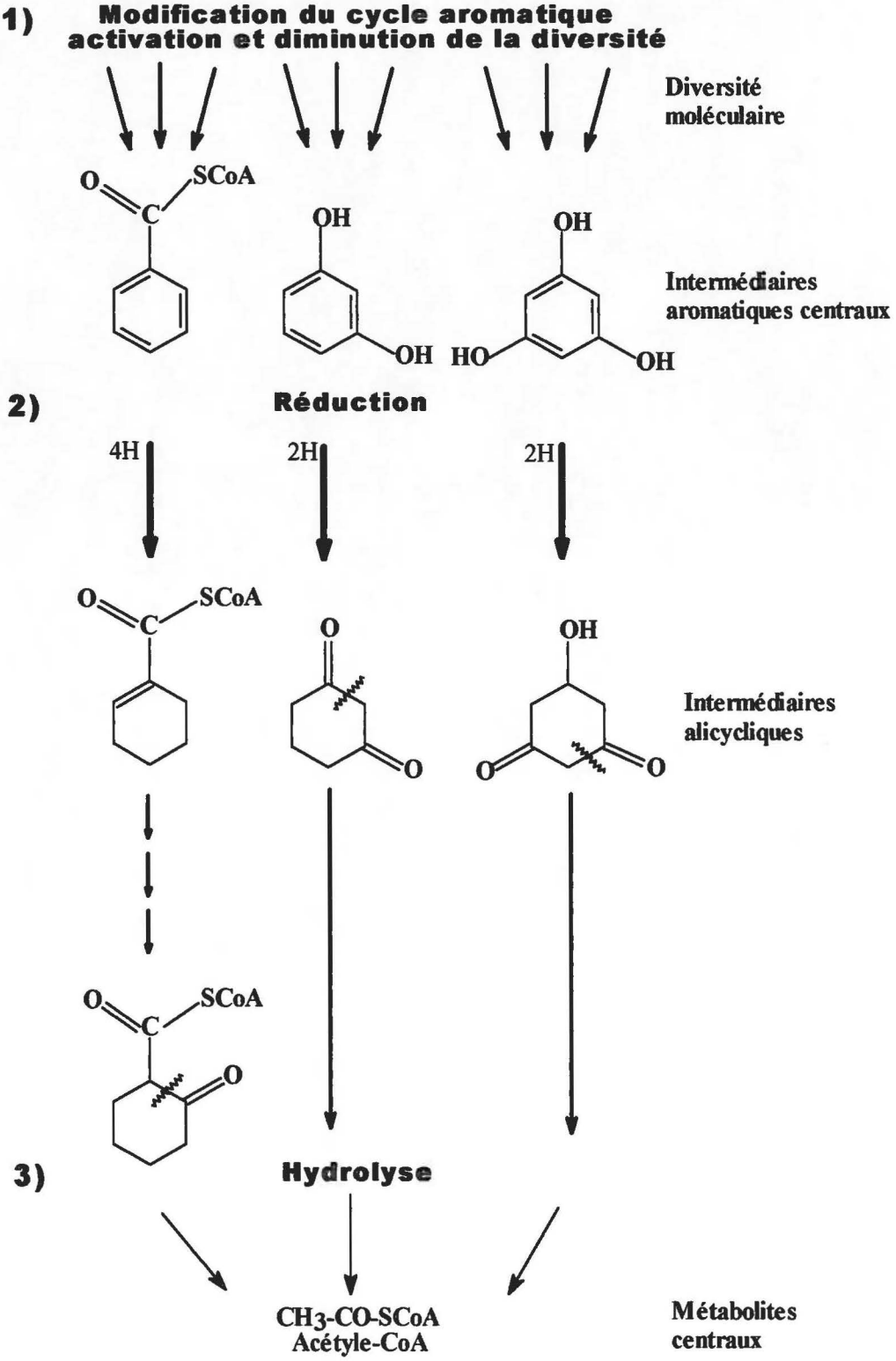


Figure 4 : Stratégie générale de biodégradation des composés aromatiques en anaérobiose (modifiée d'après Fuchs et al., 1994)

1.4 DIFFÉRENTS MÉTABOLISMES DANS LA DÉGRADATION ANAÉROBIE DES COMPOSÉS AROMATIQUES

1.4.1 Mécanismes biochimiques du métabolisme anaérobie

Dans le métabolisme anaérobie, la dégradation des composés aromatiques peut-être décrite comme le couplage de réactions de déshydrogénation et de réductions d'accepteurs externes d'électrons (Sleat et Robinson, 1984). La disponibilité des accepteurs d'électrons dans un environnement donné joue donc un rôle primordial dans l'établissement, la diversité et la succession des communautés microbiennes (Tableau 1). Ainsi, la stratégie de dégradation adoptée dépend grandement de la situation énergétique du ou des organismes impliqués et du potentiel d'oxydo-réduction des accepteurs d'électrons qui peuvent être utilisés dans un endroit donné (Kuhn et al., 1989; Schink et Muller, 2000). Les milieux marins présentent une concentration importante de sulfates alors que les composés azotés et les ions métalliques tels que le Fe(III) et le Mn(IV) sont présents en plus grande quantité dans le sol et dans l'eau douce. Toutefois, dans la majorité des habitats terrestres anaérobies, la concentration des accepteurs externes d'électrons est insuffisante pour les communautés bactériennes. Dans cette situation, les bactéries utilisent la fermentation (Fuchs et al., 1994; Zehnder, Ingvorsen et Marti, 1981). Lors de ce processus, la présence d'accepteurs externes d'électrons n'est pas nécessaire. Les composés organiques jouent à la fois le rôle de donneurs et d'accepteurs d'électrons (Elder et Kelly, 1994). En effet, l'accepteur d'électrons est généré à partir de la molécule organique qui est dégradée et l'énergie est obtenue par la phosphorylation au niveau du substrat (Berry, Francis et Bollag, 1987; Evans, 1977).

Différentes stratégies microbiennes de dégradation des composés aromatiques existent et les principales sont le photométabolisme, la réduction des nitrates, la réduction du fer, la réduction des sulfates et la fermentation méthanique (Berry, Francis et Bollag, 1987; Elder et Kelly, 1994; Evans, 1977; Evans et Fuchs, 1988; Londry et Fedorak, 1992; Schink, 1997; Schink et Muller, 2000; Sleat et Robinson, 1984).

Tableau 1: Hiérarchie de la succession des principaux régimes d'accepteurs d'électrons dans les habitats naturels, selon l'ordre de leur efficacité énergétique (modifié d'après Berry, Francis et Bollag, 1987; Brock et Madigan, 1991; Lovley, 1991)

Métabolisme	Réaction [a]	Potentiel rédox (mV)
Respiration aérobie	MO [b] $+ O_2 \Rightarrow H_2O + CO_2$	700-500
Réduction du fer	$MO + Fe\ (III) \Rightarrow Fe\ (II) + CO_2$	⇓
Réduction des nitrates	$MO + NO_3^- \Rightarrow NH_4^+ + CO_2$	⇓
Réduction du manganèse	$MO + Mn\ (IV) \Rightarrow Mn(II) + CO_2$	⇓
Dénitrification	$MO + NO_3^- \Rightarrow N_2 + CO_2$	⇓
Fermentation	$MO \Rightarrow$ acides organiques[c]	⇓
Réduction des sulfates	$MO + SO_4^{2-} \Rightarrow HS^- + CO_2$	⇓
Acétogenèse	AG[d] $+ H^+$ ou $CO_2 \Rightarrow H_2 +$ acétate	⇓
Méthanogenèse	$MO \Rightarrow CH_4 + CO_2$	< - 200

[a] donneurs d'électrons + accepteurs d'électrons
[b] MO = matière organique
[c] principalement les acides propionique, butyrique et acétique
[d] AG = acide gras

1.4.2 Photométabolisme

Les bactéries phototrophes forment un groupe de microorganismes qui est bien répandu dans l'environnement anaérobie exposé à la lumière, par exemple dans les milieux aquatiques, et qui est métaboliquement polyvalent. En effet, plusieurs espèces de bactéries dans ce groupe sont capables de dégrader une grande variété de composés aromatiques simples et d'utiliser ces derniers comme seule source de carbone. La présence de lumière est essentielle pour ces transformations et fournit l'énergie nécessaire pour la croissance (Khanna, Rajkumar et Jothikumar, 1992).

Les études les plus détaillées dans ce domaine ont été faites sur le métabolisme de l'acide benzoïque par *Rhodopseudomonas palustris*. Ces études ont démontré que la dégradation de l'acide benzoïque par le photométabolisme s'effectue par une voie réductrice dans laquelle le composé aromatique est d'abord activé en coenzyme A (CoA) thioester après quoi le cycle est réduit. Des réactions de β-oxidations subséquentes conduisent ultimement à l'ouverture du cycle (Dutton et Evans, 1969; Elder et Kelly, 1994; Merkel et al., 1989). *R. palustris* utilise également, toujours en anaérobiose et en présence de lumière, l'acide 4-hydroxybenzoïque comme source de carbone. L'implication du 4-hydroxybenzoyl-CoA comme premier intermédaire de dégradation dans cette voie métabolique a été démontrée (Merkel et al., 1989).

1.4.3 Réduction des nitrates

Le nitrate peut remplacer l'oxygène dans le processus de dégradation des composés aromatiques. Plusieurs bactéries capablent de réduire le nitrate ont été trouvées dans des environnements tels le sol, les boues activées ou encore les sédiments. La majorité sont des bactéries anaérobies facultatives (Elder et Kelly, 1994; Sleat et Robinson, 1984). Par exemple, la bactérie *Achromobacter xylosoxidans* sous-espèce *denitrificans* (initialement *Pseudomonas* PN-1) peut croître anaérobiquement sur l'acide benzoïque avec la présence obligatoire de nitrates comme accepteurs d'électrons (Evans et Fuchs, 1988). *Thauera aromatica* K172 peut utiliser comme seule source de carbone une variété de quatorze

composés aromatiques incluant l'acide benzoïque, l'acide 3- et 4-hydroxybenzoïque, le phénol, le toluène ou encore le *p*-crésol qui peuvent être complètement dégradés jusqu'au CO_2 (Fuchs et al., 1994). Fries *et al.* (1994) ont obtenu, suite à des enrichissements, huit isolats différents capablent de dégrader le toluène en conditions dénitrifiantes. La caractérisation initiale de ces derniers semblait indiquer que tous ces isolats appartenaient au genre *Azoarcus*. Trois nouvelles souches bactériennes, différentes les unes des autres du point de vue de leurs propriétés métaboliques et physiologiques mais toutes fortement apparentées au genre *Azoarcus* selon le profil de leurs acides gras, ont été récemment isolées. Il s'agit de souches qui sont capables d'utiliser le phénol comme source de carbone et d'énergie en conditions dénitrifiantes (Van Schie et Young, 1998). Une autre souche, désignée CC-26, a été isolée et est capable de croître sur le phénol, l'acide benzoïque et certains autres composés aromatiques en conditions anaérobies et dénitrifiantes. Elle est apparentée au genre *Magnetospirillum*, un membre de la sous-classe α des *Protobacteriaceae*. Il s'agit ainsi de la première souche capable de dégrader les composés aromatiques en conditions dénitrifiantes qui appartient à ce groupe (Shinoda et al., 2000).

1.4.4 Réduction du fer

Les bactéries qui réduisent le fer obtiennent leur énergie suite à l'oxydation complète des composés aromatiques en CO_2 avec le Fe(III) comme accepteur terminal d'électrons. Durant ce procédé, le Fe(II) est relâché. Ces bactéries se retrouvent principalement dans les sédiments aquatiques, dans les sols submergés ou encore dans les eaux souterraines, tous des environnements naturels anaérobies (Elder et Kelly, 1994). La réduction microbienne du fer influence grandement le cycle du carbone et la distribution des métaux traces toxiques dans l'environnement (Lovley, 1991). *Geobacter metallireducens* GS-15, une bactérie anaérobie stricte, a été isolée en culture pure et a été le premier microorganisme connu capable de coupler l'oxydation des composés aromatiques à la réduction du Fe(III). Cette dernière dégrade plusieurs composés aromatiques tels le toluène, le phénol, le *p*-crésol et l'acide benzoïque. Dans le cas de l'utilisation du phénol,

le mécanisme de dégradation qui est proposé passe par la carboxylation du phénol en acide 4-hydroxybenzoïque (Londry et Fedorak, 1992; Lovley et Lonergan, 1990).

1.4.5 Réduction des sulfates

Les bactéries sulfatoréductrices (BSR) forment un groupe de microorganismes très diversifié morphologiquement et physiologiquement. Également, elles varient au niveau de leurs besoins nutritionnels et des niches écologiques qu'elles occupent (Gibson, 1990). Il s'agit de bactéries anaérobies strictes qui oxydent les composés organiques en utilisant le sulfate (SO_4^{2-}) comme accepteur final d'électrons. Cette réduction des sulfates est couplée à la synthèse d'ATP par une chaîne de transport d'électrons et une ATP synthase (Elder et Kelly, 1994). Elles sont présentes dans un grand nombre d'habitats anaérobies mais elles favorisent la colonisation d'environnements où la concentration des sulfates est élevée. L'eau de mer présente des concentrations élevées en sulfate de l'ordre de 20 à 30 mM. Ainsi, la réduction des sulfates est considérée comme le processus métabolique majeur dans les sédiments marins (Häggblom et Young, 1995). Il a d'ailleurs été estimé que les BSR sont capables de métaboliser plus de 50% des déchets organiques retrouvés dans les sédiments des côtes marines (Gibson, 1990). Une caractéristique particulière à ce groupe est la production de H_2S qui est le résultat de la réduction du SO_4^{2-}. Il s'agit d'un gaz malodorant et corrosif qui peut également inhiber la croissance de certains microorganismes (Fang et Chen, 1997).

La grande majorité des BSR sont incluses dans les genres *Desulfovibrio, Desulfotobacter* et *Desulfotomaculum* (Tardy-Jacquenod et al., 1996). Ces bactéries sont capables de dégrader un nombre impressionnant de composés aromatiques. Par exemple, *Desulfobacter phenolicum* dégrade complètement le phénol alors que *Desulfobacterium indolicum*, pour sa part, minéralise l'indole (Bak et Widdel, 1986; Bak et Widdel, 1986a). Une coculture a été isolée en conditions sulfatoréductrices et est constituée d'une souche *Desulfotomaculum* sp. et d'une autre souche *Desulfovibrio* sp. Cette coculture peut utiliser l'acide 2 et 4-fluorobenzoïque, le phénol, l'acide benzoïque, l'acide 3 et 4-hydroxybenzoïque, le cathécol et d'autres composés (Drzyzga, Jannsen et Blotevogel,

1994). Également, la souche Groll de *Desulfotomaculum* sp. croît sur une variété de composés aromatiques incluant le *para* et *méta*-crésol (Londry, Fedorak et Suflita, 1997; Londry, Suflita et Tanner, 1999). De nombreux autres exemples ont été rapportés et répertoriés.

1.4.6 Fermentation méthanique

1.4.6.1 Généralités

La production de méthane par les microorganismes à partir des composés aromatiques a été observée pour la première fois par Soehngen en 1906. Tarvin et Buswell ont également démontré, en 1934, qu'une large variété de composés aromatiques pouvaient être métabolisés en méthane et en gaz carbonique en conditions anaérobies, avec un taux de conversion supérieur à 90 %. La dégradation des composés aromatiques par fermentation méthanique, c'est-à-dire la minéralisation jusqu'au méthane (CH_4) et dioxyde de carbone (CO_2), est un processus répandu dans plusieurs environnements anaérobies riches en matière organique où la concentration en accepteurs d'électrons tels les nitrates, les sulfates ou encore le fer oxydé est faible. La méthanogenèse est un processus de fermentation couramment retrouvé dans la voie digestive de certains animaux, particulièrement chez les ruminants (Ferry, 1992). Il s'agit du métabolisme le moins exergonique en comparaison avec les autres métabolismes anaérobies ou encore avec la dégradation en aérobie. En effet, la dégradation d'une mole de glucose en conditions aérobies ($C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \Rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$) génère 2840 kJ d'énergie alors que cette même dégradation en conditions méthanogènes ($C_6H_{12}O_6 \Rightarrow 3CO_2 + 3CH_4$) génère sept fois moins d'énergie (390 kJ). La raison de cette différence est le fait que la majeure partie de l'énergie libre, lors de la fermentation méthanique, est conservée dans le méthane qui est produit (Zinder, 1984). Cela signifie qu'il y a moins d'énergie disponible pour les microorganismes, forçant ainsi ces derniers à s'impliquer dans des relations de coopération très étroites.

1.4.6.2 Dynamique microbienne dans un consortium méthanogène

La méthanogenèse est un processus métabolique qui implique plusieurs groupes différents de bactéries qui forment une chaîne alimentaire. Le regroupement de ces différentes bactéries est communément appelé consortium bactérien (Elder et Kelly, 1994). Les membres en aval de la chaîne alimentaire dépendent des membres plus en amont pour leur fournir les substrats. Également, les membres en aval exercent une influence importante sur ceux en amont par l'enlèvement des produits du métabolisme de ces premiers. Au moins trois types distincts de bactéries, qui correspondent aux trois phases majeures (Fig. 5) de la dégradation par fermentation méthanique, sont impliqués dans la conversion de la matière organique: les bactéries fermentaires, les bactéries acétogènes et finalement les bactéries méthanogènes (Evans et Fuchs, 1988).

Durant la première phase, les bactéries fermentaires, par l'action d'enzymes hydrolytiques extracellulaires, transforment les polymères complexes tels que les lipides, les protéines et les polysaccharides en oligomères et en monomères (acides aminés, peptides, sucres simples). Ces derniers sont par la suite majoritairement fermentés, toujours par les bactéries fermentaires, en acides gras à longues chaînes (de trois à six carbones). Une faible proportion de ces monomères est convertie directement en H_2 et CO_2 ou en acétate (Schink, 1997). Durant la deuxième phase, les bactéries acétogènes productrices d'hydrogène produisent de l'acétate ainsi que de l'H_2 et du CO_2. L'effet net des deux premiers groupes est donc la conversion de la matière organique complexe en acétate, H_2 et CO_2 (Zinder, 1984). Un troisième groupe, les bactéries acétogènes consommatrices d'hydrogène convertissent une partie de l'H_2 et du CO_2 en acétate. L'acétogenèse (Fig.5) ne peut fonctionner que si la pression partielle d'hydrogène dans le milieu est suffisament basse, c'est-à-dire inférieure à 10^{-3} atmosphères. Cette contrainte est due au fait que l'énergie contenue dans les substrats fermentables par les bactéries acétogènes est très faible. Ainsi, les oxydations deviennent thermodynamiquement défavorables lorsque le produit (hydrogène) s'accumule dans le milieu. De cette façon,

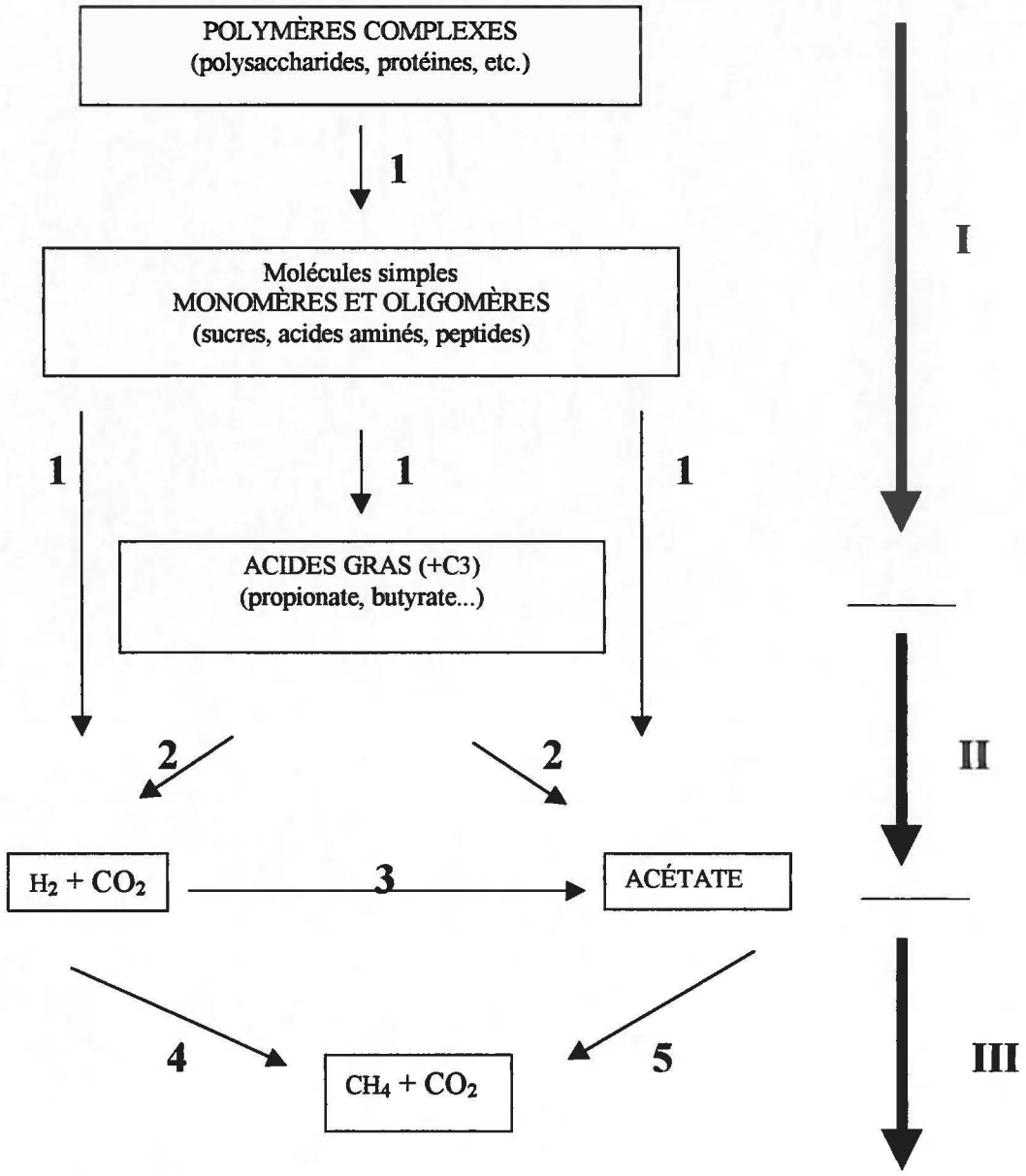


Figure 5 : Différents groupes microbiens impliqués dans la dégradation de molécules organiques complexes par fermentation méthanique. Groupes de bactéries impliqués: 1. bactéries fermentaires 2. bactéries acétogènes productrices d'H_2 3. acétogènes consommatrices d' H_2 4. méthanogènes hydrogénotrophes 5. méthanogènes acétoclastes **I**: fermentation **II**: acétogenèse **III**: méthanogenèse (modifié d'après Schink, 1997; Zinder, 1984).

une relation de syntrophie (dépendance mutuelle) existe entre les bactéries acétogènes et les bactéries hydrogénotrophes, consommatrices d'hydrogène (Voolapalli et Stuckey, 1999). Ce mécanisme global de production de l'hydrogène et de sa consommation par d'autres bactéries est appelé le "transfert inter-espèces d'hydrogène" (Dolfing et Tiedje, 1988).

L'acétate formé durant l'acétogenèse ainsi que l'H_2 et le CO_2 sont consommés par les bactéries méthanogènes lors de la troisième phase, la méthanogenèse (Fig.5). Lors de cette phase finale, deux groupes de bactéries méthanogènes produisent le méthane et le CO_2. Environ 2/3 du méthane produit est généré par les bactéries méthanogènes acétoclastes (Fig.5) à partir de l'acétate. Il s'agit de bactéries à croissance très lente et plusieurs représentants de ce groupe se retrouvent au sein des genres *Methanosarcina* et *Methanosaeta* (anciennement nommée *Methanothrix*) (Zinder, 1984). Finalement, le deuxième groupe de bactéries méthanogènes, les bactéries hydrogénotrophes, est responsable de la formation du méthane (1/3) à partir de l'H_2 et du CO_2 . En effet, le CO_2 est réduit avec les électrons provenant de l'oxydation de l' H_2 (Ferry, 1992).

1.4.6.3 Exemples de transformations méthanogènes de composés aromatiques

Les implications précises des différentes souches aux différentes étapes de la fermentation méthanique demeurent, à ce jour, encore peu connues. Toutefois les exemples comme processus global de la transformation méthanique de composés aromatiques sont nombreux. Par exemple, un consortium méthanogène a été isolé et sa capacité à minéraliser l'acide 3-chlorobenzoïque a été démontrée (Shelton et Tiedje, 1984). Young et Rivera (1985) ont isolé un consortium capable de dégrader le phénol, le phloroglucinol, l'hydroquinone ainsi que le *p*-crésol. La dégradation du pentachlorophénol jusqu'au méthane était possible avec le consortium de Juteau *et al.* (1995). Un autre exemple répertorié dans la littérature est le consortium isolé par Beaudet *et al.* (1986) qui est capable de dégrader plusieurs composés phénoliques dans des conditions méthanogènes (Béchard et al., 1990; Bisaillon et al., 1994; Bisaillon, Lépine et Beaudet, 1991; Bisaillon et al., 1991a; Bisaillon et al., 1993).

1.4.7 Voies métaboliques mineures

Les différents métabolismes exposés plus haut représentent les stratégies microbiennes les plus répandues dans les environnements anaérobies. Toutefois, les bactéries présentent une impressionnante capacité d'adaptation et elles prennent ainsi avantage de la moindre ressource environnementale disponible ce qui permet une importante diversification des voies métaboliques (Schink et Muller, 2000). Par exemple, les bactéries du genre *Desulfitobacterium* transforment la matière organique avec le sulfite mais non le sulfate comme accepteur final d'électrons (Bouchard et al., 1996). D'autres bactéries utilisent, pour transformer la matière organique, des accepteurs d'électrons tels le sélénate (Oremland et al., 1994), l'arséniate (Laverman et al., 1995) ou même l'uranium.

1.5 DÉGRADATION DU PHÉNOL

1.5.1 Voie de phosphorylation

Dans cette voie, la transformation du phénol procède initialement par une phosphorylation pour donner le phénylphosphate qui, par la suite, est carboxylé en acide 4-hydroxybenzoïque par la phénylphosphate carboxylase. L'acide 4-hydroxybenzoïque est ensuite activé par l'ajout du groupement thio-CoA par une enzyme CoA ligase, ce qui mène à la formation du 4-hydroxybenzoyl-CoA. L'étape suivante, catalysée par l'enzyme 4-hydroxybenzoyl-CoA réductase, est une déhydroxylation qui conduit à l'intermédiaire central benzoyl-CA. Finalement, ce dernier est dégradé jusqu'au CO_2 (Lack et Fuchs, 1994) (Fig. 6).

1.5.2 Voie de carboxylation directe

La voie métabolique de dégradation du phénol via la carboxylation directe, sans phosphorylation intermédiaire, a été démontrée par plusieurs auteurs (Béchard et al.,

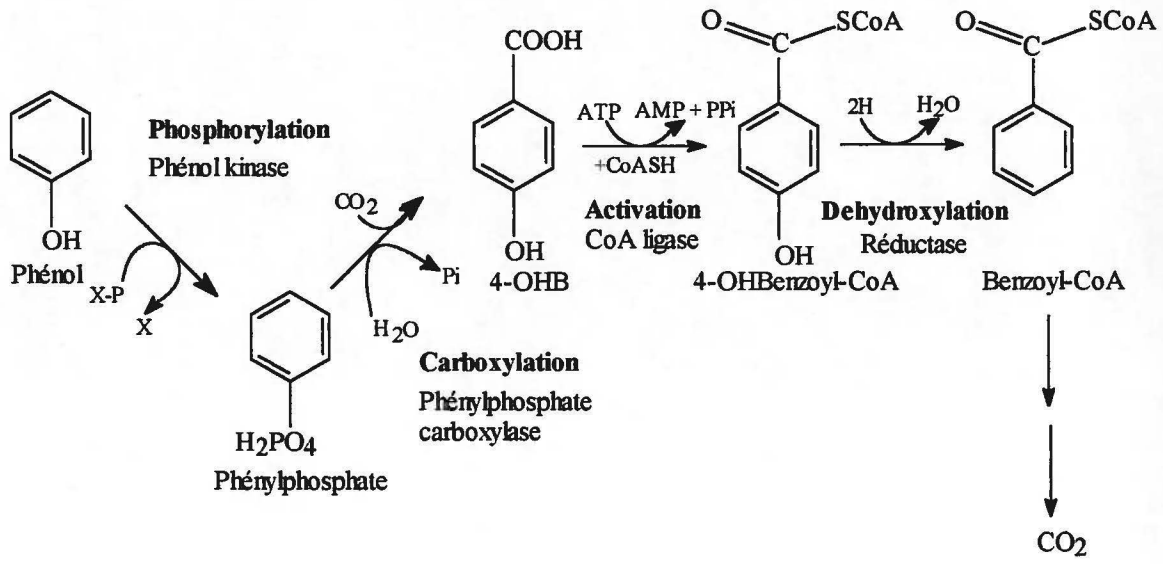


Figure 6 : Voie métabolique de dégradation du phénol via une phosphorylation (modifié d'après Lack et Fuchs, 1994).

1990; Knoll et Winter, 1989; Kobayashi et al., 1989; Sharak Genthner, Townsend et Chapman, 1989; Sharak Genthner, Townsend et Chapman, 1991; Zhang et Wiegel, 1994). Par exemple, lorsque Knoll *et al.* (1987) ont fourni du phénol non marqué ainsi que du CO_2 marqué au ^{14}C à leur consortium méthanogène, ils ont constaté la formation d'acide benzoïque radioactif. Ce résultat indique l'importante implication du CO_2 dans la dégradation du phénol et la possibilité que cette dégradation passe par la carboxylation du phénol. La réaction de carboxylation a été étudiée de façon plus détaillée par Sharak Genthner *et al.* (1989). Suite à l'utilisation d'analogues fluorés du phénol lors de la dégradation par un consortium en conditions méthanogènes, ils ont conclu que la carboxylation du phénol avait lieu en position *para* relativement à la position du groupement hydroxyle. Cette conclusion était basée sur le fait que le 2-fluorophénol était transformé en acide 3-fluorobenzoïque, le 3-fluorophénol en acide 2-fluorobenzoïque et le 4-fluorophénol n'était pas transformé. Une autre étude (Sharak Genthner, Townsend et Chapman, 1990) a démontré que l'addition d'acide 3-fluoro-4-hydroxybenzoïque (intermédiaire hypothétique mais non détecté de la carboxylation du 2-fluorophénol) à un consortium qui dégrade activement le phénol, entraîne l'apparition de deux composés différents: le 2-fluorophénol, produit d'une décarboxylation, et l'acide 3-fluorobenzoïque, produit d'une déhydroxylation. Après une incubation prolongée, le 2-fluorophénol produit a été transformé en acide 3-fluorobenzoïque. Zhang, Morgan et Wiegel (1990) ont aussi fourni une preuve additionnelle de la *para*-carboxylation en conditions méthaniques en ajoutant à leur culture du phénol marqué au ^{13}C (carbone 1) et en détectant, suite à l'incubation, de l'acide benzoïque marqué ^{13}C (carbone 4). L'utilisation de phénol deutéré par Gallert, Knoll et Winter (1991) avec leur culture mixte a clairement démontré que la carboxylation du phénol ne pouvait avoir lieu qu'en position *para*. Gallert et Winter (1994) ont démontré que le phénol était directement transformé en acide 4-hydroxybenzoïque sans qu'il y ait de phosphorylation et que l'acide 4-hydroxybenzoïque était ensuite activé par l'ajout du groupement thio-CoA, ce qui menait à la formation du 4-hydroxybenzoyl-CoA. Ce dernier était déhydroxylé par l'enzyme 4-hydroxybenzoyl-CoA réductase conduisant à l'intermédiaire central benzoyl-CoA qui était ensuite transformé en acide benzoïque (Fig. 7).

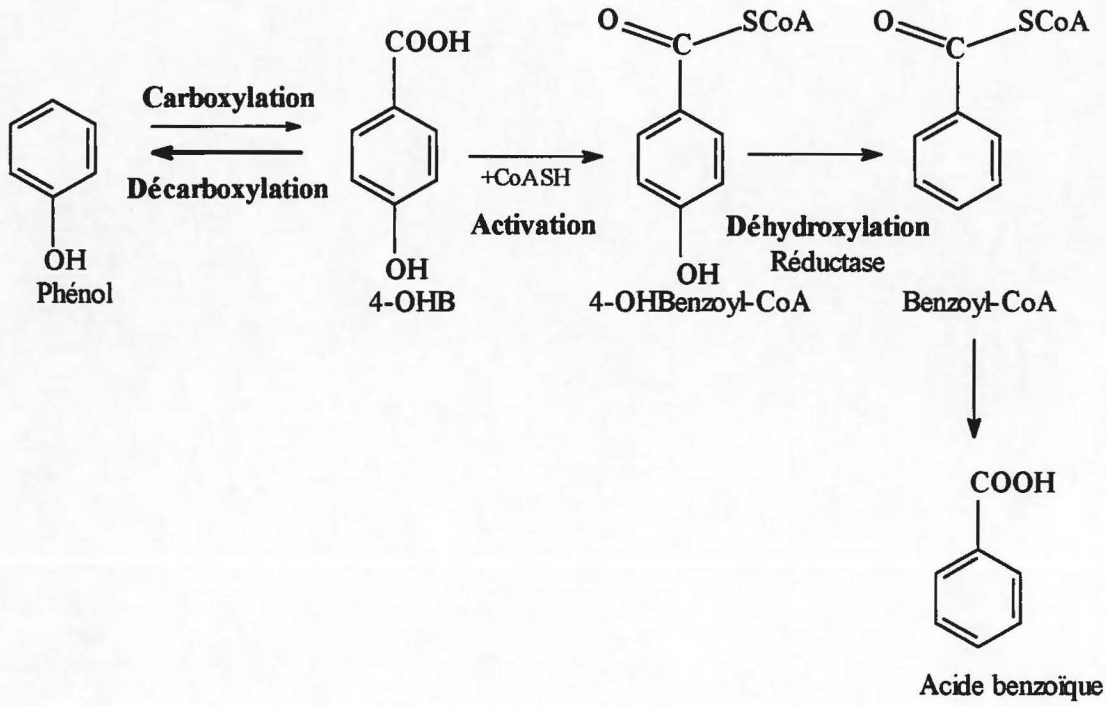


Figure 7: Voie métabolique de transformation du phénol en acide benzoïque via une carboxylation directe sans phosphorylation et avec implication du coenzyme A (modifié d'après Gallert et Winter, 1994).

1.5.3 Voie réductrice

En présence de nitrates comme accepteur terminal d'électrons, Bakker (1977) a démontré que le phénol était dégradé, par une culture mixte, en empruntant une voie métabolique ayant l'acide *n*-caproïque comme intermédiaire de dégradation. Cette accumulation d'acide *n*-caproïque dans les milieux de culture l'a amené à conclure que le phénol était dégradé via une voie réductrice, c'est-à-dire que le cycle aromatique du phénol était réduit pour former le cyclohexanone avant d'être dégradé en composés aliphatiques (Fig. 8).

Un consortium méthanogène adapté au catéchol a été utilisé par Balba et Evans (1980). Le phénol marqué au ^{14}C a été fourni à cette culture et a été suivi de même que les intermédiaires de dégradation. Le phénol a été métabolisé rapidement et les produits marqués suivants ont été détectés dans le milieu de culture: le cyclohexanone, le 2-hydroxycyclohexanone, l'adipate, le succinate, le propionate et l'acétate. La présence de cyclohexanone confirme que la dégradation du phénol a été effectuée via une voie métabolique réductrice (Fig.8).

D'autres groupes de recherche ont tenté de détecter cette voie catabolique. Ces derniers ont ajouté le cyclohexanol ou le cyclohexanone à leurs cultures anaérobie dégradant le phénol mais ils n'ont pas détecté l'utilisation de ces intermédiaires, indiquant qu'une autre voie serait empruntée par leurs organismes (Béchard et al., 1990; Kobayashi et al., 1989; Tschech et Fuchs, 1987).

1.5.4 Différents microorganismes impliqués

Le nombre d'exemples où les mécanismes de dégradation du phénol ont été étudiés avec des cultures pures est limité. Certains cas peuvent toutefois être rapportés. Tschech et Fuchs (1987) ont isolé deux souches (K 172 et S 100) appartenant au genre *Pseudomonas* sp., chacune capable de minéraliser le phénol en CO_2 en utilisant le nitrate

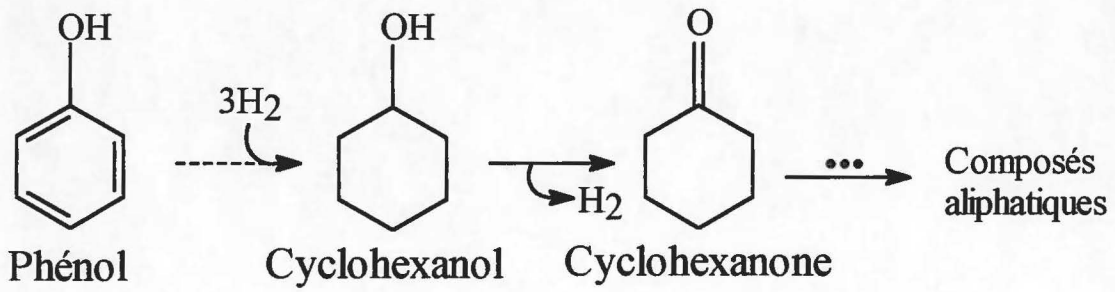


Figure 8: Dégradation du phénol par la voie métabolique réductrice (Bakker, 1977; Balba et Evans, 1980).

comme accepteur terminal d'électrons. La souche K 172 a été caractérisée et a été identifiée *Thauera aromatica*. La voie de phosphorylation présentée à la section 1.5.1 est la voie métabolique empruntée par cette dernière pour utiliser le phénol .

La souche GS-15 en culture pure (Lovley et Lonergan, 1990), réductrice de Fe(III), est capable de minéraliser le phénol jusqu'au CO_2. Le mécanisme de dégradation suggéré passe par la carboxylation du phénol en acide 4-hydroxybenzoïque, sans intermédiaire activé avec un groupement thio-CoA (Fig. 9). Contrairement à la voie de dégradation du phénol chez *Thauera aromatica* où, *in vitro*, l'accumulation de l'acide 4-hydroxybenzoïque comme intermédiaire n'est pas détectée, Lovley et Lonergan (1990) ont clairement détecté l'apparition de cet acide lors de la dégradation du phénol.

Dans des conditions méthanogènes, l'isolement de bactéries qui transforment le phénol est beaucoup plus difficile, en raison, entre autre, des étroites inter-dépendances entre les différentes bactéries impliquées. Certains auteurs n'ont pu suivre cette activité qu'au niveau de consortia bactériens non caractérisés, adaptés en présence de phénol (Gallert, Knoll et Winter, 1991; Gallert et Winter, 1992; Kobayashi et al., 1989).

Knoll et Winter (1989) ont obtenu un consortium défini constitué d'un court bâtonnet Gram négatif mobile, d'un long bâtonnet Gram négatif non mobile, d'un nombre limité de cellules *Desulfovibrio* sp. et de *Methanospirillum hungatei*, une bactérie méthanogène. Ce consortium a été obtenu à partir de boues d'épuration et sélectionné dans un milieu minéral avec du phénol comme seule source de carbone et d'énergie. Il s'agit d'un consortium capable de minéraliser le phénol et l'acide 4-hydroxybenzoïque en méthane et CO_2. Différentes expériences avec ce consortium ont démontré que les cellules de *Desulfovibrio* sp. n'étaient pas impliquées dans la dégradation du phénol. Le court bâtonnet, pour sa part, était responsable de la transformation de l'acide benzoïque en acétate puis en méthane et CO_2. Toutefois, cela avait seulement lieu en présence de *Methanospirillum hungatei*, ce qui indique une relation de syntrophie obligatoire. L'élimination du long bâtonnet a entraîné la perte de l'activité de dégradation du phénol et

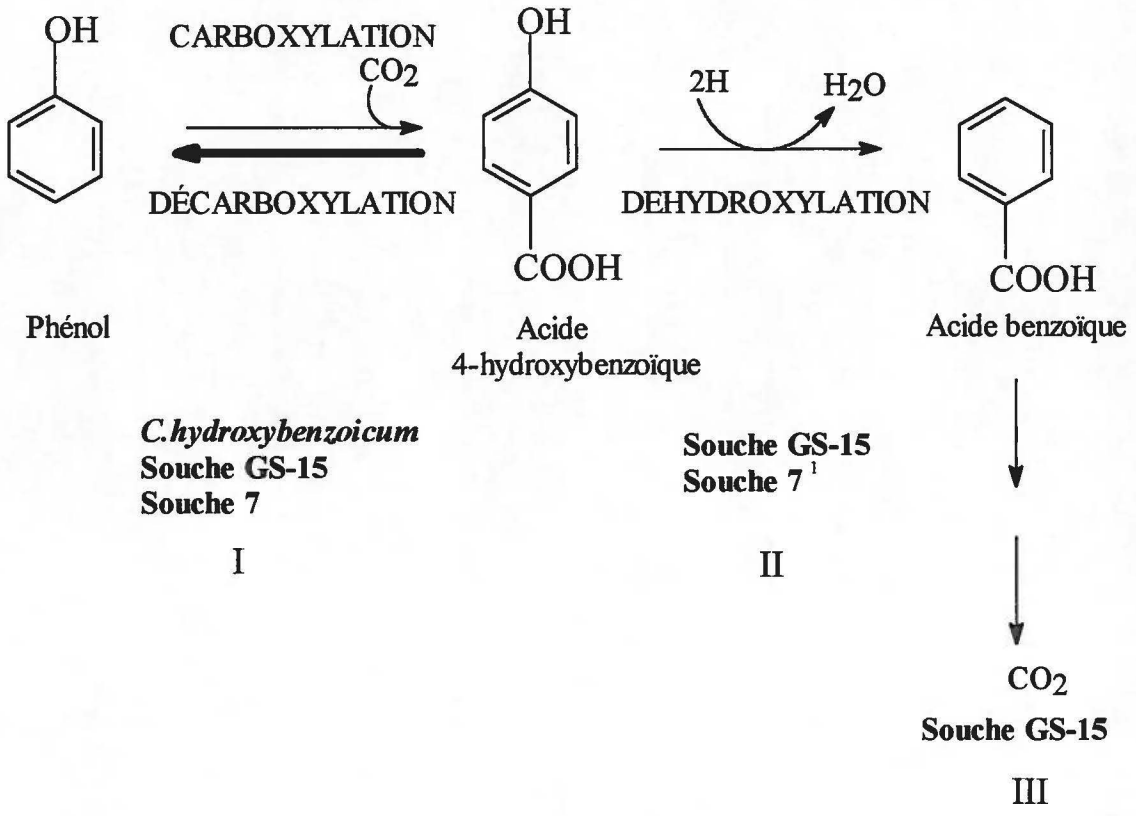


Figure 9 : Dégradation du phénol par *Clostridium hydroxybenzoicum*, par la souche GS- 15 et par la souche 7. I : phase de carboxylation / décarboxylation, II : phase de déhydroxylation et III : phase de transformation de l'acide benzoïque en CO_2. [1] : Pour la souche 7, il y aurait possibilité qu'il y ait implication du coenzyme A à cette étape tout comme à la Figure 7.

de l'acide 4-hydroxybenzoïque, indiquant que ce dernier était probablement impliqué dans la carboxylation du phénol et la décarboxylation de l'acide 4-hydroxybenzoïque. Les essais pour isoler la souche qui transforme le phénol et l'acide 4-hydroxybenzoïque ont échoué.

Un consortium, acclimaté initialement en présence de 2-chlorophénol et provenant de sédiments d'eau douce, a été obtenu (Sharak Genthner, Townsend et Chapman, 1989; Sharak Genthner, Townsend et Chapman, 1991). Ce consortium était capable de minéraliser complètement le phénol en méthane et CO_2. Il a été dilué dans un milieu de culture contenant du phénol et la dilution 10^{-8} a été nommée "sous-culture B-1". B-1 était capable de transformer le phénol en acide benzoïque mais ce dernier n'était plus dégradé par la suite. La culture a transformé l'acide 4-hydroxybenzoïque, suggérant que la voie de transformation du phénol implique une étape de carboxylation. Dans cette culture, il ont observé 5 types bactériens Gram négatifs: un bâtonnet aux extrémités arrondies, un coccobacille, un large cocci de forme ovoïde ainsi que des bâtonnets semblables à *Methanospirillum* sp. et à *Methanosaeta* sp. (Sharak Genthner, Townsend et Chapman, 1989). La composition exacte de la sous-culture et les souches responsables des différentes étapes de la transformation du phénol et de l'acide 4-hydroxybenzoïque ne sont toutefois pas connnues.

Zhang et Wiegel. (1990a) et Li *et al.* (1996) ont été les seuls à prétendre avoir isolé des souches en culture pure qui sont capables de carboxyler le phénol en conditions méthanogènes (respectivement *Clostridium hydroxybenzoicum* et la souche 6).

Initialement nommée la souche JW/Z-1, *Clostridium hydroxybenzoicum* a été enrichie à partir de sédiments méthanogènes d'eau douce. La culture initiale a été adaptée dans un milieu minéral contenant de l'extrait de levure, du 2,4-dicholorophénol et, par la suite, du phénol. Les cultures, à cette étape, capables de minéraliser le phénol, ont été diluées et le phénol a été remplacé par l'acide 4-hydroxybenzoïque. La souche pure a été obtenue par repiquages de colonies isolées après plusieurs séries de dilutions en géloses profondes (Zhang et Wiegel, 1990a).

Clostridium hydroxybenzoicum pouvait décarboxyler l'acide 4-hydroxybenzoïque en phénol (Fig. 9). Toutefois, le phénol n'était pas métabolisé par la culture pure en conditions de croissance. Par contre, dans une suspension cellulaire concentrée, avec une concentration élevée de phénol et de bicarbonate, l'activité inverse a pu être observée, soit la carboxylation du phénol en acide 4-hydroxybenzoïque (Zhang et Wiegel, 1994). Contrairement à la situation chez *Thauera aromatica*, la phosphorylation du phénol et l'activation de l'acide 4-hydroxybenzoïque par la liaison thio-CoA n'ont pas été observées chez *Clostridium hydroxybenzoicum*. Zhang et Wiegel (1994) ont donc montré que le phénol et non le phénylphosphate était le substrat pour la carboxylation en acide 4-hydroxybenzoïque. L'acide 4-hydroxybenzoïque n'était pas déhydroxylé en acide benzoïque par *Clostridium hydroxybenzoicum* (Fig. 9).

La souche 6 de Li *et al.* (1996), isolée d'un consortium méthanogène, a été étudiée et il a été démontré qu'il ne s'agissait pas d'une culture pure (Letowski, 2000). En effet, une autre souche, nommée souche 7, a été observée sous des conditions de cultures différentes.

1.5.4.1 La souche 7

Un consortium méthanogène capable de minéraliser complètement le phénol en méthane et CO_2 a été isolé à partir d'un mélange de lisier de porc, d'eau de marécage, de boues d'une usine d'épuration et de sols (Beaudet et al., 1986). Ce consortium, composé de plusieurs types morphologiques différents a été enrichi en présence de phénol et de protéose peptone (Bisaillon, Lépine et Beaudet, 1991). De manière à identifier la voie de dégradation du phénol, des intermédiaires métaboliques potentiels ont été utlisés (Béchard et al., 1990). Il a été établi que la voie de dégradation du phénol passait par l'acide benzoïque, le 1-cyclohexène carboxylate et l'heptanoate. Une partie du 1-cyclohexène carboxylate a été transformé en cyclohexane carboxylate. Il a été démontré que la dégradation du phénol impliquait la carboxylation de ce dernier en acide benzoïque et que cette dernière avait lieu en position *para* (Fig. 10) (Bisaillon et al., 1994; Bisaillon et al., 1993). Béchard *et al.* (1990) ont démontré que le protéose peptone

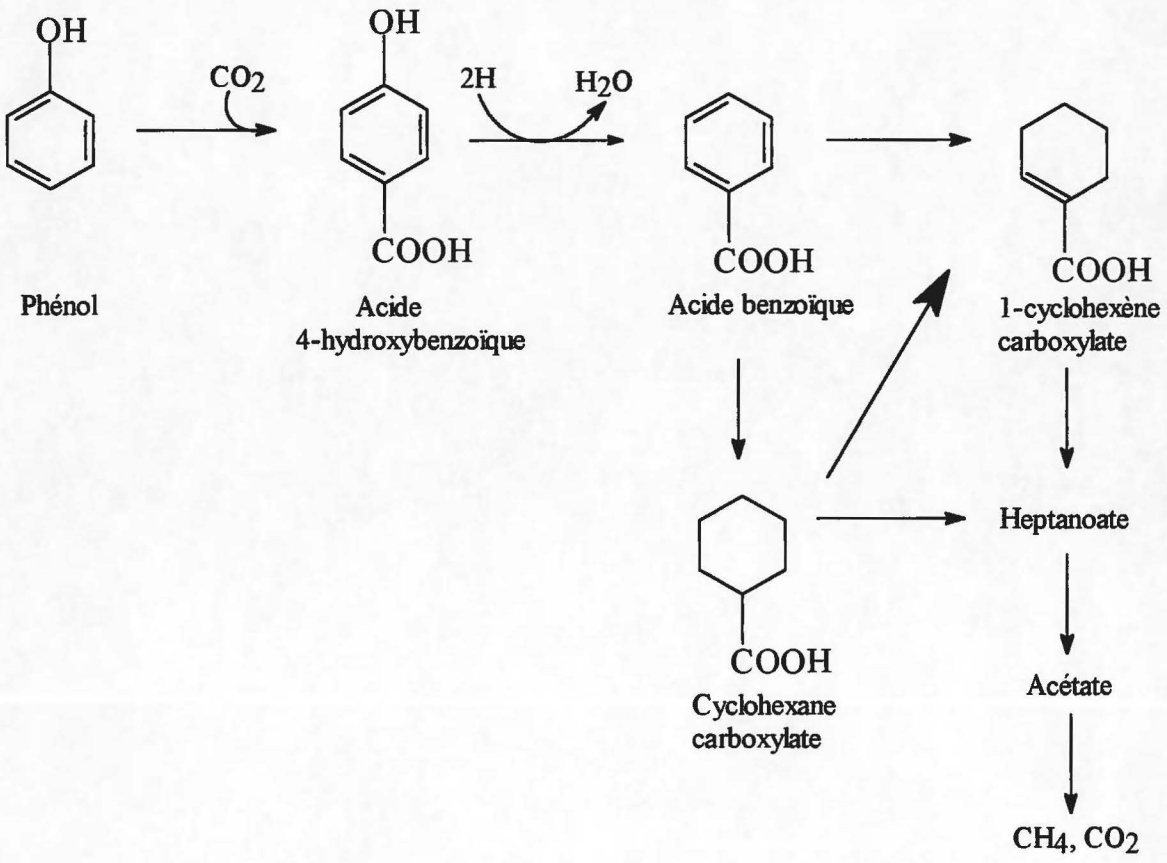


Figure 10 : Intermédiaires potentiels lors de la minéralisation du phénol par la voie métabolique impliquant la carboxylation chez le consortium méthanogène de Beaudet *et al.* (Béchard et al., 1990). Il faut aussi noter ici que l'étape de déhydroxylation de l'acide 4-hydroxybenzoïque pourrait passer par un thioester CoA, tel que présenté à la Figure 7.

était nécessaire dans le milieu de culture pour que la dégradation puisse avoir lieu. Ces derniers ont émis l'hypothèse que le phénol était dégradé par co-métabolisme et que le protéose peptone ou l'un des produits de sa dégradation servait de source de carbone et d'énergie pour permettre la croissance de la bactérie qui transformait initialement le phénol. Une observation similaire a été faite par Kobayashi *et al.* (1989) puisque la formation de méthane était accélérée en présence de protéose peptone. Bisaillon *et al.* (1991) ont montré, dans une étude subséquente que l'extrait de levure ou un mélange de tryptophane et de lysine pouvait remplacer le protéose peptone sans affecter l'activité de carboxylation.

Au sein du consortium, l'inhibition spécifique des bactéries méthanogènes suite à l'addition de BESA n'a pas eu d'effet sur la carboxylation du phénol et l'acide benzoïque s'accumulait alors dans le milieu de culture. Également, l'acide benzoïque s'accumulait indépendamment de la présence ou de l'absence d'hydrogène dans le mélange de gaz. Ceci indique que l'organisme responsable de la carboxylation du phénol ne présentait pas de relation de syntrophie avec les bactéries méthanogènes. Dans le consortium, les microorganismes responsables de la carboxylation du phénol ont été évalués à un nombre supérieur à 1 X 10^8 bactéries / ml, indiquant que ces bactéries carboxylantes faisaient partie des microorganismes dominants du consortium.

Lors des différents travaux avec le consortium, ce dernier a été traité à la chaleur. L'activité de carboxylation du phénol a été préservée après le chauffage de la culture à 80°C pendant 15 minutes. Dans cette culture chauffée, il n'y avait pas de production de méthane et l'acide benzoïque s'accumulait dans le milieu de culture. Ce résultat a suggéré que les microorganismes formant des spores étaient impliqués dans la carboxylation du phénol et dans la décarboxylation et la déhydroxylation de l'acide 4-hydroxybenzoïque (Létourneau et al., 1995). À partir d'un consortium traité à la chaleur, cinq colonies ayant des morphologies distinctes ont été isolées sur milieu solide. Quatre de celles-ci ont été

identifiées comme *Clostridium* spp. alors que la cinquième colonie n'a pu être identifiée à ce stade. Aucune de ces souches isolées n'étaient capables de carboxyler le phénol en cultures pures ou en cocultures reconstituées (Létourneau et al., 1995). Le traitement avec des antibiotiques (chloramphénicol, tétracycline et clindamycine) du consortium accumulant l'acide benzoïque a permis d'obtenir une culture composée de deux formes bactériennes différentes. La première, qui était majoritaire, a été identifiée *Clostridium hastiforme* et l'autre était un bâtonnet Gram positif non identifié. L'addition de bacitracine dans cette culture a eu comme effet d'inverser la proportion entre les deux souches et *Clostridium hastiforme* a été éliminé par dilution. La culture obtenue était capable de carboxyler le phénol en acide benzoïque et était composée d'une seule forme visible au microscope et d'un seul type de colonie sur gélose sang Columbia. Elle a été nommée "souche 6" et l'étude phylogénétique et l'analyse des acides gras membranaires ont établi qu'elle appartenait à une nouvelle espèce apparentée aux groupes III et VI du genre *Clostridium* (Li et al., 1996).

Lorsque la "souche 6" de Li *et al.* (1996) était étalée sur un milieu solide, la majorité des colonies qui étaient remises en milieu liquide avait perdu leur capacité à transformer le phénol. Quelques rares cultures liquides obtenues à partir de colonies avaient conservé leur activité. Suite à un changement de lot du protéose peptone qui entre dans la composition des milieux de culture, un deuxième type morphologique est apparu dans les cultures liquides de la souche 6 qui étaient, en fait, des cocultures. Cette deuxième souche a été nommée "souche 7". Les souches 6 et 7 ont été séparées l'une de l'autre suite à l'utilisation d'un gradient de Percoll et de séries de dilution et de repiquages (Letowski, 2000). La culture exempte de la souche 6, la souche 7, serait la souche responsable de la carboxylation du phénol. Il faut toutefois noter que cette dernière a été isolée en milieu liquide et non de façon classique par repiquages de colonies. Ainsi, quoi qu'il y ait un seul type morphologique observé dans la culture, il n'a pas encore été confirmé, hors de tout doute, qu'il s'agit d'une culture pure.

La souche 7 est capable de carboxyler le phénol et de déhydroxyler l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque sans poursuivre la dégradation (Fig. 9). Il s'agit

d'une souche Gram +, anaérobie stricte, très difficile à maintenir, qui ne présente aucune opacité en culture liquide ($5x10^6$ bactéries/ml au maximum) et qui ne croît pas sur milieu solide. Elle ne peut conserver, au fil des repiquages, son activité de transformation du phénol en absence de la souche 6 dans des milieux de culture liquides. En effet, le maintien de la souche 7 en présence de phénol n'est possible que lorsque cette dernière est cultivée dans un surnageant de la coculture des souches 6 et 7 indiquant que la souche 6 aide probablement la souche 7 au niveau de la transformation du phénol en lui fournissant un élément essentiel. Au niveau de l'identification, la souche 7 est une nouvelle espèce bactérienne appartenant probablement à un nouveau genre apparenté à certaines bactéries réductrices de sulfates et de sulfites (87 à 92% d'homologie au niveau de la séquence de l'ARNr 16S avec les genres *Desulfotomaculum, Desulfitobacterium* et *Desulfosporosinus)*. Une forte homologie a également été observée avec le genre *Sporotomaculum* (Letowski, 2000). De plus, la souche 7 présente 94-96% d'homologie avec deux bactéries WCHB1-20 et WCHB1-89 (Dojka et al., 1998) retrouvées dans des conditions méthanogènes qui n'ont pas été cultivées et qui sont connues uniquement par leurs séquences ribosomales. Deux autres bactéries anaérobies et sporulantes, SporeA et SporeB, qui oxydent le propionate en relation syntrophe avec *Methanospirillum hungatei* (Harmsen et al., 1996), présentent 92-94% d'homologie avec la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche 7. Toutefois, des essais ont démontré que la souche 7 n'est pas capable de croître et d'être active en présence de propionate et de *Methanospirillum hungatei* (Letowski, 2000).

1.5.5 Enzymes impliquées dans la transformation du phénol

He et Wiegel (1995) ont purifié et caractérisé l'enzyme 4-hydroxybenzoate décarboxylase de *Clostridium hydroxybenzoicum*. L'enzyme catalyse aussi la réaction inverse, soit la carboxylation du phénol en acide 4-hydroxybenzoïque, mais c'est nettement la décarboxylation qui est favorisée. Le gène *ohb1* qui code pour cette enzyme a été cloné et exprimé dans *Escherichia coli*. L'enzyme recombinante possède les mêmes propriétés que l'enzyme native chez *Clostridium hydroxybenzoicum* (Huang, He et Wiegel, 1999). L'enzyme 4-hydroxybenzoate décarboxylase de la coculture des souches 6 et 7 (Li et al.,

2000) a été purifiée et comparée avec la décarboxylase de *Clostridium hydroxybenzoicum*. Les deux enzymes présentaient des propriétés et des séquences N-terminales différentes ce qui suggère qu'il s'agit d'une enzyme différente de celle de *Clostridium hydroxybenzoicum*. Toutefois, dans les deux cas, les activités étaient similaires et l'activité de décarboxylation était favorisée par rapport à l'activité de carboxylation.

He et Wiegel (1995) ont postulé que, même si l'activité de décarboxylation était dominante et plus forte avec leur enzyme purifiée, cette même enzyme pourrait être responsable de la transformation du phénol via la carboxylation en présence d'une autre activité qui consommerait l'acide 4-hydroxybenzoïque telle la déhydroxylation de l'acide 4-OHB. Li *et al.* (2000) ont suggéré que cela pourrait aussi s'appliquer à l'enzyme 4-hydroxybenzoate décarboxylase isolée de la coculture des souches 6 et 7.

1.5.6 Interrelations microbiennes

Les microorganismes présents dans la nature occupent des habitats en commun et interagissent fréquemement entre eux. La syntrophie est un exemple d'interaction souvent retrouvée entre les bactéries. Dans cette relation, les deux populations échangent un facteur d'énergie ou de croissance. Le transfert d'hydrogène entre les bactéries acétogènes et les bactéries méthanogènes en anaérobiose est un cas classique de syntrophie (Berry, Francis et Bollag, 1987). Toutefois, l'hydrogène n'est pas le seul composé qui peut être transféré entre les bactéries. Mohn et Tiedje (1992) ont montré une relation de syntrophie dans le cas d'un consortium capable de déshalogéner l'acide 3-chlorobenzoïque. Dans cet exemple, la souche *Desulfomonile tiedjei* fournissait l'acide benzoïque à une bactérie fermentaire (souche BZ-2) qui, en échange, produisait les vitamines nécessaires à la croissance de *D. tiedjei* afin qu'elle puisse effectuer la déshalogénation. La souche *Methanospirillum sp.* était aussi en relation avec ces deux dernières souches en consommant l'hydrogène présent, généré par BZ-2, et en produisant également des vitamines nécessaires à *D. tiejei*. Maymò-Gatell *et al.* (1997) ont, pour leur part, démontré que durant la déshalogénation réductrice du tétrachloroéthène, une

bactérie en forme de bâtonnet fournissait un ou des nutriments, autre que l'hydrogène, à la souche "*Dehalococcoides ethenogenes*" (dénomination non validée). De telles coopérations bactériennes sont très difficiles à étudier et à mettre en évidence d'où le faible nombre d'exemples présents dans la littérature.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 PROVENANCE DE LA SOUCHE 7

La souche 7 a été isolée en milieu liquide à partir d'une coculture des souches 6 et 7 (Letowski, 2000). Cette dernière coculture a elle-même été préalablement obtenue à partir du consortium méthanogène de Beaudet *et al.* (1986) capable de minéraliser complètement le phénol en méthane et en CO_2. La souche 7 a été conservée par repiquages périodiques en milieu liquide anaérobie dans des bouteilles sérologiques (section 2.3.2). Des observations microscopiques ont été effectuées périodiquement pour s'assurer de la pureté des cultures. Également, cette souche a été conservée sous forme lyophilisée.

2.2 AUTRES MICRO-ORGANISMES UTILISÉS

2.2.1 Coculture des souches 6 et 7

La coculture capable de transformer le phénol en acide benzoïque en conditions strictement anaérobies a été initialement décrite comme une culture pure de la souche 6 (Li et al., 1996) . Toutefois, il a été démontré par Letowski (2000) qu'elle était constituée de deux souches: la souche 6 de type *Clostridium* et la souche 7 qui est probablement un nouveau genre et une nouvelle espèce bactérienne. Cette coculture a été utilisée comme témoin positif de l'activité de transformation tout au long de ces travaux.

2.2.2 Souche 6

La souche 6 isolée en culture pure sur milieu solide a été utilisée (Letowski, 2000). Cette souche a été conservée par repiquages périodiques dans un milieu liquide anaérobie. Des

observations microscopiques ont été effectuées périodiquement pour s'assurer de la pureté des cultures.

2.2.3 *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1

La souche PCP-1 anaérobie stricte a été fournie par le laboratoire du Dr. Réjean Beaudet (INRS-IAF, Groupe de recherche en microbiologie de l'environnement). L'inoculum utilisé provenait d'une culture de maintien en milieu anaérobie liquide (Lanthier, 1999).

2.2.4 *Enterococcus faecalis*

Cette souche anaérobie facultative a été fournie par le laboratoire du Dr. Richard Villemur (INRS-IAF, Groupe de recherche en microbiologie de l'environnement). Elle a été fournie sous forme de colonies sur gélose "Brain Heart Infusion" (BHI) (Laboratoires Difco, Détroit, MI) obtenues après incubation en présence d'oxygène et conservation à 4°C. Ces colonies ont été cultivées, par la suite, en milieu BHI liquide à 37°C à la noirceur et avec agitation de manière à obtenir une culture en phase de croissance logarithmique avant que la souche soit utilisée en anaérobiose.

2.2.5 *Clostridium butyricum* M-55

La souche *Clostridium butyricum* M-55 isolée du sol dans le laboratoire du Dr Fredette (IAF) a été fournie sous forme lyophilisée. Cette souche a été inoculée, en condition d'anaérobiose stricte à 37°C, dans un milieu riche à base de viande (section 2.4.1) jusqu'à l'obtention d'une turbidité dans le milieu de culture.

2.3 CONDITIONS STANDARDS DE CULTURE

2.3.1 Milieu de culture liquide BM

Le milieu minéral anaérobie de Boyd *et al.* (1983) additionné de protéose peptone no 3 (Laboratoires Difco) a été utilisé (milieu de Boyd modifié ou milieu BM). Pour préparer celui-ci, les composés suivants ont été ajoutés à un litre d'eau: 0,27 g de KH_2PO_4 (Baker, Phillipsburg, NJ), 0,35 g de K_2HPO_4 (Fluka Biochemika, Switzerland), 0,53 g de NH_4Cl (Fisher, Montréal, Qué), 0,1 g de $MgCl_2 \bullet 6H_2O$ (Fluka Biochemika), 0,073 g de $CaCl_2 \bullet 2H_2O$ (Anachemia, Montréal, Qué), 0,02 g de $FeCl_2 \bullet 4H_2O$ (Anachemia) et 0,001 g de résazurine (BDH Chemicals, Toronto, Ont), un indicateur de potentiel rédox. Également, 6,25 ml/L de NaOH 1N et 10 ml/L d'une solution de minéraux en trace ont été ajoutés à ce milieu de culture. Cette solution de minéraux en trace contenait, par litre: 0,1 g de $MnCl_2 \bullet 4H_2O$, 0,1 g de $ZnCl_2$, 0,1g de $CoCl_2 \bullet 6H_2O$, 0,1g de H_3BO_3 et 0,1g de $Na_2MoO_4 \bullet 2H_2O$. Le milieu a été additionné de 0,5% (p/v) de protéose peptone no 3 comme source de carbone. Pour chasser l'oxygène, le milieu a été bouilli 20 minutes dans un ballon à fond plat branché à une colonne réfrigérante afin de limiter l'évaporation. Le milieu a ensuite été transféré dans des bouteilles sérologiques de 100 ml (Wheaton, Millville, NJ), à raison de 70 ml par bouteille et a été barboté avec un mélange gazeux contenant 10% H_2: 80% N_2: 10% CO_2 (Praxair, Ontario) pendant 5 minutes. Les bouteilles ont ensuite été hermétiquement fermées avec des bouchons de butyl (Bellco, Vineland, NJ) sous le jet continuel du mélange de gaz et scellées avec un anneau d'aluminium (Tompkins seal, Pottstown, PA). Les milieux ont ensuite été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Après que les milieux aient été refroidis, ces derniers ont été complétés en ajoutant, par bouteille, 1 ml d'une solution de $NaHCO_3$ 10% (p/v) (BDH), 0,35 ml d'une solution de vitamines (Wolin, Wolin et Wolfe, 1963) et 0,5 ml d'une solution de $Na_2S \bullet 9H_2O$ 7% (p/v) (Anachemia), ce dernier étant un agent permettant de réduire le potentiel rédox du milieu. Les milieux étaient prêts à être utilisés 24 heures après l'ajout de l'agent réducteur. La solution de vitamines (Wolin, Wolin et Wolfe, 1963) utilisée dans ce milieu était composée de 4 mg/L de biotine, 4 mg/L d'acide folique, 20 mg/L de pyridoxine, 10 mg/L de riboflavine, 10 mg/L de

thiamine, 10 mg/L d'acide nicotinique, 10 mg/L d'acide pantothénique, 0,2 mg/L de vitamine B12, 10 mg/L d'acide *p*-aminobenzoïque et 10 mg/L d'acide thioctique. Ces solutions avaient toutes été barbotées afin de les désoxygéner et avaient été préalablement stérilisées à l'aide d'un filtre de porosité de 0,2 µm (Nalgene, Rochester, NY). Finalement, le phénol ou l'acide 4-hydroxybenzoïque (Sigma-Aldrich Oakville, Ont) a été ajouté aux milieux de culture à une concentration finale de 1,6 à 2 mM.

Il est à noter que tout au long des expériences le mélange gazeux contenant 10% H_2: 80% N_2: 10% CO_2 (Praxair) a été utilisé pour barboter les milieux de culture. Également, les milieux ont tous été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

2.3.2 Conditions de culture de la souche 7

La souche 7 a été cultivée dans 70 ml de milieu BM tel que décrit ci-dessus. Les cultures ont été incubées à 37°C à l'obscurité et sans agitation. Un volume de 2 ml d'une culture liquide de la souche 7 ayant complété l'activité de transformation (présence uniquement d'acide benzoïque dans la culture) a été utilisé comme inoculum (3% v/v). Ce dernier a été ajouté à l'aide d'une seringe stérile (Becton-Dickenson, Cockeysville, MD) de manière à toujours conserver l'anaérobiose. Les conditions de culture telles que décrites ici constituent les conditions dites standards, appellation qui sera retrouvée tout au long de ce travail. Tous les essais présentés au cours de ce mémoire ont été effectués en duplicata. Pour maintenir la souche 7, cette dernière a été repiquée périodiquement dans 70 ml de milieu BM. Les transferts ont été effectués lorsque la transformation de l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque était complétée, soit après environ 10 jours d'incubation à 37°C en absence de lumière. Tel qu'il le sera décrit plus loin dans le texte, quelques mois après le début des travaux, le milieu de maintenance de la souche 7 (BM) a été remplacé par un milieu contenant 25 ml de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 ainsi que 45 ml de milieu BM (voir section 2.6.3.2).

2.3.3 Culture de la souche 6 et de la coculture

La souche 6 isolée ainsi que la coculture (souches 6 et 7) ont été cultivées dans le milieu BM dans les conditions identiques à celles décrites pour la culture de la souche 7 à la section précédente. Toutefois, le milieu de culture ne contenait ni phénol ni acide 4-hydroxybenzoïque.

2.3.4 Culture de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1

La souche PCP-1 a été cultivée en milieu BM contenant, en plus du protéose peptone, 55mM de pyruvate de sodium (Mallinckrodt, Paris, KY) comme source de carbone, ce dernier étant essentiel à cette souche. Également, la concentration de l'agent réducteur dans le milieu de culture était 10 fois inférieure (0,05 g/L) à celle retrouvée en conditions standards (0,5 g/L). Il n'y avait pas d'acide 4-hydroxybenzoïque ou de phénol dans ces cultures.

2.3.5 Culture d'*Enterococcus faecalis* et de *Clostridium butyricum*

Les souches d'*Enterococcus faecalis* et de *Clostridium butyricum* ont toutes deux été cultivées en milieu BM sous les conditions standards de culture mais sans acide 4-hydroxybenzoïque ou phénol dans les cultures et avec une concentration de Na_2S 10 fois moindre (0,05 g/L).

2.4 CULTURE EN MILIEUX PROTÉIQUES RICHES

2.4.1 Milieu à base de viande hachée

Le milieu a été préparé selon la recette dans le guide "Anaerobe laboratory manual" (Holdeman, Cato et Moore, 1977). Une quantité de 500 g de boeuf haché extra maigre a été utilisée et mélangée à un litre d'eau distillée et à 25 ml de NaOH 1N. Ce mélange a été porté à ébullition tout en agitant. Par la suite, ce dernier a été refroidi à 4°C de

manière à ce que le gras de la viande se solidifie. Puis, tout ce gras solide a été enlevé. Les morceaux de viande ont ensuite été séparés du liquide par filtration sur cotton fromage. La viande a été mise de côté. Le liquide, pour sa part, a subit une première filtration, sous vide, sur deux épaisseurs de papier absorbant Kimwipes EXL (Kimberly-Clark, Roswell, GA) suivi d'une deuxième filtration sur un papier filtre no 5 de 90 mm de diamètre (Whatman, England) de manière à se débarasser de tous les solides en suspension. Le filtrat obtenu a été complété à 1 litre avec de l'eau distillée et ensuite les composés suivants ont été ajoutés sous agitation: 30 g de peptone (BBL Beckton Dickinson, Cockeysville, MD), 5 g d'extrait de levure (Difco Laboratories), 5 g de K_2HPO_4 et 0,5 ml d'une solution de résazurine 0,2% (p/v). Ce mélange a ensuite été bouilli et puis refroidi sur glace et 0,5 g de L-cystéine $HCl \bullet H_2O$ (Baker) a été ajouté. Lorsque le liquide a atteint la température ambiante, le pH de ce dernier a été ajusté à 7, avec du NaOH 1N, sous jet gazeux. Finalement, le liquide a été bouilli durant 20 minutes de manière à chasser l'oxygène. Pendant ce temps, la viande hachée a été distribuée dans les bouteilles sérologiques de 100 ml de façon approximative en considérant le rapport suivant : une part de viande pour cinq parts de liquide. Le liquide bouilli a ensuite été réparti dans les bouteilles contenant la viande : certaines bouteilles ont reçu 70 ml de liquide alors que d'autres en ont reçu 25 ml. Ces milieux ont été barbotés 5 minutes. Les bouteilles ont été fermées hermétiquement avec des bouchons de butyl sous le jet continuel du mélange de gaz et scellées avec un anneau d'aluminium. Les milieux ont finalement été stérilisés. Les milieux contenant 25 ml de milieu de viande hachée (36% du milieu total) ont été complétés jusqu'à 70 ml avec du milieu BM. L'acide 4-hydroxybenzoïque a été ajouté aux milieux à une concentration finale de 2 mM.

2.4.2 Milieu à base de foie de boeuf

Le milieu a été préparé selon la recette dans le guide "Anaerobe laboratory manual" (Holdeman, Cato et Moore, 1977). Une quantité de 500 g de foie de boeuf a été coupée en petit morceaux et ajoutée à un litre d'eau provenant du robinet. Ce mélange a ensuite été placé à 4°C durant la nuit. Le lendemain, le mélange a été chauffé à 121°C pendant 10 minutes à l'autoclave. Par la suite, la viande a été séparée du liquide par filtration sur

cotton fromage. La viande a été mise de côté. Le liquide a été refroidi sur glace et les composés suivants ont été ajoutés tout en agitant: 10 g de peptone et 1 g de K_2HPO_4. Le pH du liquide a été ajusté à 8 avec du NaOH 1N. Le liquide a été centrifugé 10 minutes à 18 480 x g pour se débarasser des matières en suspension et filtré sur un papier filtre no 5 90 mm de diamètre. Le tout a été complété à un litre avec de l'eau provenant du robinet et bouilli 20 minutes. Les morceaux de foie ont été distribués dans les bouteilles tel que décrit plus haut pour la viande hachée. Toutefois, environ 0.1 g de $CaCO_3$ (Sigma-Aldrich) a été ajouté dans chacune des bouteilles avant d'y mettre le liquide bouilli. Le reste de la procédure est identique à celle décrite plus haut (section 2.4.1).

2.4.3 Milieu "Luria Broth" (LB)

Le milieu LB a été préparé en mélangeant 10 g de Bacto-Tryptone (Difco), 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl (Fisher) dans 900 ml d'eau déionisée. Ensuite, le pH du milieu a été ajusté à 7 avec du NaOH 1N et le volume a été complété à 1 litre. Finalement, le milieu a subit les mêmes traitements que le milieu BM de manière à le rendre anaérobie (voir section 2.3.1) et il a été stérilisé. Environ 2 mM d'acide 4-hydroxybenzoïque ont été ajoutés aux milieux de culture ainsi que 0,5 g/l de $Na_2S \bullet 9H_2O$.

2.4.4 Milieu "Brain Heart Infusion" (BHI)

Le milieu commercial "Brain Heart Infusion" (Difco) a été utilisé. Trente-sept grammes de ce produit ont été ajoutés à un litre d'eau déionisée. Le milieu résultant a été traité de la même manière que le milieu BM afin de le rendre anaérobie et stérile (section 2.3.1). L'acide 4-hydroxybenzoïque (concentration finale de 2 mM) a été ajouté à ce milieu.

2.5 CULTURE EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS SUPPLÉMENTS PROVENANT D'ENVIRONNEMENTS COMPLEXES

2.5.1 Lisier de porc

Le lisier de porc a été prélevé en profondeur (environ à 6 pieds) dans une fosse à liser (St-Janvier, Québec) à l'aide d'une perche ayant une bouteille à son extrémité de manière à préserver l'anaérobiose. Par la suite, le lisier a été conservé à 4°C dans des bouteilles sérologiques scellées, sous une atmosphère gazeuse de 10% H_2: 80% N_2: 10% CO_2. Le surnageant de ce lisier de porc a servi de supplément dans certains milieux de culture. Le surnageant a toujours été préparé sous des conditions d'anaérobiose stricte. Le lisier de porc a été transféré dans une bouteille à centrifugation de 500 ml (Beckman Instruments, Fullerton, CA) dans une chambre anaérobie modèle 1024 (Forma Scientific, Marietta, OH), enceinte où le mélange gazeux présent était de 10% de H_2, 10% de CO_2 et 80% de N_2. Il est à noter que les bouteilles à centrifugation ont été placées dans la chambre anaérobie au moins 24 heures avant l'utilisation de manière à ce qu'elles soient très bien désoxygénées. Le lisier a été centrifugé dans des conditions anaérobies à 4°C pendant 30 minutes à 18 480 x g dans un rotor JLA-10.500 (Beckman Instruments) à l'aide d'une centrifugeuse Beckman Aventi JA-25 (Beckman Instruments). Le surnageant a été recueilli dans l'enceinte anaérobie et a été distribué dans des bouteilles sérologiques de 100 ml. Les bouteilles ont été hermétiquement fermées avec des bouchons de butyl et scellées avec un anneau d'aluminium. Le surnageant a finalement été stérilisé. Les milieux de culture testés contenant ce surnageant étaient composés de 45 ml de milieu BM, de 25 ml de surnageant de lisier de porc (36% (v/v) du milieu total) et de 2 mM d'acide 4-hydroxybenzoïque. Le pH des cultures a été ajusté à 7,0-7,5 avec du NaOH 1N stérile et désoxygéné avant l'inoculation de la souche 7 (inoculum 3% (v/v)).

2.5.2 Liquide du rumen

Le liquide du rumen utilisé (liquide prélevé de la première poche de l'estomac des ruminants) provenait de la "vache hublot" de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec. Ce liquide a été conservé à 4°C dans des bouteilles sérologiques scellées sous une atmosphère gazeuse de 10% H_2: 80% N_2: 10% CO_2. La même procédure que celle décrite ci-haut pour le lisier de porc a été utilisée pour obtenir le surnageant anaérobie et stérile et pour préparer les milieux de culture.

2.5.3 Boue d'un digesteur anaérobie

La boue granulaire du digesteur anaérobie à lit fluidisé de la compagnie alimentaire Champlain (Champlain Industries, Cornwall, Ontario) a été prélevée sous des conditions d'anaérobiose stricte et a été conservée à 4°C. Cette boue nous a été fournie par le laboratoire du Dr Serge Guiot de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (Montréal, Québec). Le surnageant de cette boue ainsi que les milieux de cultures ont été préparés suivant la même procédure que celle décrite en 2.5.1 pour le lisier de porc.

2.5.4 Extrait de terre

L'extrait de la terre prélevée du terrain d'un domicile privé (Monsieur Guy McSween, Laval) a été préparé en ajoutant 300 g de terre à 1 litre de milieu minéral Bushnell-Haas (Difco). Ce mélange a été bouilli 30 minutes de manière à libérer la matière organique et a ensuite été autoclavé à 121°C durant 20 minutes. Une fois refroidi, ce mélange a été centrifugé à 739 x g pendant 20 minutes. Le surnageant obtenu après la centrifugation a été récupéré stérilement. Cet extrait de terre a été conservé à 4°C.

Le surnageant de cet extrait de terre a été obtenu suite à une centrifugation de 30 minutes à 18 480 x g à 4°C. Le surnageant a été bouilli 20 minutes dans un ballon à fond plat branché à une colonne réfrigérante avant d'être distribué dans des bouteilles sérologiques

de 100 ml et barboté 15 minutes. Les bouteilles ont ensuite été fermées avec un bouchon de butyl et autoclavées. Tout comme les autres composantes ci-dessus (sections 2.5.1, 2.5.2 et 2.5.3), le surnageant d'extrait de terre a servi de supplément dans le milieu de culture a raison de 25ml (36% (v/v) du milieu total) pour 45 ml de milieu BM.

2.6 CULTURE DE LA SOUCHE 7 EN PRÉSENCE DE LA SOUCHE 6 VIVANTE OU MORTE OU DANS UN SURNAGEANT DE CULTURE DE LA SOUCHE 6

2.6.1 Reconstitution de la coculture des souches 6 et 7

Tous les milieux de culture utilisés dans cette expérience ont été des milieux BM standards avec une concentration finale d'acide 4-hydroxybenzoïque de 1,6 mM. Des bouteilles contenant 70 ml de milieu ont reçu 100 µl d'une culture de la souche 6 en phase de croissance exponentielle ainsi qu'un volume de 2, 5 ou 10 ml (3, 7 ou 14 % (v/v)) d'une culture liquide de la souche 7 où la transformation de l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque était complétée. D'autres bouteilles ont été inoculées avec soit 100 µl de la souche 6 en phase exponentielle ou 2 ml de la culture de la souche 7 (3% v/v).

2.6.2 Préparation du surnageant d'une culture de la souche 6

Une culture de la souche 6 a été incubée jusqu'à l'obtention d'une turbidité facilement détectable, soit après environ 5 à 7 jours d'incubation à 37°C. Cette culture a été centrifugée à 18 480 x g dans un appareil Beckman Aventi J-25 dans des conditions anaérobies pendant 20 minutes à 4°C dans un rotor JLA-10.500. Le surnageant de cette culture a été recueilli puis filtré sur une membrane de 0,45µm (Nalgene) à l'intérieur d'une enceinte anaérobie. Par la suite, le surnageant a été stérilisé à l'aide d'une seringue désoxygénée et d'une unité filtrante Sterivex-GV 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) reliée à une aiguille qui était plantée dans une bouteille sérologique stérile et fermée

hermétiquement avec un bouchon de butyl. Des volumes de 70 ml de surnageant ont été mis dans des bouteilles et ont servi comme milieu de culture. Pour remédier à la perte, suite aux manipulations, de CO_2 et du précipité de FeS qui étaient présents dans la culture de la souche 6, 1 ml d'une solution de $NaHCO_3$ 10% (p/v) et 100 µl d'une solution de $FeCl_2$ 1% (p/v) ont été ajoutés à chacune des bouteilles contenant le surnageant. L'acide 4-hydroxybenzoïque a été ajouté aux milieux à une concentration finale de 2 mM. Avant l'inoculation de la souche 7 (3% (v/v)), le pH de la culture a été ajusté à 7,0-7,3 avec du NaOH 1N stérile et désoxygéné.

Un essai a également été effectué où le milieu de culture était composé de 35 ml de surnageant stérile d'une culture de la souche 6 (tel que décrit ci-haut) et de 35 ml de milieu BM réduit. Ce milieu contenait également une concentration finale d'environ 2 mM d'acide 4-hydroxybenzoïque et le pH a aussi été ajusté à 7,0-7,3.

2.6.3 Utilisation de la culture autoclavée de la souche 6

2.6.3.1 Culture complète

Après une incubation de 5 à 7 jours à 37 °C, une culture de la souche 6 a été autoclavée 20 minutes à 121°C en conservant l'anaérobiose. Un volume de 25 ml de cette culture autoclavée (36% (v/v) du milieu total) a été ajouté en conditions anaérobies et stérilement à 45 ml de milieu BM. L'acide 4-hydroxybenzoïque a été ajouté à ce milieu de culture à une concentration finale de 1,6 mM. Le pH a été ajusté à 7,1-7,3 avec du NaOH 1N stérile et désoxygéné.

Afin de vérifier l'effet du double autoclavage sur le milieu BM (premier autoclavage lors de la stérilisation du milieu au moment de la préparation et deuxième lors de l'autoclavage de la culture de la souche 6 après incubation), un témoin négatif a été inclus à l'essai. Ce dernier a été constitué de 45 ml de milieu BM, comme pour l'ensemble des autres milieux, et de 25 ml de milieu BM non inoculé mais autoclavé deux fois pendant 20 minutes à 121°C.

2.6.3.2 Surnageant ou culot de la culture

Deux cultures de la souche 6, après une incubation de 5 jours à 37°C, ont été autoclavées en conservant l'anaérobiose. Après le refroidissement, ces cultures ont été jumelées dans une bouteille à centrifugation de 500 ml désoxygénée, dans une chambre anaérobie. Par la suite, ces cultures ont été centrifugées en conditions anaérobies pendant 30 minutes à 18 480 x g à 4°C dans un rotor JLA-10.500 à l'aide d'un appareil Beckman Aventi J-25. Après cette centrifugation, le surnageant a été récupéré dans une bouteille sérologique non stérile, toujours dans l'enceinte anaérobie, par décantation et passage sur cotton fromage (de façon à retenir les légères particules du précipité de FeS qui restent difficilement au fond). Cette bouteille a été scellée avec un bouchon de butyl et autoclavée de manière à stériliser le surnageant nouvellement obtenu de la culture autoclavée de la souche 6. Pour ce qui est du culot de la culture autoclavée de la souche 6, ce dernier a été resuspendu, sans être lavé, dans 60 ml de milieu BM dans la chambre anaérobie et cette suspension a été transférée dans une bouteille sérologique non stérile qui a été scellée au moyen d'un bouchon de butyl. Finalement, cette suspension a été autoclavée.

Comme pour les autres cas vus précédemment, les milieux de culture étaient composés de 25 ml de l'un des ajouts préparés ci-haut et de 45 ml de milieu BM. L'acide 4-hydroxybenzoïque a été ajouté aux milieux à une concentration finale d'environ 1,75 à 2,0 mM. En dernier lieu, le pH des milieux a été ajusté, en anaérobiose, à 7,1-7,3 avec du NaOH 1N stérile et désoxygéné.

2.7 CULTURE AVEC DES SURNAGEANTS DE CULTURES AUTOCLAVÉES DE DIFFÉRENTES SOUCHES BACTÉRIENNES

Des surnageants de cultures autoclavées de d'autres souches bactériennes différentes de la souche 6 (*Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, *Enteroccocus faecalis* et *Clostridium butyricym* M-55) ont été ajoutés au milieu BM. Pour ce faire, les cultures de ces souches

ont été incubées, à la noirceur et sans agitation, à 37 °C pendant 4 à 6 jours. Ces cultures ont ensuite été autoclavées en anaérobiose. Le surnageant de ces cultures autoclavées a été obtenu et récupéré en anaérobiose suivant exactement la même procédure que pour la culture de la souche 6 autoclavée (section 2.6.3.2). Toutefois, dans ces cas, le culot obtenu après centrifugation n'a pas été récupéré et a été jetté. Finalement, les milieux de culture dans cette expérience ont aussi été constitués de 36% (v/v) du surnageant des cultures autoclavées et ont été préparés tel que décrit à la section 2.6.3.2.

2.8 AUTRES CONDITIONS DE CULTURE

2.8.1 Sources de carbone

Dans une expérience visant à tester différentes sources de carbone, le protéose peptone a été remplacé, dans le milieu BM, par 0,5% (p/v) de glucose (Baker), 0,5% (p/v) de fructose (Baker), 0,5% (p/v) de maltose (Difco) ou 55 mM de pyruvate de sodium (Mallinckrodt) comme seule source de carbone.

2.8.2 Température d'incubation

Une expérience avait pour but de déterminer la température d'incubation optimale de la souche 7. Dans ce cas, les différentes cultures en milieu BM ont été incubées à 4, 21, 29, 37, 42 ou 55°C.

2.8.3 Augmentation de la concentration du fer et des minéraux en trace

Dans un essai, la concentration en fer dans le milieu BM a été doublée (0,04 g/l). Pour ce faire, un volume de 0,14 ml d'une solution de $FeCl_2$ 1% (p/v) désoxygénée a été ajouté stérilement à un milieu de culture BM (70 ml). Également, dans un autre essai, la concentration finale des minéraux en trace a été doublée (environ 0,029g/l) dans le milieu. Cette fois, un volume de 0,7 ml de la solution de minéraux en trace 0,1g/l (section 2.3.1) désoxygénée et stérile a été ajouté au milieu de culture BM (70 ml).

2.8.4 Variation de la concentration de l'acide 4-hydroxybenzoïque

Dans cet essai, la concentration finale de l'acide 4-hydroxybenzoïque a varié dans les différentes cultures. Les milieux de culture étaient composés de 45 ml de milieu BM et de 25 ml de surnageant de culture autoclavée de la souche 6 tel que décrit à la section 2.6.3.2. Les différentes concentrations finales obtenues ont été de 0,8, 1,6, 3,25 et 6,5 mM d'acide 4-hydroxybenzoïque ce qui représente respectivement 0,5, 1, 2 et 4 fois la concentration standard habituellement retrouvée dans les cultures.

Le milieu à une concentration de 6,5 mM d'acide 4-OHB a reçu, à l'aide d'une seringue, 11,2 ml d'une solution de 40 mM d'acide 4-hydroxybenzoïque désoxygénée et stérile. Les autres milieux ont reçu un volume inférieur de la solution d'acide 4-hydroxybenzoïque (1,4, 2,8 et 5,6 ml pour les milieux à 0,5, 1 et 2 fois la concentration) mais ont également reçu un certain volume d'eau déionisée désoxygénée et stérile de façon à ce que le volume total ajouté soit 11,2 ml. Ainsi, le facteur de dilution a été le même pour tous les milieux de culture.

2.8.5 Ajout de coenzyme A dans les milieux de culture

Afin de voir l'implication possible du coenzyme A dans la voie métabolique de transformation du phénol par la souche 7, le coenzyme A a été ajouté aux milieux de culture. Une solution de 6 mM de coenzyme A-SH (réduit) sous forme de sel (Sigma-Aldrich) a été préparée et stérilisée par filtration sur une membrane 0,22 µm. Un volume de 0,25 ml de cette solution a été ajouté par bouteille sérologique (70 ml) de manière à obtenir une concentration finale de 0,02 mM de CoA-SH. Différents milieux de culture ont été utilisés dans cette expérience: le milieu BM standard, le milieu BM additionné de surnageant de culture autoclavée de la souche 6 et le milieu BM additionné de surnageant d'une culture autoclavée de *Clostridium butyricum* (section 2.7). L'acide 4-hydroxybenzoïque a été ajouté à une concentration finale d'environ 1,6 mM. Avant inoculation avec la souche 7 (inoculum 3% v/v), le pH de tous les milieux a été ajusté à 7,1-7,3 avec du NaOH 1N ou du HCl 1N stérile.

2.8.6 Ajout de sulfites et de sulfates aux milieux de culture

Afin de vérifier le rôle possible des sulfites et des sulfates comme accepteurs terminaux d'électrons, des quantités croissantes de ces deux composés ont été ajoutées aux milieux de culture de la souche 7. Une première série d'expériences a été faite avec des milieux BM où le protéose peptone avait été remplacé par 0,5% (p/v) d'extrait de levure. Des concentrations finales de 0,25, 0,5 et 1 mM de sulfites ont été obtenues en ajoutant respectivement 0,125, 0,25 ou 0,5 ml d'une solution anaérobie et stérile de Na_2SO_3 2% (p/v) aux bouteilles contenant 70 ml de milieu. Aussi, des volumes de 0,1 et 0,25 ml d'une solution de Na_2SO_3 20% (p/v) ont été respectivement ajoutés afin d'obtenir des concentrations finales de 2 et 5 mM. Pour les sulfates, les mêmes concentrations finales ont été utilisées. Un inoculum de 3% (v/v) provenant d'une culture liquide de la souche 7 a été utilisé.

Dans une deuxième série d'expérience, un autre milieu de culture a été utilisé. Ce dernier était composé de 25 ml de surnageant de culture autoclavée de la souche 6 et de 45 ml de milieu BM standard. Les mêmes concentrations de sulfites ou de sulfates, telles que décrites ci-haut, ont été ajoutées à ce milieu de culture en utilisant les solutions de Na_2SO_3 2 ou 20% et Na_2SO_4 2 ou 20% préparées précédemment. Ces deux expériences ont été effectuées en parallèle, c'est donc dire que le même inoculum (3% (v/v)) de la souche 7 a été utilisé pour inoculer ces milieux.

2.9 SENSIBILITÉ À L'OXYGÈNE DU SURNAGEANT D'UNE CULTURE AUTOCLAVÉE DE LA SOUCHE 6

2.9.1 Oxygénation du surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6

Une culture de la souche 6, après 6 jours d'incubation à 37°C à la noirceur et sans agitation, a été autoclavée en condition d'anaérobiose. Le surnageant de cette culture autoclavée a été récupéré en anaérobiose dans une bouteille sérologique (section 2.6.3.2)

mais n'a pas été stérilisé. Ce surnageant a, par la suite, été exposé à l'oxygène en le barbotant 10 minutes avec de l'air sous la hotte chimique étant donné le dégagement de H_2S. Après cette oxygénation, le surnageant a été autoclavé afin de retrouver la stérilité. Ce dernier a ensuite été barboté 10 minutes sous la hotte à flux laminaire de manière à le rendre à nouveau anaérobie puis la bouteille a été fermée avec un bouchon de butyl et un anneau d'aluminium. Finalement, 0,5 ml d'une solution de $Na_2S \bullet 9H_2O$ 7% (p/v) a été ajouté de manière à réduire à nouveau le surnageant. Une fois réduit, ce surnageant a été ajouté (25 ml) stérilement à 45 ml de milieu BM et le tout a servi de milieu de culture pour la souche 7 (3% (v/v) d'inoculum).

2.9.2 Témoin de traitement

Le surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 a subi les mêmes traitements que ceux décrits à la section 2.9.1 en conservant toutefois toujours l'anaérobiose donc sans être soumis à l'étape de l'oxygénation. Ce surnageant a servi de témoin afin de vérifier l'effet des traitements subis autre que l'oxygénation.

2.10. EXTRACTIONS DE SURNAGEANTS DE CULTURES AUTOCLAVÉES DE LA SOUCHE 6 OU DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*

2.10.1 Extraction du surnageant

Les surnageants de cultures autoclavées de la souche 6 et de *Clostridium butyricum* ont été préparés tel que déjà décrit (sections 2.6.3.2). Ces surnageants anaérobies et stériles ont, par la suite, été extraits à l'aide de solvants organiques. Les extraits (phases organiques) et les phases aqueuses épuisées ont servi dans la préparation des milieux de culture. La procédure d'extraction a été exactement la même pour les deux types de surnageants.

Un volume de 40 ml de surnageant a été exposé à l'oxygène et transvidé dans une ampoule à décantation. Un volume de 10 ml d'éther froid ("ultra resi-analyzed", Mallinckrodt) a été ajouté et l'ampoule a été agitée très fortement pendant environ 15 secondes. L'ampoule à décantation a ensuite été déposée sur un support de manière à ce que la phase organique remonte sur le dessus. Étant donné la très forte émulsion, la phase organique a été récupérée et centrifugée 5 minutes à 1000 x g de manière à complètement la séparer de la phase aqueuse. La phase organique a été mise de côté et la phase aqueuse a été extraite encore deux fois de la même manière. Les trois phases organiques récupérées ont ensuite été jumelées et asséchées avec environ 300 mg de Na_2SO_4 (Fisher, Montréal, Qc) pendant 20 minutes. Le solvant organique a ensuite été évaporé sous vide dans un ballon de 100 ml à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotovapor, Büchi). Le résidu d'évaporation a été solubilisé dans 30 ml de milieu BM en utilisant les ultrasons. Cette solution a été bouillie 15 minutes et barbotée sous jet gazeux pendant 5 minutes dans une bouteille sérologique de 100 ml de manière à la rendre anaérobie. Après, la bouteille a été scellée à l'aide d'un bouchon de butyl et autoclavée.

La phase aqueuse "épuisée" a aussi été traitée et récupérée. Cette dernière a d'abord été barbotée sous la hotte chimique à l'aide d'azote (Praxair) environ 25 à 30 minutes de manière à favoriser la volatilisation de l'éther. Le liquide a ensuite été bouilli 15 minutes et barboté 5 à 10 minutes sous jet gazeux dans une bouteille sérologique pour le rendre anaérobie. Puis, il a été autoclavé et après refroidissement, a été réduit avec 0,2 ml de Na_2S-$9H_2O$ 7% (p/v).

Dans le but de constituer un témoin de traitement, le surnageant a été traité en suivant exactement la même procédure que celle utilisée pour la phase aqueuse sans toutefois avoir été en contact avec le solvant organique.

2.10.2 Milieux de culture

Les extraits et phases aqueuses de la souche 6 et de *Clostridium butyricum* obtenus précédemment ont été utilisés pour préparer les milieux de culture pour la souche 7. Un

volume de 25 ml de l'un de ces derniers a été ajouté stérilement à 45 ml de milieu BM pour donner un milieu de culture final de 70 ml. L'acide 4-hydroxybenzoïque a été ajouté à une concentration finale de 1,7 mM. Le pH des milieux a été ajusté en anaérobiose à 7,0-7,2.

2.10.3 Autres essais d'extraction

L' expérience décrite aux sections 2.10.1 et 2.10.2 a été reprise mais en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant organique plutôt que l'éther. Cette expérience a aussi été répétée en extrayant cette fois les surnageants à pH 2 plutôt qu'à pH 7 comme dans les autres essais. Dans ce cas, la phase aqueuse a été neutralisée par la suite à pH 7,0-7,2 avant utilisation.

2.11 FRACTIONNEMENT DU SURNAGEANT D'UNE CULTURE AUTOCLAVÉE DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*

2.11.1 Préparation de la membrane

Une cellule Amicon de 50 ml et de 43 mm de diamètre (Amicon, Danvers, MA) a été utilisée avec une membrane 1K 43 mm (1000 Da , Pall Filtron, É-U.). La membrane a été placée dans la cellule et a été lavée trois fois, sous agitation, avec 50 ml d'eau déionisée sous pression d'azote (30 psi) à 4°C. Après ces lavages, environ 10 ml d'eau déionisée ont été laissés dans la cellule et cette dernière a été mise dans une jarre anaérobie, munie d'un système de sortie (pour le vide) et d'entrée de gaz (Quelab, Montréal, Québec). La jarre a été déposée sur une plaque agitatrice et reliée à un système de vide et à une bombonne de gaz. Des lavages avec le mélange gazeux 10% H_2: 80% N_2: 10% CO_2 ont été effectués en alternant la création du vide et l'entrée du mélange gazeux à l'intérieur de la jarre, et ce, en maintenant le liquide dans la cellule sous agitation. Ensuite, la jarre a été transférée dans l'enceinte anaérobie et la cellule a été sortie de la jarre et est restée dans l'enceinte anaérobie environ 18 heures de manière à être bien désoxygénée.

2.11.2 Préparation des fractions

Lors de l'utilisation de la cellule Amicon et de la membrane, l'eau déionisée qui restait a été remplacée par 50 ml du surnageant de la culture autoclavée de *Clostridium butyricum* (voir section 2.7). La cellule a ensuite été transférée, en maintenant toujours des conditions anaérobies, à 4°C où elle a été branchée à un système fermé permettant au liquide de passer, sous agitation, à travers la membrane sous une pression d'azote (30 psi). Le liquide qui a passé à travers la membrane a été récupéré dans une bouteille sérologique scellée avec un bouchon de butyl et cette fraction représentait la fraction "inférieure à 1000 Da". Lorsqu'il restait 10 ml de surnageant dans la cellule, le système a été arrêté et 40 ml de milieu BM ont été ajoutés dans la cellule. La pression a ensuite été remise jusqu'à ce qu'il ne reste à nouveau que 10 ml dans la cellule. Ces 10 ml restant ont été récupérés et ont été dilués avec 30 ml de milieu BM. Cette fraction représentait la fraction "supérieure à 1000 Da". Les deux fractions ont été stérilisées.

2.11.3 Milieux de culture

Chacune des fractions obtenues à la section précédente a été utilisée pour préparer les milieux de culture pour la souche 7 et ce, dans les proportions de 25 ml pour 45 ml de milieu BM. D'autres milieux ont été préparés en mélangeant cette fois 12,5 ml de chacune des fractions à 45 ml de milieu BM. L'acide 4-hydroxybenzoïque a été ajouté aux milieux à une concentration finale de 1,6 mM. Le pH de tous les milieux de culture a été ajusté en anaérobiose à 7,5-7,6 avec du NaOH 1N stérile.

2.12 ESSAIS RELIÉS À LA VOIE MÉTABOLIQUE MINEURE DE TRANSFORMATION DU PHÉNOL EN PHÉNYLALANINE

Suite à l'identification de l'acide 3-phénylpropionique dans les milieux de culture contenant le surnageant d'une culture autoclavée de *Clostridium butyricum*, différents composés reliés à la voie métabolique mineure de transformation du phénol en phénylalanine (Lépine et al., 1996) ont été testés pour leur capacité à stimuler l'activité de

la souche 7. Tous les essais ont été réalisés en milieu BM (70 ml). Dans un premier essai, l'acide 3-phénylpropionique a été ajouté au milieu BM à une concentration finale de 0,45 mM en y mettant 2 ml d'une solution stérile de 17 mM. Dans un autre essai, la concentration en phénylalanine déjà présente dans le milieu BM (provenant du protéose peptone no 3) a été doublée en ajoutant 1 ml d'une solution stérile de 125 mM de L-phénylalanine (Sigma-Aldrich). Ceci a permis d'obtenir une concentration finale en phénylalanine dans le milieu, après l'ajout, de 2,5 mM. Le dernier essai a consisté à ajouter 2 ml d'une solution de 17 mM d'acide cinnamique (Sigma-Aldrich) au milieu BM de façon à obtenir une concentration finale de 0,45 mM. Le pH de tous les milieux a été ajusté à 7,0 - 7,2 avec du NaOH 1N ou du HCl 1N stériles et désoxygénés.

2.13 MICRO-COLONIES DE LA SOUCHE 7 EN MILIEU SEMI-SOLIDE 0,3 % (P/V) D'AGAR

2.13.1 Préparation des milieux semi-solides

Des milieux semi-solides 0,3% (p/v) d'agar ont été utilisés dans des tubes allongés de Veillon (8 X 200 mm) de façon à préserver l'anaérobiose. Pour les préparer, 0,225 g de "Bacteriological Agar" no 1 (Oxoid, Basingstoke, Angleterre) a été ajouté à 45 ml de milieu BM. Ce milieu a été chauffé à 100°C pendant 20 minutes dans un ballon à fond plat branché à une colonne réfrigérante de manière à éviter l'évaporation. Par la suite, le milieu a été barboté dans une bouteille sérologique de 100 ml pendant 20 minutes. La bouteille a ensuite été fermée hermétiquement avec un bouchon de butyl. Le tout a été autoclavé. À la sortie de l'autoclave, la bouteille a été transférée dans un bain-marie (Labline Inst. Inc.) à 45°C de manière à ce que l'agar ne se solidifie pas. Stérilement, à l'aide de seringues, 25 ml de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 (stérile et anaérobie, section 2.6.3.2) maintenus à une température de 45°C ainsi que 2.8 ml d'une solution d'acide 4-hydroxybenzoïque 40 mM ont été ajoutés à travers le bouchon de butyl. Le milieu, une fois complété, a été conservé dans le bain-marie à 45°C durant toute la nuit. Ce milieu a été appelé milieu semi-solide.

Le lendemain matin, un milieu liquide constitué de 25 ml de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 et de 45 ml de milieu BM a été inoculé stérilement avec 10 ml d'une culture liquide de la souche 7 montrant une transformation complète de l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque. Cette culture liquide nouvellement inoculée a été considérée comme la dilution 8^{-1} et elle a été incubée à 37°C et observée en parallèle pour suivre l'activité de transformation de la souche 7. Un volume de 10 ml de cette culture liquide a été transféré stérilement dans le milieu semi-solide conservé à 45°C (représente la dilution 8^{-2}). Ensuite, un volume de 10 ml de cette dilution 8^{-2} a été transféré stérilement dans un autre milieu semi-solide à 45°C et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution 8^{-8} en milieu semi-solide. Ces dilutions ont été maintenues dans le bain-marie à 45°C jusqu'au moment où elles ont été transférées dans les tubes de Veillon. Un volume de 7 ml du milieu semi-solide, prélevé stérilement et en anaérobiose, a été déposé, sous la hotte à flux laminaire, dans un tube Veillon stérile toujours sous un jet gazeux de 10% H_2: 80% N_2: 10% CO_2 stérile. Finalement, le tube a été scellé avec un bouchon de butyl (Fisher). Les tubes ont ensuite été entreposés à 4°C pendant 20 minutes de manière à permettre à l'agar de se solidifier avant d'être incubés à 37°C. Seules les cultures représentant les dilutions 8^{-4} à 8^{-8} ont été incubées. Cette procédure a été répétée trois fois pour une même dilution de façon à obtenir des triplicata.

2.13.2 Repiquage des micro-colonies

Après incubation des tubes Veillon à 37°C pendant environ 10 jours, des micro-colonies ont été obtenues dans la gélose semi-solide. Ces dernières ont été repiquées dans un milieu semi-solide frais. À partir du tube qui contenait environ 8 à 15 micro-colonies, une colonie a été prélevée sous jet gazeux 10% H_2: 80% N_2: 10% CO_2 stérile avec une seringue stérile en observant le tube sous le binoculaire (Wild Heerbrugg, Switzerland) pour faciliter la récupération de la micro-colonie. Cette micro-colonie a, par la suite, été mise en suspension dans un milieu liquide constitué de 25 ml de surnageant et de 45 ml de milieu BM. Le reste de la procédure a été telle que décrite ci-haut de manière à obtenir à nouveau des micro-colonies dans les tubes de Veillon après incubation.

2.14 MÉTHODES ANALYTIQUES

2.14.1 Évaluation de la concentration des composés aromatiques

2.14.1.1 Extractions

Dans les différentes cultures, les concentrations de phénol, d'acide 4-hydroxybenzoïque et d'acide benzoïque ont été déterminées périodiquement par chromatographie en phase gazeuse. Avant d'être injecté dans le chromatographe pour l'analyse, un volume de 1 ml de l'échantillon à analyser a été prélevé stérilement avec une seringe et additionné de 20 µl d'une solution de *para*-crésol 7,5 g/l (Baker) utilisé comme standard interne. Par la suite, l'échantillon a été acidifié par l'ajout de 0,2 ml de H_2SO_4 50% (v/v). Finalement, 0,4 g de NaCl et 1 ml d'acétate d'éthyle froid (Qualité HPLC, EM Science, N-J) ont été ajoutés. Après agitation et centrifugation (1 min à 1000 x g), la phase organique a été récupérée et transférée dans un tube contenant environ 100 mg de Na_2SO_4 afin de la déshydrater. La phase organique a été conservée sur glace.

2.14.1.2 Analyses

Un volume de 240 µl de la phase organique déshydratée a été déposé dans un flacon à chromatographie (Chromacol, Trumbull, CT) et puis dérivé par la technique de silylation (remplacement de l'hydrogène des groupements OH par un groupement Si-3CH_3) avec 60 µl de N,O-bis (triméthylsilyl)-trifluoroacélanide (BSTFA) (Supelco, PA). L'échantillon a été finalement chauffé durant 25 minutes à 70 °C. Un volume de 1 µl de cette solution a été injecté dans le chromatographe en phase gazeuse (CG) modèle 5890 muni d'un injecteur automatique et d'un contrôleur HP 7673A (Hewlett Packard Canada, Kirkland). L'appareil était équipé d'une colonne capillaire HP-5 (5% phényl-méthyl-silicone) de 25 m et de 0,2 mm de diamètre interne. Le chromatographe était également couplé à un détecteur à ionisation par flamme (FID). L'hélium a servi de gaz vecteur (Praxair). La température initiale du four a été de 50°C puis elle a été augmentée à un taux de 5°C / min pour atteindre une température de 100°C qui a été maintenue pendant 6 minutes.

Ensuite, elle a été augmentée de 20°C / min jusqu'à 230°C et de 30°C / min jusqu'à 310°C. Cette température finale a été maintenue pendant 2 minutes. La température de l'injecteur a été de 250°C et celle du détecteur de 340°C. L'acquisition et l'analyse des données ont été faites de façon automatique par le logiciel ChemStation version A.03.34 fourni avec l'appareil.

2.14.1.3 Détermination de la concentration

La concentration des différents composés, par rapport à celle du standard interne *p*-crésol, a été calculée automatiquement par le logiciel HP ChemStation selon une courbe standard préalablement obtenue pour chacun des produits à l'étude.

2.14.2 Identification du composé inconnu par spectrométrie de masse

Le composé inconnu retrouvé dans le surnageant d'une culture autoclavée de *Clostridium butyricum* a été identifié par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CG/SM). L'appareil utilisé comprenait un chromatographe Varian 3005 (Varian, Walnut Creek) équipé d'une colonne capillaire telle que décrite à la section 2.14.1.2, couplé à un spectromètre de masse (SM) à trappe ionique (Ion Trap 800, Finnigan, San Jose). La programmation de l'appareil était telle que décrite ci-haut. Les échantillons analysés ont été extraits en suivant la procédure décrite précédemment. Des flacons à chromatographie à fond conique ont toutefois été utilisés. Un échantillon d'acide 3-phénylpropionique pur (Sigma-Aldrich) a été préparé comme suit : environ 0,2 mg du produit pur et 1 µl de BSTFA ont été déposés dans un flacon à fond conique et ce dernier a ensuite été scellé avant d'être chauffé 25 minutes à 70 °C. Après chauffage, 500 µl d'acétate d'éthyle (Qualité HPLC) ont été ajoutés à l'échantillon avant injection dans l'appareil. De plus, un échantillon combiné d'un extrait de surnageant de culture autoclavée de *Clostridium butyricum* (240 µl) et d'acide 3-phénylpropionique pur (100µl) a été analysé.

2.14.3 Dosage des sulfites SO_3^{2-}

Les sulfites présents dans le surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 et dans le milieu BM ont été dosés par titration selon la méthode iodométrique telle que décrite par Clesceri, Greenberg et Trussell (1989). Le surnageant de la culture autoclavée de la souche 6 utilisé a été obtenu tel que décrit à la section 2.6.3.2. Dans le cas du milieu BM réduit, ce dernier a été centrifugé en anaérobiose 30 minutes à 18 480 X g. De cette façon, seul le surnageant a été récupéré dans une enceinte anaérobie et le précipité noir de FeS a été jetté. Afin d'éviter toute interférence possible avec la présence du H_2S dans les échantillons à doser, une quantité de 0,5 g d'acétate de zinc (Baker) a été ajoutée aux échantillons dans l'enceinte anaérobie quelques minutes après l'ajout de la solution d'EDTA 2,5 % (p/v). Suite à cet ajout, l'apparition d'un important précipité a été presque instantannée. L'échantillon a donc, par la suite, été centrifugé et le surnageant a été recupéré très délicatement en aérobiose en évitant toute agitation. Ce dernier a ensuite été dosé (Clesceri, Greenberg et Trussell, 1989).

2.14.4 Dénombrement bactérien en milieu liquide

La croissance de la souche 7 a été estimée par observation microscopique. Un volume de 60 µl de l'échantillon a été placé sur une lame multitest 12 puits (ICN Biomedicals Inc., Ohio) séché à l'air ambiant, fixé à la chaleur puis coloré 2 minutes au crystal violet (Difco). Le compte direct a été effectué avec le microscope Leitz Laborlux D (Leitz, Wetzlar, Allemagne). Pour chaque échantillon, le dénombrement des bactéries dans 20 champs microscopiques différents pris au hasard a été effectué à un grossissement de 1000X. Le facteur d'équivalence a été estimé à 1 bactérie/champ = 3 X 10^4 bactéries/mL.

2.14.5 Observations en microscopie électronique

Les observations ont été effectuées avec le microscope à électrons Hitachi 7100 (Hitachi, Tokyo). La souche 7 provenant d'environ 1 ml de culture liquide a été préalablement

fixée avec 1 à 2 % (p/v) de glutaraldéhyde et colorée négativement environ 5 secondes avec 2% (p/v) de phosphotungstate.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 MISE EN SITUATION

Tout au long du projet, l'activité de transformation de la souche 7 a été suivie en dosant le phénol, l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'acide benzoïque à un temps donné dans les cultures liquides. Certains essais ont été effectués en fournissant, au départ, du phénol aux cultures. Toutefois, la majorité des cultures ont plutôt reçu de l'acide 4-hydroxybenzoïque (revoir Figure 9 pour un rappel de la voie de transformation par la souche 7). La première expérience présentée dans cette section comprendra le suivi du phénol, de l'acide 4-hydroxybenzoïque et de l'acide benzoïque au fil du temps. Dans le but d'alléger la présentation des résultats, toutes les expériences qui suivront présenteront seulement le graphique qui montre l'apparition du produit final, l'acide benzoïque, en fonction du temps suite à la transformation de l'acide 4-hydroxybenzoïque fourni au départ. Ainsi, si rien n'est précisé, le phénol et l'acide 4-hydroxybenzoïque ont été détectés tel qu'attendu au fil du temps dans tous ces essais. Il est à noter que la transformation du phénol ou de l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque est une réaction stoechiométrique. Cela signifie que si 2 mM de phénol ou d'acide 4-hydroxybenzoïque sont fournis à la culture, il faut s'attendre à retrouver environ 2 mM d'acide benzoïque (il faut tenir compte de la légère variation possible au niveau de la méthode analytique) si l'activité de transformation est complétée. Il faut également prendre note que chacune des courbes représente la moyenne de duplicata.

Dans les différentes expériences, une culture inoculée avec un échantillon de la coculture des souches 6 et 7 a toujours été incluse. Cette dernière constitue le témoin positif de l'activité de transformation. Également, peu importe les conditions de culture testées, une culture de la souche 7 en milieu BM a été incluse comme témoin de comparaison. En effet, cette culture établit les résultats initiaux que l'on cherche à améliorer tant au niveau

de la croissance, de la cinétique de transformation que du maintien de l'activité de transformation.

Au début du projet, la souche 7 obtenue par Letowski (2000) était très difficile à maintenir. La croissance était très faible et l'activité de transformation du phénol était fréquemment perdue pour des raisons inconnues et ce, sans aucun changement dans les conditions de culture. Différents amendements aux milieux de culture ont été imaginés afin de conserver la souche 7 active et d'améliorer le système pour permettre la caractérisation de cette nouvelle souche.

3.2 IMPLICATION DE L'ACIDE 4-HYDROXYBENZOÏQUE

3.2.1 Remplacement du phénol par l'acide 4-hydroxybenzoïque

La première modification aux conditions de culture initiales (Letowski, 2000) qui a été testée fut le remplacement du phénol par l'acide 4-hydroxybenzoïque. La Figure 11a montre bien que la souche 7 n'a pas été capable de transformer le phénol fourni à la culture et qu'ainsi ni l'acide benzoïque ni l'acide 4-hydroxybenzoïque n'ont été détectés au fil du temps d'incubation. Toutefois, le même inoculum de la souche 7 a été capable de transformer l'acide 4-hydroxybenzoïque fourni au départ de la culture (Fig. 11b) avec une apparition transitoire de phénol qui a aussitôt été carboxylé et déhydroxylé en acide benzoïque (Fig. 11b). Ainsi, tout l'acide 4-hydroxbenzoïque fourni a été transformé en acide benzoïque. La coculture des souches 6 et 7, témoin positif, a transformé le phénol (Fig. 11c) et l'acide 4-hydroxybenzoïque (Fig. 11d) en acide benzoïque.

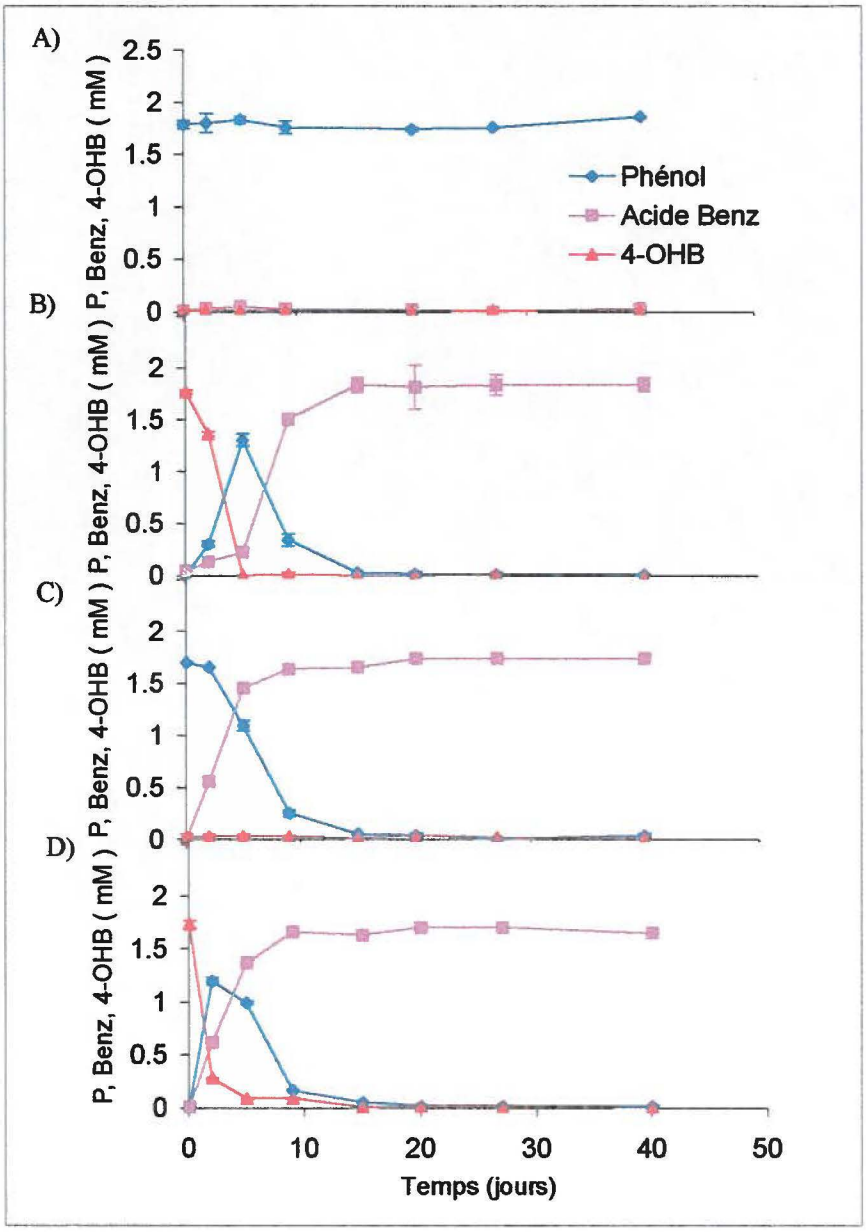


Figure 11 : Transformation du phénol et de l'acide 4-hydroxybenzoïque. Les concentrations de phénol (P), d'acide benzoïque (Benz) et d'acide 4-hydroxybenzoïque (4-OHB) ont été suivies dans des cultures de la souche 7 (A et B) et des cocultures des souches 6 et 7 (C et D) ayant reçu au départ soit du phénol (A et C), soit de l'acide 4-hydroxybenzoïque (B et D). Les cultures ont été effectuées dans du milieu BM.

3.2.2 Variation de la concentration de l'acide 4-hydroxybenzoïque

Cette expérience avait pour but de vérifier l'effet de la variation de la concentration de l'acide 4-hydroxybenzoïque sur la croissance de la souche 7 et sur l'activité de transformation. Le fait de diminuer de moitié, de doubler ou de quadrupler la concentration normalement utilisée (1,6 mM) n'a eu aucun effet significatif sur la densité de la population (Fig. 12a). L'activité de transformation a été complétée dans toutes les cultures sauf lorsque la concentration a été quadruplée. Dans ce dernier cas, seulement 5,5 mM d'acide benzoïque ont été accumulées au lieu des 6,4 mM attendues, même après une incubation prolongée de 35 jours.

3.3 TEMPÉRATURE OPTIMALE D'INCUBATION

La souche 7 a été incubée à différentes températures. C'est à 37°C que la croissance (Fig. 13b et 13c) et l'activité de transformation de l'acide 4-hydroxybenzoïque (Fig. 13a et 13c) ont été les plus rapides. À une température d'incubation de 4, 42 et 55°C, la souche n'a présenté aucune activité et aucune croissance.

3.4 CULTURES EN MILIEUX PROTÉIQUES RICHES

Lorsque la souche 7 a été cultivée dans les milieux LB ou BHI, deux milieux commerciaux très riches, aucune croissance et aucune transformation de l'acide 4-hydroxybenzoïque n'a été observée (résultats non illustrés). Également, il n'y a pas eu d'activité de transformation lorsque la souche 7 a été cultivée dans des milieux contenant seulement le milieu de viande que ce soit à base de foie ou de boeuf haché (Fig.14). Lorsque les milieux à base de viande ont été dilués avec le milieu BM, l'accumulation d'acide benzoïque a été observée mais l'activité de transformation n'a pas été complétée contrairement à ce qui a été obtenu dans le milieu BM. La croissance de la souche dans les milieux à base de viande n'a pu être suivie. En effet, les bactéries ont adhéré aux

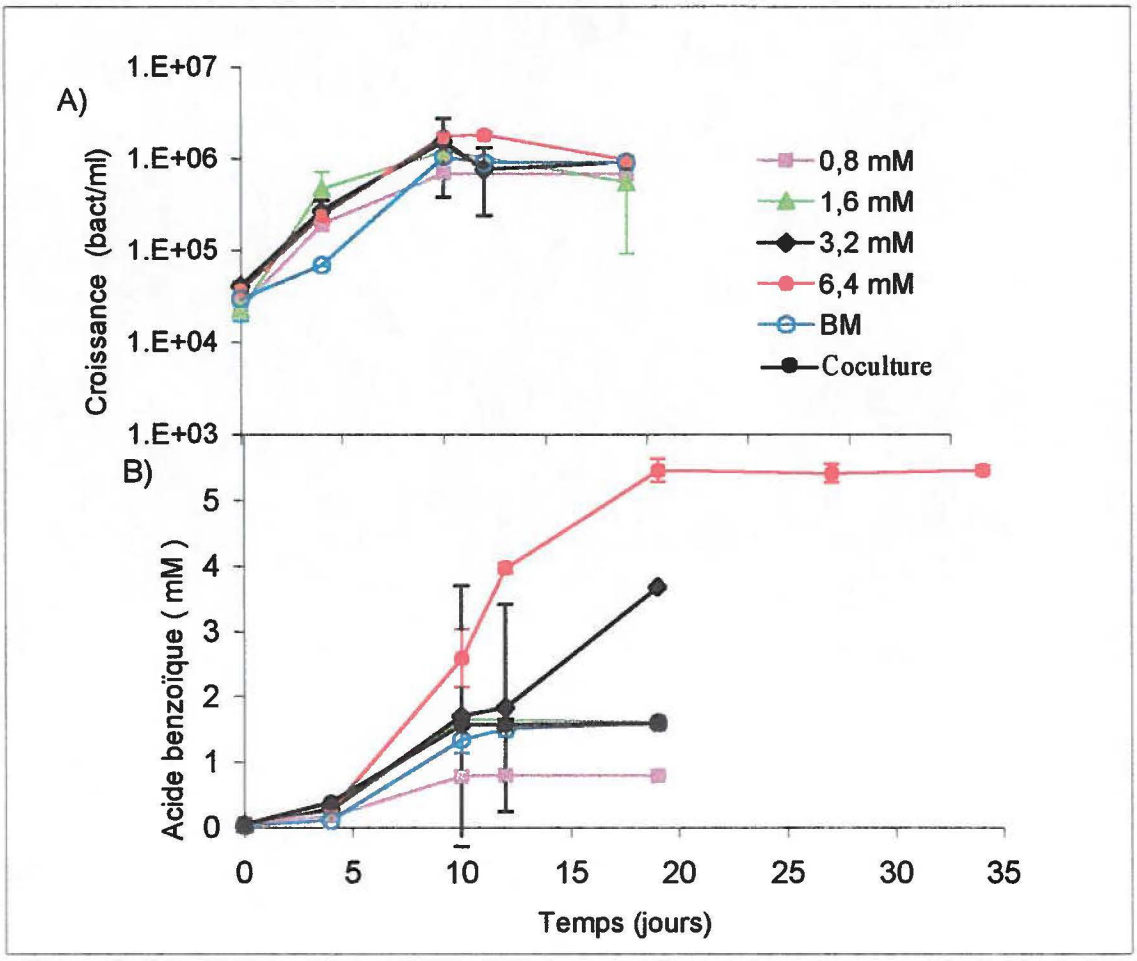


Figure 12: **Effet de la variation de la concentration de l'acide 4-hydroxybenzoïque**. La souche 7 a été dénombrée à différents moments dans des cultures ayant reçu 0,8, 1,6, 3,2 et 6,4 mM d'acide 4-hydroxybenzoïque (A) et les concentrations d'acide benzoïque ont également été suivies (B). Les essais ont été faits dans des milieux constitués de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 (voir section 3.6.3) et de milieu BM sauf pour les cultures identifiées "BM" et "coculture" où seul le milieu BM a été utilisé.

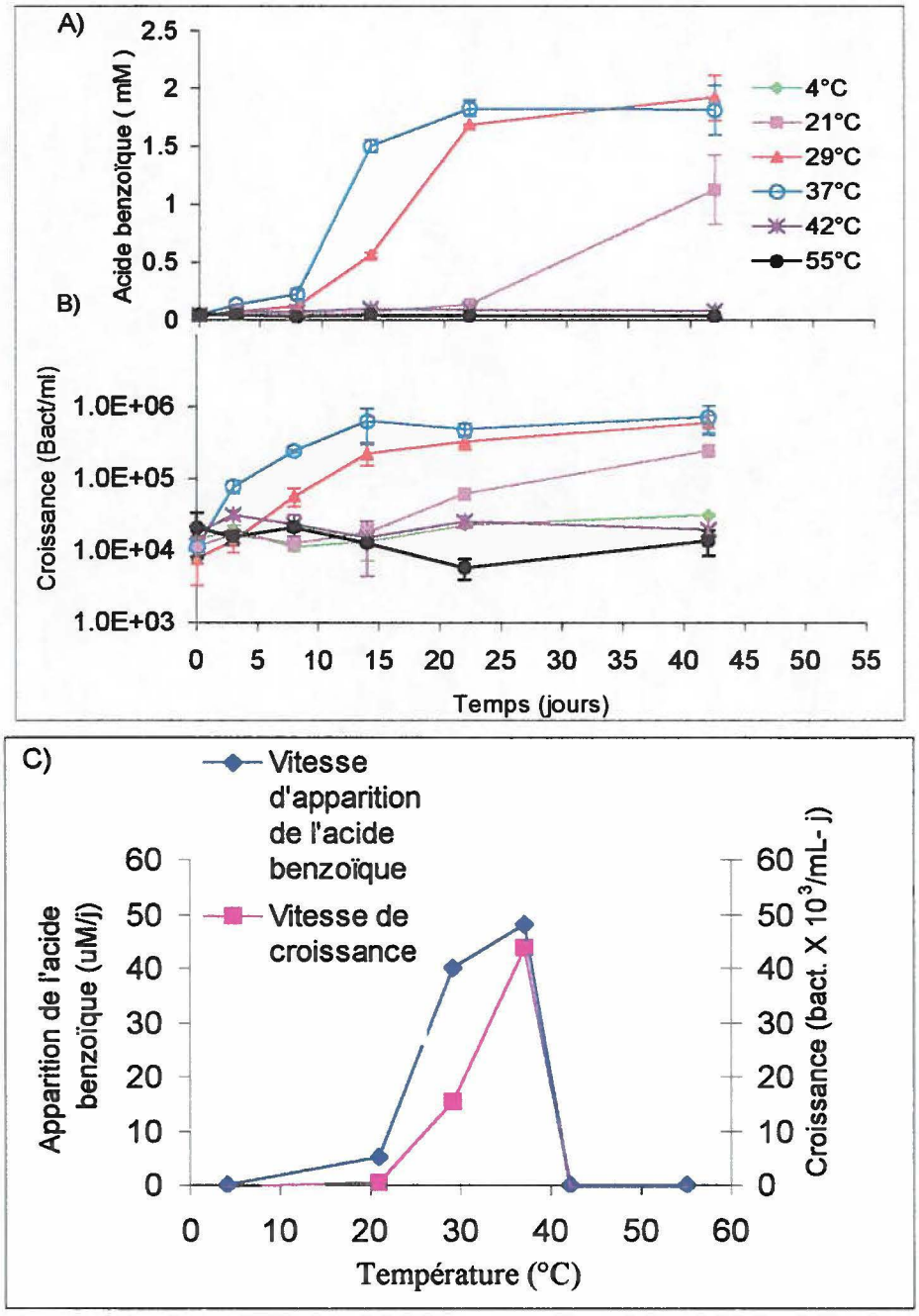


Figure 13 : Température optimale d'incubation de la souche 7. La concentration de l'acide benzoïque (A) et la croissance de la souche 7 (B) ont été suivies dans des cultures de la souche 7 incubées à différentes températures. Les vitesses initiales (14 premiers jours) moyennes d'apparition de l'acide benzoïque et de croissance ont été calculées et sont exprimées en fonction de la température d'incubation (C). Les cultures ont été effectuées dans du milieu BM.

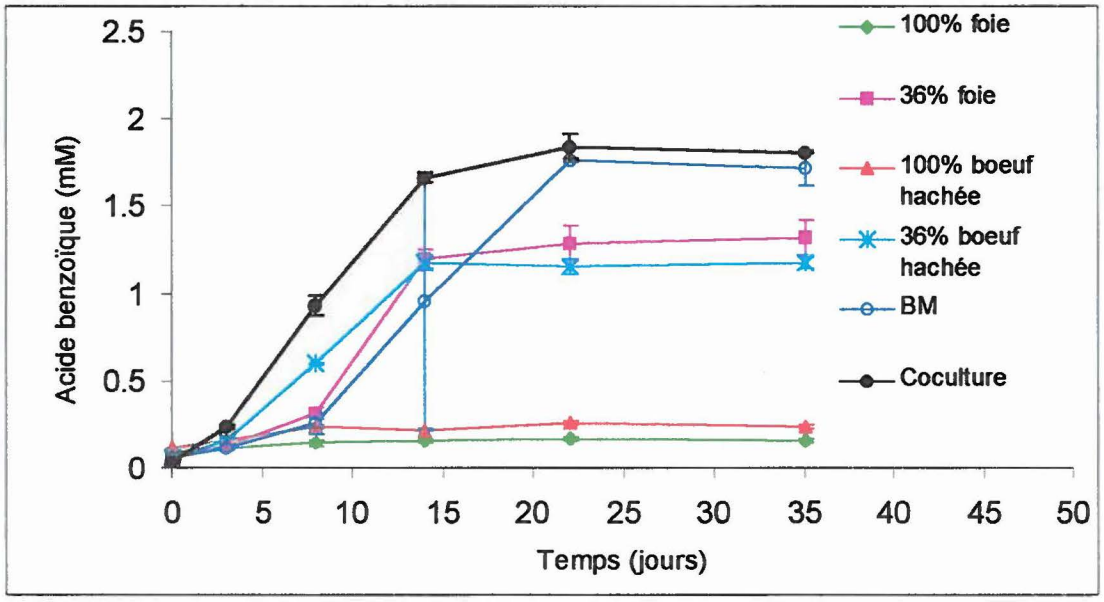


Figure 14: Culture de la souche 7 en milieux riches à base de viande. Les concentrations d'acide benzoïque ont été suivies dans des cultures de la souche 7 constituées de milieu de viande uniquement (foie ou boeuf hachée) ou de milieu de viande (36%) dilué avec du milieu BM. Les cultures identifiées "BM" et "coculture" ont été faites dans du milieu BM seul.

particules de viande et n'ont pu être prélevées pour faire le décompte microscopique sur lame. Comme attendu, la coculture a permis une transformation complète et une accumulation rapide de l'acide benzoïque.

3.5 AJOUT DE SUPPLÉMENTS D'ENVIRONNEMENTS COMPLEXES

Lorsque ajoutés au milieu de culture BM, les surnageants de lisier de porc et d'extrait de terre ont nui à la souche 7 et à son activité (Fig. 15). Les ajouts de surnageants de boue de digesteur anaérobie et de liquide du rumen ont permis une accumulation plus rapide de l'acide benzoïque dans les milieux de culture comparativement au milieu standard BM. Toutefois, ces milieux n'ont pas amélioré la croissance de la souche et cette dernière a été comparable à la très faible croissance obtenue en milieu BM (résultats non illustrés). La coculture a rapidement transformé tout l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque tel qu'attendu.

3.6 RELATION ENTRE LA SOUCHE 6 ET LA SOUCHE 7

3.6.1 Reconstitution de la coculture des souches 6 et 7

Tel qu'attendu, la souche 6 n'a aucunement transformé l'acide 4-hydroxybenzoïque comme en fait foi l'absence de formation d'acide benzoïque (Fig. 16). Également, l'essai confirme que l'activité de transformation de la souche 7 est considérablement accélérée en présence de la souche 6 comme nous l'avions vu précédemment. Toutefois, l'importance de l'inoculum de la souche 7 au départ de la culture n'a pas eu d'effet sur la cinétique de transformation et les trois courbes présentant différents inocula se confondent.

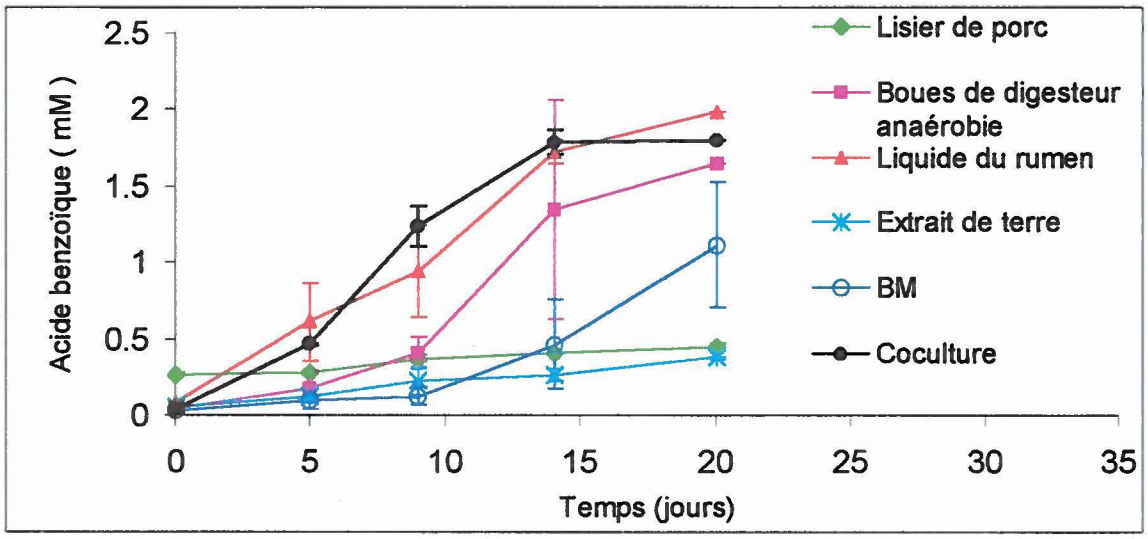


Figure 15: Culture de la souche 7 en présence de suppléments. Les concentrations d'acide benzoïque ont été suivies dans des cultures de la souche 7 constituées de milieu BM et de 36% (v/v) de surnageant de lisier de porc, de surnageant de boues de digesteur anaérobie, de surnageant de liquide du rumen ou de surnageant d'un extrait de terre sauf pour les cultures "BM" et "coculture" qui ont été faites dans du milieu BM seul.

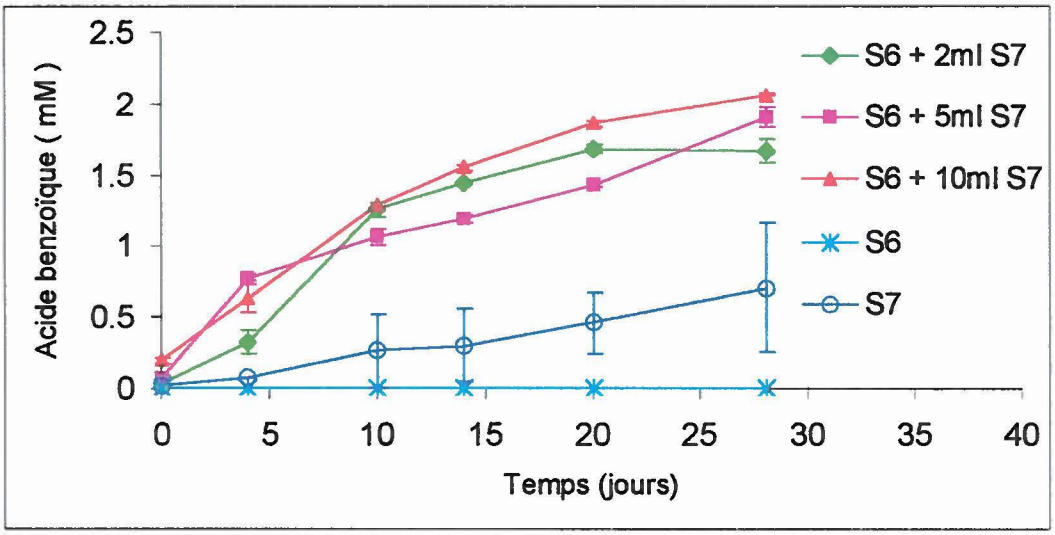


Figure 16: Effet de la variation de l'inoculum de la souche 7 au sein de la coculture avec la souche 6. Les concentrations d'acide benzoïque ont été suivies dans des cultures en milieu BM avec différents inocula: la souche 6 (S6) seule, la souche 7 (S7) seule ou ces deux souches réassociées dans des proportions différentes.

3.6.2 Ajout de surnageant d'une culture de la souche 6

L'ajout de surnageant d'une culture de la souche 6 à une culture de la souche 7 a permis d'accélérer l'activité de transformation par rapport à celle observée dans des conditions standards en milieu BM (Fig. 17) Toutefois, les rendements obtenus ont été les mêmes en présence de 50 ou 100% (v/v) de surnageant d'une culture de la souche 6. La présence de 36% (v/v) d'une culture autoclavée de la souche 6 a aussi produit un effet positif (Fig. 17). Tel qu'attendu, la coculture a rapidement transformé tout l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque.

3.6.3 Culture de la souche 7 avec le surnageant ou le culot d'une culture autoclavée de la souche 6

L'ajout au milieu BM d'une culture autoclavée de la souche 6, du culot ou du surnageant de cette culture autoclavée a eu un effet positif similaire sur l'activité de transformation de la souche 7 (Fig. 18). La cinétique de transformation dans les milieux BM où les concentrations en fer ou en minéraux traces ont été doublées est comparable à celle obtenue dans le milieu standard. Aucune amélioration significative de la croissance de la souche 7 a été notée dans les différents milieux comparativement au milieu standard (résultats non illustrés). Le témoin positif, soit la coculture, a permis une accumulation rapide de l'acide benzoïque comme prévue.

3.7 SENSIBILITÉ À L'OXYGÈNE DU SURNAGEANT D'UNE CULTURE AUTOCLAVÉE DE LA SOUCHE 6

Cette expérience a été planifiée dans le but de vérifier si le facteur présent dans le surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 qui semble aider la souche 7 à

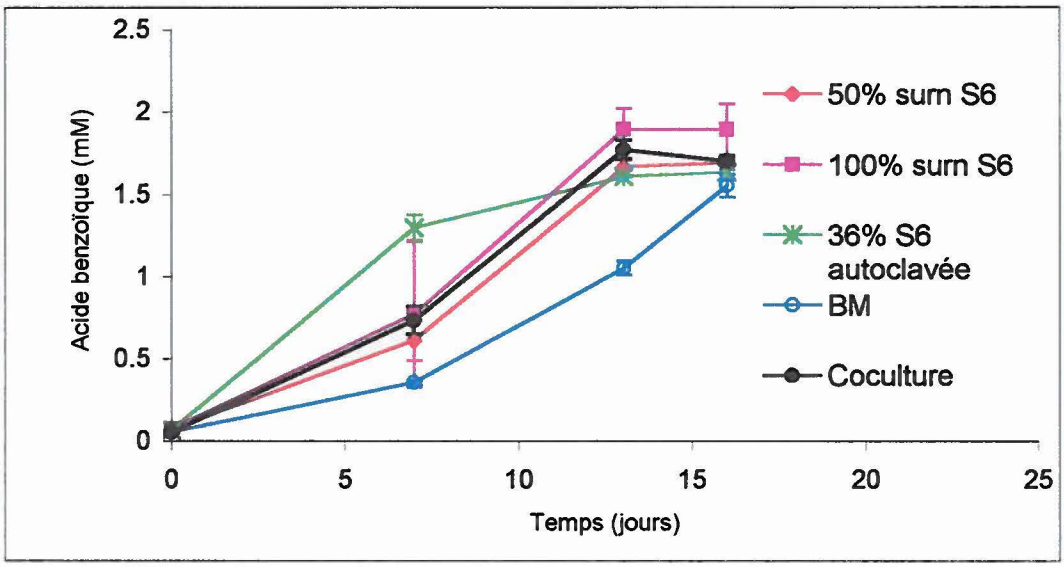


Figure 17 : Culture de la souche 7 en présence de surnageant d'une culture de la souche 6. Les concentrations d'acide benzoïque ont été suivies dans des cultures de souche 7 en présence de 50 ou 100% (v/v) de surnagenant d'une culture de la souche 6. Un milieu constitué de 36% (v/v) d'une culture autoclavée de la souche 6 a aussi été testé. Les cultures "BM" et "coculture" ont été faites dans du milieu BM seul.

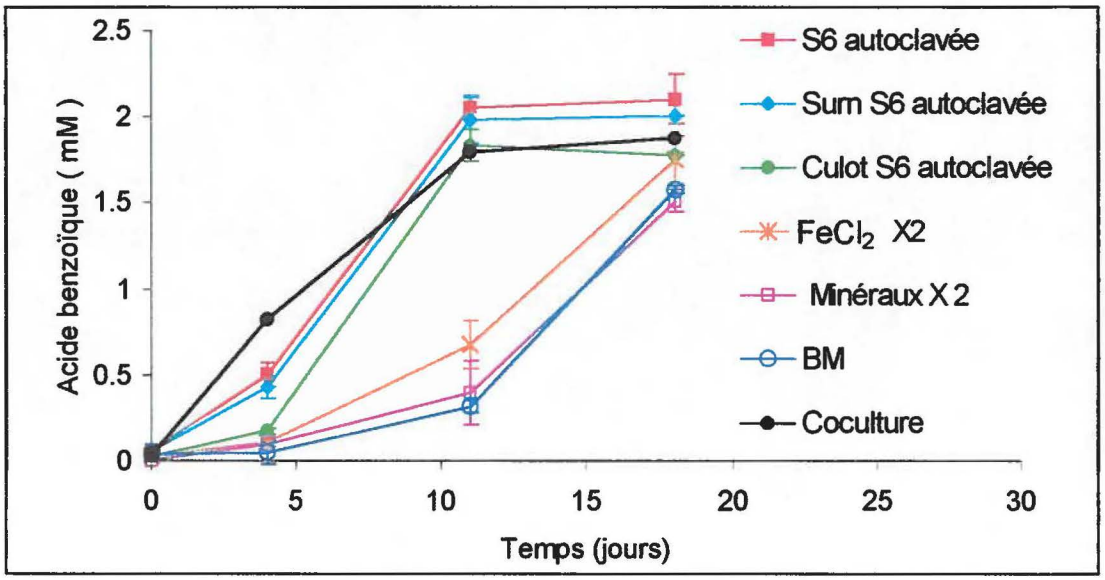


Figure 18 : Effet du culot ou du surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 ajoutés dans le milieu de culture de la souche 7. Les concentrations d'acide benzoïque ont été suivies dans des milieux constitués de 36% (v/v) d'une culture autoclavée de la souche 6 ou de 36 % (v/v) du surnageant ou du culot d'une culture autoclavée de la souche 6. Des milieux BM où la concentration standard du fer ou des minéraux trace a été doublée ont été testés. Les cultures "BM" et "coculture" ont été faites dans le milieu BM seul.

transformer l'acide 4-hydroxybenzoïque est résistant à l'oxygène. La Figure 19a montre que l'ajout de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 qui a été oxygéné améliore, tout autant qu'un ajout non oxygéné, la cinétique de transformation de la souche 7 tel que révélé par la vitesse d'accumulation de l'acide benzoïque. Pour ce qui est de la croissance de la souche 7 (Fig. 19b), contrairement à ce qui a été observé à la section 3.6.3, une légère augmentation du compte a été observée en présence du surnageant (oxygéné ou non) par rapport au milieu BM standard. Dans la coculture, il y a eu accumulation de tout l'acide benzoïque attendu.

3.8 CULTURE AVEC DES SURNAGEANTS DE CULTURES AUTOCLAVÉES DE DIFFÉRENTES SOUCHES BACTÉRIENNES

La Figure 20 montre que l'ajout de surnageants de cultures autoclavées de différentes souches bactériennes a favorisé l'activité de transformation de la souche 7 par rapport au milieu BM seul. Ce résultat confirme l'effet positif qui a déjà été observé en présence du surnageant de la culture autoclavée de la souche 6. En présence du surnageant de culture de *Desulfitobacterium frappieri*, l'activité de transformation n'a pas été complétée même après 22 jours d'incubation. L'accumulation d'acide benzoïque la plus rapide a été obtenue en présence du surnageant de *Clostridium butyricum*. Aussi, au niveau de la croissance, les ajouts de surnageants de la souche 6 et de *Clostridium butyricum* ont entraîné une légère augmentation du compte bactérien par rapport à la croissance obtenue en milieu standard (résultats non illustrés).

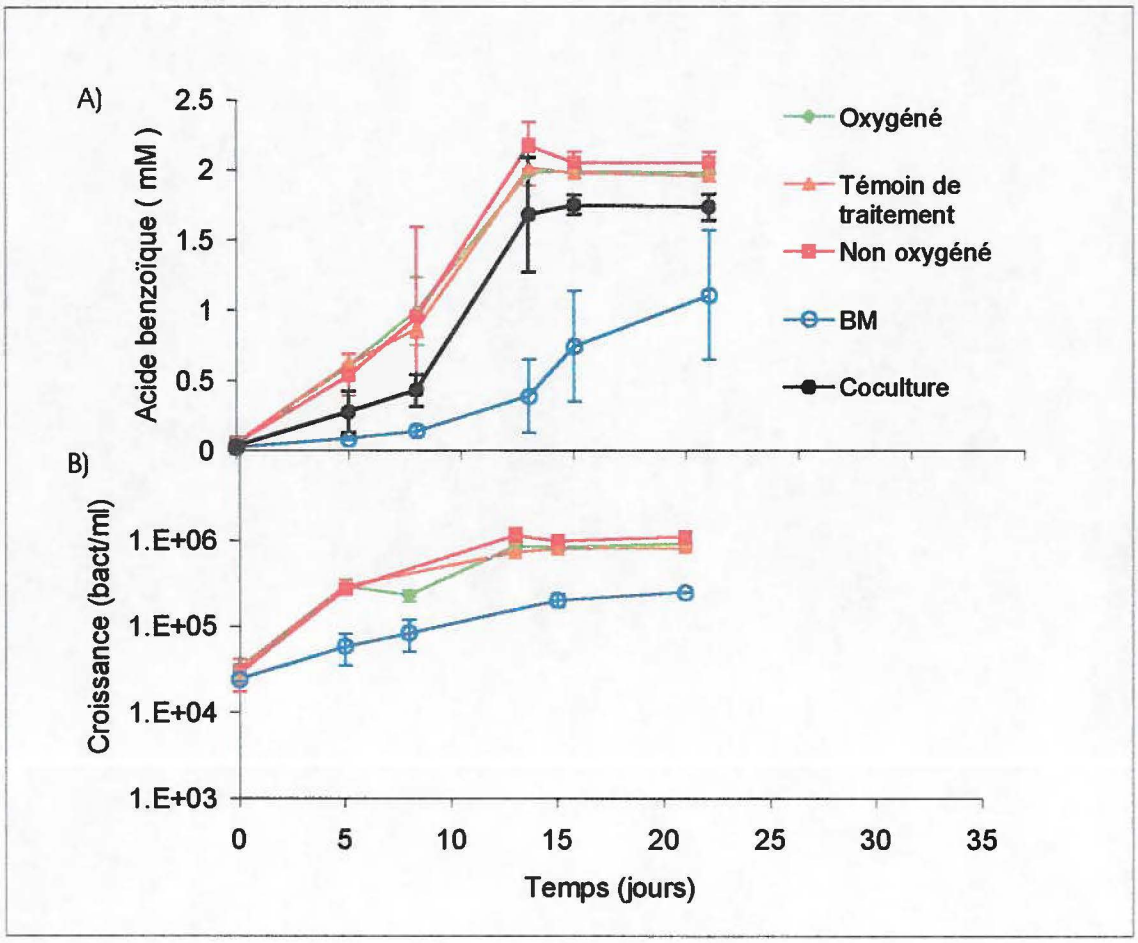


Figure 19 : Effet de l'oxygénation du surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6. Les concentrations d'acide benzoïque (A) ainsi que la croissance (B) de la souche 7 ont été suivies dans des milieux composés de 36% (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 oxygéné ou non. Un témoin traité sans avoir toutefois subit l'oxygénation a été inclus. Les cultures "BM" et "coculture" ont été faites dans le milieu BM seul.

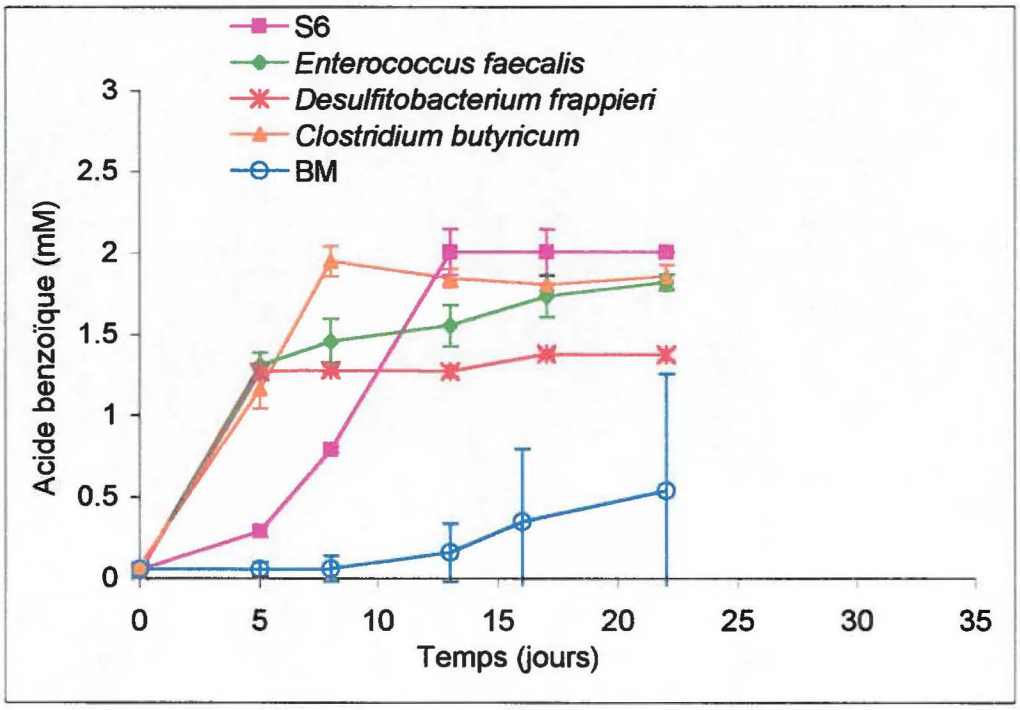


Figure 20 : Essais avec des surnageants de cultures autoclavées de différentes souches bactériennes anaérobies. Les concentrations d'acide benzoïque ont été suivies dans des milieux constitués de milieux BM et de 36% (v/v) de surnageant des différentes cultures autoclavées. La culture "BM" a été faite dans le milieu BM seul.

3.9 COMPOSÉ INCONNU RETROUVÉ DANS LE SURNAGEANT D'UNE CULTURE AUTOCLAVÉE DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*

3.9.1 Consommation au fil du temps par la souche 7

Lors de la culture de la souche 7 en présence de surnageant d'une culture autoclavée de *Clostridium butyricum*, un nouveau pic, qui n'avait jamais été présent dans les autres conditions, a été observé sur les chromatogrammes. La Figure 21 montre que ce composé a été utilisé par la souche 7 en fonction du temps d'incubation.

3.9.2 Identification du composé inconnu

Les principaux ions du spectre de masse du composé inconnu retrouvé dans le surnageant d'une culture autoclavée de *Clostridium butyricum* (Fig. 22a) présentent des masses (m/z) de 207, 104 et 91. Ce spectre est comparable à celui de l'acide 3-phénylpropionique (Fig. 22b). Donc, l'ion 207 m/z correspond au dérivé triméthylsilyl de l'acide 3-phénylpropionique ayant perdu un groupement méthyl. L'ion 104 m/z, pour sa part, correspond à un noyau phényl accompagné d'un groupement CH_2 et d'un groupement CH. Finalement, l'ion 91 m/z est constitué d'un noyau phényl accompagné d'un groupement CH_2. On peut remarquer l'absence de l'ion moléculaire, à 222 m/z, du dérivé triméthylsilyl de l'acide 3-phénylpropionique ce qui est fréquent lors de la fragmentation en spectrométrie de masse. Le composé inconnu et l'acide 3-phénylpropionique ont été observés au même temps de rétention sur le chromatogramme soit à environ 18 minutes et 20 secondes (résultat non illustré).

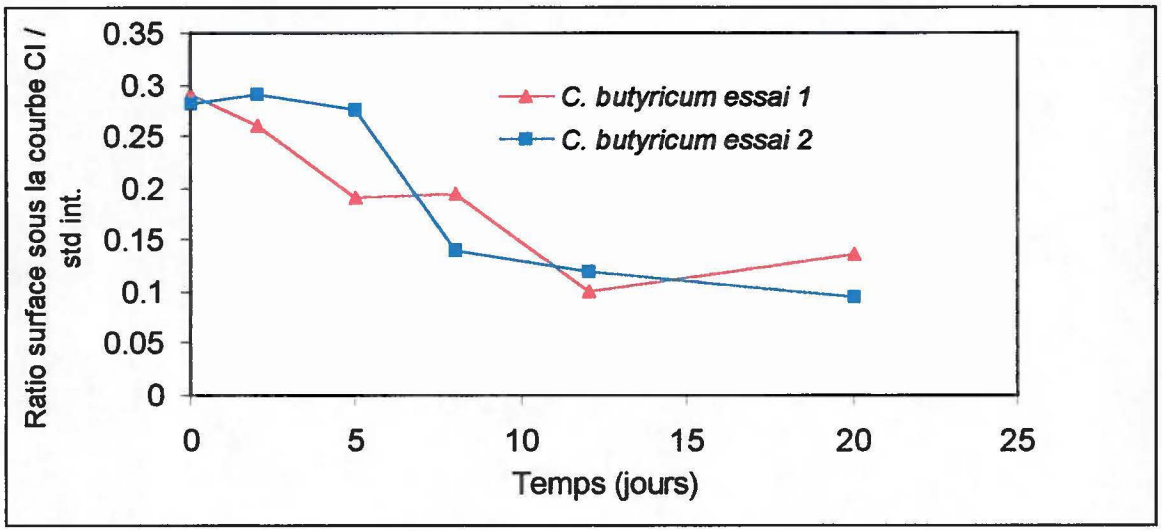


Figure 21: Utilisation par la souche 7 d'un composé inconnu retrouvé dans le surnageant de la culture autoclavée de *Clostridium butyricum*. La diminution de la surface sous la courbe d'un composé inconnu (CI), obtenue en chromatographie en phase gazeuse et corrigée par rapport au standard interne (std int.), est exprimée en fonction du temps d'incubation de deux cultures de la souche 7 composées de 36% (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de *Clostridium butyricum* et de milieu BM.

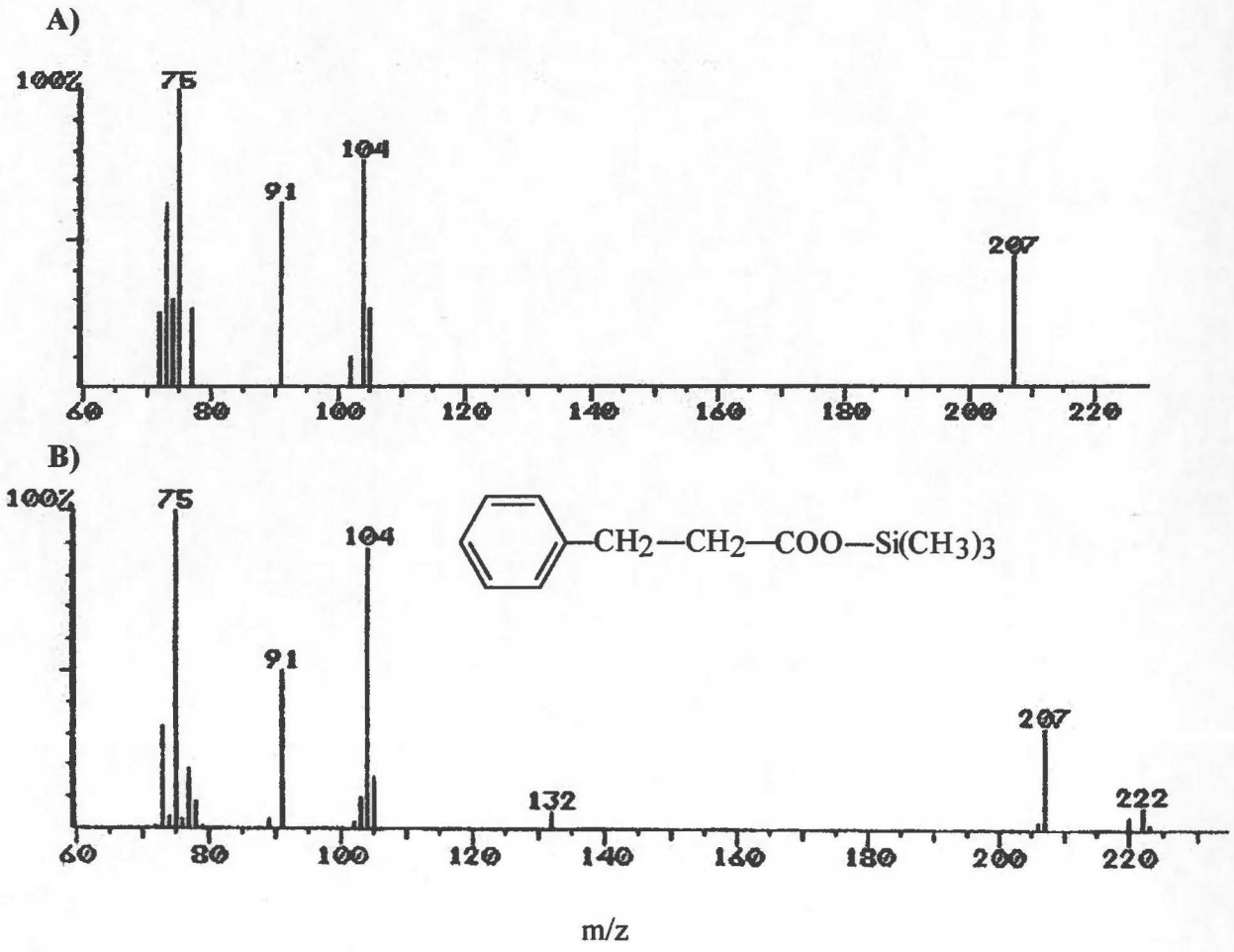


Figure 22: Spectres de masse du dérivé triméthylsilyl d'un composé inconnu retrouvé dans le surnageant de la culture autoclavée de *Clostridium butyricum* (A) et du dérivé triméthylsilyl de l'acide 3-phénylpropionique pur (B).

3.10 ESSAIS RELIÉS À LA VOIE DE SYNTHÈSE DE LA PHÉNYLALANINE

La Figure 23 montre que l'ajout d'acide phénylpropionique, d'acide cinnamique ou de phénylalanine n'a pas accéléré la cinétique de transformation de l'acide 4-hydroxybenzoïque comparativement à celle observée en milieu BM seul. L'addition de phénylalanine semblerait même avoir ralenti cette transformation. À nouveau, on remarque une activité plus rapide dans les cultures où nous avons ajouté du surnageant de la culture autoclavée de *Clostridium butyricum* ou de la souche 6. La coculture, témoin positif, a montré tel que prévu une transformation rapide.

3.11 AUTRES CONDITIONS DE CULTURE

3.11.1 Ajout de coenzyme A dans les milieux de culture

La Figure 24 montre qu'il n'y pas eu d'amélioration au niveau de l'activité de transformation de l'acide 4-hydroxybenzoïque par la souche 7 (A) ni de la croissance (B) lors de l'ajout de coenzyme A au milieu BM seul. Toutefois, l'accumulation de l'acide benzoïque a été plus rapide en présence de coenzyme A lorsque la souche a été cultivée en milieux BM additionnés de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 ou de *Clostridium butyricum*. Au niveau de la croissance, cette amélioration a été moins évidente. La coculture, témoin positif, a été l'une des plus rapide pour la transformation de l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque.

3.11.2 Modification de la source de carbone

Aucune croissance et aucune activité de transformation de l'acide 4-hydroxybenzoïque n'a été observée dans les cultures de la souche 7 en milieu BM dans lequel le protéose peptone avait été remplacé par 0,5% (p/v) de glucose, fructose ou maltose comme seule source de carbone. Également, la même chose a été observée avec 55 mM de pyruvate de sodium comme seule source de carbone en milieu BM (résultats non illustrés).

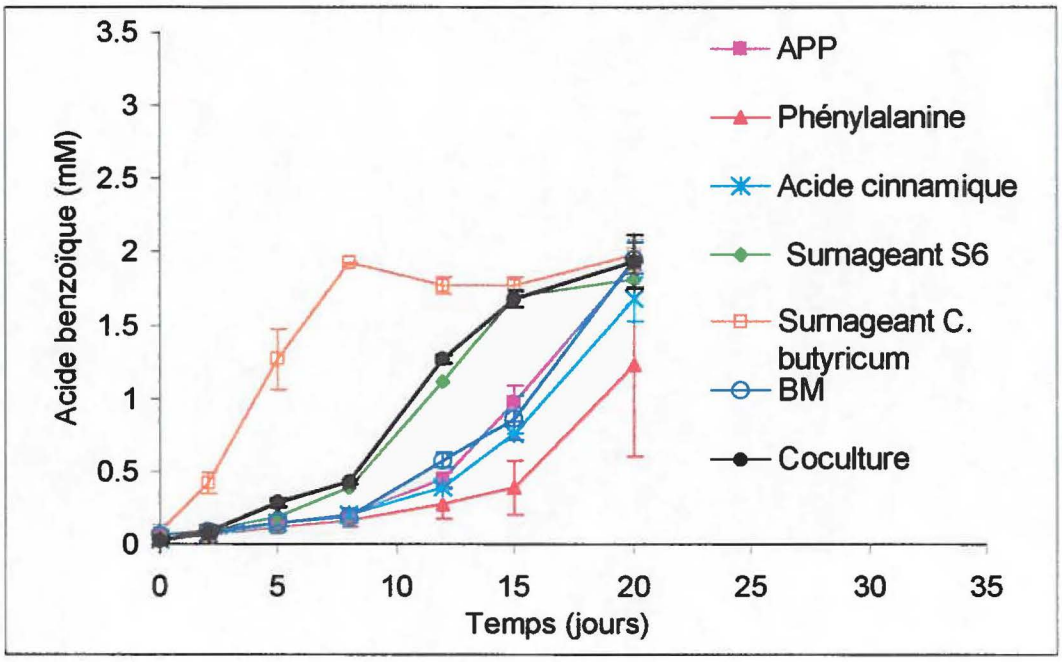


Figure 23 : Effet de l'ajout au milieu BM de différents composés reliés à la voie de synthèse de la phénylalanine. Les concentrations d'acide benzoïque ont été suivies dans des milieux où 0,45 mM d'acide phénylpropionique (APP), 1,7 mM de phénylalanine ou 0,45 mM d'acide cinnamique ont été ajoutés au milieu BM. Des essais constitués de milieu BM et de 36% (v/v) de surnageant de cultures autoclavées de la souche 6 ou de *Clostridium butyricum* ont également été faits. Les cultures "BM" et "coculture" ont été faites dans le milieu BM seul.

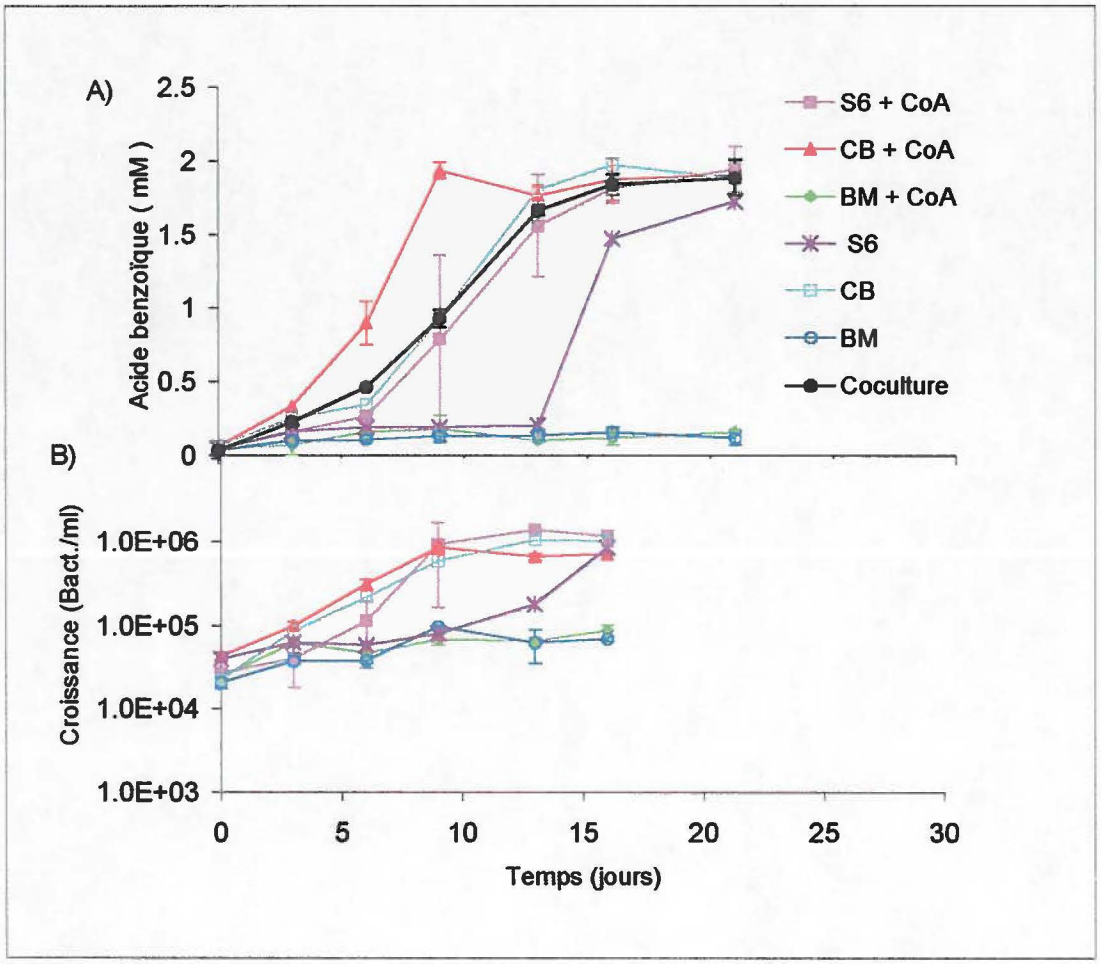


Figure 24 : Effet de l'ajout de coenzyme A dans les milieux de culture. Les concentrations d'acide benzoïque (A) et la croissance de la souche 7 (B) ont été suivies. Les essais ont été effectués dans des milieux BM seuls, ou des milieux BM additionnés de surnageant de culture autoclavée de la souche 6 (S6) ou de *Clostridium butyricum* (CB). La concentration de coenzyme A (CoA) utilisée dans certains milieux était de 0,02 mM.

3.11.3 Ajout de sulfites et de sulfates aux milieux de culture

3.11.3.1 Essais en milieu BM avec 0,5 % (p/v) d'extrait de levure

L'addition de sulfites (≤ 2 mM) aux milieux BM où le protéose peptone a été remplacé par 0,5 % (p/v) d'extrait de levure a eu un effet positif nettement détectable au niveau de l'activité de transformation (Fig. 25a) et de la croissance (Fig. 25b) de la souche 7. Par contre, l'addition de 5 mM de sulfites a eu un effet inhibiteur sur la souche et aucune activité ni croissance n'a été détectée. L'ajout de sulfates dans le même milieu et aux mêmes concentrations que les sulfites n'a eu aucun effet, ni positif, ni inhibiteur sur l'activité de transformation et la croissance (résultats non illustrés). La coculture a rapidement transformé l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque.

3.11.3.2 Essais en milieu constitué de 36% (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 et de milieu BM

En premier lieu, la Figure 26 montre bien, une fois de plus, l'accélération de l'activité en présence de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 en comparant les courbes "BM" et "0 mM". Il faut également remarquer que l'addition de 0,25 et 0,5 mM de sulfites dans ces conditions n'a pas engendré d'accélération supplémentaire et les cinétiques de transformation se confondent avec celle de la culture "0 mM". Toutefois, les concentrations plus élevées soit 1, 2 et 5 mM ralentissent l'activité de la souche 7 et, pour les courbes 2 et 5 mM, les cinétiques sont comparables à celles en milieu BM. L'ajout de sulfates, aux mêmes concentrations que les sulfites, n'a eu aucun effet sur la souche, peu importe la concentration (résultats non illustrés).

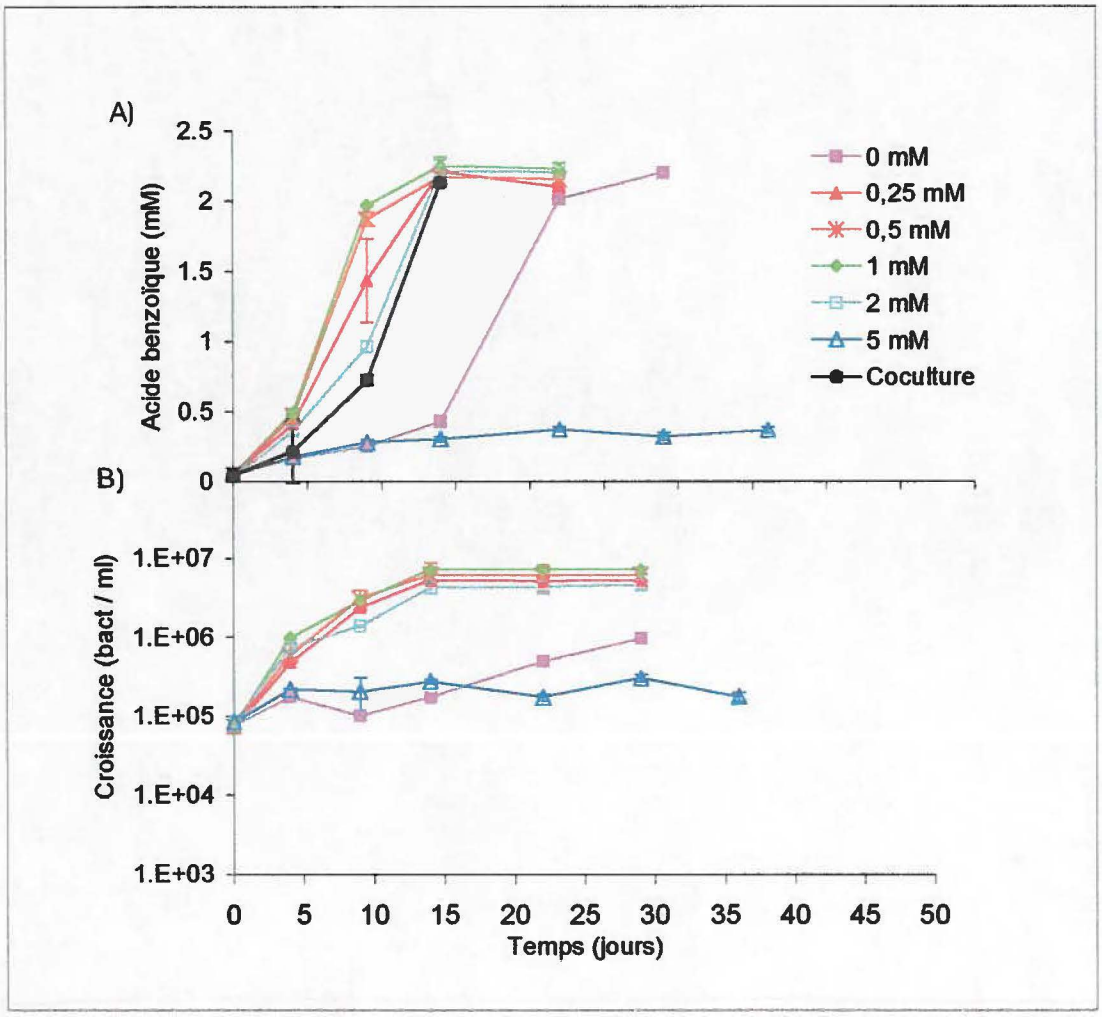


Figure 25 : Effet de l'ajout de sulfites au milieu de culture BM. Les concentrations d'acide benzoïque (A) ainsi que la croissance de la souche 7 (B) ont été suivies. Les milieux BM utilisés contenaient 0,5% (p/v) d'extrait de levure (en remplacement du protéose peptone) et ont été additionnés de sulfites à différentes concentrations. La coculture a été effectuée en milieu BM standard.

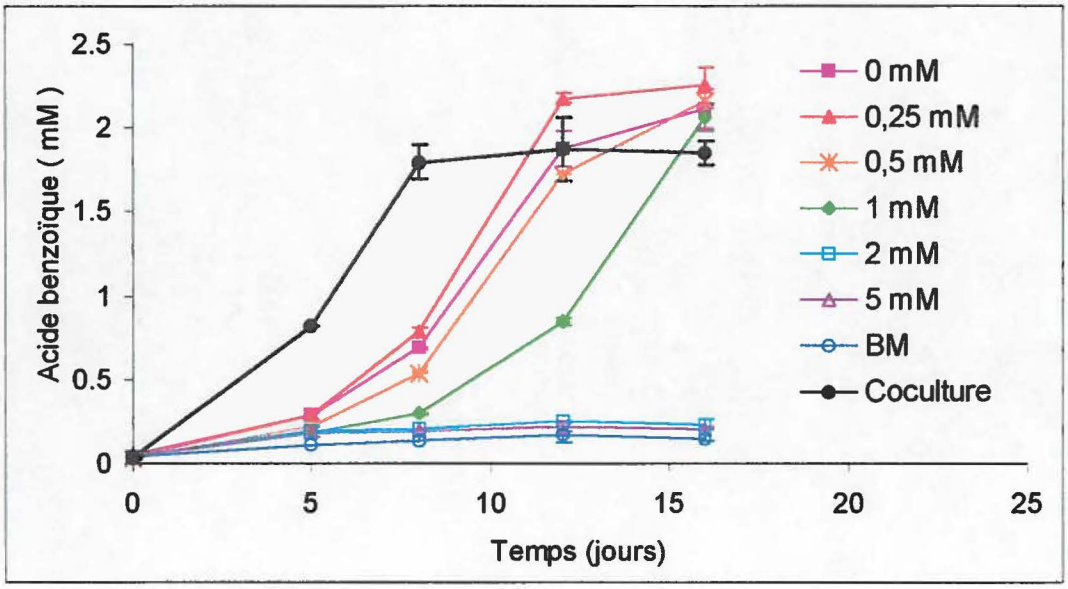


Figure 26 : Effet de l'ajout de sulfites aux milieux constitués avec 36% (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6. Les concentrations de l'acide benzoïque ont été suivies dans des milieux additionnés de sulfites à différentes concentrations. Les cultures "BM" et "coculture" ont été effectuées avec du milieu BM standard.

3.11.3.3 Dosage des sulfites dans le surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 et dans le milieu BM

Même après plusieurs tentatives, la méthode utilisée n'a pas été efficace pour doser une solution standard de sulfites. Cette même méthode ne nous a pas permis de doser les sulfites dans les échantillons de milieux BM et de surnageant et ce, étant donné la constante variabilité de la couleur lors de la titration.

3.12 EXTRACTIONS DE SURNAGEANTS DE CULTURES AUTOCLAVÉES DE LA SOUCHE 6 OU DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*

La présente expérience a été planifiée dans le but d'extraire des surnageants de cultures autoclavées le ou les facteurs qui sont favorables pour la souche 7 et, par la suite, d'arriver à identifier ces derniers. Cette extraction a été effectuée à l'aide de l'éther comme solvant organique et à un pH de 7. La Figure 27 montre que l'ajout des extraits de l'un ou l'autre des surnageants (Fig. 27a et 27b) au milieu de culture n'a pas favorisé la souche et a ralenti l'activité de transformation par rapport au surnageant total. Les grandes barres d'erreur indiquent aussi la variabilité des résultats lorsque l'extrait est présent dans le milieu de culture. Le témoin de traitement présente un certain ralentissement indiquant que les nombreuses manipulations auraient affecté le surnageant. La coculture a rapidement accumulé tout l'acide benzoïque attendu.

Une autre expérience d'extractions, cette fois avec l'acétate d'éthyle comme solvant et à pH 2, n'a pas fonctionné. En effet, plusieurs duplicata donnaient des résultats très différents et certains milieux n'ont présenté aucune activité de transformation. Le témoin de traitement a été clairement affecté par les manipulations (résultats non illustrés).

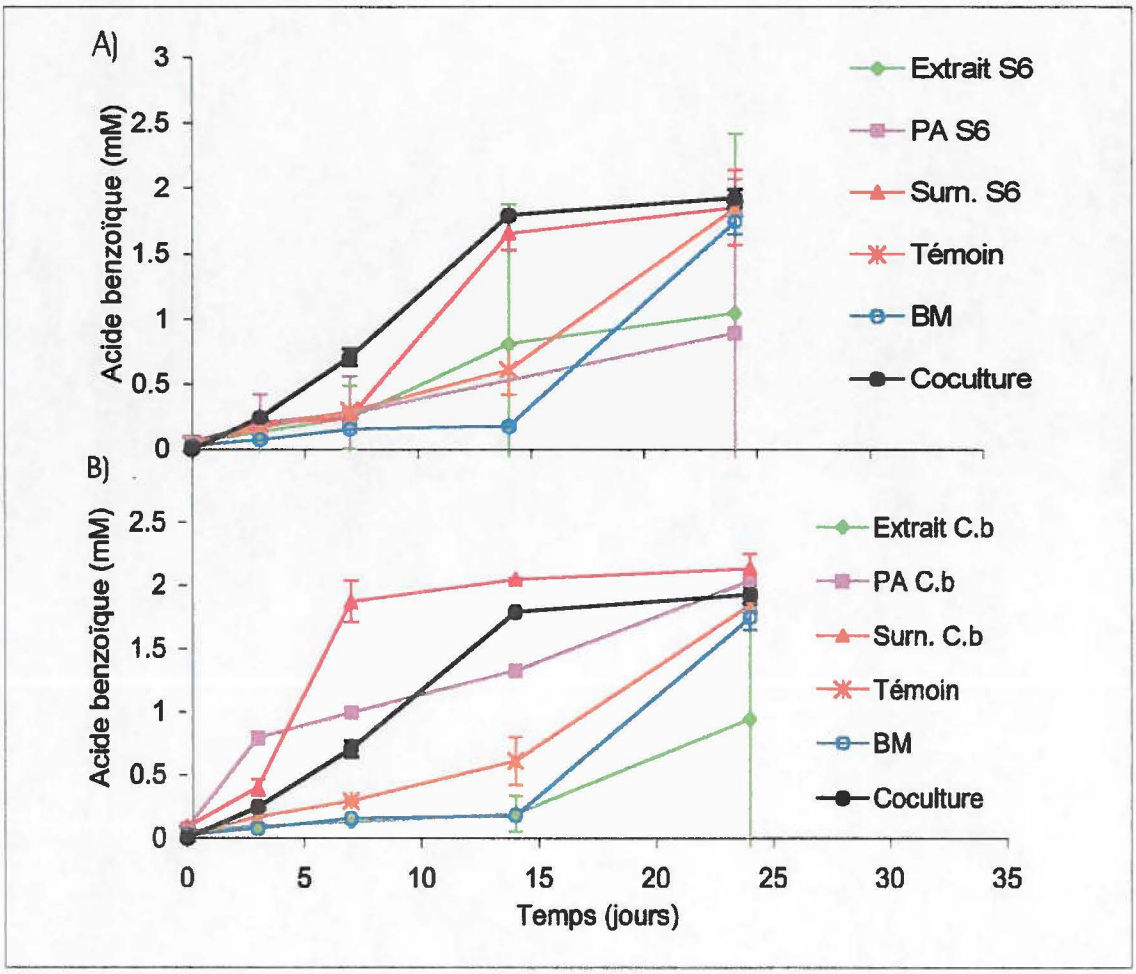


Figure 27 : Extractions de surnageants de cultures autoclavées des souches 6 et *Clostridium butyricum*. Les concentrations d'acide benzoïque ont été suivies dans des milieux composés de 36% (v/v) d'extraits ou de phases aqueuses (PA) de la souche 6 (S6) (A) ou de *Clostridium butyricum* (C.b) (B). Des essais ont aussi été faits avec les surnageants (Surn.) complets (non extraits). Un témoin de traitement composé de 36% (v/v) de surnageant traité mais non extrait a été inclus. Les cultures "BM" et "coculture" ont été effectuées avec le milieu BM seul.

3.13 FRACTIONNEMENT DU SURNAGEANT D'UNE CULTURE AUTOCLAVÉE DE *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*

Pour cet essai, le surnageant d'une culture autoclavée de *C. butyricum* a été fractionné à l'aide d'une cellule Amicon avec une membrane de 1000 Da. La Figure 28 montre que le milieu contenant la fraction "inférieure à 1000 Da" a permis d'obtenir une cinétique de transformation se rapprochant de celle observée avec le surnageant entier. À l'inverse, la culture de la souche en présence de la fraction "supérieure à 1000 Da" présente une activité ralentie. La réassociation des deux fractions a conduit à une cinétique qui se confond avec celle en présence du surnageant complet.

3.14 OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DE LA SOUCHE 7

La souche 7, cultivée dans un milieu BM additionné de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 a été observée par microscopie électronique après une coloration négative. Il s'agit d'un court bâtonnet Gram positif qui est très dense aux électrons (Fig. 29). Ce bâtonnet a une dimension d'environ 1,2 µm de largeur et 2 - 2,2 µm de longueur. Quelques flagelles ont été observés.

Lors des observations en microscopie électronique, il a été possible de voir des formes allongées de la souche 7 qui, en fait, étaient des souches qui se divisaient pour se multiplier (Fig. 30a). Des observations de la souche 7 ont aussi été faites en présence d'une culture de la souche 6 autoclavée (Fig. 30b).

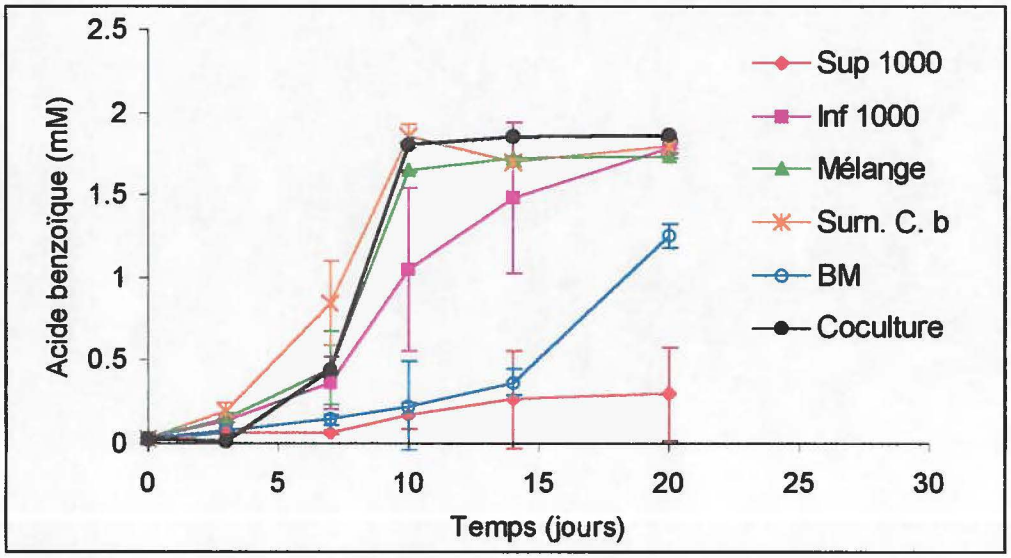


Figure 28 : Essais avec des fractions du surnageant d'une culture autoclavée de *Clostridium butyricum*. Les concentrations d'acide benzoïque ont été suivies dans des milieux de culture contenant 36% (v/v) d'une fraction "supérieure à 1000 Da" (Sup) ou "inférieure à 1000 Da" (Inf) ou encore 18% de chacune de ces fractions (mélange). Un essai avec 36% du surnageant "entier" a été inclus. Les cultures "BM" et "coculture" ont été effectuées avec le milieu BM seul.

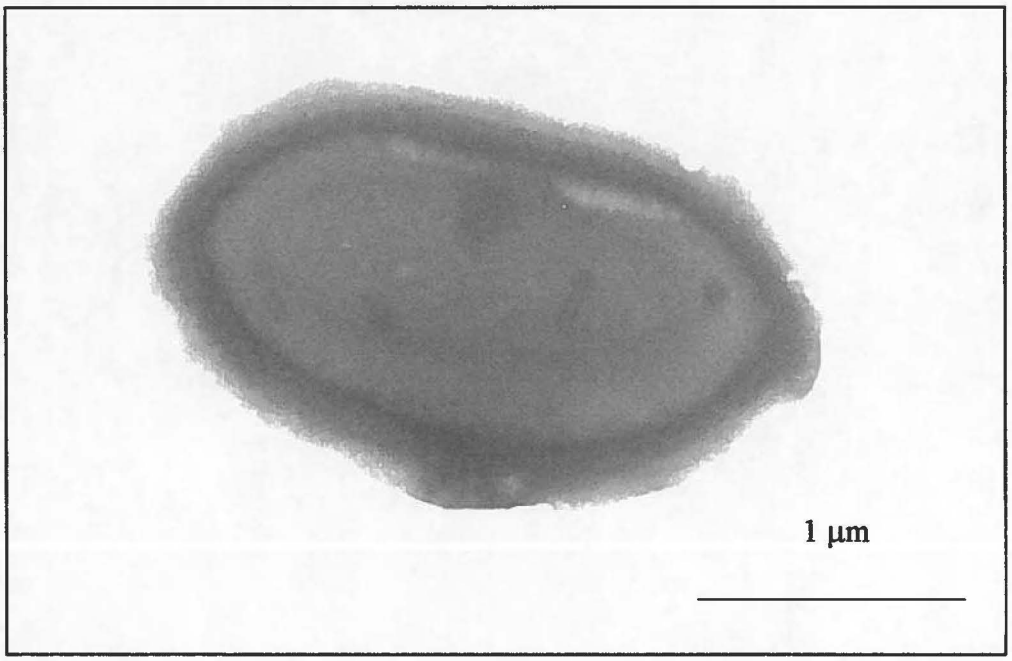
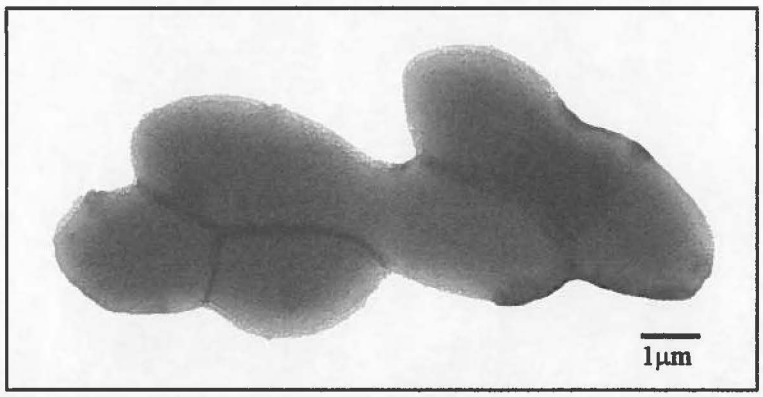


Figure 29 : Observation de la souche 7 en microscopie électronique. La photographie a été prise après une coloration négative, à un grossissement de 88 000 x.

A)



B)

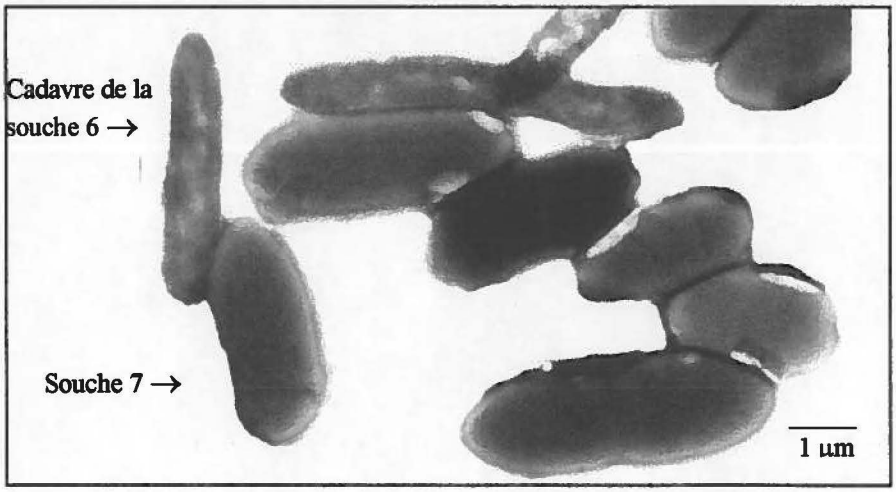


Figure 30 : Observation de la souche 7 en microscopie électronique. La souche 7 en voie de division à un grossissement de 36 000 x (A) et accompagnée de la souche 6 morte suite à l'autoclavage (grossissement de 27 000 x) (B).

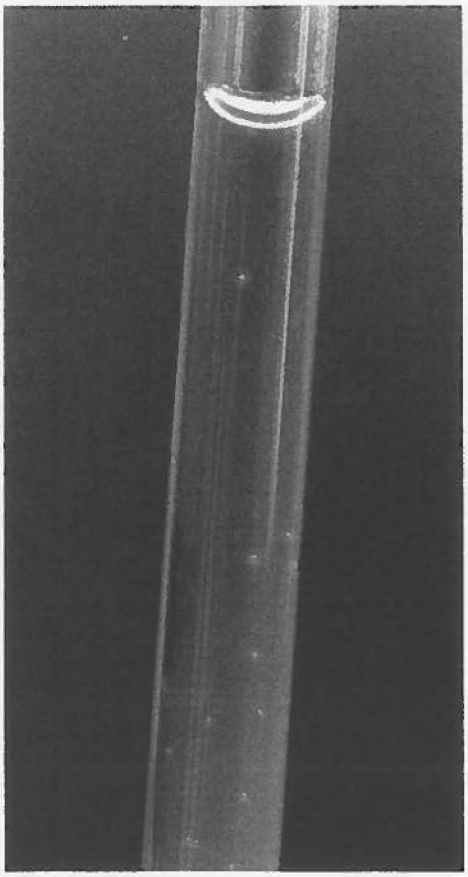
3.15 OBTENTION DE MICRO-COLONIES DE LA SOUCHE 7 EN MILIEU SEMI-SOLIDE

Depuis l'isolement de la souche 7 en culture liquide (Letowski, 2000), de nombreux essais ont été effectués afin d'obtenir des colonies de la souche 7. Les tentatives d'obtenir des colonies sur milieu BM solide, que ce soit en Pétri, dans une bouteille aplatie, dans un vial sérologique ou encore en tube Veillon, ont toutes échoué. De la même manière, il a été impossible d'obtenir des colonies dans une gélose BM semi-solide contenant 0,3% (p/v) d'agar. Toutefois, au cours des présents travaux, nous avons finalement réussi à obtenir des micro-colonies de la souche 7 dans des géloses profondes (tube de Veillon) semi-solide et constituées de milieu BM additionné de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 après 10-15 jours d'incubation à 37°C (Fig. 31a). Les colonies mesuraient environ 1 mm et présentaient parfois une périphérie diffuse avec un centre plus dense (Fig. 31b). La souche obtenue après trois repiquages successifs en milieu semi-solide a été nommée "souche LR7.2".

3.15.1 Observations par microscopie des bactéries constituant les micro-colonies et suivi de leur activité

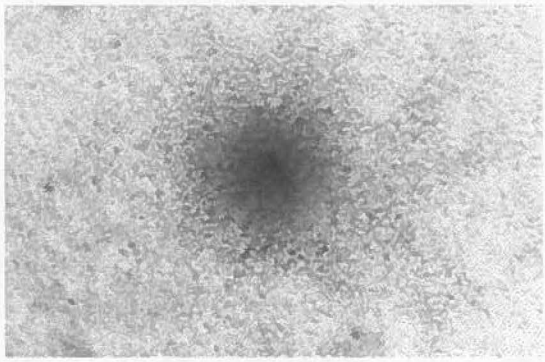
La souche LR7.2 a été observée en microscopie photonique et en microscopie électronique (résultats non illustrés). Celle-ci était morphologiquement identique à la forme de la souche 7 présentée précédemment. La souche LR7.2 cultivée en milieu liquide BM additionné de 36% (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 a transformé l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque sans qu'il y ait toutefois d' accumulation transitoire de phénol (Fig. 32). Lorsque le phénol, plutôt que l'acide 4-hydroxybenzoïque a été fourni au départ, il a aussi été transformé en acide benzoïque (Fig. 33).

A)



1 mm

B)



1 mm

Figure 31 : Micro-colonies de la souche 7 en milieu semi-solide. Le tube Veillon contenait du milieu BM additionné de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 avec 0,3% (p/v) d'agar. (A) Photographie rapprochée du tube de culture (B) Photographie de la micro-colonie réalisée en microscopie photonique à un grossissement de 200 x .

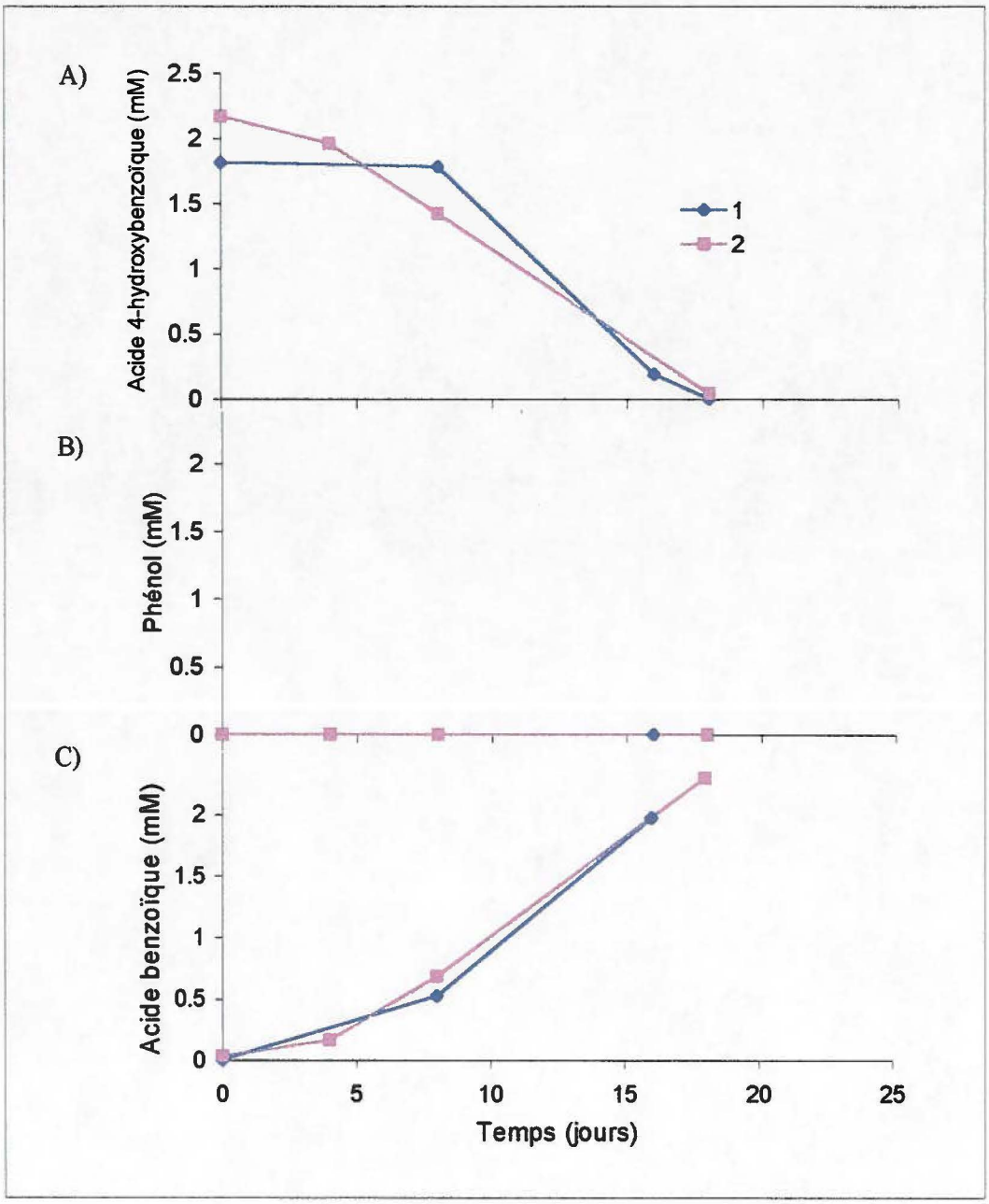


Figure 32 : Suivi de l'activité d'une micro-colonie remise en culture en milieu liquide contenant l'acide 4-hydroxybenzoïque au départ. Les concentrations d'acide 4-hydroxybenzoïque (A), de phénol (B) et d'acide benzoïque (C) ont été suivies dans deux cultures de la souche 7 dans des milieux BM additionnés de 36 % (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6.

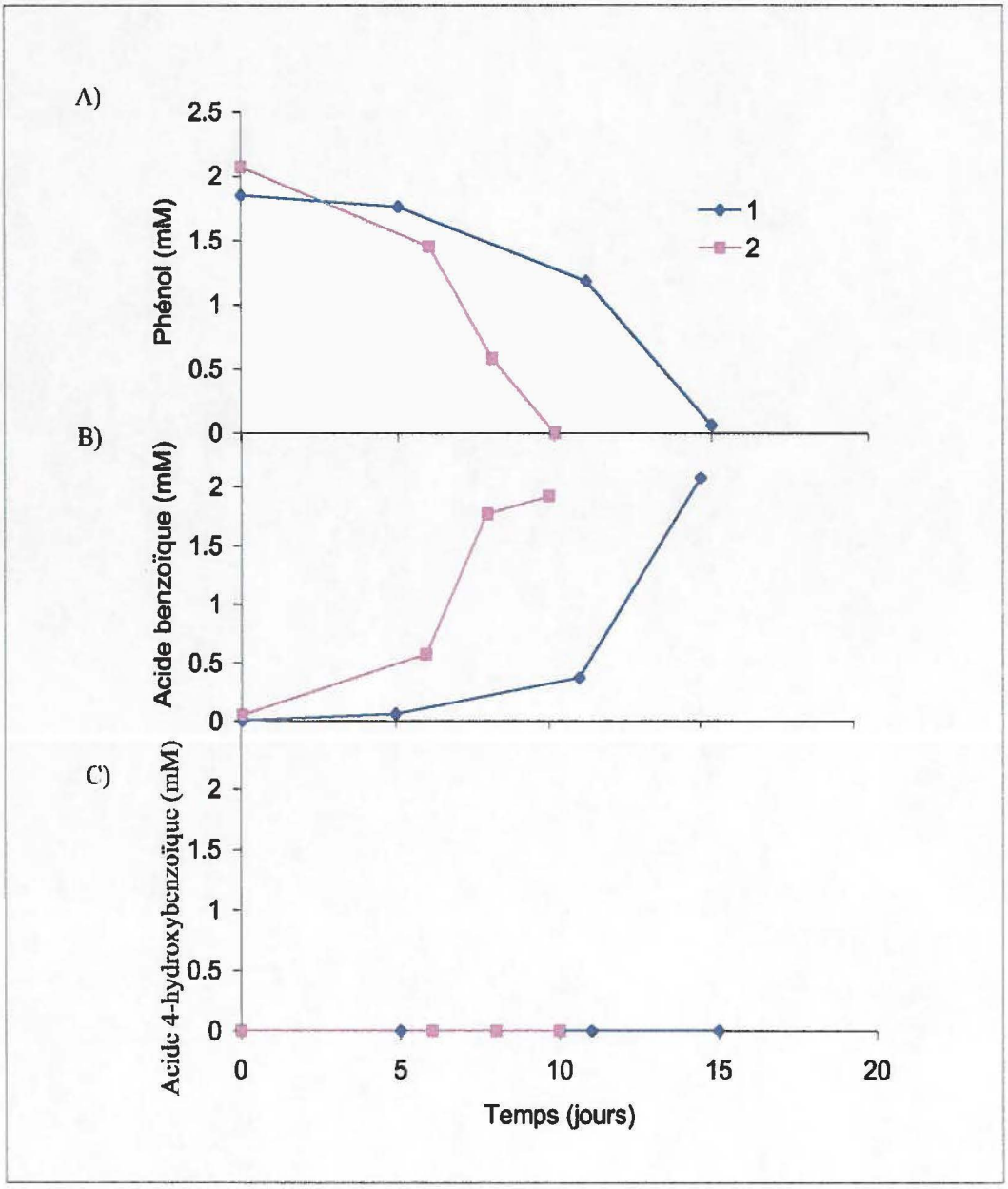


Figure 33 : Suivi de l'activité d'une micro-colonie remise en culture en milieu liquide contenant du phénol au départ. Les concentrations du phénol (A), de l'acide benzoïque (B) et de l'acide 4-hydroxybenzoïque (C) ont été suivies dans deux cultures de la souche 7 dans des milieux BM additionnés de 36 % (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 UTILISATION DE L'ACIDE 4-HYDROXYBENZOÏQUE VERSUS L'UTILISATION DU PHÉNOL DANS LES CULTURES DE LA SOUCHE 7

Le phénol fourni originellement aux cultures depuis le début de l'étude de la souche 7 a été remplacé par l'acide 4-hydroxybenzoïque. De cette façon, il a été possible de vérifier si la souche 7 était capable de transformer ce dernier. De plus, Gallert et Winter (1993) avait noté que le rendement cellulaire de leur consortium était plus grand en utilisant l'acide 4-hydroxybenzoïque comme substrat de départ plutôt que le phénol. La même équipe a ensuite confirmé que la réaction de décarboxylation de l'acide 4-hydroxybenzoïque fournit de l'énergie ce qui se traduit par la formation d'ATP (Gallert et Winter, 1994). Il était donc possible de penser que l'utilisation de l'acide 4-hydroxybenzoïque par la souche 7 pourrait favoriser sa croissance. L'inoculum de la souche 7, utilisé à la Figure 11, était métaboliquement très instable et quasi inactif. Ainsi, le phénol ajouté à la culture n'a pas été transformé alors que l'acide 4-hydroxybenzoïque l'a été. Des repiquages successifs de ces cultures ont également démontré plus de stabilité et d'uniformité pour les cultures en présence d'acide 4-hydroxybenzoïque ce qui pourrait suggérer, dans ce cas, la conservation d'une certaine énergie supplémentaire lors de la réaction de décarboxylation. Il est aussi possible que l'acide 4-hydroxybenzoïque joue un rôle d'activateur des activités enzymatiques impliquées dans la transformation de ce dernier en acide benzoïque. En considérant que l'activité carboxylation/décarboxylation soit assurée par une même enzyme, tel que postulé par He et Wiegel (1995), avec un équilibre favorisé vers le produit de la décarboxylation (voir Figure 9), l'acide 4-hydroxybenzoïque pourrait, par exemple, être responsable d'activer l'activité de déhydroxylation située au niveau de la deuxième

portion de la transformation du phénol en acide benzoïque permettant ainsi un déplacement de l'équilibre de la réaction et un accomplissment de la transformation.

La concentration initiale de l'acide 4-hydroxybenzoïque a été variée afin de voir l'effet sur la croissance de la souche et sur son activité. En effet, il était possible de penser qu'une plus forte concentration générerait une quantité plus importante d'énergie ce qui pourrait se traduire par une croissance plus marquée de la souche. Toutefois, la Figure 12 montre qu'une augmentation de la concentration de l'acide 4-hydroxybenzoïque n'a pas eu d'impact significatif sur la croissance. Ainsi, il demeure possible que la réaction de décarboxylation ait fourni une quantité d'énergie supplémentaire mais ce résultat nous indique qu'un autre élément était manquant dans le milieu de culture et que ce dernier était nécessaire pour obtenir une bonne croissance de la souche 7. Il serait possible d'imaginer que cet élément limitant se trouvait au niveau de la source de carbone par exemple. Il est à noter que la méthode de dénombrement utilisée n'était pas très précise. Le suivi de la croissance a été effectué par énumération directe des cellules observées au microscope puisque la souche 7 ne croît pas sur milieu solide. Cette méthode demeure plutôt une "évaluation" de la croissance qu'une détermination absolue du compte bactérien. La possibilité de faire le suivi de la croissance par la cytofluorométrie a été écartée étant donné la présence d'un précipité dans les milieux de culture qui viendrait augmenter le nombre d'évènements détectés par le cytofluoromètre et ainsi faussement augmenter le compte. Toutefois, malgré son imprécision, la méthode de dénombrement directe est suffisament reproductible pour considérer comme fiable l'observation faite ici, c'est-à-dire l'absence de différence significative entre les courbes de croissance.

4.2 CROISSANCE DE LA SOUCHE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX

4.2.1 Température optimale d'incubation de la souche 7

À l'époque où les travaux étaient effectués avec le consortium, il a été démontré que la température optimale d'incubation était de 37 °C (Beaudet et al., 1986). Nous avons

voulu vérifier si, pour la souche 7 seule, cette température optimale était la même. La Figure 13 permet de conclure que 37°C demeure la température idéale tant pour la croissance que pour l'activité de transformation du phénol. Il est également intéressant de noter l'étroit lien entre la vitesse d'apparition de l'acide benzoïque et la vitesse de croissance de la souche ce qui exprime bien que c'est l'activité bactérienne qui est reponsable de la transformation.

4.2.2 Milieux protéiques riches

Comme cela a déjà été énoncé par Beaudet *et al.* (1986) avec le consortium d'origine et par Li *et al.* (1996) avec la souche 6, il a été démontré que la souche 7 est incapable d'utiliser une source de carbone de nature glucidique (section 3.10.2) et qu'ainsi, elle utilise plutôt des composés de nature protéique comme sources de carbone. Puisqu'il s'agit d'une souche fastidieuse et à croissance très faible, nous avons tenté de la faire croître dans des milieux protéiques très riches afin de combler ses différents besoins. Or, au contraire, aucune croissance ni activité n'ont été observées dans les milieux "Brain Heart Infusion" ou "Luria Broth", deux milieux commerciaux très riches. Les résultats obtenus lors de la culture de la souche dans les milieux à base de viande vont dans le même sens et il est clair que la dilution de ces milieux à base de viande avec le milieu BM a favorisé la souche. De cette façon, des milieux contenant une très forte concentration de matière organique n'améliorent en rien la culture de la souche et inhibent probablement certaines fonctions métaboliques essentielles.

4.2.3 Milieux avec suppléments d'environnements complexes

En considérant la composition du milieu duquel est provenue la souche 7, c'est-à-dire un mélange de lisier de porc, d'eau de marécage, de boues d'une usine d'épuration et de sols, différents ajouts ont été faits au milieu BM pour constituer des milieux de culture. La Figure 15 montre qu'un ajout de surnageant d'un extrait de terre a complètement inhibé l'activité de la souche 7. Ce phénomène pourrait peut-être s'expliquer par la présence de différents composés. Un exemple pourrait être les acides humiques qui sont

fréquemment retrouvés dans le sol et qui auraient pu nuire à la souche 7. Également, le surnageant de lisier de porc a inhibé l'activité de la souche. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus précédemment en milieux riches (4.2.2) où la souche était également complètement inhibée. En effet, le lisier de porc est aussi très riche en matière organique. Un essai avec une concentration moindre de ce surnageant aurait peut-être donné des résultats plus prometteurs. Tout comme Maymò-Gallell *et al.* (1997), nous avons utilisé, dans le milieu de culture, un surnageant de boues d'un digesteur anaérobie. Dans ce cas, une amélioration au niveau de l'activité a été notée mais aucune amélioration n'a été remarquée au niveau de la croissance. De plus, au fil des repiquages dans ces conditions, une instabilité et une variabilité était toujours notée. Le même phénomène a été observé lors de l'essai avec le surnageant de liquide de rumen. Ce résultat est logique puisque ces deux types d'ajouts présentent des similitudes intéressantes. En effet, il s'agit dans les deux cas, d'environnements où une flore bactérienne anaérobie est présente, très active et relâche une multitude de composés. Finalement, cette expérience pourrait peut-être être reprise en diminuant les concentrations finales des ajouts qui sont, d'une part, très riches en matière organique mais qui, d'autre part, peuvent contenir plusieurs composés inhibiteurs de natures diverses.

4.2.4 Effet de différentes souches bactériennes

4.2.4.1 Relation entre la souche 6 et la souche 7

Letowski (2000) a modifié les propos de Li *et al.*(1996) et a montré que la souche 7 est responsable de l'activité de transformation du phénol. Toutefois, il a également énoncé qu'il y aurait une relation particulière "d'entraide" de type inconnu entre la souche 6 et la souche 7. La souche 6 fournirait probablement un élément nécessaire à la souche 7 qui faciliterait la transformation du phénol. Cette activité n'était en effet possible que lorsque la souche 7 était cultivée en présence de la souche 6 ou bien cultivée seule mais dans un surnageant de coculture. Des exemples de "coopérations" impliquant des bactéries anaérobies ont déjà été énoncés. Lors de la déshalogénation de l'acide 3-chlorobenzoïque par *Desulfomonile tiedjei* (Mohn et Tiedje, 1992), cette dernière fournissait l'acide

benzoïque à la souche BZ-2 (bactérie fermentaire) et, en échange, BZ-2 ou *Methanospirillum sp* (bactérie méthanogène) produisaient des vitamines nécessaires à *D. tiedjei* pour effectuer la déshalogénation. Dans le cas de la déshalogénation du tétrachloroéthène par "*Dehalococcoides ethenogenes*" (dénomination non validée) (Maymò-Gatell et al., 1997), le composé échangé entre les bactéries n'a pas été identifié mais, pour croître, la culture pure de *D. ethenogenes* devait se faire en présence de surnageant ou d'extrait cellulaire de la culture mixte de laquelle elle originait.

Comme nous l'avons observé dans le cadre des présents travaux, la souche 7 peut être cultivée seule en milieu BM si de l'acide 4-hydroxybenzoïque plutôt que du phénol est fourni au départ. Nous savions que, même avec l'acide 4-hydroxybenzoïque, la présence de la souche 6 était favorable puisque la coculture le transformait toujours plus rapidement et que l'activité de la culture était facile à maintenir dans ces conditions. Dans un premier temps, une expérience (Fig. 16) a démontré que le volume de l'inoculum initial de la souche 7 au sein de la coculture n'avait pas d'influence sur la cinétique de l'activité de transformation. Dans tous les cas, le fait de cultiver la souche 7 avec la souche 6 vivante a favorisé la souche et accéléré l'activité. Partant de cette idée, il a été imaginé de faire croître la souche 7 dans un surnageant d'une culture de la souche 6 en supposant que le ou les facteurs produits soient relâchés dans le milieu. Cet essai a donné des résultats positifs et a accéléré l'activité de transformation de la souche (Fig. 17). Une autre approche s'est avérée encore plus intéressante. Une culture de la souche 6, après incubation, a été autoclavée afin de libérer tout le contenu des cellules dans le milieu de culture et de vérifier la résistance du ou des facteurs à l'autoclavage. L'ajout de 36% (v/v) de cette culture autoclavée au milieu BM a constitué de très bonnes conditions de culture et une activité accélérée a été notée. Ce résultat a ainsi confirmé la thermorésistance du facteur.

Des travaux ont été entrepris dans le but de déterminer si le ou les facteurs positifs retrouvés dans la culture autoclavée de la souche 6 se trouvaient au niveau du surnageant ou du culot de cette dernière. Il était possible de penser que les débris cellulaires retrouvés dans le culot pouvaient servir de sources de différents éléments pour la souche

7. Autrement, ce facteur pourrait être en suspension dans la phase aqueuse du milieu de culture. L'ajout du surnageant ou du culot de la souche 6 autoclavée a, de façon similaire, nettement accéléré l'activité tout comme la culture autoclavée complète. Le fait que le culot n'était pas un culot lavé mais simplement resuspendu pourrait expliquer ce résultat. Ainsi, les cultures subséquentes ont été faites en présence de 36% (v/v) du surnageant de la culture autoclavée ce qui facilitait le suivi de la croissance de la souche 7 par décompte microscopique étant donné l'absence des "cadavres" de la souche 6. À partir de ce moment, nous avions donc trouvé des conditions de culture qui nous permettaient de maintenir la souche au fil des repiquages sans perdre l'activité et ce, avec une reproductibilité accrue. Toutefois, à ce moment, il n'y a pas eu d'amélioration significative au niveau de la croissance de la souche dans ces nouvelles conditions.

La rupture des cellules lors de l'autoclavage aurait aussi peut-être pu entraîner une libération de fer ou encore de minéraux traces qui étaient contenus dans les cellules d'où les essais de culture de la souche en milieu BM avec des concentrations accrues de fer et de minéraux traces. Toutefois, l'expérimentation nous a démontré que cette augmentation de fer et de minéraux traces n'a pas amélioré la culture en comparaison au milieu BM seul.

4.2.4.2 Relation avec des souches autres que la souche 6

À ce moment du projet, il était clair qu'une relation particulière existait entre les souches 6 et 7. En effet, l'effet positif en présence du surnageant de la culture autoclavée de la souche 6 a été démontré à plus d'une reprise. La question demeurait toutefois à savoir si ce "facteur" et cette relation était spécifique à la souche 6 ou si, encore, l'ajout du surnageant d'une autre culture autoclavée pouvait engendrer le même effet. Ainsi, différentes souches, cultivées en anaérobiose, ont été choisies en raison de leur similitude ou de leur différence au niveau phylogénique. *Enterococcus faecalis* a été sélectionné comme le "représentant éloigné" de la souche 7. Letowski (2000) a montré que la souche 7 présentait un pourcentage d'homologie d'environ 90% avec le genre *Desulfitobacterium* au niveau de leur séquence du gène de l'ARNr 16S. Plus particlièrement, elle présente

91% d'homologie avec la bactérie *Desulfitobacterium frappieri* (Letowski, 2000) qui a été choisie comme le "représentant rapproché" de la souche 7. Finalement, la souche *Clostridium butyricum* a été sélectionnée pour sa similitude avec la souche 6 qui a été identifiée comme une souche apparentée au genre *Clostridium* (Li et al., 1996).

Les résultats indiquent que le ou les facteurs "positifs" ne sont probablement pas spécifiques à la souche 6 puisque l'ajout du surnageant de *Clostridium butyricum* a engendré une accélération de l'activité encore plus marquée. Étant donné la proximité entre la souche 6 et *Clostridium butyricum*, il apparaît plausible que la nature des facteurs produits par ces souches pourrait être semblable. Ceci dit, l'ajout du surnagant d'*Enterococcus faecalis* a aussi favorisé la souche et une accélération de l'activité a été notée. Toutefois, au niveau de la croissance, une amélioration plus significative a été remarquée en présence du surnageant de *Clostridium butyricum* (1 à 1,5 log). Dans cette expérience, l'ajout du surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 a permis aussi un léger gain au niveau de la croissance (environ 0,5 à 1 log) de la souche 7 (résultats non illustrés) comparativement à certains essais faits précédemment dans ces conditions. Cela indique probablement une certaine adaptation de la souche à ces conditions. Il est aussi important de remarquer, à la Figure 20, que l'activité a été beaucoup plus stable et les résultats plus reproductibles en présence des différents ajouts comparativement au comportement en milieu BM. Cela se traduit par les barres d'erreur qui sont beaucoup moins importantes.

4.3 NATURE DU OU DES FACTEURS FAVORABLES À LA SOUCHE 7

4.3.1 Sensibilité à l'oxygène du surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6

Dans le but de caractériser le ou les facteurs retrouvés dans le surnageant de la culture autoclavée de la souche 6 et aussi dans l'optique de vérifier l'éventuelle possibilité

d'extraire ce surnageant à l'air libre, la sensibilité à l'oxygène de ces facteurs a été déterminée. L'expérimentation a révélé que même après une forte oxygénation, l'effet positif était présent. Ce résultat indique clairement que les facteurs n'ont pas été affectés par l'exposition à l'oxygène.

4.3.2 Cultures avec des composés reliés à la voie de synthèse de la phénylalanine

L'essai avec l'ajout du surnageant d'une culture autoclavée de *Clostridium butyricum* a particulièrement attiré notre attention. En effet, lors du suivi des différents composés par chromatographie en phase gazeuse, un nouveau pic, jamais vu auparavant, a été détecté sur les chromatogrammes. De plus, la surface sous la courbe de ce pic diminuait au fil du temps indiquant que ce composé, possiblement produit par *Clostridium butyricum*, serait consommé par la souche 7. L'hypothèse que ce composé soit responsable de l'effet positif obtenu en présence de ce surnageant a donc été posée. Ce composé a été identifié par spectrométrie de masse comme étant l'acide 3-phénylpropionique. Ceci nous a conduit sur une nouvelle piste dans le cadre du projet de la souche 7. En effet, Lépine *et al.* (1996) ont démontré, avec le consortium d'origine, qu'une portion du phénol fourni (4%) était transformée en phénylalanine. Une voie métabolique mineure de transformation du phénol en phénylalanine a ainsi été proposée et l'acide 3-phénylpropionique de même que l'acide cinnamique ont été identifiés comme des intermédiaires dans la voie de synthèse de la phénylalanine. Dans cette optique, nous avons posé comme hypothèse que l'acide 3-phénylpropionique produit par *C. butyricum,* serait peut-être utilisé par la souche 7 et que l'apport additionnel en phénylalanine pourrait être responsable du bon comportement de la culture. Ainsi, différentes cultures ont été testées en milieu BM avec des ajouts d'acide 3-phénylpropionique, d'acide cinnamique ou de phénylalanine. Ces amendements au milieu BM n'ont pas permis de recréer l'effet positif obtenu avec le surnageant de la culture autoclavée de *C. butyricum*. À la lumière de ces résultats, nous ne pouvons déterminer si l'acide 3-phénylpropionique retrouvé est impliqué ou non dans cette voie de biosynthèse mais, chose certaine, il ne s'agit pas du seul élement présent dans le surnageant de *C. butyricum* qui aide à la souche 7. D'ailleurs, l'acide 3-phénylpropionique n'a pas été détecté dans le surnageant des

cultures autoclavées de la souche 6 qui, pourtant, engendre lui aussi une accélération de l'activité.

4.3.3 Cultures avec le coenzyme A

En anaérobiose, l'activation des composés aromatiques par l'addition d'une molécule de coenzyme A représente une étape fréquemment retrouvée dans différentes voies cataboliques. Cette activation est assurée par des enzymes nommées "coenzyme A ligases" (Villemur, 1995). Chez la bactérie dénitrifiante *Thauera aromatica* par exemple, l'acide 4-hydroxybenzoïque est activé en acide 4-hydroxybenzoyl-CoA avant d'être déhydroxylé en acide benzoyl-CoA puis dégradé jusqu'au CO_2 (Lack et Fuchs, 1994). Gallert et Winter (1994) ont aussi observé ces deux étapes (formation de benzoyl-CoA et déhydroxylation) chez leur consortium méthanogène mais il y avait ensuite libération du CoA et formation d'acide benzoïque. En considérant ces faits, il a été imaginé que cette voie puisse être empruntée par la souche 7 et qu'ainsi l'ajout de coenzyme A, qui pourrait être présent en quantité limitante dans la cellule de la souche 7, pourrait favoriser son activité ainsi que sa croissance. L'ajout de coenzyme A dans le milieu BM seul n'a eu aucun effet (Fig. 24). Par contre, ce même ajout dans des milieux contenant les surnageants de cultures autoclavées de la souche 6 et de *C. butyricum* nous a permis d'observer une accélération des activités par rapport aux milieux sans coenzyme A ajouté. Ainsi, le coenzyme A a bel et bien un effet positif sur l'activité de transformation mais ce n'est pas l'élément qui pourrait expliquer, à lui seul, la stimulation de l'activité et de la croissance de la souche 7 par les surnageants de culture.

4.3.4 Cultures avec l'ajout de sulfites ou de sulfates

Dans le métabolisme anaérobie, la présence des accepteurs externes d'électrons est très importante et peut même être déterminante dans le fait qu'un métabolisme ou un autre soit emprunté par la bactérie. Dans le cas de la souche 7, nous ignorons encore quel accepteur terminal d'électron est utilisé par la souche. Letowski (2000) a démontré, tel que mentionné plus tôt, que la souche 7 présentait une importante homologie avec le

genre *Desulfitobacterium*, genre à l'intérieur duquel les différents représentants utilisent les sulfites comme accepteur terminal d'électrons. Il a aussi précisé qu'une homologie au niveau du gène de l'ARNr 16S existait entre la souche 7 et certains représentants du genre *Desulfotomaculum* qui utilisent, pour leur part, les sulfates comme accepteur terminal d'électrons. Ainsi, cela pourrait nous amener à penser que la souche 7, étant donné sa similitude, serait en mesure d'utiliser les sulfites ou encore les sulfates. Ces derniers sont certainement présents dans les milieux de culture suite à l'oxydation du soufre provenant du Na_2S qui est présent comme agent réducteur dans les milieux de culture mais ils peuvent toutefois être en quantité limitante et un ajout pourrait améliorer la croissance et l'activité de la souche. Des essais à différentes concentrations de sulfites et de sulfates ajoutés ont donc été faits dans le milieu BM contenant 0,5% (p/v) d'extrait de levure comme source de carbone et dans les milieux contenant 36% (v/v) de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 et du milieu BM. Il est à noter dans cette expérience que le protéose peptone a exceptionnellement été remplacé par l'extrait de levure comme source de carbone et ce, afin de reproduire un résultat déjà obtenu auparavant.

L'ajout de sulfates n'a rien amélioré. En effet, peu importe la concentration ou encore les conditions du milieu de culture, les sulfates n'ont eu aucun effet, ni sur l'activité ni sur la croissance de la souche ce qui indique que celle-ci ne les utilise pas. L'addition des sulfites a eu un effet beaucoup plus marqué. Par exemple, en milieu BM seul, l'activité et la croissance ont été nettement améliorés jusqu'à une certaine concentration de sulfites. À 5 mM, la souche a été complètement inhibée indiquant qu'à une forte concentration, les sulfites ont un effet inhibiteur pour la souche 7 contrairement à ce qui est observé avec la souche *Desulfitobacterium frappieri* pour laquelle l'addition de 5 mM de sulfites au milieu de culture engendre une amélioration marquée au niveau de la croissance de la souche (Bouchard et al., 1996). Dans les milieux avec 36% (v/v) de surnageant ajouté, les résultats obtenus ont été différents. Le même effet positif a été observé à de faibles concentrations de sulfites mais dès qu'une concentration de 1 mM a été atteinte, l'effet inhibiteur a débuté pour ralentir complètement la souche à 2 et 5 mM. Ce résultat semble indiquer que le milieu additionné de surnageant contenait déjà au départ une concentration de sulfites ce qui expliquerait que l'inhibition soit apparue plus tôt dans ces

conditions. À la lumière de ces résultats, il serait logique de poser comme hypothèse que la présence des sulfites dans les conditions avec le surnageant de la culture de souche 6 autoclavée pourrait, en partie, être responsable de l'effet positif retrouvé dans ces conditions. Brauman *et al.* (1998) ont isolé la souche anaérobie stricte "*Sporotomaculum hydroxybenzoicum*" qui utilise l'acide 3-hydroxybenzoïque comme source d'énergie et de carbone. Ils ont déclaré que cette dernière était incapable d'utiliser les sulfites comme accepteur terminal d'électrons mais les expériences faites pour le déterminer ont été exécutées à une concentration de 10 mM de sulfites. En considérant les donnés que nous avons obtenus avec la souche 7, il est possible de croire que l'ajout de sulfites dans le milieu de culture de *Sporotomaculum* à des concentrations de l'ordre de 0,25, 0,5 ou encore 1 mM pourrait peut-être conduire à des résultats différents quant à la capacité de cette dernière à utiliser les sulfites.

Nous avons essayé de doser les sulfites dans le surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 et dans le milieu BM afin de comparer les valeurs obtenues qui, selon notre hypothèse, devraient différées et être plus élevées dans le surnageant. Suite à plusieurs recherches, la méthode iodométrique a été retenue pour doser ces sulfites, méthode qui semble être couramment utilisée dans ce genre d'exercice. Toutefois, en suivant la méthode sans modification, il nous a été impossible de doser les échantillons et d'obtenir des valeurs. Cette méthode, qui est une titration, a présenté beaucoup d'interférence et de fluctuation avec les échantillons. Il faudrait donc envisager des modifications dans la présente méthode ou encore l'emploi d'une autre méthode, un peu plus complexe au niveau des manipulations, comme la méthode phénanthroline (Clesceri, Greenberg et Trussell, 1989) par exemple qui pourrait peut-être donner de meilleurs résultats.

4.3.5 Fractionnement des surnageants de culture

4.3.5.1 Extractions de surnageants de cultures autoclavées de la souche 6 ou de *Clostridium butyricum*

Puisque nous avons démontré plus tôt dans l'expérimentation que le ou les facteurs étaient résistants à l'oxygénation, nous avons tenté d'extraire à l'air libre les surnageants de cultures autoclavées à l'aide de solvants organiques de manière à obtenir une phase organique, qui contiendrait idéalement le facteur, et une phase aqueuse épuisée. Cette phase organique pourrait, par la suite, être étudiée de manière à identifier le facteur inconnu. Toutefois, cette expérience a impliqué de nombreuses manipulations qui se sont avérées néfastes. En effet, la souche 7 est très sensible aux changements dans les conditions de culture. Ainsi, la moindre trace de solvant organique résiduel ou encore un potentiel d'oxydo-réduction légèrement plus élevé que normalement a probablement affecté grandement son métabolisme ce qui expliquerait la grande variabilité observée au niveau des résultats. Ainsi, peu importe le solvant organique utilisé ou encore la valeur de pH à laquelle l'extraction a été effectuée, cette approche n'a pas permis de recueillir des résultats interprétables. Une extraction sur phase solide pourrait être une approche plus prometteuse étant donné le nombre limité de manipulations par rapport à l'extraction présentée ci-dessus.

4.3.5.2 Séparation à l'aide de la cellule Amicon sur la base du poids moléculaire

Une autre stratégie de fractionnement utilisée fut la séparation des éléments du surnageant de *C. butyricum* sur la base de leur poids moléculaire. Un avantage de cette approche, où il y a filtration sur une membrane de faible porosité, était de limiter les manipulations par rapport aux extractions avec solvant. La fraction retenue par la membrane qui contient les composés supérieurs à 1000 Da n'a pas aidé la souche et n'a pas accéléré l'activité alors que la fraction "inférieure à 1000 Da" a eu un effet stimulant presque similaire au surnageant entier, ceci en comparaison à la cinétique en milieu standard BM. Cela nous indique que le ou les facteurs positifs sont d'un poids inférieur à

1000 Da et donc de petites molécules. En fait, nous nous attendions à ce résultat. Étant donné la résistance à l'autoclavage des facteurs, il était facile de penser que le facteur n'était probablement pas une protéine ayant un poids moléculaire important qui n'aurait assurément pas résisté à une température de 121°C pendant 20 minutes. Puisque ce résultat a été obtenu à la fin des travaux de maîtrise, nous n'avons pas pu, dans le cadre du projet, investiguer plus loin et analyser la composition de la fraction "inférieure à 1000 Da". Toutefois, puisque le projet sera poursuivi par un autre étudiant, cette méthode de fractionnement sera déjà au point et pourra alors être utilisée afin d'arriver à identifier la nature de ces facteurs inconnus qui pourrait être, par exemple, de petites vitamines qui auraient résisté à l'autoclavage ou encore un élément minéral.

4.4 OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DE LA SOUCHE 7

La souche 7 est un court bâtonnet très dense aux électrons. Lors des différentes observations au cours de ce projet, nous avons clairement noté pour la première fois la présence de flagelles qui, malheureusement, ne sont pas observables sur aucune des photographies obtenues. Lors de l'observation de la souche 7 en présence d'une culture autoclavée de la souche 6, nous avons pu distinguer aisément les deux formes, soit la souche 7 vivante et les résidus de la souche 6 tuée par autoclavage. Différentes variations au niveau de la technique de préparation des échantillons ont permis d'obtenir des images plus nettes et plus claires. Une coloration négative raccourcie à quelques secondes seulement a d'ailleurs été retenue comme la meilleure méthode.

4.5 ISOLEMENT EN MILIEU SEMI-SOLIDE

Lors de l'obtention d'une nouvelle souche comme la souche 7, il est idéal que la bactérie subissent plusieurs repiquages sur milieu solide, de colonies à colonies, avant que la souche puisse être déclarée hors de tout doute "culture pure". Dans notre cas, la souche 7 est incapable de croître sur milieu solide. Ainsi, de nombreux essais de culture ont été

faits avec différents milieux contenant des pourcentages moins importants d'agar et, après plusieurs tentatives, des micro-colonies ont finalement été obtenues dans des tubes allongées contenant du milieu BM, 36% de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 et seulement 0,3% (p/v) d'agar. L'utilisation des tubes de Veillon a été très avantageuse puisque cette technique permet de bien maintenir l'anaérobiose étant donné la profondeur, ce qui est essentiel avec la souche 7 qui est très sensible à l'exposition à l'oxygène. Les micro-colonies obtenues ont été très petites et parfois même difficiles à observer à l'oeil nu.

L'observation par microscopie des bactéries qui composaient ces micro-colonies (souches LR7.2) n'a rien révélé de particulier. En effet, les bactéries présentes semblaient, en tout point, être identiques morphologiquement à la forme habituelle de la souche, observée jusqu'à ce moment en culture liquide. Ainsi, ce résultat semblait bien indiquer que les micro-colonies obtenues étaient composées de la souche 7. Toutefois, la remise en suspension et en culture liquide de la souche LR7.2 a donné un résultat surprenant. L'activité observée était désormais seulement une déhydroxylation (Figure 32), soit le passage direct de l'acide 4-hydroxybenzoïque à l'acide benzoïque, sans l'activité de carboxylation-décarboxylation qui résulte en l'accumulation transitoire de phénol et qui avait toujours été observée avec la culture liquide (Figure 11). Ceci dit, lorsque le phénol était fourni au départ aux cultures provenant de micro-colonies, il était transformé en acide benzoïque présumément via une *para*-carboxylation (Figure 33). L'hypothèse que le passage en milieu semi-solide ait modifié les activités enzymatiques de la souche demeure peu probable car la pression sélective était la même qu'en milieu liquide (même concentration d'acide 4-hydroxybenzoïque). Il serait plus plausible que la croissance sur milieu semi-solide ait engendré la sélection d'une sous-population de la souche 7 qui présente une activité enzymatique légèrement différente soit absence d'une décarboxylase. Encore, peut-être s'agit-il de deux populations différentes, chacune étant responsable d'une portion de l'activité. Toutefois, ces énoncés demeurent simplement des hypothèses et rien ne peut être affirmé en considérant ce résultat nouvellement obtenu. De plus profondes investigations et d'autres expériences devront être faites afin de pouvoir interpréter correctement ce résultat.

CONCLUSION

La biodégradation de plusieurs composés aromatiques a souvent été observée sous des conditions d'anaérobioses. Notamment, la biodégradation du phénol en conditions méthaniques a été étudiée. Plusieurs mécanismes demeurent toutefois mal compris étant donné la complexité des regroupements microbiens impliqués dans ce genre de métabolisme. La souche 7, issue originellement d'un consortium méthanogène, est un organisme capable de transformer le phénol (sous certaines conditions) et l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque en présence d'une source de carbone et donc par cométabolisme. Il s'agit d'une souche à croissance faible et le maintien de son activité est difficile. La difficulté que nous avons à élucider le métabolisme de cette souche ainsi que la nature de sa relation avec d'autres souches anaérobies est une belle illustration de la complexité des systèmes anaérobies. L'objectif du présent projet était de caractériser la souche 7 ainsi que d'identifier ses besoins spécifiques de manière à optimiser sa croissance et son activité de transformation.

Dans le cadre du projet, il a d'abord été démontré que la culture de la souche 7 était favorisée lorsque l'acide 4-hydroxybenzoïque était fourni initialement dans les cultures plutôt que le phénol. Dans ces conditions, le maintien de l'activité au fil des repiquages était plus facile ce qui explique que l'ensemble des expériences ont été réalisées en présence d'acide 4-hydroxybenzoïque. Toutefois, la variation de la concentration de cet acide fourni aux cultures n'a pas eu d'impact sur la densité des populations de la souche 7. De la même manière, une stabilisation de la culture de la souche 7 ainsi qu'une stimulation de son activité ont été obtenues lors de l'ajout de 36% du surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6 ou de *Clostridium butyricum* au milieu BM. À partir de ce moment, ces conditions de culture nous ont permis de maintenir l'activité de la souche au fil des repiquages sans problème et avec une reproductibilité accrue. Seulement une légère amélioration au niveau de la croissance a toutefois été obtenue dans ces conditions.

La nature exacte du ou des facteurs favorables à la souche 7 et fournis par la souche 6 et par *Clostridium butyricum* nous échappe encore. Par contre, nous savons à ce jour qu'il

s'agit d'un facteur thermostable et qui est résistant à l'oxygène. Également, nous avons pu déterminer qu'il est de faible poids moléculaire (<1000 Da). Nous avons également montré que l'acide 3-phénylpropionique présent dans le surnageant de *C. butyricum* n'était pas, à lui seul, responsable de l'effet positif qu'a procuré le surnageant. De la même façon, le coenzyme A a engendré un effet positif sans être le seul élément responsable de cet effet.

Les sulfites ajoutés, en faible concentration, au milieu de culture ont eu un effet stimulant pour la souche 7. D'ailleurs, une concentration de sulfites, légèrement supérieure à celle dans le milieu BM standard, retrouvée dans le surnageant de la culture autoclavée de la souche 6 pourrait être à l'origine de l'effet positif de ce surnageant. Toutefois, cette hypothèse devra être vérifiée à l'aide d'une méthode qui permettra de doser les sulfites dans ce genre d'échantillons.

Pour la première fois, des micro-colonies de la souche 7 ont été obtenues en milieu semi-solide. La chose a été rendue possible grâce à l'utilisation d'une faible concentration d'agar et d'un milieu BM additionné de surnageant d'une culture autoclavée de la souche 6. Ces colonies semblaient être, en tout point, constituées de bactéries morphologiquement identiques à la forme de la souche 7. La souche isolée (LR7.2) et testée en culture liquide était capable de transformer le phénol et l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque mais elle ne montrait aucune décarboxylation de l'acide 4-hydroxybenzoïque. Donc, la souche LR7.2 présente une activité légèrement différente de l'activité de la culture liquide de la souche 7. L'activité de décarboxylation de la souche 7 pourrait être due à la présence d'une sous-population apparentée à la souche 7 et qui possède cette activité de décarboxylation. Il faudrait, pour confirmer cette hypothèse, isoler sur milieu solide la souche responsable de la décarboxylation de l'acide 4-hydroxybenzoïque.

Les travaux de l'actuel projet de maîtrise ont été déterminants puisqu'ils ont permis d'identifier des conditions de culture permettant de cultiver une souche 7 active et capable de se maintenir au fil du temps. Ils ont également permis l'isolement de la souche LR7.2

en milieu semi-solide. Un petit pas a ainsi été franchi vers ce grand défi qu'est la compréhension des mécanismes de transformation du phénol en conditions méthanogènes.

LISTE DE RÉFÉRENCES

ALLENDE, J. L., A. Gibello, A. Fortun, G. Mengs, E. Ferre et M. Martin. 2000. «4-hydroxybenzoate uptake in an isolated soil *Acinetobacter* sp.». Current Microbiology, vol. 40, p. 34-39.

BABICH, H. et D. L. Davis. 1981. «Phenol: a review of environmental and health risks». Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 1, p. 90-109.

BAK, F. et F. Widdel. 1986. «Anaerobic degradation of indolic compounds by sulfate-reducing enrichment cultures, and description of *Desulfobacterium indolicum* gen. nov. sp. nov.». Archives of Microbiology, vol. 146, p. 170-176.

BAK, F. et F. Widdel. 1986a. «Anaerobic degradation of phenol and phenolic derivatives by *Desulfobacter phenolicum* sp. nov.». Archives of Microbiology, vol. 146, p. 177-180.

BAKKER, G. 1977. «Anaerobic degradation of aromatic compounds in the presence of nitrate». FEMS Letters, vol. 1, p. 103-108.

BALBA, M. T. et W. C. Evans. 1980. «The methanogenic biodegradation of catechol by a microbial consortium: evidence for the production of phenol through *cis* -benzenediol». Biochemical Society Transactions, vol. 8, p. 452-453.

BEAUDET, R., J.-G. Bisaillon, M. Ishaque et M. Sylvestre. 1986. «Isolation of an anaerobic bacterial consortium degrading phenolic compounds - assay in swine waste». Agricultural Wastes, vol. 17, p. 131-140.

BÉCHARD, G., J.-G. Bisaillon, R. Beaudet et M. Sylvestre. 1990. «Degradation of phenol by a bacterial consortium under methanogenic conditions». Canadian Journal of Microbiology, vol. 36, p. 573-578.

BERRY, D. F., A. J. Francis et J.-M. Bollag. 1987. «Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions». Microbiological Reviews, vol. 51, no. 1, p. 43-59.

BISAILLON, J.-G., F. Lépine et R. Beaudet. 1991. «Study of the methanogenic degradation of phenol via carboxylation to benzoate». Canadian Journal of Microbiology, vol. 37, p. 573-576.

BISAILLON, J.-G., F. Lépine, R. Beaudet et M. Sylvestre. 1991a. «Carboxylation of *o* - cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions». Applied and Environmental Microbiology, vol. 57, no. 8, p. 2131-2134.

BISAILLON, J.-G., F. Lépine, R. Beaudet et M. Sylvestre. 1993. «Potential for carboxylation-dehydroxylation of phenolic compounds by a methanogenic consortium». Canadian Journal of Microbiology, vol. 39, p. 642-648.

BISAILLON, J.-G., R. Beaudet, F. Lépine et M. Sylvestre. 1994. «Microbiological study of the carboxylation of phenols by methanogenic fermentation». Water Pollution Research in Canada, vol. 29, no. 1, p. 117-127.

BOUCHARD, B., R. Beaudet, R. Villemur, G. McSween, F. Lépine et J.-G. Bisaillon. 1996. «Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 46, no. 4, p. 1010-1015.

BOYD, S. A., D. R. Shelton, D. Berry et J. M. Tiedje. 1983. «Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge». Applied and Environmental Microbiology, vol. 46, no. 1, p. 50-54.

BROCK, T. D. et M. T. Madigan. 1991. Biology of microorganisms. 6e édition. Englewood Cliffs, New-Jersey : Prentice Hall, 874 p.

CERNIGLIA, C. E. 1984. «Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons». Advances in Applied Microbiology, vol. 30, p. 31-71.

CLESCERI, L. S., A. E. Greenberg et R. R. Trussell. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington : American Public Health Association, 1587 p.

COLBERG, P. J. et L. Y. Young. 1982. «Biodegradation of lignin-derived molecules under anaerobic conditions». Canadian Journal of Microbiology, vol. 28, p. 886-889.

DAVI, M. L. et F. Gnudi. 1999. «Phenolic compounds in surface water». Water Research, vol. 33, no. 14, p. 3213-3219.

DOJKA, M. A., P. Hugenholtz, S. K. Haack et N. R. Pace. 1998. «Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, no. 10, p. 3869-3877.

DOLFING, J. et J. M. Tiedje. 1988. «Acetate inhibition of methanogenic, syntrophic benzoate degradation». Applied and Environmental Microbiology, vol. 54, no. 7, p. 1871-1873.

DRZYZGA, O., S. Jannsen et K.-H. Blotevogel. 1994. «Mineralization of monofluorobenzoate by a diculture under sulfate-reducing conditions». FEMS Microbiology Letters, vol. 116, p. 215-220.

DUTTON, P. L. et W. C. Evans. 1969. «The metabolism of aromatic compounds by *Rhodopseudomonas palustris* ». Biochemical Journal, vol. 113, p. 525-535.

ELDER, D. J. E. et D. J. Kelly. 1994. «The bacterial degradation of benzoic acid and benzoid compounds under anaerobic conditions: unifying trends and new perspectives». FEMS Microbiology Reviews, vol. 13, p. 441-468.

EPA. 1998. Envirofacts warehouse chemical references Phenol CAS #108-95-2. Environmental Protection Agency. Washington.

EVANS, W. C. 1977. «Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments». Nature, vol. 270, no. 3, p. 17-22.

EVANS, W. C. et G. Fuchs. 1988. «Anaerobic degradation of aromatic compounds». Annual Reviews in Microbiology, vol. 42, p. 289-317.

FANG, H. H. P., Y. Liu et T. Chen. 1997. «Effect of sulfate on anaerobic degradation of benzoate in UASB reactors». Journal of Environmental Engineering, vol. 123, no. 4, p. 320-328.

FERRY, J. G. 1992. «Methane from acetate». Journal of Bacteriology, vol. 174, no. 17, p. 5489-5495.

FRIES, M. R., J. Zhou, J. Chee-Sanford et J. M. Tiedje. 1994. «Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats». Applied and Environmental Microbiology, vol. 60, no. 8, p. 2802-2810.

FUCHS, G., M. Mohamed, U. Altenschmidt, J. Koch, A. Lack, R. Brackmann, C. Lochmeyer et B. Oswald. 1994. «Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds». In Biochemistry of microbial degradation, p. 513-553. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers.

GALLERT, C., G. Knoll et J. Winter. 1991. «Anaerobic carboxylation of phenol to benzoate: use of deuterated phenols revealed carboxylation exclusively in the C4-position». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 36, p. 124-129.

GALLERT, C. et J. Winter. 1992. «Comparison of 4-hydroxybenzoate decarboxylase and phenol carboxylase activities in cell-free extracts of a defined, 4-hydroxybenzoate and phenol-degrading anaerobic consortium». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 37, p. 119-124.

GALLERT, C., et J. Winter. 1993. «Uptake of phenol by the phenol-metabolizing bacteria of a stable, strictly anaerobic consortium». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 39, p. 627-631.

GALLERT, C. et J. Winter. 1994. «Anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate: reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA and ATP formation during 4-hydroxybenzoate decarboxylation by the phenol-metabolizing bacteria of a stable, strictly anaerobic consortium». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 42, p. 408-414.

GIBSON, G. R. 1990. «Physiology and ecology of sulphate-reducing bacteria». Journal of Applied Bacteriology, vol. 69, p. 769-797.

HÄGGBLOM, M. M. et L. Y. Young. 1995. «Anaerobic degradation of halogenated phenols by sulfate-reducing consortia». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 4, p. 1546-1550.

HARMSEN, H. J. M., A. D. L. Akkermans, W. M. De Vos et A. J. M. Stams. 1996. «Enrichment and phylogenetic analysis of sporeforming syntrophic propionate-oxidizing bacteria». In Detection, phylogeny and population dynamics of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in anaerobic granular sludge, p. 48-60. Wageningen, Pays-Bas : Dept. of Microbiology, Wageningen Agricultural University.

HE, Z. et J. Wiegel. 1995. «Purification and characterization of an oxygen-sensitive reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum* ». European Journal of Biochemistry, vol. 229, p. 77-82.

HOLDEMAN, L. V., E. P. Cato et W.E.C. Moore. 1977. Anaerobe laboratory manual . 4e édition. Blackburg, Virginia: Virginia Polytechnic Institute and state University, 142 p.

HOROWITZ, A., D.R. Shelton, C. P. Corwell et J. M. Tiedje. 1982. «Anaerobic degradation of aromatic compounds in sediments and digested sludge». Development in Industrial Microbiology, vol. 23, p. 435-444.

HUANG, J., H. He et J. Wiegel. 1999. «Cloning, characterization and expression of a novel gene encoding a reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum* ». Journal of Bacteriology, vol. 181, no. 16, p. 5119-5122.

JUTEAU, P., R. Beaudet, G. McSween, F. Lépine et J.-G. Bisaillon. 1995. «Study of the reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium». Canadian Journal of Microbiology, vol. 41, p. 862-868.

KHANNA, P., B. Rajkumar et N. Jothikumar. 1992. «Anoxygenic degradation of aromatic substances by *Rhodopseudomonas palustris* ». Current Microbiology, vol. 25, p. 63-67.

KNOLL, G. et J. Winter. 1987. «Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 25, p. 384-391.

KNOLL, G. et J. Winter. 1989. «Degradation of phenol via carboxylation to benzoate by a defined, obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 30, p. 318-324.

KOBAYASHI, T., T. Hashinaga, E. Mikami et T. Suzuki. 1989. «Methanogenic degradation of phenol and benzoate in acclimated sludges». Water Science Technology, vol. 21, p. 55-65.

KOCH, J., W. Eisenreich, A. Bacher et G. Fuchs. 1993. «Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism». European Journal of Biochemistry, vol. 211, p. 649-661.

KUHN, E. P., J. M. Suflita, M. D. Rivera et L. Y. Young. 1989. «Influence of alternate electron acceptors on the metabolic fate of hydroxybenzoate isomers in anoxic aquifer slurries». Applied and Environmental Microbiology, vol. 55, no. 3, p. 590-598.

LACK, A., I. Tommasi, M. Aresta et G. Fuchs. 1991. «Catalytic properties of phenol carboxylase - *in vitro* study of CO_2 : 4-hydroxybenzoate isotope exchange reaction». European Journal of Biochemistry, vol. 197, p. 473-479.

LACK, A. et G. Fuchs. 1994. «Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp.». Archives of Microbiology, vol. 161, p. 132-139.

LANTHIER, Martin. 1999. «Étude de la biodégradation anaérobie du pentachlorophénol dans le sol par *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1». Mémoire de maîtrise, Laval, INRS-Institut Armand-Frappier, 155 p.

LAVERMAN, A. M., J.-E. Lin, J.-G. Mueller et P. H. Pritchard. 1995. «Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 10, p. 3556-3561.

LÉPINE, F., J.-G. Bisaillon, S. Milot, K. Tawfiki Hajji, R. Beaudet et R. Villemur. 1996. «Transformation of phenol into phenylalanine by a methanogenic consortium». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, no. 3, p. 809-814.

LÉTOURNEAU, L., J.-G. Bisaillon, F. Lépine et R. Beaudet. 1995. «Spore-forming bacteria that carboxylate phenol to benzoic acid under anaerobic conditions». Canadian Journal of Microbiology, vol. 41, p. 266-272.

LETOWSKI, Jaroslaw. 2000. «Isolement et étude d'une souche bactérienne transformant le phénol en benzoate en conditions anaérobies». Thèse de doctorat, Montréal, Université de Montréal, 183 p.

LI, T., J.-G. Bisaillon, R. Villemur, L. Létourneau, K. Bernard, F. Lépine et R. Beaudet. 1996. «Isolation and characterization of a new bacterium carboxylating phenol to benzoic acid under anaerobic conditions». Journal of Bacteriology, vol. 178, no. 9, p. 2551-2558.

LI, T., P. Juteau, R. Beaudet, F. Lépine, R. Villemur et J.-G. Bisaillon. 2000. «Purification and characterization of a 4-hydroxybenzoate decarboxylase from an anaerobic coculture». Canadian Journal of Microbiology, vol. 46, p. 1-4.

LONDRY, K. L. et P. M. Fedorak. 1992. «Benzoic acid intermediates in the anaerobic biodegradation of phenols». Canadian Journal of Microbiology, vol. 38, p. 1-11.

LONDRY, K. L., P. M. Fedorak et J. M. Suflita. 1997. «Anaerobic degradation of *m* -cresol by a sulfate-reducing bacterium». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 8, p. 3170-3175.

LONDRY, K. L., J. M. Suflita et R. S. Tanner. 1999. «Cresol metabolism by the sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum* sp. strain Groll». Canadian Journal of Microbiology, vol. 45, p. 458-463.

LOVLEY, D. R. et D. J. Lonergan. 1990. «Anaerobic oxidation of toluene, phenol and *p* -cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15». Applied and Environmental Microbiology , vol. 56, no. 6, p. 1858-1864.

LOVLEY, D. R. 1991. «Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction». Microbiological Reviews , vol. 55, no. 2, p. 259-287.

MAYMÒ-GATELL, X., Y.-T. Chien, J. M. Gossett et S. H. Zinder. 1997. «Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene». Science, vol. 276, p. 1568-1571.

MERKEL, S. M., A. E. Eberhard, J. Gibson et C. S. Harwood. 1989. «Involvement of coenzyme A thioesters in anaerobic metabolism of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* ». Journal of Bacteriology, vol. 171, no. 1, p. 1-7.

MOHN, W. W. et J. M. Tiedje. 1992. «Microbial reductive dehalogenation». Microbiological Reviews, vol. 56, no. 3, p. 482-507.

MONTIZAAN, G. K. 1994. «Phenol» In The Environmental Health criteria series (no 161) , 151 p. Geneva : World Health Organization.

OREMLAND, R. S., J. Switzer Blum, C. W. Culberston, P. T. Visscher, L. G. Miller, P. Dowdle et F. E. Strohmaier. 1994. «Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3». Applied and Environmental Microbiology, vol. 60, no. 8, p. 3011-3019.

ORTH, A. B., M. Denny et M. Tien. 1991. «Overproduction of lignin-degrading enzymes by an isolate of *Phanerochaete chrysosporium* ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 57, no. 9, p. 2591-2596.

PHILIPP, B. et B. Schink. 2000. «Two distinct pathways for anaerobic degradation of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* strain AR-1». Archives of Microbiology, vol. 173, p. 91-96.

SCHINK, B. 1997. «Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation». Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 61, no. 2, p. 262-280.

SCHINK, B. et P. J. Muller. 2000. «Anaerobic degradation of phenolic compounds». Naturwissenschaften, vol. 87, p. 12-23.

SHARAK GENTHNER, B. R., G. T. Townsend et P. J. Chapman. 1989. «Anaerobic transformation of phenol to benzoate via *para* -carboxylation: use of fluorinated analogues to elucidate the mechanism of transformation». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 162, no. 3, p. 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, vol. 1, p. 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 Microbiology Letters, vol. 78, p. 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». Applied and Environmental Microbiology, vol. 48, no. 4, p. 840-848.

SHINODA, Y., Y. Sakai, M. Ué, A. Hiraishi et N. Kato. 2000. «Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, no. 4, p. 1286-1291.

SLEAT, R. et J. P. Robinson. 1984. «The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds». Journal of Applied Bacteriology, vol. 57, p. 381-394.

TARDY-JACQUENOD, C., P. Caumette, R. Matheron, C. Lanau, O. Arnauld et M. Magot. 1996. «Characterization of sulfate-reducing bacteria isolated from oil-field waters». Canadian Journal of Microbiology, vol. 42, p. 259-266.

TSCHECH, A. et G. Fuchs. 1987. «Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads». Archives of Microbiology, vol. 148, p. 213-217.

VAN SCHIE, P. M. et L. Y. Young. 1998. «Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, no. 7, p. 2432-2438.

VILLEMUR, R. 1995. «Coenzyme A ligases involved in anaerobic biodegradation of aromatic compounds». Canadian Journal of Microbiology, vol. 41, p. 855-861.

VOOLAPALLI, R. K., et Stuckey, D.C. 1999. «Relative importance of trophic group concentrations during anaerobic degradation of volatile fatty acids». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, no. 11, p. 5009-5016.

WOLIN, E. A., M. J. Wolin et R. S. Wolfe. 1963. «Formation of methane by bacterial extracts». The Journal of Biological Chemistry, vol. 238, no. 8, p. 2882-2886.

YAP, L. F., Y. K. Lee et C. L. Poh. 1999. «Mechanism for phenol tolerance in phenol-degrading *Comamonas testosteroni* strain ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 51, p. 833-840.

YOUNG, L. Y. et M. D. Rivera. 1985. «Methanogenic degradation of four phenolic compounds». Water Research, vol. 19, no. 10, p. 1325-1332.

ZEHNDER, A. J. B., K. Ingvorsen et T. Marti. 1981. «Microbiology of methane bacteria». In Anaerobic digestion , p.45-68. New-York : Elsevier Biomedical Press.

ZHANG, X., T. V. Morgan et J. Wiegel. 1990. «Conversion of ^{13}C-1 phenol to ^{13}C-4 benzoate, an intermediate step in the anaerobic degradation of chlorophenols». FEMS Microbiology Letters, vol. 67, p. 63-66.

ZHANG, X. et J. Wiegel. 1990. «Isolation and partial characterization of a *Clostridium* species transforming para-hydroxybenzoate and 3,4 dihydroxybenzoate and producing phenols as the final transformation products». Microbial Ecology, vol. 20, p. 103-121.

ZHANG, X., L. Mandelco et J. Wiegel. 1994. «*Clostridium hydroxybenzoicum* sp. nov., an amino acid-utilizing, hydroxybenzoate-decarboxylating bacterium isolated from methanogenic freshwater pond sediment». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 44, no. 2, p. 214-222.

ZHANG, X. et J. Wiegel. 1994. «Reversible conversion of 4-hydroxybenzoate and phenol by *Clostridium hydroxybenzoicum* ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 60, no. 11, p. 4182-4185.

ZHOU, G.-M. et H. H. Fang. 1997. «Co-degradation of phenol and *m*-cresol in a UASB reactor». Bioresource Technology, vol. 61, p. 47-52.

ZINDER, S. H. 1984. «Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments». ASM News, vol. 50, no. 7 , p. 294-298.