



Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION ANAÉROBIE DU  
PENTACHLOROPHÉNOL DANS LE SOL PAR *DESULFITOBACTERIUM*  
*FRAPPIERI* SOUCHE PCP-1**

Par  
Martin Lanthier

Mémoire  
présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.) en microbiologie appliquée

Novembre 1999

La biodégradation anaérobie du pentachlorophénol (PCP) a été étudiée dans des bioréacteurs rotatifs composés de 200 g de sol et de 250 ml de milieu liquide. Les bioréacteurs ont été inoculés avec *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 ( $10^4$  à  $10^7$  bactéries PCP-1/ml), une bactérie possédant la capacité de déshalogéner le PCP en 3-monochlorophénol (3-MCP). Un suivi par PCR de cette souche dans des bioréacteurs contaminés par différentes doses de PCP a permis de déterminer que cette souche peut survivre pendant au moins 21 jours dans des bioréacteurs contaminés jusqu'à 500 mg de PCP/kg de sol humide, soit une dose relativement élevée. Toutefois, il n'a pas été possible d'évaluer l'effet à long terme de ces doses de PCP sur la population de bactéries PCP-1, puisque aucun échantillon n'a été prélevé après 21 jours.

La biodégradation du PCP a été possible en moins de 9 jours dans des bioréacteurs contenant du sol MS1 ou du sol TS (des sols sablonneux ou de surface, respectivement et non contaminés au départ) contaminés jusqu'à 189 mg de PCP/kg de sol sec. Le temps d'agitation et la taille de l'inoculum n'ont pas affecté l'efficacité de dégradation. La flore indigène de ces deux sols a également été capable de dégrader le PCP avec des rendements très comparables à ceux obtenus chez les bioréacteurs inoculés avec la souche PCP-1. La détection par PCR de *D. frappieri* sp. dans les bioréacteurs non inoculés suggère que des bactéries appartenant à cette espèce sont présentes parmi la flore indigène de ces sols, mais ne sont pas nécessairement responsables de la dégradation du PCP. L'étape limitante de la dégradation du PCP est la déshalogénation du 3-MCP, ce dernier étant généralement peu ou pas dégradé dans les conditions utilisées.

Aucune dégradation du PCP n'a été observée dans les bioréacteurs contenant du sol RIM (un sol sablonneux provenant d'un site industriel et déjà contaminé par une faible dose de PCP) ou un mélange de sol ITB (un sol sablonneux contaminé par le créosote) et MS2 (un sol sablonneux non contaminé). Dans les deux cas, la disparition rapide du signal PCR pour la souche PCP-1 a été obtenue, suggérant que le milieu pourrait

être toxique. Dans le cas des bioréacteurs contenant du sol RIM qui est un sol ayant un contenu faible en matières organiques, une concentration de plus de 100 mg/l de PCP a été retrouvée dans la phase liquide, suggérant que l'adsorption du PCP à la matière organique du sol est importante pour diminuer la toxicité du milieu. Pour sa part, le sol ITB est fortement contaminé par le créosote et contient de fortes concentrations en hydrocarbures aromatiques polycycliques (750 mg/kg) qui pourraient être responsables de la toxicité et de la disparition du signal PCR de la souche PCP-1.

L'enrichissement de la flore anaérobie de divers échantillons de sols a permis de détecter par PCR le genre *Desulfitobacterium* dans 16 sols sur 34 et l'espèce *D. frappieri* dans 17 sols sur 34. Tous les sols où ces bactéries ont été détectées proviennent de la région de la vallée du St-Laurent (sauf une exception provenant des Laurentides), suggérant que ces bactéries sont fréquemment retrouvées dans cette région. Aucune corrélation n'a été remarquée entre la présence de ces bactéries et la présence de certains polluants dans les sols testés. Des analyses de polymorphisme conformationnel de l'ADN simple brin ont permis de confirmer la présence de plusieurs souches ou espèces du genre *Desulfitobacterium* parmi la flore indigène des échantillons de sol testés avec cette technique.

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier :

mon directeur de recherche, le docteur Réjean Beaudet, pour son appui, ses conseils judicieux et sa grande disponibilité.

le docteur Richard Villemur, qui m'a grandement aidé au cours de mon projet pour la facette de biologie moléculaire.

les techniciens de laboratoire du centre de recherche en microbiologie environnementale, tout particulièrement madame Rita Alary, madame Francine Turcotte et monsieur Sylvain Milot, qui m'ont fait bénéficier de leur grande expérience et pour le support technique qu'ils m'ont apporté

Marie-Josée Lévesque, qui m'a grandement appris sur la technique de PCR

monsieur Guy McSween, qui m'a initié aux techniques de microbiologie anaérobie

Charles Roy, qui m'a gracieusement fourni son aide pour la carte géographique

et finalement, le Fonds FCAR, pour son soutien financier

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
REMERCIEMENTS	vi
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE D'ABBREVIATIONS	xv
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.0 Les polluants chlorés	6
2.0 Le pentachlorophénol	7
2.1 Historique et utilité	7
2.2 Propriétés physico-chimiques	9
2.3 Fabrication du PCP	9
2.3.1 Artificiel	9
2.3.2 Production naturelle de métabolites organochlorés	11
2.4 Toxicité	12
2.5 Écotoxicologie du PCP	14
2.6 Comportement du PCP dans l'environnement	15
2.7 Niveaux de contamination	17
3.0 La biodégradation	19
3.1 Avantages et définition	19
3.2 Facteurs influençant le rendement des processus de biodégradation	19
4.0 Biodégradation du PCP	21
4.1 Consortia anaérobies	23
4.1.1 Sols	23
4.1.2 Sédiments estuariens et marins	26
4.1.3 Sédiments d'eau douce	28
4.1.4 Boues	30
4.1.5 Bioréacteurs	34
4.2 Souches pures anaérobies dégradant les chlorophénols	35
4.2.1 <i>Desulfomonile tiedjei</i> souche DCB-1	35
4.2.2 Souche 2CP-1	36
4.2.3 <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> souche JW/IU-DC1	37

4.2.4 <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> souche XZ-1	38
4.2.5 <i>Desulfitobacterium</i> sp. souche PCE1	39
4.2.6 <i>Desulfitobacterium hafniense</i> souche DCB-2	40
4.2.7 <i>Desulfitobacterium chlororespirans</i> souche Co23	40
4.2.8 <i>Desulfitobacterium</i> sp. souche PCE-S	41
4.2.9 <i>Desulfitobacterium frappieri</i> souche PCP-1 et travaux sur la biodégradation du PCP ayant mené à son isolement	41
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>46</b>
1.0 Micro-organismes	47
2.0 Culture des micro-organismes	47
2.1 Milieu liquide minimal anaérobie (LMA)	47
2.2 Culture de <i>Desulfitobacterium frappieri</i> souche PCP-1	48
2.3 Culture de <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> souche JW/IU-DC1	48
3.0 Énumération des bactéries PCP-1 dans un milieu liquide	50
3.1 Cytométrie en flux	50
3.2 Étalement sur milieu solide	51
3.3 Courbe de croissance de <i>D. frappieri</i> PCP-1	51
4.0 Sols	52
5.0 Essais en bioréacteurs rotatifs anaérobies	54
5.1 Bioréacteurs rotatifs	54
5.2 Calculs du poids sec	56
5.3 Suivi de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs contenant différentes doses de PCP	57
5.4 Effets de l'agitation sur la dégradation du PCP	57
5.5 Effet de la taille de l'inoculum de bactéries PCP-1 sur la biodégradation du PCP	58
5.6 Essai de biodégradation du PCP avec le sol TS	59
5.7 Essai de biodégradation du PCP avec le sol RIM	60
5.8 Essai de biodégradation du PCP avec le sol ITB	60
6.0 Recherche du genre <i>Desulfitobacterium</i> et de <i>D. frappieri</i> sp. dans différents sols	61
6.1 Enrichissement de la flore anaérobie d'échantillons de sols	61
7.0 Analyse chimique lors des expériences en bioréacteurs	62
7.1 Extraction des chlorophénols dans les bioréacteurs	62
7.2 Dosage des chlorophénols par chromatographie liquide à haute pression	64
8.0 Analyses de biologie moléculaire	65

	x
8.1 Extraction et purification de l'ADN	65
8.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	68
8.3 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative	69
8.4 Polymorphisme conformationnel de l'ADN simple brin	72
RÉSULTATS	74
1.0 Courbe de croissance de <i>D. frappieri</i> PCP-1	75
2.0 Essais en bioréacteur rotatifs anaérobies	75
2.1 Suivi par PCR et PCR quantitatif de la souche PCP-1	75
2.2 Effet de l'agitation sur la biodégradation du PCP	82
2.3 Effet de la taille de l'inoculum de bactéries PCP-1 sur la dégradation du PCP	88
2.4 Essai de biodégradation du PCP avec le sol TS	90
2.5 Essai de biodégradation du PCP avec le sol RIM	97
2.6 Essai de biodégradation du PCP avec le sol ITB	101
3.0 Recherche du genre <i>Desulfitobacterium</i> et de <i>D. frappieri</i> sp. dans différents sols	104
3.1 Test des sondes moléculaires	104
3.2 Analyse des sols par PCR	104
3.3 Enrichissement des bactéries réductrices de sulfate	111
3.4 Polymorphisme conformationnel de l'ADN simple brin	111
DISCUSSION	114
1.0 Essais en bioréacteurs anaérobies	115
1.1 Énumérations bactériennes de la souche PCP-1	115
1.2 Survie de la souche PCP-1 dans les bioréacteurs contenant des sols contaminés au PCP	117
1.3 Essais de biodégradation du PCP	118
1.3.1 Rendements d'extraction chimique des chlorophénols	118
1.3.2 Essais où la biodégradation du PCP a été obtenue	120
1.3.3 Essais où la biodégradation du PCP n'a pas été obtenue	127
2.0 Recherche du genre <i>Desulfitobacterium</i> et de <i>D. frappieri</i> sp. dans différents sols	128
CONCLUSION	133
BIBLIOGRAPHIE	137

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Courbe de croissance de la souche PCP-1 en milieu de culture LMA contenant 55 mM de pyruvate de sodium, 10 mg/l de 2,4,6-TCP et 0,1 % d'extrait de levure.....	76
FIGURE 2 : Analyse par cytométrie en flux d'une culture de <i>D. frappieri</i> souche PCP-1 ayant servi d'inoculum.....	80
FIGURE 3 : Quantification par PCR de l'ADN de <i>D. frappieri</i> PCP-1 extrait à partir d'un échantillon de phase liquide prélevé au treizième jour dans le bioréacteur contaminé par 750 mg de PCP/kg de sol et agité pendant 1 heure par jour (1 rot./min) lors de l'expérience portant sur l'effet de l'agitation sur la biodégradation du PCP.....	81
FIGURE 4 : Effet de l'agitation sur la dégradation du PCP en bioréacteur rotatif contenant du sol MS1 contaminé par 100 mg PCP/kg de sol humide.....	83
FIGURE 5 : Effet de l'agitation sur la dégradation du PCP en bioréacteur rotatif contenant du sol MS1 contaminé par 750 mg PCP/kg de sol humide.....	84
FIGURE 6 : Effet de la taille de l'inoculum de bactéries PCP-1 sur la dégradation du PCP en bioréacteur rotatif contenant du sol MS1 contaminé par environ 105 mg PCP/kg sol sec.....	89
FIGURE 7 : Déshalogénéation du PCP dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol TS contaminé par environ 189 mg PCP/kg sol sec.....	92
FIGURE 8 : Biodégradation du PCP dans des bioréacteurs contenant du sol RIM contaminé par environ 224 mg PCP/kg sol sec.....	98

FIGURE 9 : Biodégradation du PCP dans des bioréacteurs contaminés par environ 180 mg PCP/kg sol sec et contenant du sol ITB ou un mélange de sol ITB et MS2.....102

FIGURE 10 : Amplification par PCR de l'ADN extrait à partir de cultures pures de *D. dehalogenans* JW/IU-DC1 (puits 1, 4, 7, 8, 9) et de *D. frappieri* PCP-1 (puits 2, 5, 10, 11, 12).....105

FIGURE. 11 : Carte géographique de la section sud de la province de Québec, Canada, présentant les villes où des échantillons de sol ont été prélevés pour la détection par PCR du genre *Desulfitobacterium* et de *D. frappieri* sp. (après enrichissement de la flore anaérobie des échantillons).....109

FIGURE 12 : Détection par PCR du genre *Desulfitobacterium* et de *D. frappieri* sp. dans un échantillon de sol non contaminé (sol MS1) dont la flore indigène anaérobie a été enrichie.....110

FIGURE 13 : Analyse par PCSB de l'ADN extrait à partir d'échantillons de sol dont la flore indigène a été enrichie et amplifié par PCR à l'aide des amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium*.....113

**LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU 1 : Propriétés physico-chimiques du PCP.....	10
TABLEAU 2 : Facteurs influençant le processus de biodégradation.....	20
TABLEAU 3 : Dégradation du PCP par des consortia anaérobies indigènes.....	24
TABLEAU 4 : Caractéristiques des sols utilisés lors des expériences de biodégradation du PCP en bioréacteur.....	53
TABLEAU 5 : Détection par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol MS1 contaminé par différentes doses de PCP lors de l'expérience sur le suivi de la souche PCP-1.....	77
TABLEAU 6 : Suivi par PCR quantitatif de la population de bactéries PCP-1 dans un bioréacteur rotatif contenant du sol MS1 contaminé par 750 mg de PCP/kg de sol humide.....	79
TABLEAU 7 : Suivi par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol MS1 contaminé par différentes doses de PCP lors d'une expérience visant à déterminer l'effet de l'agitation sur la biodégradation du PCP.....	86
TABLEAU 8 : Suivi par PCR quantitatif de la population de bactéries PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol MS1 contaminé par 100 mg PCP/kg de sol humide lors d'une expérience visant à déterminer l'effet de l'agitation sur la biodégradation du PCP.....	87
TABLEAU 9 : Détection par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol MS1 contaminé par environ 105 mg PCP/kg de sol sec lors d'une	

expérience visant à déterminer l'effet de la taille de l'inoculum de bactéries PCP-1 sur la dégradation du PCP.....91

TABLEAU 10 : Détection par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol TS contaminé par environ 189 mg PCP/kg de sol sec.....96

TABLEAU 11 : Détection par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol RIM contaminé par environ 224 mg PCP/kg de sol sec.....100

TABLEAU 12 : Détection par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant un mélange de sol ITB (contaminé au PCP et au créosote) et MS2 (non contaminé) dont la concentration en PCP a été ajustée à environ 180 mg PCP/kg de sol sec.....103

TABLEAU 13 : Réponses positives obtenues suite aux essais de détection par PCR du genre *Desulfitobacterium* et de *D. frappieri* sp. à partir d'échantillons de sol dont la flore indigène anaérobie a été enrichie pendant 11 à 14 jours.....106

TABLEAU 14 : Réponses négatives obtenues suite aux essais de détection par PCR du genre *Desulfitobacterium* et de *D. frappieri* sp. à partir d'échantillons de sol dont la flore indigène anaérobie a été enrichie pendant 11 à 14 jours.....107

TABLEAU 15 : Résultats de l'enrichissement des bactéries réductrices de sulfate chez 20 des 34 sols sur lesquels des essais de détection par PCR de l'espèce *frappieri* et du genre *Desulfitobacterium* ont été effectués parallèlement après enrichissement de la flore anaérobie.....112

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- 3-Cl-4-OHPA : 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate
- CFU : Unités formatrices de colonies
- CLHP : Chromatographie liquide à haute pression
- DC1 : *Desulfitobacterium dehalogenans* souche JW/IU-DC1
- DCP : Dichlorophénol
- DDT : Dichloro-diphényl-trichloroéthane (1,1,1-trichloro-2,2-di-[4-chlorophényl]éthane)
- HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
- LMA : Milieu de culture liquide minimal anaérobie
- LMAS : Milieu de culture LMA supplémenté avec 0,1 % d'extrait de levures, 0,5 g/l de glucose et 1,1 g/l de formiate de sodium
- MBrP : Monobromophénol
- MCP : Monochlorophénol
- MFP : Monofluorophénol
- pb : Paires de bases
- PCE : Perchloroéthylène, tétrachloroéthène ou tétrachloroéthylène
- PCP-1 : *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1
- PCP : Pentachlorophénol
- PCP-Na : Pentachlorophénate de sodium
- PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
- PCSB : Polymorphisme conformationnel de l'ADN simple brin
- PVPP : Polyvinylpolypyrrolidone
- TBrP : Tribromophénol
- TCP : Trichlorophénol
- TeCP : Tétrachlorophénol
- TRH : Temps de rétention hydraulique

## **INTRODUCTION**

Le premier composé organique chloré à être synthétisé de manière artificielle fut le dichloro-diphényl-trichloroéthane (1,1,1-trichloro-2,2-di-[4-chlorophényl]éthane), plus communément nommé DDT. D'abord synthétisé en 1874, ce produit ne fut pas utilisé à grande échelle avant le milieu des années 40. Le DDT s'avérait alors un insecticide très efficace et il a donc été largement utilisé à cet effet, ce qui a fortement contribué à sa dispersion dans l'environnement. Toutefois, personne n'avait songé à l'effet d'une utilisation abusive de ce produit et ce n'est qu'en 1962, avec la parution du livre "Silent Spring" de Rachael Carson, que le grand public autant que les scientifiques sont appelés à se poser des questions à propos de l'utilisation abusive du DDT et des autres composés organiques synthétiques.

La grande efficacité du DDT a favorisé la recherche au niveau de la synthèse de nouveaux produits organiques halogénés. Ceci a permis aux chimistes de l'époque de mettre au point plusieurs nouvelles molécules organiques chlorées. Ces recherches ont donc donné naissance à plusieurs produits chlorés, tels le pentachlorophénol (PCP), les biphényles polychlorés et le tétrachloroéthylène (perchloroéthène, tétrachloroéthène ou PCE).

Le pentachlorophénol est utilisé depuis les années 30 comme biocide et pour la préservation du bois. Depuis, des millions de tonnes de PCP ont été relâchées dans l'environnement et ce produit a contaminé les sols et les eaux souterraines, principalement aux environs des usines de traitement du bois. On retrouve également de fortes concentrations de PCP dans les sédiments, surtout parce que ce produit est retrouvé dans beaucoup d'effluents industriels. Aussi, ce produit est décrit comme un polluant prioritaire par la U.S. Environmental Protection Agency, car il s'accumule dans la chaîne alimentaire, s'avère carcinogène et est extrêmement toxique.

Pour tenter de régler le problème de pollution occasionné par le PCP, divers traitements thermiques ou physico-chimiques ont déjà été mis sur pied. Toutefois, bien que ces traitements réussissent à éliminer relativement bien les contaminants, ils sont très coûteux à utiliser et peuvent modifier de manière importante l'environnement traité. Par contre, les traitements biologiques, ou biotraitements, tirent avantage des capacités de biodégradation des micro-organismes et sont souvent plus efficaces et moins coûteux tout en ne modifiant pas l'environnement de manière drastique. Deux types de biotraitements peuvent être mis au point, soit *in situ*, c'est-à-dire effectué directement au site contaminé, et *ex situ*, qui nécessite le transport des matières contaminées au site de traitement.

Des biotraitements aérobies dégradant efficacement le PCP ont déjà été développés, mais l'utilisation de biotraitements anaérobies offre également des perspectives intéressantes, notamment pour la biodégradation de substances fortement chlorées, difficilement dégradées par les bactéries aérobies. Également, les bioprocédés anaérobies sont généralement moins coûteux, car ils ne nécessitent pas de système d'aération et la récupération du méthane produit par ces bactéries peut également augmenter la rentabilité. De plus, les biotraitements anaérobies sont plus facilement applicables *in situ*, puisque les environnements contaminés sont souvent sous conditions anaérobies (par exemple, à partir d'une certaine profondeur le sol devient un environnement anaérobie). Toutefois, les micro-organismes anaérobies fonctionnent souvent en consortium et le manque de connaissances à leur propos limite l'utilisation de tels traitements.

Récemment, les chercheurs du Centre de Recherche en Microbiologie Appliquée de l'INRS-Institut Armand-Frappier ont réussi à isoler à partir d'un consortium méthanogène dégradant complètement le PCP une bactérie possédant la capacité de déshalogéner le PCP en 3-monochlorophénol (3-MCP). Nommée *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, cette souche bactérienne constitue le seul micro-organisme anaérobie

pouvant déshalogéner le PCP en position *ortho*, *meta* et *para*, différents chlorophénols, ainsi que plusieurs autres molécules halogénées, ce qui en fait une souche ayant un spectre d'activité large. La souche PCP-1 peut également dégrader le PCP dans des bioréacteurs à boues granulaires, à film-fixe, ainsi que dans des sols contaminés. Une technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permettant la détection de la souche PCP-1 dans le sol, ainsi qu'une technique de PCR compétitif permettant de quantifier cette souche ont également été mis au point.

Des travaux effectués antérieurement ont montré que la souche PCP-1 était capable de dégrader le PCP dans des microcosmes composés de 2 g de sol contaminé et de 20 ml de milieu liquide minimal anaérobie (LMA). Le premier objectif de ce projet consistait à vérifier si la souche PCP-1 pouvait dégrader le PCP en bioréacteurs rotatifs constitués de 200 g de sol et de 250 ml de milieu liquide et à effectuer le suivi de la souche PCP-1 par PCR lors de ces essais. Le second objectif de ce projet consistait à rechercher la présence de micro-organismes du genre *Desulfitobacterium* et de *D. frappieri* sp. dans différents sols à l'aide de la technique de PCR et de sondes spécifiques.

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1.0 Les polluants chlorés

Il existe trois grandes classes de molécules organiques halogénées, soit les pesticides organochlorés, les solvants de type alkyle et les aryles halides. Les pesticides organochlorés comprennent des molécules telles le DDT, le lindane, le mirex, le toxaphène, le dieldrine, l'alachlor, ainsi que le PCP. Pour leur part, les solvants de type alkyle incluent des molécules halogénées composées d'un seul ou de deux carbones. Par exemple, le chlorométhane, le chloroforme (trichlorométhane), le trichloroéthène ainsi que le perchloroéthène (PCE) font partie de ce groupe. Ces molécules sont principalement utilisées pour le dégraissage de machinerie, pour le nettoyage à sec, lors de la fabrication de composantes électroniques et en tant que pesticide. En ce qui concerne le groupe des aryles halides, il comprend des molécules halogénées telles les anilines, les biphényles, les phénoxyacétates et les phénols. Ces produits sont utilisés comme solvants, comme isolants, comme pesticides et font également partie des déchets produits par plusieurs industries (Mohn et Tiedje, 1992).

Malgré la grande diversité de polluants halogénés, ce sont les composés chlorés qui ont été les plus étudiés parmi les polluants halogénés, ceci principalement à cause de la grande publicité accordée aux pesticides (plus particulièrement le DDT) et autres solvants chlorés (Peyton, 1984). Les composés organiques chlorés ont été et sont encore largement utilisés au niveau industriel et agricole, ce qui a fortement contribué à leur dispersion dans l'environnement. Toutefois, la toxicité et la récalcitrance à la dégradation de plusieurs d'entre eux ont forcé la mise en place de législations. Ces dernières visent à diminuer ou même cesser l'utilisation ou la production de certains de ces produits. Par ailleurs, des normes ont également été établies afin de déterminer le niveau de contamination des sites pollués par ces produits.

## 2.0 Le pentachlorophénol

### 2.1 Historique et utilité

Le PCP a été introduit sur le marché en tant qu'antiseptique commercial en 1936 (Jensen, 1996). Ses qualités d'algicide, de bactéricide, de fongicide, d'insecticide, d'herbicide et de molluscicide ont favorisé une utilisation généralisée de ce composé (Rao, 1978 ; Crosby, 1981). Ainsi, le PCP a été utilisé comme biocide dans plusieurs produits, dont les adhésifs, l'amidon, le caoutchouc, les cuirs, les graines (non comestibles), les huiles, les nettoyeurs à tapis, les peintures, les produits contenant de la cellulose, les protéines et les textiles. De plus, ce produit a même été utilisé par les usines de traitement de la nourriture, par les usines de papeterie et dans l'eau des systèmes de climatisation (Bevenue et Beckman, 1967 ; Cirelli, 1978 ; Crosby, 1981).

Toutefois, la majeure partie du PCP produit a été employée par l'industrie de préservation et de traitement du bois (Rao, 1978 ; Crosby, 1981). En effet, l'utilisation du PCP par cette industrie avait plusieurs avantages comparativement à l'utilisation de la créosote, qui était utilisée depuis 1910 au Canada (Hoos, 1978). D'abord, la créosote est un produit cancérigène. Aussi, ce produit est salissant et cause des irritations de la peau aux travailleurs. Le traitement du bois au PCP augmente considérablement sa durée de vie. En effet, le bois qui n'est pas traité a une durée de vie d'environ 5 ans, alors que lorsqu'il est traité au PCP, sa durée de vie se trouve multipliée par huit (Crosby, 1981). Ceci est possible grâce à l'effet biocide du PCP qui protège le bois contre les attaques des agents biologiques (principalement les insectes et les micro-organismes), ce qui permet de préserver la structure du bois intacte. Évidemment, c'est surtout le bois qui doit servir pour de longues périodes de temps qui est traité, comme par exemple, les poteaux servant au soutien des lignes électriques et téléphoniques ou encore le bois servant à la construction ou à la fabrication de chemins de fer (Hoos, 1978).

Jusqu'à récemment, le PCP était le pesticide le plus utilisé de la planète, avec une production annuelle mondiale située entre 25 000 et 100 000 tonnes (World Health Organization, 1987 ; Butte *et al.*, 1985 ; Crosby, 1981). En ce qui concerne la production canadienne de PCP, celle-ci était estimée en 1984 à 1 770 tonnes par année (Jones, 1984). Environ 80 % du PCP consommé au Canada est utilisé par l'industrie de préservation du bois (Cirelli 1978). En effet, en 1982 la quantité de bois traité au Canada était estimée à 253 000 m<sup>3</sup> (Brudermann *et al.*, 1982). Par exemple, en 1978, il y avait plus de 150 millions de poutres traitées utilisées par l'industrie canadienne du chemin de fer, sans compter les 3 millions de poutres requises annuellement pour remplacer celles devenues hors d'usage. Toujours en 1978, entre 300 000 et 400 000 poteaux servant au support des lignes électriques et téléphoniques étaient produits au Canada, dont 5 % à 10 % servait au remplacement des poteaux endommagés (Hoos, 1978). Aussi, la compagnie Hydro-Québec comptait à elle seule en 1991 plus de 1,5 millions de poteaux traités pour la plupart au PCP. L'entretien et l'amélioration de ce réseau nécessitent environ 80 000 nouveaux poteaux chaque année (Ottou, 1991).

Le PCP a été déclaré polluant prioritaire par la "Environmental Protection Agency" ainsi que par la Communauté Européenne (Bajpai et Banerji, 1992 ; Wild *et al.*, 1993). Son utilisation a été interdite dans les produits de consommation dès 1984, principalement à cause de la grande toxicité associée à ce produit (Bajpai et Banerji, 1992). La fabrication du PCP au Canada a cessé vers 1985 suite à des études entreprises par Environnement Canada. Ces études, débutées en 1981, avaient pour but de déterminer le niveau de contamination des sols et des eaux par le PCP (Konasewich et Henning, 1988). Malgré l'arrêt de la fabrication du PCP au Canada, il existe toujours des millions de poteaux traités au PCP qui sont toujours utilisés. Aussi, les sols de plusieurs usines de traitement du bois sont toujours contaminés par le PCP.

## 2.2 Propriétés physico-chimiques

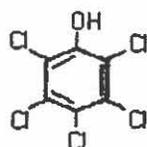
Le PCP se présente sous la forme d'un cristal chamois. C'est un composé halogéné semi-volatile correspondant à la structure chimique  $C_6Cl_5OH$ . Ce produit est peu soluble dans l'eau (0,014 g/l, à pH 7,0 et 20°C), mais sa solubilité augmente avec la température et le pH. Le PCP sous forme PCP-Na est plus soluble dans l'eau que la forme originale (22,4 g/l, à 20°C). Le PCP est aussi soluble dans plusieurs solvants organiques, dont l'acétone, le benzène, l'éthanol et le méthanol. De plus, le PCP sous forme neutre est une molécule hydrophobe et non-polaire qui peut alors s'accumuler facilement dans les lipides (World Health Organization 1987 ; Ottou 1991 ; Davis *et al.*, 1994 ; Loubier, 1996). Bien que le PCP et le pentachlorophénate de sodium (PCP-Na) soient les formes les plus courantes, d'autres formes sont utilisées. Par exemple, le PCP peut être retrouvé sous la forme de sels de baryum, de cuivre, de potassium ou d'amine ou encore sous forme d'ester laurate ou acétate (Crosby, 1981). Les propriétés physico-chimiques du PCP sont résumées dans le tableau 1.

## 2.3 Fabrication du PCP

### 2.3.1 Artificiel

Il existe deux techniques permettant la fabrication artificielle du PCP. La première technique consiste en la chloration de molécules de phénol en présence d'un catalyseur. Lors de la première étape (effectuée à 105°C) des isomères de trichlorophénol (TCP) et de tétrachlorophénol (TeCP) sont produits. Puis, lors de la seconde étape, la température de la réaction est augmentée graduellement de manière à ce que les réactifs soient toujours en état de fusion. Cela favorise la chloruration des molécules de TCP et de TeCP en PCP (Cirelli, 1978).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du PCP

Propriété	Valeur
Coefficient d'adsorption sur la matière organique ( $K_{oc}$ )	4,8
Coefficient de partition <i>n</i> -octanol/eau (log P) à pH 7,2	3,32
Densité relative	
Air = 1	9,2
Eau = 1	2,0
Formule moléculaire	$C_6Cl_5OH$
pKa à 25°C	4,7
Poids moléculaire	266,35 g/mol
Point d'ébullition	310°C
Point de fusion	191°C
Pression de vapeur à 20°C	$2 \times 10^{-6}$ kPa ( $1,5 \times 10^{-5}$ mm Hg)
Solubilité dans l'eau	(g/l)
20°C pH 7	2
20°C pH 10	15
Solubilité dans le gras à 37°C	213 g/kg
Solubilité dans les solvants organiques (25°C)	( $g_{PCP}/l_{solvant}$ )
Acétone	500
Benzène	150
Éthanol (95 %)	1 200
Méthanol	1 800
Structure chimique	
Tension de vapeur à 20°C	1,1 à $1,7 \times 10^{-4}$ mm Hg

Gebeřgi *et al.* (1979), Ottou (1991), World Health Organization (1989) et Loubier (1996)

Dans le cas de la seconde technique, le PCP est formé par l'hydrolyse de molécules d'hexachlorobenzène en présence d'hydroxyde de sodium, de carbonate de sodium ou encore par la méthode de Raschig-Hooker. Dans ce dernier cas, l'hexachlorobenzène est mis en présence d'un catalyseur (phosphate de calcium ou phosphate de silicate) à très haute température (450°C) (Crosby, 1981).

Le PCP de grade technique contient plusieurs impuretés. Le contaminant retrouvé en plus grande quantité est le TeCP (entre 4 et 12 %) (Cirelli, 1978). Le PCP de grade technique contient également des phénoxyphénols chlorés (1 % à 5 %) et des traces de chlorodioxines, de chlorofurannes, de diphényls éthers chlorés, de dibenzofurannes et de dihydroxybiphényles (Nilsson *et al.*, 1978).

### 2.3.2 Production naturelle de métabolites organochlorés

Plusieurs micro-organismes sont reconnus pour leur capacité à synthétiser *de novo* plus de 1 500 métabolites organochlorés (Gribble, 1992 ; Siuda et DeBernardis, 1973). En effet, plusieurs souches de basidiomycètes ayant la capacité de dégrader le bois ou se retrouvant dans les sols forestiers sont capables de synthétiser des métabolites aromatiques chlorés. Suite à leur relâchement dans l'environnement, ces métabolites pourraient ensuite être minéralisés ou encore transformés en chlorophénols par d'autres micro-organismes. Les chlorophénols ainsi produits pourraient alors être minéralisés, être incorporés dans l'humus (détoxification) ou encore être transformés en dioxines ou furannes (biotoxification) par l'action de peroxydases (Öberg *et al.*, 1990 ; De Jong *et al.* 1994).

En ce qui concerne le PCP, peu de recherches ont été effectuées dans le but de déterminer s'il y avait une production naturelle de ce produit. Les recherches effectuées

par Arsenault (1976) ont permis d'émettre l'hypothèse de la présence d'un niveau basal de PCP (ou de molécules semblables) dans l'environnement. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le paraméthoxytétrachlorophénol, un métabolite produit par un champignon, pouvait interférer avec le PCP lors des analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la capture d'électron, ceci à cause de la taille, de la forme et du temps de rétention très similaires de ces deux produits. Toutefois, les essais effectués par Siuda (1980) pour produire des chlorophénols possédant plusieurs atomes de chlore par réaction enzymatique suggèrent que le PCP retrouvé dans l'environnement provient exclusivement des activités humaines.

## 2.4 Toxicité

Depuis que Bechold et Ehrlich (1906) ont remarqué la toxicité associée au PCP, plusieurs études ont été réalisées sur les propriétés toxiques du PCP et les mécanismes métaboliques associés à cette toxicité, dont celles de Weinbach et Garbus (1965), Ravanel *et al.* (1985), Cascorbi et Ahlers (1989), Cascorbi et Forêt (1991) et Wester *et al.* (1993), pour ne citer que celles-ci.

La lipophilicité des chlorophénols dépend du nombre et de l'emplacement des atomes de chlore sur le cycle benzénique. Or, il existe une bonne corrélation entre lipophilicité et toxicité. Ainsi, puisque le PCP est le plus lipophile des chlorophénols, il est également le plus toxique. La toxicité des molécules lipophiles telles le PCP est principalement associée au bris des membranes cellulaires. Le mécanisme d'action est simple : l'accumulation des molécules lipophiles dans les membranes cellulaires augmente la fluidité des domaines fonctionnels de la bicouche lipidique, ce qui mène à l'inhibition des protéines associées à la membrane (comme par exemple les  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases ou encore le système de transport du glucose) (Ravanel *et al.*, 1985 ; Cascorbi et Ahlers, 1989 ; Cascorbi et Forêt, 1991).

Selon Weinbach et Garbus (1965), le PCP pourrait également se lier aux protéines de membranes, altérant alors leur configuration et leur mécanisme. De plus, le potentiel de découpleur d'électrons du PCP est déjà bien connu chez les membranes transductrices d'énergie comme les mitochondries et les chloroplastes. Le mécanisme d'action de ces membranes est basé sur l'utilisation d'un gradient transmembranaire d'ions  $H^+$ . La chaîne de transport d'électrons située dans la membrane est responsable de l'établissement du gradient d'ions  $H^+$ , et ce gradient permet de former un champ électrique transmembranaire qui dirige les ions  $H^+$  au travers d'un complexe enzymatique producteur d'ATP, soit l'ATPase. Toutefois, en présence de découpleurs d'électrons comme le PCP, les ions hydrogène empruntent un chemin membranaire différent et l'énergie produite par cette opération est alors transformée en chaleur plutôt qu'en molécules d'ATP. L'augmentation de chaleur occasionnée par ce mécanisme chez l'organisme est un des facteurs sublétaux du PCP observé chez certains organismes (Desaiah 1978 ; Drong et Lamprecht, 1993). Le PCP est donc un biocide non-spécifique, puisque la production de molécules d'ATP pour le stockage de l'énergie est un mécanisme universel chez les organismes vivants.

Les chlorophénols peuvent aussi inhiber *in vitro* les enzymes comme le complexe P-450, mais normalement à des concentrations élevées (Ahlborg et Thunberg, 1980 ; Wedding *et al.*, 1967). Par ailleurs, les produits de la biodégradation du PCP par les bactéries peuvent également jouer un rôle dans l'action bactéricide de ce produit. En effet, l'activité antibactérienne des MCP augmente selon la position des atomes de chlore par rapport à la fonction hydroxyle, soit *ortho* < *meta* < *para* (Ruckdeschel *et al.*, 1987)

Il a également été montré que le PCP retrouvé dans des sols pouvait être directement absorbé par la peau des mammifères. En effet, une expérience effectuée avec des singes Rhésus a permis de déterminer que ceux-ci avaient absorbé 24,4 % du PCP

provenant d'un sol contaminé (Wester *et al.*, 1993). Ces résultats sont plutôt alarmants, puisque le PCP est corrosif pour la peau et peut causer des brûlures et des cloques. Chez les mammifères, une exposition aiguë au PCP peut mener à une élévation de la température corporelle, une accélération de la respiration, une pression sanguine plus élevée, de l'hyperglycémie et peut même causer un stress au niveau cardio-vasculaire (Crosby, 1981). Malgré tout cela, il y a peu de preuves permettant de conclure à des effets défavorables pour la santé chez les personnes qui ont été exposées de manière chronique à ce produit (Gilbert *et al.*, 1990). Le PCP reste tout de même un composé hautement embryotoxique et est également suspecté d'avoir des effets carcinogènes et tératogènes (Crosby, 1981).

## 2.5 Écotoxicologie du PCP

Dans le sol, les biocides non-spécifiques comme le PCP peuvent avoir des effets à plusieurs niveaux de la chaîne alimentaire (de la microflore aux arthropodes) et ils peuvent avoir une plus grande influence que les produits n'affectant que quelques espèces. Il est aussi possible que les polluants comme le PCP qui sont liés au sol (de manière irréversible) puissent conserver leur effet bactéricide, puisqu'il a déjà été prouvé que non seulement les micro-organismes du sol dégradent lentement ces polluants, mais qu'en plus ils les relâchent lentement dans le sol. Ces polluants relâchés en faible quantité pourraient alors de nouveau exercer leur effet de biocide, ce qui influencerait faiblement la biomasse du sol ainsi que son activité biologique, mais ceci pendant de longues périodes de temps (Salminen *et al.*, 1995 ; Scheunert *et al.*, 1995).

Scheunert *et al.* (1995) se sont penchés sur la question et ont étudié l'effet sur la microflore des résidus de PCP liés au sol. Ces chercheurs ont remarqué que dans un sol dont les résidus de PCP extractables (et donc biodisponibles) ont été éliminés, la mobilisation et la liaison des molécules de PCP aux particules de sol étaient en équilibre.

Ils ont également remarqué un effet négatif à très court terme (une journée) de ces résidus sur la quantité totale d'ATP (croissance cellulaire) dans un terreau. Le retour à des quantités normales d'ATP a nécessité 20 semaines (Scheunert *et al.*, 1995).

Plusieurs scientifiques ont étudié le phénomène de bioaccumulation du PCP et des autres chlorophénols. Ces études ont été effectuées avec des organismes aquatiques (Virtanen et Hattula, 1982), des plantes (Bellin et O'Connor, 1990 ; Scheunert *et al.*, 1986), des vers de terre (Van Gestel et Ma, 1988), et chez des écosystèmes terrestres (Gruttke *et al.* 1988; Lu *et al.*, 1978). Les résultats de ces recherches ont permis à ces chercheurs de conclure que le PCP, ainsi que les autres chlorophénols ne sont généralement pas biomagnifiés et n'ont donc pas tendance à se bioaccumuler dans la chaîne alimentaire, ceci principalement à cause des processus de métabolisation et d'excrétion très efficaces des organismes (Jensen, 1996).

## 2.6 Comportement du PCP dans l'environnement

Le comportement du PCP dans le sol est modulé par trois caractéristiques, soit sa densité, son point de fusion et sa solubilité. Étant donné que le PCP possède une densité et un point de fusion élevés et que sa solubilité est modérée, ce produit a un comportement de "dense non aqueous phase liquid" ou "liquide dense en phase non-aqueuse". Ainsi, la densité élevée (en phase liquide) de ce produit favorise sa déposition et son infiltration dans les anfractuosités du sol et sa migration en profondeur, sa solubilité modérée favorise la contamination de l'eau souterraine alors que ses propriétés d'adsorption élevées favorisent la contamination de la zone vadose (Loubier, 1996).

Le PCP se retrouve généralement sous forme aqueuse dans l'environnement. La volatilité relative de ce produit, ainsi que la solubilité modérée dans l'eau de sa forme

ionisée ont favorisée une contamination généralisée de l'environnement (voir tableau 1). De plus, le bois traité au PCP constitue une autre voie d'entrée du PCP dans l'environnement, puisque jusqu'à 80 % du PCP utilisé de cette manière peut s'évaporer au cours des 12 premiers mois suivant le traitement, ceci en fonction du type de bois, du pH de la température et du solvant utilisé (World Health Organization, 1987).

Toutefois, d'autres facteurs peuvent affecter le comportement de ce produit dans le sol. Par exemple, la force capillaire (force d'un pore à retenir un fluide mouillant ou à repousser un fluide non-mouillant) limite la dispersion de ce produit dans le sol, puisque le PCP est un fluide non-mouillant. Ainsi, pour pénétrer les pores des particules de sol, le PCP devra donc exercer une pression supérieure à la pression capillaire de ces pores (Loubier, 1996). Aussi, les coefficients d'adsorption sur la matière organique (Koc) et de partition octanol/eau (Log P) élevés du PCP favorisent son adsorption sur la matière organique et les particules de sol (voir tableau I) (Loubier, 1996). Ce phénomène d'adsorption a été observé par Bellin *et al.* (1990). Ces chercheurs ont effectivement remarqué que la sorption du PCP augmentait dans les sols auxquels on ajoutait des boues contenant de fortes concentrations de matière organique. C'est probablement la formation de liens hydrophobes entre le PCP et la matière organique ou la partition du PCP dans la matière organique qui est responsable de ce phénomène de sorption (Lagas, 1988 ; Schellenberg *et al.*, 1984). De plus, la sorption de la forme ionisée et non-dissociée du PCP est possible, mais en présence d'une force ionique faible et d'un pH n'excédant pas la valeur de pKa de plus d'un log, la sorption de la forme dissociée est négligeable (Schellenberg *et al.*, 1984). Le PCP est donc plutôt mobile dans les sols alcalins et plutôt immobile dans les sols acides contenant beaucoup de matières organiques et les sols neutres (World Health Organization, 1987 ; Jensen, 1996). Selon Klein et Scheunert (1982), les phénols (dont le PCP) ont une grande affinité pour le sol à cause de leur ressemblance au niveau chimique avec les précurseurs des acides humiques. Ceci est corroboré par Salminen *et al.* (1995), qui ont remarqué que le PCP était fortement adsorbé sur l'humus, dont ils ont estimé à 65 % la quantité de carbone organique. Ainsi, à cause

de cette forte sorption, la bioaccumulation et la toxicité du PCP corrélient de manière négative avec la quantité de matière organique.

En plus de l'adsorption, le PCP peut également être incorporé dans la matière organique par un lien covalent catalysé par des enzymes produites par des bactéries, des champignons et même des plantes. Ces molécules liées de manière covalente sont alors très fortement immobilisées et stabilisées, ce qui les rend très peu biodégradables (Boyd *et al.*, 1989). Lagas (1988) a également remarqué que dès l'ajout de PCP dans le sol, il y avait formation de résidus inextractables, et que l'augmentation de ces résidus était fonction du temps au carré, suggérant alors qu'une partie du PCP était initialement sorbée de manière réversible, mais que cette sorption devenait irréversible avec le temps. La seule manière d'inverser le processus consiste à dégrader la matrice à laquelle le PCP est fixé. McFarland *et al.* (1994) et Scheunert *et al.* (1995) ont également remarqué une augmentation de la quantité de PCP inextractable avec le temps, mais les premiers ont suggéré que cette sorption pouvait être en partie due à une activité biologique, une hypothèse en accord avec celle émise par Boyd *et al.* (1989).

## 2.7 Niveaux de contamination

Les concentrations en PCP normalement retrouvées dans les eaux de surface varient entre 0,1 et 1,0  $\mu\text{g/l}$ , avec des valeurs maximales d'environ 11  $\mu\text{g/l}$ . Toutefois, près des usines de traitement du bois, des concentrations en PCP variant entre 0,07 et 31,9  $\mu\text{g/l}$  pour les eaux de surface et entre 3 et 23  $\mu\text{g/l}$  pour les eaux souterraines ont déjà été détectées. De plus, des concentrations de l'ordre du  $\text{mg/l}$  peuvent être rencontrées près de décharges industrielles (World Health Organization, 1987). Par exemple, des concentrations variant entre 25 et 150  $\text{mg/l}$  ont déjà été détectées dans les effluents d'usine de traitement du bois (Crosby, 1981) alors que des concentrations de plus de 200  $\mu\text{g/l}$  ont été rapportées dans les effluents d'usines de fabrication de papier (Jones et Zabel, 1988).

Une étude portant sur la contamination de la rivière Danube (Slovaquie) démontre que les concentrations de PCP qu'on y retrouve ont varié entre 0 et 3,785 µg/l au cours d'une période de quatre années (Veningerová *et al.*, 1998).

Pour leur part, les sédiments contiennent généralement de plus grandes quantités de PCP que les eaux qui se retrouvent au-dessus (World Health Organization, 1987). Par exemple, les sédiments du fleuve St-Laurent contiennent environ 46 ng de PCP/g de sédiment (Quémarais *et al.*, 1994).

Du PCP a également été détecté dans 156 des 223 échantillons de boues municipales et industrielles récoltées à autant d'endroits dans l'état du Michigan. Les concentrations variaient entre 0,2 et 8 490 mg/kg, avec une moyenne d'environ 5 mg/kg (poids sec) (Jacobs *et al.*, 1987). Aussi, des concentrations de PCP variant entre 0,1 et 2,04 mg/kg ont été détectées dans des boues municipales provenant du Royaume-Uni (Wild *et al.*, 1993).

Des échantillons de sol provenant d'usines fabriquant du PCP et autres pesticides contenaient des concentrations de PCP de près de 100 µg/kg (poids sec), alors que des concentrations allant jusqu'à 45,6 mg/kg ont déjà été détectées à proximité d'usines de traitement du bois (World Health Organization, 1987). De plus, Salkinoja-Salonen (1990) a rapporté la présence de concentration de plus de 10 000 mg de chlorophénols/kg de sol sur le terrain d'une usine de traitement du bois. Pour leur part, Kitunen *et al.* (1987) rapportent non seulement la présence de fortes concentrations de PCP et d'autres chlorophénols sur les sites de quatre usines de traitement du bois (en fonction depuis 3 à 40 ans), mais également de fortes concentrations de phénoxyphénols polychlorés (entre 1 et 50 mg/kg sol sec) et de dibenzofurannes polychlorés (entre 0,2 et 5 mg/kg sols sec).

### 3.0 La biodégradation

#### 3.1 Avantages et définition

Des processus abiotiques visant la destruction de certains polluants ont déjà été étudiés. Ces processus, basés sur des principes physiques (incinération, sonication) ou chimiques (déchloration chimique, traitement électrochimique ou photochimique), ne sont toutefois pas toujours appropriés lorsque ces mêmes polluants sont dispersés dans l'environnement. En effet, les coûts associés à l'utilisation de ces méthodes sont souvent élevés et les rendements faibles. Il y a toujours un risque de produire des molécules intermédiaires aussi néfastes, sinon plus, que le polluant original. De plus, l'opinion publique n'est pas toujours très favorable à l'utilisation de tels procédés. Par contre, les processus biotiques, ou biotraitements, consistent en l'utilisation de micro-organismes et sont nettement moins dispendieux tout en possédant l'avantage de dégrader efficacement les contaminants (Providenti *et al.*, 1993; Samson, 1994).

#### 3.2 Facteurs influençant le rendement des processus de biodégradation

Les processus de biodégradation existent dans l'environnement, mais ils se produisent souvent à une vitesse très lente. En effet, les micro-organismes possédant une activité de biodégradation envers certains polluants ne sont pas toujours dans des conditions environnementales idéales à la dégradation ou encore, ces micro-organismes n'ont pas encore eu le temps de s'adapter à la présence de ces polluants et d'élaborer des mécanismes visant leur dégradation.

Plusieurs facteurs peuvent affecter la biodégradation des contaminants (voir tableau 2). Il y a d'abord les paramètres environnementaux: le pH, la température, la

Tableau 2 : Facteurs influençant le processus de biodégradation

Paramètres		Effet sur le processus de biodégradation
Environnementaux	pH	- Activité microbienne dépend du pH - La solubilité et la sorption du contaminant peuvent varier selon le pH
	Température	- Métabolisme microbien varie selon la température - La température peut affecter la solubilité, la sorption, la viscosité et la volatilisation du contaminant
	Aération	- Nécessaire aux processus aérobies. L'oxygène est souvent limité dans le sol et les systèmes aqueux - L'oxygène est un substrat essentiel chez plusieurs réactions cataboliques de dégradation
	Potentiel redox	- Des accepteurs d'électrons sont nécessaires aux processus de dégradation anaérobies
	Type de sol	- Peut affecter la sorption du contaminant, le type de micro-organisme présent et le type de nutriments
	Humidité du sol	- Affecte le déplacement du contaminant, des nutriments, des micro-organismes et leur métabolisme
	Contaminant	- Le type de produit, la quantité et le nombre de produits différents jouent un rôle dans la dégradation
Biologiques	Enzymes de dégradation	- Les gènes codant pour ces enzymes peuvent ne pas être présents ou être peu ou pas induits - La fréquence d'échanges génétiques peut également affecter le processus de dégradation
	Prédation	- La prédation par des protozoaires affecte le nombre de micro-organismes responsables de la dégradation
	Inoculum	- Sa taille et son état physiologique vont affecter la dégradation

Modifié de Providenti *et al.* (1993)

présence de nutriments, l'aération (dans le cas de la biodégradation aérobie) et le potentiel redox (dans le cas de la biodégradation anaérobie). Aussi, le mouvement de l'eau dans le cas de sites aquatiques ou encore le type de sol et l'humidité dans le cas de sites terrestres sont d'autres facteurs importants. La biodisponibilité du contaminant est un autre facteur à considérer. Également, les micro-organismes ont une capacité de déplacement dans le sol qui est très limitée, ce qui peut affecter le rendement de biodégradation. Ensuite, certaines limitations métaboliques peuvent être impliquées au niveau des micro-organismes. En effet, il est possible que les micro-organismes présents sur le site contaminé ne possèdent pas les gènes codant pour les enzymes responsables de la dégradation, que la synthèse de ces enzymes soit peu ou pas induite, que les micro-organismes préfèrent utiliser une source de carbone autre que le polluant, ou encore qu'il y ait présence sur le site contaminé d'une substance inhibant la dégradation. Enfin, la présence d'une faible quantité de polluant, la prédation des micro-organismes responsables de la dégradation par des protozoaires, la fréquence des échanges génétiques entre les micro-organismes ou encore la taille de l'inoculum et son état physiologique sont autant d'autres facteurs pouvant influencer le processus de biodégradation (Providenti *et al.*, 1993).

#### 4.0 Biodégradation du PCP

L'étude de la biodégradation anaérobie du PCP est importante puisque les sites contaminés par ce produit incluent des environnements anaérobies (McAllister *et al.*, 1996). La biodégradation du PCP en milieu anaérobie est initiée par un mécanisme connu sous le nom de déshalogénéation réductrice. Cette réaction implique le remplacement d'un atome d'halogène situé sur une molécule par l'addition d'un atome d'hydrogène. Cette réaction permet la formation de produits moins toxiques et plus

susceptibles à la dégradation par les micro-organismes anaérobies ou aérobies (Mikesell et Boyd, 1985).

Suite à l'élimination des atomes de chlore du PCP, le noyau aromatique est clivé (Mohn et Tiedje, 1992; Hale *et al.*, 1994). Le phénol produit par l'élimination des atomes de chlore peut donc être transformé en cyclohexanol, cyclohexanone, adipate, succinate, propionate et acétate. Ces produits sont alors eux-mêmes dégradés en méthane et dioxyde de carbone. En conditions anaérobies, ces transformations sont effectuées par plusieurs micro-organismes, dont des bactéries acidogènes, acétogéniques et les méthanogènes, qui forment des consortia (Hale *et al.*, 1994).

La biodégradation du PCP peut également s'effectuer sous conditions aérobies. Les micro-organismes impliqués (souches pures ou consortia) utilisent différents mécanismes de dégradation, dont la déchloruration oxygénolytique et la déchloruration hydrolytique. Lors des processus de déchloruration oxygénolytique ou hydrolytique, les atomes de chlore sont substitués par des groupements hydroxyles par l'action d'une monooxygénase ou d'une hydroxylase, respectivement. Le processus de déshalogénéation réductrice est également utilisé par certains micro-organismes aérobies. Lors des processus de dégradation aérobie du PCP, l'étape limitante diffère selon les micro-organismes impliqués, mais le clivage des liens entre les atomes de chlore et le noyau aromatique est critique, car la présence de ces atomes empêche le clivage du cycle aromatique (Hagglom, 1990 ; Hardman, 1991 ; Ryding *et al.*, 1994 ; Chénier, 1997). Pour plus d'informations sur les processus aérobies, il est suggéré de consulter les références suivantes: Hagglom, 1990 ; Hardman, 1991; Neilson, 1990, 1996 ; Chaudry et Chapalamagu, 1991 ; Hale *et al.*, 1994.

## 4.1 Consortia anaérobies

Un résumé de la dégradation anaérobie du PCP par des consortia anaérobies est présenté au tableau 3.

### 4.1.1 Sols

Les premiers travaux portant sur la biodégradation anaérobie du PCP en sol ont été effectués avec des systèmes visant à mimer les conditions retrouvées dans les rizières (Ide *et al.*, 1972, Kuwatsuka *et al.*, 1975). D'abord, les recherches effectuées par Ide *et al.* (1972) ont permis pour la première fois de démontrer le processus de biodégradation du PCP en conditions anaérobies. En effet, le PCP contenu dans un sol inondé contaminé par 100 mg/kg a été presque complètement dégradé (>90 %) en moins de quatre semaines. Pour leur part, Kuwatsuka *et al.* (1975) ont comparé la dégradation du PCP (100 mg/kg, poids sec) dans 11 sols différents. Ceux-ci ont pu déterminer que la dégradation du PCP était beaucoup plus efficace lorsque les sols étaient sous conditions anaérobies (inondés) que chez les sols en conditions aérobies. En effet, la période de temps nécessaire à la dégradation de 90 % du PCP était de 30 jours ou plus sous conditions anaérobies, alors qu'elle était de 50 jours ou plus chez les sols sous conditions aérobies. De plus, ces chercheurs ont remarqué que le PCP était biodégradé plus rapidement en conditions anaérobies si le sol utilisé provenait d'une rizière mature plutôt que d'une rizière immature ou d'un sol forestier, et suggèrent que ce phénomène est causé par le fait que le sol de la rizière mature a déjà été exposé au PCP (Kuwatsuka *et al.*, 1975).

Lors des expériences effectuées par Ide *et al.* (1972), plusieurs chlorophénols ont été détectés, dont des TeCP (2,3,4,5-, 2,3,5,6- et 2,3,4,6-), des TCP (2,4,5- et 2,3,5-), des DCP (3,4- et 3,5-) et un MCP (3-). Ces intermédiaires ont permis de conclure que les micro-organismes impliqués dans le processus de biodégradation utilisaient un

Tableau 3 : Dégradation du PCP par des consortia anaérobies indigènes

Origine de l'inoculum	Conditions	Acclimatation	[PCP]	Dégradation	Minéralisation	Intermédiaires de dégradation	Déshal. aux positions	Références
Sol de rizière mature	Sol inondé	*	100 mg/kg	90 % en 4 semaines	-	TeCP, TriCP, DCP, 3-CP	<i>Ortho, meta, para</i>	Ide <i>et al.</i> 1972
Sol de rizière mature	Sols inondés	*	100 mg/kg	90 % en 30 jours	-	TeCP, TriCP, DCP	<i>Ortho, meta, para</i>	Kuwatsuka <i>et al.</i> 1975
Loam glaiseux humidifiés	Sols sous atmosphère d'azote	-	10 mg/kg	71,6 %	-	TeCP, TriCP, PCanisole	<i>Ortho, meta, para</i>	Murthy <i>et al.</i> 1977
Sol de rizière	Sols inondés	-	10-12 mg/kg	36,5 % de récupération après une période de croissance	-	TeCP, TriCP	<i>Ortho, para</i>	Weiss <i>et al.</i> 1982
Sédiments estuariens	Suspensions de sédiments	-	20 µg/g	68 % en 5 semaines	68 %	CO <sub>2</sub>	n.d.	DeLaune <i>et al.</i> 1983
Sédiments estuariens	Slurry	*	4 µmol/l	Demie vie de 2,1 jour	-	2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TriCP, 3,4-DCP, 3-CP	<i>Ortho, meta, para</i>	Susarla <i>et al.</i> 1998
Sédiments marins	Sédiments marins	*	0,8 µg/g	99 % en deux semaines	-	2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TCP, 3,5-DCP, 3-CP	<i>Ortho, meta, para</i>	Abrahamson <i>et al.</i> 1991
Sédiments d'eau douce	Slurry	-	350 µg/l	93 % en 14 semaines	10 %	-	-	Pignatello <i>et al.</i> 1985
Sédiments d'eau douce	Slurry	2,4-DCP	20 µg/ml	40 % en 5 jours	-	2,3,4,5-TeCP	<i>Ortho</i>	Bryant <i>et al.</i> 1991
	Slurry	3,4-DCP	20 µg/ml	95 % en 5 jours	-	2,3,5,6-TeCP	<i>Para</i>	
	Mélange slurry des deux communautés	2,4- et 3,4-DCP	20 µg/ml	75 % en 5 jours	-	2,3,5,6-TeCP, 2,3,5-TriCP, 3,5-DCP, 3-CP, phénol	<i>Ortho, meta, para</i>	

Boues de digesteurs anaérobies municipaux	Slurry	*	46,9 µM	100 % en 14 jours	-	3,4,5-TCP, 3,5-DCP	<i>Ortho, para</i>	Mikesell et Boyd 1985
Boue de digesteur anaérobie municipal	Slurry	2-CP pendant 2 ans	11 µg/ml	100 % en 3 jours	-	3,4,5-TCP, 3,5-DCP	<i>Ortho, para</i>	Mikesell et Boyd 1986
		3-CP pendant 2 ans	11 µg/ml	100 % en 9 jours	-	2,3,4,6-TeCP, 2,4,6-TCP	<i>meta</i>	
		4-CP pendant 2 ans	11 µg/ml	100 % en 12 jours	-	2,3,5,6-TeCP, 2,3,5-TCP	<i>Ortho, para</i>	
		2-CP, 3-CP, 4-CP pendant 2 ans	11 µg/ml	100 % en 3-6 jours	-	3,4,5-TCP, 3,5-DCP, 3-CP	<i>Ortho, meta, para</i>	
Boue de digesteur anaérobie municipal	Bioaugmentation d'un sol avec de la boue	*	10-30 mg/kg	99 % en 28-35 jours	-	2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TCP, 3,5-DCP, 3,4-DCP, 3-CP	<i>Ortho, meta, para</i>	Mikesell et Boyd 1988
Boue provenant d'un réacteur digérant le fumier	Conditions thermophiles (50°C)	-	7,5 ou 37,5 µM	68,8 % en huit mois	-	2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TCP, 3,5-DCP	<i>Ortho, para</i>	Larsen et al 1991
Boue d'un bioréacteur UASB	Milieu liquide	18 mois avec du PCP	2,5 mg/l	99 % en 2 jours	-	2,3,5,6-TeCP, 2,3,5-TCP, 3,5-DCP	<i>Para, ortho</i>	Hendriksen et Ahring 1992
Boue d'un digesteur anaérobie	Milieu liquide	6 mois avec du PCP	4,38 µM	99,7 % en moins de 1,2 jours	-	TeCP, TCP, DCP	<i>Ortho, meta et para</i>	Nicholson et al. 1992
Consortiums méthanogène	Milieu liquide	Phénol	0,015 mM	100 % en 50 jours	n.d.	2,3,4,6-TeCP	<i>Meta</i>	Wang et al. 1998
	Milieu liquide	phénol, 2-CP, 3-CP	0,016 mM	100 % en 50 jours	n.d.	2,3,4,6-TeCP, 2,4,6-TCP, 2,4-DCP, 4-CP	<i>Ortho, meta, para</i>	

\* Les chercheurs n'ont pas effectué d'acclimatation, mais ces inoculum proviennent de sites contaminés

mécanisme de déchloruration réductrice, et que les atomes de chlore situés en position *ortho* et *para* étaient éliminés plus facilement que ceux situés en position *meta* (Ide *et al.*, 1972).

Le processus de déchloruration réductrice a également été observé par Weiss *et al.* (1982) et par Murthy *et al.* (1977). Dans le cas de Weiss *et al.* (1982), ces chercheurs ont étudié la dégradation du PCP (10-12 mg/kg) en conditions anaérobies dans des sols inondés mais ont remarqué que sous les conditions employées, la déshalogénéation s'arrêtait à l'étape des TCPs. De plus, les résultats de ces recherches ont également démontré que la déchloruration s'effectuait en position *ortho* et *para*, mais pas en position *meta*, ce qui recoupe les résultats obtenus par Ide *et al.* (1972). Par contre, Murthy *et al.* (1977), ont effectué leurs expériences avec des sols (contaminés par 10 mg/kg de PCP) maintenus sous conditions anaérobies dans des bouteilles sous atmosphère d'azote et ils ont détecté du 2,3,5,6-TeCP, du 2,3,4,5-TeCP ainsi que du 2,3,6-TCP comme produits de dégradation.

#### 4.1.2 Sédiments estuariens et marins

Peu d'études sur la biodégradation anaérobie du PCP par des micro-organismes provenant de sédiments estuariens (DeLaune *et al.*, 1983, Susarla *et al.*, 1998) et marins (Abrahamson et Klick, 1991) ont été effectuées. La première étude portant sur des sédiments estuariens fut effectuée par DeLaune *et al.* (1983) suite à un important déversement de PCP dans l'estuaire du Golfe du Mississippi (Louisiane, É.-U.). Ces chercheurs ont utilisé des suspensions de sédiments contaminées par 20 µg PCP/g poids sec et ont observé la transformation de 68 % du PCP en CO<sub>2</sub> (pH 8,0, potentiel redox + 500 mV) en moins de cinq semaines. Les intermédiaires de dégradation n'ont pas été recherchés.

Pour leur part, les travaux effectués par Susarla *et al.* (1998) démontrent également que la dégradation du PCP par des micro-organismes provenant de sédiments sulfidogènes estuariens est possible. Ces chercheurs ont utilisé des sédiments récoltés dans la baie de Tokyo, à l'embouchure de la rivière Tsurumi. Ces sédiments étaient déjà contaminés par plusieurs polluants (des chlorophénols ont été détectés, mais pas le PCP), puisque plusieurs industries rejettent leurs eaux usées dans cette rivière. Les conditions utilisées ("slurry" de sédiments contaminés par 4  $\mu\text{mol PCP/l}$ ) ont également permis de conclure à une activité de dégradation des micro-organismes retrouvés dans ces sédiments. La dégradation a débuté après un délai de 24 heures et la demi-vie du PCP fut de 2,1 jours. La voie principale de dégradation passait par le 2,3,4,5-TeCP, le 3,4,5-TCP, le 3,4-DCP et le 3-MCP, impliquant donc des déshalogénations en position *ortho*, *meta* et *para*.

Les travaux d'Abrahamson et Klick (1991) sur l'activité de dégradation du PCP des sédiments marins sulfidogènes ont permis d'affirmer que les micro-organismes présents dans de tels sédiments pouvaient dégrader le PCP. Les sédiments ont été récoltés dans le fjord d'Idefjorden, fortement contaminé par des effluents d'industries papetières (aucun chlorophénol n'a été détecté dans les sédiments). Ces sédiments ont été contaminés avec 0,80-0,85  $\mu\text{g}$  de PCP/g et ont été directement utilisés dans les expériences (pas de système "slurry"). La dégradation a débuté suite à un délai de 5 jours (en partie due à la différence entre la température d'entreposage et d'incubation des échantillons) et après deux semaines, seulement des traces de PCP ont été détectées. Les intermédiaires de dégradation identifiés étaient le 2,3,4,5-TeCP, le 3,4,5-TCP, le 3,5-DCP et le 3-CP, impliquant des déshalogénations en positions *ortho*, *para*, et *meta*. Toutefois, le 3,5-DCP avait tendance à s'accumuler.

#### 4.1.3 Sédiments d'eau douce

Une première étude portant sur la dégradation du PCP par des micro-organismes anaérobies provenant de sédiments d'eau douce a été publiée en 1986 par Pignatello *et al.* Ces chercheurs ont prélevé des sédiments dans un système de cours d'eau artificiels en plein air préalablement contaminés par 144 µg PCP/l. Des systèmes "slurry" ont ensuite été conçus avec ces sédiments et du PCP fut ajouté jusqu'à une concentration de 350 µg/l. Ces chercheurs ont remarqué que la dégradation était plus rapide si les sédiments provenaient du cours d'eau déjà contaminé par le PCP. L'étude s'est déroulée sur une période de 14 semaines au cours de laquelle les micro-organismes ont réussi à transformer 93 % du PCP présent, mais n'ont pas réussi à minéraliser plus de 10 % du PCP. Cette faible minéralisation a poussé les auteurs à rechercher la présence d'intermédiaires de dégradation, mais aucun TeCP, TCP, DCP ni chloroanisole n'a pu être détecté.

Bryant *et al.* (1991) ont étudié la capacité de déchloration du PCP par des micro-organismes anaérobies provenant de sédiments d'eau douce et déjà adaptés à la présence de DCP (2,4-DCP ou 3,4-DCP). Les communautés de micro-organismes préalablement adaptées au 2,4-DCP ont effectué une déchloration en position *ortho* en premier, alors que les communautés adaptées à la présence de 3,4-DCP ont déchloruré le PCP en position *para*. La dégradation a débuté sans aucun délai avec les sédiments adaptés à la présence de DCP, alors qu'un délai d'au moins 40 jours a été observé chez les sédiments servant de contrôle (n'ayant pas été adaptés à la présence de chlorophénols). Plus de 40 % du PCP (20 µg/ml) a été dégradé par la communauté adaptée au 2,4-DCP en moins de 5 jours et le reste du PCP a ensuite été dégradé lentement pendant les 14 jours suivants. Dans le cas de la communauté adaptée au 3,4-DCP, la concentration du PCP (20 µg/ml) a été réduite à moins de 1 µg/ml en moins de 5 jours. La dégradation d'une seconde dose de PCP (20 µg/ml) par les deux communautés fut plus lente. Les deux types de communautés ont éliminé en premier le chlore du PCP situé à la même position que sur le DCP, c'est-à-dire que du 2,3,5,6-TeCP (déshalogénéation en position *para*) a été détecté

chez les sédiments adaptés au 3,4-DCP et du 2,3,4,5-TeCP (déshalogénéation en position *ortho*) a été détecté chez les sédiments adaptés au 2,4-DCP.

Suite à ces résultats, l'activité de déchloruration d'un mélange 1:1 des deux types de sédiments adaptés au DCP a été investiguée. La dégradation du PCP (20 µg/ml) a été plus rapide (environ 15 µg/ml en 5 jours) dans ce mélange qu'avec la communauté adaptée au 2,4-DCP, mais pas celle adaptée au 3,4-DCP. Toutefois, des taux de dégradation plus élevés ont été remarqués avec le mélange des deux communautés suite à l'ajout d'une seconde (20 µg/ml en moins de deux jours) et d'une troisième dose (15 µg/ml en moins de deux jours, suivi d'un délai pour le reste), d'environ 20 µg/ml et 26 µg/ml respectivement. Au cours de cette expérience, les intermédiaires de dégradation ont été détectés, soit le 2,3,5,6-TeCP, le 2,3,5-TCP, le 3,5-DCP, le 3-CP et le phénol (suivant l'ordre de déshalogénéation *para*, *ortho*, *meta*) (Bryant *et al.*, 1991).

Larsen *et al.* (1991) se sont également intéressés à la dégradation anaérobie du PCP par les micro-organismes provenant de sédiments d'eau douce, mais mis en présence de conditions thermophiles (50°C). Ils ont prélevé des sédiments d'un marais, d'un lac et d'une rivière (tous à une température variant entre 10 et 15°C) et les ont mis en présence de 7,5 ou 37,5 µM de PCP pendant une période de neuf mois. Le PCP a été dégradé à plus de 99 % par les échantillons provenant du marais et du lac et à plus de 80 % par les échantillons provenant de la rivière. Des TeCP, des TCP et des DCP ont été détectés suite à l'incubation. Une seconde dose de PCP a été ajoutée aux échantillons et fut dégradée en moins de quatre semaines. Deux voies de dégradation ont été répertoriées, soit une voie passant par le 2,3,4,5-TeCP, le 3,4,5-TCP et le 3,5-DCP (déshalogénéation en *ortho*, *para*) et une autre passant par le 2,3,5,6-TeCP, le 2,3,5-TCP et le 3,5-DCP (déshalogénéation en *para*, *ortho*). La seconde voie était utilisée par les micro-organismes provenant des sédiments du lac (sauf un échantillon utilisant la première et la deuxième

voie simultanément). Pour leur part, les micro-organismes provenant des sédiments de la rivière et du marais employaient les deux voies de manière simultanée.

#### 4.1.4 Boues

Mikesell et Boyd (1985, 1986, 1988) ont étudié la biodégradation du PCP par des micro-organismes provenant de boues de digesteurs anaérobies. Ces chercheurs ont d'abord effectué des expériences (Mikesell et Boyd, 1985) visant à comparer l'efficacité de dégradation du PCP par des boues provenant de trois digesteurs municipaux recevant différentes quantités d'eaux usées de source industrielle (Mason, 20 %, Jackson, 40 %, Adrian, 50 %) et donc ayant été plus ou moins en contact avec des produits chlorés. Les résultats obtenus suite à l'incubation d'échantillons de ces boues en présence de 46,9  $\mu\text{M}$  (12,5 ppm) de PCP ont permis de déterminer que la boue provenant du digesteur de la ville de Jackson (disparition complète du PCP en 14 jours) était plus efficace que les autres (39 % et 69 % de dégradation en 70 jours chez les boues de Mason et Adrian, respectivement). La voie de dégradation du PCP a été déterminée pour la boue Jackson:  $\text{PCP} \rightarrow 3,4,5\text{-TCP} \rightarrow 3,5\text{-DCP}$ , ce qui correspond à un déchloruration en position *ortho*, puis *para*.

Ainsi, puisque les micro-organismes provenant de la boue Jackson ne dégradent pas complètement le PCP, Mikesell et Boyd (1986) ont enrichi pendant une période de deux ans des échantillons de cette boue avec un mélange des trois MCP et également avec les trois MCP séparément. Les expériences effectuées ont permis de déterminer que le PCP (40  $\mu\text{M}$ , 11  $\mu\text{g/ml}$ ) avait complètement disparu en trois, neuf et douze jours chez les boues acclimatées au 2-MCP, 4-MCP et 3-MCP, respectivement. Les produits de dégradation qui ont été détectés sont le 3,4,5-TCP et le 3,5-DCP (déshalogénéation aux positions *ortho* et *para*), le 2,3,4,6-TeCP et le 2,4,6-TCP (déshalogénéation en position *meta*) et le 2,3,5,6-TeCP et le 2,3,5-TCP (déshalogénéation aux positions *ortho* et *para*)

dans le cas de l'enrichissement séparé avec le 2-MCP, 3-MCP et 4-MCP, respectivement. Ces résultats démontrent que l'élimination des atomes de chlore en position *ortho* est plus rapide que ceux situés en position *meta* ou *para* et que la déshalogénéation se produit généralement, mais pas exclusivement à la position correspondant à l'enrichissement.

Dans le cas de la boue enrichie avec une mixture des trois MCP, la disparition du PCP (40  $\mu$ M, 11  $\mu$ g/ml) est toujours survenue dans une période variant entre trois et six jours. Les produits de dégradation qui ont été détectés sont le 3,4,5-TCP, le 3,5-TCP et le 3-MCP, ce qui correspond à une dégradation en positions *ortho*, *para* et *meta*. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque trois échantillons de boues enrichis avec des MCP différents ont été rassemblés et incubés en présence de PCP (Mikesell et Boyd, 1986). Ces chercheurs ont également comparé la dégradation du PCP de grade technique et le PCP de grade réactif chez la boue enrichie simultanément avec les trois MCP. Peu de différences ont été observées dans le taux de dégradation des deux produits jusqu'à la troisième dose, où la dégradation du PCP de grade technique a commencé à ralentir. Ce phénomène pourrait être causé par l'accumulation des contaminants toxiques contenus dans le PCP de grade technique, ce qui causerait l'élimination des micro-organismes impliqués dans le phénomène de dégradation (Mikesell et Boyd, 1986).

Mikesell et Boyd (1988) ont ensuite voulu étudier la dégradation du PCP en sol suite à une bioaugmentation de ce sol avec de la boue provenant directement du réacteur municipal de Jackson. Suite à l'addition de 5 g de boue par kg de sol (poids sec) et à l'incubation de la mixture sous conditions anaérobies, les concentrations initiales de PCP (10-30 mg/kg) ont été complètement dégradées (< 0,5 mg/kg) dans une période variant entre 28 et 35 jours. Par contre, chez les sols incubés de manière anaérobie sans boue ou aérobie avec ou sans boues, 45 % et 10 % du PCP a été dégradé, respectivement après une période de 56 jours. Malheureusement, les temps d'incubation utilisés n'ont pas permis de déterminer un pourcentage de minéralisation. La voie de dégradation utilisée est

identique à celle décrite par l'article de Mikesell et Boyd (1986), sauf que du 2,3,4,5-TeCP et du 3,4-DCP ont également été détectés. Ces résultats démontrent que l'activité de dégradation du PCP peut être transférée de manière efficace à un sol contaminé par ce produit.

Pour leur part, Larsen *et al.* (1991) ont étudié le potentiel de dégradation du PCP de boues sous conditions thermophiles (50°C). Les boues utilisées provenaient de différents réacteurs anaérobies municipaux (35°C à 37°C) traitant les eaux usées, d'un réacteur de laboratoire (60°C) contenant des boues municipales et d'un autre réacteur de laboratoire (55°C) digérant du fumier. Après huit mois d'incubation en présence de 7,5 µM ou de 37,5 µM de PCP, entre 7 % et 17,5 % du PCP a été dégradé chez les boues provenant des digesteurs municipaux, 2,8 % du PCP a été dégradé chez la boue provenant du réacteur thermophile contenant des boues municipales et 68,8 % du PCP a été dégradé chez les boues provenant du réacteur digérant le fumier. Dans tous les cas, des TeCP et des TCP ont été détectés, mais pas des MCP. Une seconde dose de PCP a été ajoutée à la boue du digesteur de fumier et a été complètement dégradé en moins de quatre semaines en utilisant la voie de dégradation suivante: PCP → 2,3,4,5-TeCP → 3,4,5-TCP → 3,5-DCP (déshalogénéation en *ortho*, *para*). Comme ces essais ont été effectués en parallèle avec des échantillons de sédiments (voir section précédente), il est intéressant de constater que la dégradation du PCP en conditions thermophiles a été plus efficace avec des micro-organismes provenant de milieux naturels à température de 10 à 15°C, alors que des micro-organismes déjà adaptés à des températures plus élevées et ayant probablement déjà été en présence de produits chlorés n'ont pas pu dégrader le PCP aussi efficacement. Pour expliquer ce phénomène, les auteurs avancent l'hypothèse qu'il existe une plus grande variété de micro-organismes dans les échantillons provenant de milieux naturels, et donc un plus grand nombre de micro-organismes susceptibles de posséder les enzymes nécessaires à la dégradation de ce produit.

Hendriksen et Ahring (1992) se sont penché sur l'étude du métabolisme et de la cinétique de transformation du PCP par les micro-organismes contenus dans une boue provenant d'un réacteur à boues granulaires (mieux connu sous le nom de "upflow anaerobic sludge blanket") enrichi pendant 18 mois avec du PCP. Les résultats obtenus par ces chercheurs démontrent que l'addition de glucose permet l'augmentation de 150 % à 200 % du taux de déchloruration (concentration initiale en PCP entre 1285 et 1668  $\mu\text{g/l}$ ), alors que les substrats tels que l'hydrogène, le formate, le butyrate, l'éthanol, l'acétate et le sulfate n'ont montré que peu ou pas d'effet. Par contre, l'addition de nitrate a inhibé très fortement l'activité de dégradation du PCP. Ces chercheurs concluent donc que le glucose a probablement servi d'agent réducteur ou de facteur de croissance pour les micro-organismes responsables de l'activité de déchloruration ou encore que la population de micro-organismes utilisant le glucose a produit un cofacteur ou une vitamine qui a stimulé l'activité de déchloruration. L'effet inhibiteur du nitrate a été attribué à une augmentation du potentiel redox pendant la réduction du nitrate par l'hydrogène. La voie de dégradation utilisée était la suivante:  $\text{PCP} \rightarrow 2,3,5,6\text{-TeCP} \rightarrow 2,3,5\text{-TCP} \rightarrow 3,5\text{-DCP}$  (déshalogénéation en positions *para* et *ortho*) et même en présence des meilleurs conditions, l'étape limitante restait toujours le 3,5-DCP. Ces chercheurs ont également remarqué que la boue contenait environ  $10^1\text{-}10^2$  micro-organismes possédant une activité de déchloruration par ml de boue, soit un nombre relativement faible.

Pour leur part, Nicholson *et al.* (1992) ont étudié l'activité de déshalogénéation réductrice chez un consortium méthanogène enrichi avec du PCP pendant une période de six mois. Ils ont remarqué que 99,7 % du PCP ajouté (4,38  $\mu\text{M}$ ) était transformé en moins de 1,2 jours et que le consortium pouvait déshalogéner le PCP en position *ortho*, *meta* et *para*, puisque le PCP ajouté (0,9 mg/l ou 3,4  $\mu\text{M}$ ) était dégradé en 2,3,4,5-TeCP, 2,3,4,6-TeCP et 2,3,5,6-TeCP. Le 2,3,4,5-TeCP était déshalogéné en position *ortho*, formant alors du 3,4,5-TCP, lui-même dégradé en 3,5-DCP et, en concentration plus faible et persistant, en 3,4-DCP. Le 2,3,4,6-TeCP a produit le 2,4,6-TCP et le 2,4,5-TCP. Le 2,4,6-TCP a été déshalogéné en position *ortho* pour former du 2,4-DCP, puis du 4-CP,

alors que le 2,4,5-TCP a été déshalogéné pour produire du 3,4-DCP et du 2,4-DCP. Dans le cas du 2,3,5,6-TeCP, celui-ci a été déshalogéné de manière séquentielle pour former du 2,3,5-TCP, puis du 3,5-DCP. Les auteurs concluent donc que le consortium étudié déshalogène plus fréquemment les chlorophénols en position *ortho*. En effet, huit des neuf produits de dégradation possible en *ortho* ont été observés, alors que seulement deux des sept produits de dégradation en *para* et quatre des neuf produits de dégradation en *meta* ont été observés.

Enfin, Wang et al. (1998) se sont penchés sur la dégradation de chlorophénols (dont le PCP) par trois consortiums différents. Le consortium provenant des boues d'un digesteur anaérobie n'a pas réussi à dégrader le PCP (0,015 mM) en 60 jours. Par contre, le consortium méthanogène enrichi avec du phénol a réussi à transformer complètement le PCP (0,015 mM) en 50 jours, résultant en la présence de 2,3,4,6-TeCP (*meta*). Toutefois, cet intermédiaire n'était pas dégradé davantage. Dans le cas du consortium enrichi avec du phénol et acclimaté à la présence de 2-CP et de 3-CP, la voie de dégradation du PCP était la suivante: PCP → 2,3,4,6-TeCP → 2,4,6-TCP → 2,4-DCP → 4-CP (déshalogéné en positions *meta*, *ortho*). Le PCP (0,016 mM) a complètement disparu en moins de 50 jours.

#### 4.1.5 Bioréacteurs

Les performances de la biodégradation anaérobie du PCP en bioréacteur ont été étudiées dans différents types de bioréacteurs. En effet, plusieurs types de bioréacteurs ont été testés, soit des réacteurs à film-fixe (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1983; Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen et Ahring, 1993), agités et à flux semi-continu (Guthrie *et al.*, 1984), à boues granulaires (Woods *et al.*, 1989; Hendriksen *et al.*, 1992; Hendriksen et Ahring, 1993; Wu *et al.*, 1993) et à flux continu (Puhakka *et al.* 1994; Stuart et Woods, 1998). Aussi, certains chercheurs se sont intéressés à la dégradation du PCP en

bioréacteurs sous une alternance de conditions aérobies et anaérobies. Par exemple, Hakulinen et Salkinoja-Salonen (1982) ont utilisé un bioréacteur anaérobie à lit fluidisé et un bioréacteur aérobie de type "trickling filter", alors que Strömpl et Thiele (1997) ont utilisé des réacteurs séquentiels en cuvée.

Les meilleures performances (réacteurs aérobies/anaérobies et anaérobies stricts) ont été obtenues avec un réacteur à boues granulaires contenant des granules anaérobies (Wu *et al.* 1993). Ce bioréacteur pouvait effectuer la dégradation de 99 % du PCP entrant dans le réacteur (40 à 60 mg de PCP/l/jour ou 88 à 97 mg de PCP/l/jour). Les temps de rétention hydraulique variaient entre 10,8 et 15 heures. De plus, aucun chlorophénol n'a été détecté dans l'effluent, suggérant une déchloruration complète du PCP. D'autres travaux effectués par ces chercheurs (Kennes *et al.*, 1996) ont permis d'étudier plus en détail les granules anaérobies impliqués dans le processus de dégradation du PCP. Les résultats de ces travaux ont suggéré l'implication de bactéries réductrices du sulfate et la voie de dégradation utilisée par les micro-organismes composant les granules anaérobies favorisait une déshalogénéation en position *meta*, puis *ortho* et *para/meta* ou *ortho/meta*. Le phénol ainsi produit était alors dégradé en CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>.

## 4.2 Souches pures anaérobies dégradant les chlorophénols

### 4.2.1 *Desulfomonile tiedjei* souche DCB-1

Ce bâtonnet non sporulant, de type Gram négatif et réducteur de sulfate possède une structure en forme de collet impliquée dans le processus de réplication bactérienne et a été isolé d'un consortium méthanogène utilisant l'acide 3-chlorobenzoïque comme seule source de carbone et d'énergie. (Shelton et Tiedje, 1984). D'autres travaux ont permis de déterminer que l'activité de déshalogénéation de cette souche anaérobie stricte était couplée à la production de molécules d'ATP (Dolfing, 1990; Mohn et Tiedje, 1990). Aussi, la

capacité de déshalogénéation de cette souche a été testée sur plusieurs produits, ce qui a permis de déterminer qu'elle pouvait également déshalogéner d'autres substrats, dont certains chlorophénols (Linkfield et Tiedje, 1990; Dolfing et Tiedje 1991; Mohn et Kennedy, 1992). En effet, les travaux effectués par Mohn et Kennedy (1992) ont permis de découvrir que la souche DCB-1 pouvait déshalogéner le pentachlorophénol (54  $\mu\text{mol}$  de Cl-/heure/g de protéine) en 2,4,6-TCP (déshalogénéation en position *meta*). La capacité de déshalogénéation de la souche DCB-1 a également été testée avec les autres chlorophénols, et il y a eu déshalogénéation seulement en position *meta*, sauf dans le cas du 3-CP, qui n'a pas été déshalogéné. Toutefois, les chlorophénols n'induisaient pas la capacité de déshalogénéation de la souche et du 3-chlorobenzoate devait être utilisé comme inducteur.

Cette souche a également été introduite avec succès dans des microcosmes de sol non stérile en "slurry" et contaminés par 2,5 mM de 3-chlorobenzoate. Les microcosmes étaient composés de 50 g de sol (provenant d'un champ servant à l'agriculture) et de 80 ml d'un milieu de culture permettant la croissance de *D. tiedjei* et un inoculum de  $10^7$  cellules/ml a été ajouté. La dégradation du 3-chlorobenzoate a été possible en moins de 15 jours chez les microcosmes supplémentés avec de l'acétate et de l'acide formique et en moins de 30 jours chez les microcosmes n'ayant pas été supplémentés avec ces produits. Aucune dégradation n'a été observée chez les microcosmes n'ayant pas été ensemencés avec *D. tiedjei*. Également, le suivi de cette souche a pu être effectué par PCR au cours de cette expérience, avec une limite de détection de  $5 \times 10^3$  bactéries/g de "slurry" (El Fantroussi, *et al.*, 1997a et b).

#### 4.2.2 Souche 2CP-1

Cette souche anaérobie facultative a été isolée à partir d'une culture enrichie à partir de sédiments d'eau douce et est capable de déshalogéner le 2-chlorophénol (250

μM) et de tirer de l'énergie de cette réaction. Ce bâtonnet Gram négatif peut également déshalogéner le 2,5-DCP et le 2,6-DCP. Plusieurs autres substances halogénées ont été testées (3-MCP, 4-MCP, monobromophénol ou MBrP, monofluorophénol ou MFP, monoiodophénol ou MIP, acide 2-chlorophénoxyacétique, acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), mais aucune activité de déshalogénéation n'a pu être détectée vis-à-vis de ces produits. L'activité de déshalogénéation de cette souche est donc limitée à la position *ortho*. Le faible nombre de substrats pouvant être déshalogénés par cette souche suggère que cette activité de déshalogénéation ne serait pas fortuite et que la souche 2CP-1 aurait évolué pour pouvoir utiliser les *ortho*-chlorophénols ou d'autres molécules analogues naturelles. Des analyses biochimiques ont révélé que ce micro-organisme ne possédait pas de catalase ni d'oxidase, alors que des analyses moléculaires ont révélé que ce micro-organisme appartient à la subdivision Delta des protéobactéries et est relié aux myxobactéries (Cole *et al.*, 1994).

#### 4.2.3 *Desulfitobacterium dehalogenans* souche JW/IU-DC1

Le premier micro-organisme du genre *Desulfitobacterium* à être isolé fut *D. dehalogenans* souche JW/IU-DC1 (Utkin *et al.*, 1994). Cette bactérie est capable de résister à la chaleur (mais aucune spore n'a été détectée) et de réduire le sulfite, le thiosulfate ainsi que le nitrate. Ce bâtonnet Gram positif doté de 1 à 4 flagelles a été isolé à partir de sédiments méthanogènes (eau douce) et possède la capacité de déshalogéner en position *ortho* le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (3-Cl-4-OHPA; 15 mM), ainsi que plusieurs chlorophénols, dont le 2,3-DCP, le 2,4-DCP, le 2,6-DCP, le 2,3,4-TCP, le 2,3,6-TCP, le 2,4,6-TCP, le 2,3,4,6-TeCP, le 2,3,4,5-TeCP, le 2,3,5,6-TeCP et le PCP. Toutefois, les atomes de chlore en position *ortho* du 2-MCP et du 2,5-DCP ne sont pas déshalogénés. L'activité de déshalogénéation de la souche a également été testée avec les autres chlorophénols, mais sans succès (Utkin *et al.*, 1994). De plus, cette bactérie peut également déshalogéner, en présence de 3-Cl-4-OHPA et toujours en position *ortho*, le 2,6-dichloro-4-R-phénol (où R est -H, -F, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>- ou COOCH<sub>3</sub>), le 2-chloro-4-R-

phénol (où R est -H, -F, -Cl, -Br, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, ou -COOCH<sub>3</sub>), ainsi que certains bromophénols (le 2-MBrP, le 2,6-dibromophénol, et le 2-bromo-4-chlorophénol). Toutefois, *D. dehalogenans* ne peut déshalogéner l'analogue fluoré du 3-Cl-4-OHPA (Utkin *et al.*, 1995). Également, ce micro-organisme peut déshalogéner certains biphényles hydroxylés en position *ortho* du groupement hydroxyle (Wiegel *et al.*, 1999).

Après analyse des différents résultats, les chercheurs s'intéressant à *D. dehalogenans* ont observé que la présence d'un substituant chloré en position 3 (*meta*), 4 (*para*) ou 6 (*ortho*) du cycle aromatique facilitait la déshalogénéation en position 2 (*ortho*), et que la présence d'un atome de chlore en position 5 (*meta*) avait un effet négatif sur le taux de déshalogénéation ainsi que sur la déshalogénéation en position 2 (*ortho*) (Utkin *et al.*, 1995).

Tout comme *D. tiedjei* (voir section 4.2.1), cette bactérie a également déjà été introduite avec succès dans des microcosmes composés de sol en "slurry". Les conditions utilisées étaient les mêmes que pour *D. tiedjei*, sauf que les microcosmes étaient contaminés par 6 mM de 3-Cl-4-OHPA. La disparition complète de ce produit est survenue en moins de 4 jours chez les microcosmesensemencés avec *D. dehalogenans* et en moins de 11 jours chez les microcosmes n'ayant pas étéensemencés avec cette souche, suggérant une activité de la flore indigène. La détection de *D. dehalogenans* par PCR a également été possible lors de ces expériences, avec un seuil de détection d'environ 10<sup>4</sup> cellules/g de sol (El Fantroussi *et al.*, 1997b).

#### 4.2.4 *Desulfitobacterium dehalogenans* souche XZ-1

Tout comme *D. dehalogenans* souche JW/IU-DC1, cette souche est capable de déshalogéner certains biphényles hydroxylés en position *ortho* du groupement hydroxyl

(Wiegel *et al.*, 1999). Toutefois, aucune information n'a encore été publiée au sujet de cette souche et de la manière dont elle a été isolée.

#### 4.2.5 *Desulfitobacterium* sp. souche PCE1

La souche PCE1 a été isolée à partir d'un enrichissement dégradant le tétrachloroéthène obtenu à partir d'un échantillon de sol contaminé par du perchloroéthylène. Ce bâtonnet incurvé anaérobie stricte est de type Gram positif et possède quatre flagelles latéraux. Des analyses moléculaires ont révélé que le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S de cette bactérie est homologue à 99,3 % au même gène chez *D. dehalogenans*, suggérant que la souche PCE1 soit une souche de *D. dehalogenans* ou est une nouvelle espèce très proche sur le plan génomique de *D. dehalogenans*. Cette bactérie est capable de déshalogéner le PCE, le 3-Cl-4-OHPA, ainsi que le 2-MCP et le 2,4,6-TCP, ce qui en fait le premier organisme isolé à pouvoir croître à l'aide de la déshalogénéation réductrice de substances aliphatiques ou aromatiques. Les produits phénolés (1 mM) ont été déshalogénés en position *ortho* exclusivement, donnant lieu à du 4-OHPA, du phénol et du 2,4-DCP, du 2-MCP et du phénol, respectivement. Aucune activité de déshalogénéation n'a été obtenue avec plusieurs autres produits phénolés, tels que l'hexachlorobenzène, le 2,5-dichlorobenzoate, le 3,4-dichlorobenzoate, le 2,3,6-trichlorobenzoate, le pentachlorophénol et le 4-chlorophénylacétate (Gerritse *et al.*, 1996).

#### 4.2.6 *Desulfitobacterium hafniense* souche DCB-2

Ce bâtonnet incurvé, anaérobie strict et sporulant a été isolée à partir d'un consortium provenant de boues municipales dégradant le TCP. Cette bactérie possède également 1 ou 2 flagelles terminaux, est de type Gram positif et peut réduire le thiosulfate, le sulfite et le fer, mais pas le sulfate. La souche DCB-2 est tolérante à

l'oxygène. En effet, en présence d'oxygène, cette souche ne peut croître, mais conserve sa motilité. Sa croissance reprend en milieu anaérobie suite à une exposition de 24 heures à l'oxygène. D'abord reliée au genre *Clostridium* (Madsen et Licht, 1992), la souche DCB-2 fut classée parmi le genre *Desulfitobacterium* en 1996 (Christiansen et Ahring, 1996a). Cette bactérie possède la capacité de déshalogéner les atomes de chlore situés en position *ortho* chez le PCP, le 2,4,5-TCP, le 2,4,6-TCP et le 2,4-DCP (concentrations de 40  $\mu\text{M}$ ). Elle peut également déshalogéner le 3,5-DCP en 3-MCP, ce qui correspond à une déshalogénéation en position *meta*. L'activité de déshalogénéation a été testée avec d'autres chlorophénols (2-MCP, 3-MCP, 4-MCP, 3,4-DCP et 3,4,5-TCP), mais aucune déshalogénéation n'a été observée (Madsen et Licht, 1992). Cette souche peut aussi déshalogéner le 3-Cl-4-OHPA et conserve de l'énergie suite à cette réaction (Christiansen et Ahring, 1996a)

Certains travaux ont déjà été effectués avec cette souche dans le but d'étudier sa capacité de dégradation lorsqu'elle était immobilisée dans un bioréacteur à boues granulaires contenant des granules stériles. Les résultats obtenus ont permis de déterminer que le PCP entrant dans le réacteur (120  $\mu\text{mol/l/jour}$ ) était dégradé en 3,4,5-TCP, et ceci même si le temps de rétention hydraulique (TRH) du réacteur était réduit à un temps inférieur au temps de génération de la souche DCB-2. Ceci suggère que la souche s'est effectivement immobilisée sur les granules (Christiansen et Ahring, 1996b).

#### 4.2.7 *Desulfitobacterium chlororespirans* souche Co23

La souche Co23, isolée à partir de compost, possède la capacité de déshalogéner de manière réductrice plusieurs composés phénolés. Ce bâtonnet incurvé sporulant est de type Gram négatif après coloration, mais Gram positif après examen en microscopie électronique. Cette souche est capable de réduire le sulfite, le thiosulfate ainsi que le

soufre. En effet, cette souche peut éliminer les atomes d'halogène situés en position *ortho* chez les produits suivants (100  $\mu\text{M}$ ): le 2,3-DCP, le 2,6-DCP, le 2,4,6-TCP, le 2,4,6-TBrP, l'acide 3-chlorohydroxybenzoïque, le 3-Cl-4-OHPA. D'autres produits furent testés (100  $\mu\text{M}$ ), dont plusieurs chlorophénols (le 2-MCP, le 3-MCP, le 4-MCP, le 2,4-DCP, le 2,5-DCP et le 2,3,5-TCP), le 2-MFP, le 2-MBrP, le 2,4,6-TBrP, le 2-MIP, le 3-chlorobenzoate, le 3-chloro-L-tyrosine et le 3-chloroanisaldéhyde, mais aucun ne fut déshalogéné (Sanford *et al.*, 1996).

#### 4.2.8 *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S

La souche PCE-S a été isolée à partir d'un sol contaminé par le tétrachloroéthène. Toutefois, les résultats concernant l'isolement et la caractérisation de ce micro-organisme n'ont pas encore été publiés. Les auteurs se sont plutôt intéressés à l'isolement et à la caractérisation de la tétrachloroéthène déshalogénase produite par cette bactérie et n'ont pas spécifié si cette bactérie pouvait déshalogéner des molécules aromatiques (Miller *et al.*, 1997; 1998).

#### 4.2.9 *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 et travaux sur la biodégradation du PCP ayant mené à son isolement

Un consortium méthanogène pouvant dégrader le PCP a été enrichi à partir de boues activées et de sols contaminés par le PCP (Juteau *et al.*, 1995a et b). L'activité de dégradation du PCP par ce consortium a d'abord été étudiée dans un bioréacteur à flux semi-continu où le PCP était ajouté directement dans le réacteur (doses de 3 à 22  $\mu\text{M}$ ). L'activité de biodégradation du PCP dans ce bioréacteur, ainsi que la formation de méthane était peu stable, suggérant que la toxicité du PCP envers les micro-organismes du consortium était probablement responsable de cette instabilité. Par contre, de meilleurs résultats ont été obtenus suite à l'utilisation d'un bioréacteur à flux continu où le

PCP était compris dans l'affluent. Sous ces conditions, le PCP était ajouté de manière graduelle dans le bioréacteur, permettant sa dégradation immédiate. L'addition d'une source de carbone complémentaire comme le glucose ou le formiate de sodium était toutefois nécessaire afin de préserver l'activité de dégradation. Lorsque des concentrations de PCP de l'ordre de 20 mg/l étaient ajoutées à l'affluent, celui-ci était complètement dégradé et aucun intermédiaire de dégradation n'était détecté, alors qu'avec des concentrations de 50 mg/l, du PCP, du 3-MCP et du 3,5-TCP ont été détectés à des concentrations inférieures à 2 mg/l. Par contre, à des concentrations en PCP de 70 mg/l, le PCP et différents intermédiaires s'accumulaient dans l'effluent. La principale voie de dégradation du PCP utilisé par ce consortium était:  $\text{PCP} \rightarrow 2,3,5,6\text{-TeCP} \rightarrow 2,3,5\text{-TCP} \rightarrow 3,5\text{-DCP} \rightarrow 3\text{-MCP} \rightarrow \text{phénol}$ , soit des déshalogénations en position *para*, *ortho*, et *meta* (Juteau *et al.*, 1995a). Toutefois, des essais effectués avec une mixture (39  $\mu\text{M}$ ) de 2-MCP, 3-MCP et 4-MCP ont démontré que l'ordre préférentiel de déshalogénéation était *ortho*, *meta*, *para* (Juteau *et al.*, 1995b).

La biodégradation du PCP par le même consortium a également été étudiée dans un bioréacteur à film-fixe. Des performances de plus de 99 % de dégradation ont été obtenues avec des concentrations en PCP de l'ordre de 60  $\mu\text{mol/l}$  de volume de bioréacteur/jour (Juteau *et al.*, 1995a). Si l'on compare ces résultats avec ceux retrouvés dans la littérature, seuls Wu *et al.* (1993) ont obtenu de meilleurs résultats, avec des performances allant jusqu'à 90 mg de PCP/l/jour avec un bioréacteur à boues granulaires. De plus, ce réacteur a également été utilisé pour traiter le PCP extrait de copeaux de bois contaminés au PCP. La performance de dégradation était de 13,3 à 18,0 mg de PCP/l/jour, lorsque le TRH était de 0,5 à 0,6 jour et avec un système de recirculation de l'effluent (Beaudet *et al.*, 1997).

La bactérie *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 a été isolée du consortium méthanogène dont il a été question aux paragraphes précédents. Ce micro-organisme

réagit de manière négative à la coloration de Gram, mais après examen en microscopie électronique, possède une paroi de type Gram positif. Cette bactérie sporulante en forme de bâtonnet n'est pas mobile et peut utiliser plusieurs accepteurs d'électrons, dont le sulfite, le thiosulfate et le nitrate. La souche PCP-1 possède la capacité de déshalogéner le PCP en 3-MCP, selon la voie de dégradation suivante :  $PCP \rightarrow 2,3,4,5\text{-TeCP} \rightarrow 3,4,5\text{-TCP} \rightarrow 3,5\text{-DCP} \rightarrow 3\text{-MCP}$ . Cette voie de dégradation correspond à l'élimination des atomes de chlore selon l'ordre *ortho*, *ortho*, *para*, *meta*, ce qui en fait le seul micro-organisme anaérobie connu pouvant déshalogéner le PCP aux trois positions. Cette bactérie peut également déshalogéner plusieurs chlorophénols à différentes positions, mais ne peut déshalogéner aucun des MCP, ni le 2,3-DCP, le 2,5-DCP et le 3,4-TCP (Bouchard *et al.*, 1996). Deux enzymes sont impliquées au niveau de la déshalogénéation chez cette souche, la première est inductible pour les déshalogénéation en position *ortho*, alors que la seconde est inductible pour les déshalogénéations en position *meta* et *para* (Dennie *et al.*, 1998).

La souche PCP-1 possède un spectre d'activité large. En effet, cette bactérie peut déshalogéner (en position *ortho*, *meta* et/ou *para*) une vaste gamme de produits chlorés (5 mg/l), dont des produits phénolés (2,4,6-TBrP, tétrachlorocatéchol, tétrachloroguaiacol, tétrachlorovératrole, pentachloroanisole, 3,5-dichloro-4-hydroxybiphényl, 3-Cl-4-OHPA), des produits aminés (pentachloroaniline, 2,3,5,6-tétrachloroaniline, pentachloronitrobenzène, pentachloropyridine) et des hydrocarbures linéaires (tétrachloroéthylène) (Dennie *et al.*, 1998).

Des outils moléculaires permettant la détection et la quantification de cette souche ont également été développés. Une technique de détection de cette souche dans le sol par PCR a été mise au point et permet la détection de  $10^4$  bactéries PCP-1 par g de sol (Lévesque *et al.*, 1997). Cette technique a été appliquée avec succès lors d'essais de biodégradation en microcosmes composés de 10 % de sol contaminé par le PCP et

inoculés avec la souche PCP-1 (Beaudet *et al.*, 1998). Une technique de PCR compétitif (ou quantitatif) permettant la quantification de la souche PCP-1 a également été développée et appliquée avec succès lors d'essais en microcosme (Beaudet *et al.*, 1998), ainsi que dans un bioréacteur anaérobie à flux continu contenant le consortium méthanogène pouvant dégrader le PCP dont il a été question plus haut (Lévesque *et al.*, 1998). Une technique de détection et de quantification de la souche PCP-1 en milieu liquide par cytométrie en flux a également été développée (Thomas *et al.*, 1997).

Beaudet *et al.* (1998) ont montré que l'ajout du consortium méthanogène dégradant le PCP à des microcosmes contenant 10 %, 20 % et 40 % de sol contaminé par 100 mg PCP/kg de sol permettait la dégradation de plus de 90 % du PCP en 3-MCP en moins de 30 jours. De plus, l'inoculation de la souche PCP-1 à des microcosmes contenant 10 % de sol permettait d'obtenir la dégradation du PCP (100 mg/kg de sol) et 3-MCP en moins de 7 jours. Le suivi des bactéries PCP-1 par PCR et PCR quantitatif a montré que la population de la souche PCP-1 était stable tout au long du traitement. Lorsque la concentration du PCP dans les microcosmes était de 300 mg et 500 mg/kg de sol, une baisse de 150 à 200 mg de PCP/kg de sol suivie d'un arrêt de la dégradation a été observé. Une seconde inoculation de la souche PCP-1 au douzième jour a permis d'obtenir la dégradation complète du PCP dans ces microcosmes en moins de 28 jours. Ceci implique donc que plusieurs inoculations de la souche PCP-1 pourraient être utilisées pour traiter des sols fortement contaminés. Lors de certains essais, la flore indigène du sol a également dégradé le PCP, mais avec une période de latence variant entre 7 et 14 jours. (Beaudet *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que des micro-organismes possédant une activité de dégradation sont présents chez certains sols et qu'ils peuvent dégrader le PCP lorsque les conditions sont favorables.

Le but de ce projet de recherche consiste à étudier la biodégradation anaérobie du PCP par *D. frappieri* PCP-1 en bioréacteur rotatif, ceci afin de déterminer les conditions

optimales de dégradation. La détection et le suivi de la souche PCP-1 par PCR au cours de ces expériences permettra de connaître les fluctuations de cette population occasionnées par un tel traitement.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1.0 Micro-organismes

La souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 (ATCC 700357) a été isolée à partir d'un consortium méthanogène pouvant effectuer la dégradation du PCP (Bouchard *et al.*, 1996). Cette souche a été conservée sous forme lyophilisée et également par repiquage périodique dans un milieu anaérobie liquide dans des bouteilles de sérum.

La souche *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1 a été obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC 700041). Expédiée sous forme lyophilisée, cette bactérie a par la suite été conservée par repiquage périodique dans un milieu liquide anaérobie. Ces bactéries ont été repiquées à chaque semaine à partir d'un inoculum de 1 ml provenant d'une culture en phase stationnaire. Des colorations Gram ont été effectuées périodiquement afin de vérifier la pureté des cultures.

## 2.0 Culture des micro-organismes

### 2.1 Milieu liquide minimal anaérobie (LMA)

Un milieu de culture liquide minimal anaérobie semblable à celui décrit par Boyd *et al.* (1983) a été utilisé. Ce milieu contenait, par litre, les composés suivants: 0,27 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,35 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (tous deux de chez Fisher, Montréal, Qc), 0,53 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,10 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,013 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (tous trois de chez J.T. Baker, Philipsburg, NJ) et 0,53 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Montréal, Qc). Également, 0,001 g/l de resazurine (Sigma chemical co., St-Louis, MO), un indicateur du potentiel redox, était ajouté, ainsi qu'un volume de 10 ml/l d'une solution de minéraux (Wolin *et al.*, 1963). Cette solution contenait, par litre, 0,1 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{ZnCl}_2$ , 0,1 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  et 0,1 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Le milieu était bouilli pendant 1 heure avec une colonne réfrigérante limitant l'évaporation. Le milieu était ensuite transféré dans des bouteilles sérologiques de 70 ml (Can Lab, Pointe-Claire, Qc), à raison de 35 ml par

bouteille, et était barboté avec un mélange gazeux contenant 10 % d'hydrogène, 10 % de gaz carbonique et 80 % d'azote (Praxair, Mississauga, Ont.). Les bouteilles étaient alors scellées avec des bouchons de butyle et stérilisées à l'autoclave (121 °C pendant 20 minutes). Les dernières traces d'oxygène étaient ensuite éliminées par l'ajout de 0,05 g/l de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Sigma chemical co., St-Louis, MO).

## 2.2 Culture de *D. frappieri* souche PCP-1

La souche PCP-1 a été cultivée dans des bouteilles sérologiques de 70 ml contenant 35 ml de milieu LMA supplémenté avec 0,1 % d'extrait de levure (Gibco laboratories, Madison, WI). Le pH du milieu était d'abord ajusté à 7,5-8,0 avec du  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2M. Puis, 55 mM de pyruvate de sodium (Mallinckrodt, Paris, KY), ainsi que 10 mg/l de 2,4,6-TCP (Aldrich, Milwaukee, WI) ont été ajoutés à partir de solutions anaérobies préalablement stérilisées à l'aide d'un filtre de porosité de 0,2  $\mu\text{m}$  (Acrodisk, Gelman, Ann Arbour, NJ). Un inoculum de 1 ml (3 % v/v) provenant d'une culture en phase stationnaire était ajouté et les bouteilles incubées à 37°C à l'obscurité.

## 2.3 Culture de *D. dehalogenans* souche JW/IU-DC1

La bactérie *D. dehalogenans* a d'abord été cultivée selon les indications de Utkin *et al.* (1994). Le milieu liquide utilisé contenait 5,4 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 90 mg/l de  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 33,1 mg/l de  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (J.T. Baker, Philipsburg, NJ) et 0,1 % d'extrait de levure (Gibco laboratories, Madison, WI). Un volume de 5 ml/l d'une solution minérale était ensuite ajouté. La solution minérale contenait, par litre, 10 mg de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (Anachemia, Montréal, Qc), 10 mg de  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, St-Louis, MO), 10 mg de  $\text{NaWO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, St-Louis, MO), 1,5 g d'acide nitriloacétique (Sigma, St-Louis, MO), 3 g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Anachemia, Montréal, Qc), 0,5 g de  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Montréal, Qc), 1 g de  $\text{NaCl}$  (J.T. Baker, Philipsburg, NJ), 0,1 g de  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

(J.T. Baker, Philipsburg, NJ), 0,1 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,13 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (J.T. Baker, Philipsburg, NJ), 10 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Fisher, Montréal, Qc), 10 mg de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (J.T. Baker, Philipsburg, NJ), 10 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (J.T. Baker, Philipsburg, NJ) et 10 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Le pH du milieu a été ajusté à 7,5 avec du  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (J.T. Baker, Philipsburg, NJ) et bouilli pendant 1 heure avec une colonne réfrigérante. Le milieu était ensuite transféré dans des bouteilles sérologiques de 70 ml (Can Lab, Pointe-Claire, Qc), à raison de 35 ml par bouteille, et était barboté avec un mélange gazeux contenant 10 % d'hydrogène, 10 % de gaz carbonique et 80 % d'azote (Praxair, Mississauga, Ont.). Les bouteilles étaient alors scellées avec des bouchons de butyle et stérilisées à l'autoclave (121 °C pendant 20 minutes).

Une quantité de 20 mM de pyruvate (Mallinckrodt, Paris, KY) et de 20 mM de 3-Cl-4-OHPA (Aldrich chemical co., Milwaukee, WI) étaient ensuite ajoutés, ainsi que 20 ml/l d'une solution réductrice (8 g/l de NaOH, 12,5 g/l de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 12,5 g/l de cystéine) et un volume de 5 ml/l d'une solution vitaminée. La solution vitaminée contenait, par litre, 4 mg de biotine, 4 mg d'acide folique, 20 mg de pyridoxine-HCl, 10 mg de thiamine-HCl, 10 mg de riboflavine, 10 mg d'acide nicotinique, 10 mg de calcium D-(+)-pantothenate, 200 µg de cyanocobalamine, 10 mg d'acide *p*-aminobenzoïque et 10 mg d'acide thioctique. Le pH était ajusté à 7,5 avec une solution de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2M (Fisher, Montréal, Qc). Les solutions ajoutées après autoclavage ont été préparées de manière anaérobie et ont été préalablement stérilisées à l'aide d'un filtre de porosité de 0,2 µm (Acrodisk, Gelman, Ann Arbour, NJ). Un inoculum de 1 ml (3 % v/v) provenant d'une culture en phase stationnaire était ajouté et les bouteilles incubées à 37°C à l'obscurité.

Après quelques repiquages, *D. dehalogenans* a été cultivée dans le milieu LMA supplémenté avec 0,1 % d'extrait de levure (Gibco laboratories, Madison, WI). Suite à l'autoclavage, le pH du milieu était ajusté à 7,5-8,0 avec du  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2M (Fisher, Montréal, Qc). Aussi, 20 mM de 3-Cl-4-OHPA (Aldrich chemical co., Milwaukee, WI)

et 20 mM de pyruvate (Mallinckrodt, Paris, KY) étaient ajoutés. Les solutions ajoutées après autoclavage ont été préparées de manière anaérobie et ont été préalablement stérilisées à l'aide d'un filtre de porosité de 0,2 µm (Acrodisk, Gelman, Ann Arbour, NJ).

### 3.0 Énumération des bactéries PCP-1 dans un milieu liquide

#### 3.1 Cytométrie en flux

Un volume de 4 ml d'une culture de *D. frappieri* PCP-1 en phase exponentielle de croissance était d'abord prélevé stérilement, puis répartis en 4 échantillons de 1 ml chacun dans des tubes de 1,5 ml. Ces tubes étaient ensuite centrifugés à 8000 g pendant 2 minutes et le surnageant éliminé. Chacun des culots était resuspendu dans un volume de 1 ml de pyrophosphate 0,01 M préalablement stérilisé par filtration. La suspension a été centrifugée à 8000 g pendant 2 minutes et le surnageant a été éliminé. Cette dernière étape était ensuite répétée et les culots obtenus étaient resuspendus dans 1 ml de tampon PBS constitué de tampon phosphate 10 mM à pH 7,2 et contenant 130 mM de chlorure de sodium et 10 mM de pyrophosphate stérilisé par filtration (filtres 0,2 µm, Acrodisk, Gelman, Ann Arbour, NJ). Puis, différentes dilutions (de ½ à 1/20) de la préparation bactérienne étaient effectuées dans des volumes de 5 ml de tampon PBS. Ces différentes dilutions étaient ensuite analysées par cytométrie en flux (Coulter Electronics, Hialeah, FL) équipé d'un laser argon (488 nm). L'appareil était réglé afin d'obtenir un débit de 10 µl/min et un taux d'analyse à environ 1000 événements/seconde. L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL). L'intensité du bruit de fond a été déterminé à l'aide d'échantillons de milieu de culture non inoculés avec la souche PCP-1. Ces échantillons ont été préparés de la même manière que les échantillons provenant de milieux ensemencés.

### 3.2 Étalement sur milieu solide

Les énumérations bactériennes de la souche PCP-1 ont été effectuées sur milieu solide à l'aide de géloses Columbia anaérobies ANA 1121 (Quélab, Montréal, Qc). Différentes dilutions ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) d'une culture de *D. frappieri* PCP-1 ont été effectuées dans du milieu LMA et un volume de 0,1 ml était étalé sur la gélose (en triplicata). Les géloses ont ensuite été incubées à 37°C pendant 14 jours. Le nombre de bactéries a été évalué en déterminant le nombre d'unités formatrices de colonies (CFU) par ml de culture. Ces manipulations ont été effectuées dans une chambre anaérobie (Shel Lab, Sheldon Manufacturing Inc., modèle Bactron Anaerobic/Environmental Chamber, Oregon, É.-U.) sous une atmosphère de 10 % de H<sub>2</sub>, 10 % de CO<sub>2</sub> et 80 % de N<sub>2</sub> (Praxair, Mississauga, Ont).

### 3.3 Courbe de croissance de *D. frappieri* PCP-1

La courbe de croissance de la souche PCP-1 en milieu liquide a été réalisée à partir de cultures effectuées dans des bouteilles de sérum incubées à 37°C. Pour ce faire, des échantillons de 1 ml de milieu ont été prélevés stérilement à différents intervalles de temps et la densité optique a été déterminée avec un spectrophotomètre (Pye Unicam, modèle SP6-550 UV/VIS) à une longueur d'onde de 600 nm. Les valeurs ont été déterminées par comparaison avec un échantillon provenant d'un milieu non inoculé. Également, le pH des différents échantillons prélevés était déterminé à l'aide d'un pH mètre (modèle 125, Corning, USA).

#### 4.0 Sols

Tous les sols ont été tamisés (3-4 mm) avant utilisation et conservés à 4°C à l'obscurité. Le sol ITB a été prélevé en juin 96 sur le site d'une industrie de traitement du bois dans la région de Tracy (Québec). Ce sol est fortement contaminé par le PCP et également par de l'huile de créosote, constituée à environ 85 % d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Mueller *et al.*, 1989). Les sols MS sont des sols de texture sablonneuse qui ont été prélevés au même endroit, sur le terrain d'une résidence privée à Laval en 1996 (MS1) et en octobre 1998 (MS2). Le sol TS, une terre noire de type "top soil", a été prélevé en décembre 98 sur le campus de l'Institut Armand-Frappier, à partir d'un sol en pile. Le sol RIM a été prélevé sur un site industriel à Rimouski (Québec) en 1996. Ce sol était déjà faiblement contaminé par le PCP. Les caractéristiques de ces sols sont présentées au tableau 4.

Le contenu en eau, en matières organiques et en carbone total ont été déterminés pour les différents sols étudiés. D'abord, pour chacun des sols un échantillon de sol tamisé (5 à 10 g) était pesé (poids humide), puis incubé à 105°C pendant 18 heures et pesé à nouveau (poids sec). Le sol sec était ensuite incubé 18 heures à 550 °C, puis pesé à nouveau (poids inorganique). La teneur en eau, en matière organique et en carbone total étaient déterminés à l'aide des formules suivantes :

$$1) \text{ Contenu en eau (\%)} = ((\text{poids humide} - \text{poids sec}) \times 100) / \text{poids humide}$$

$$2) \text{ Matière organique (\%)} = ((\text{poids sec} - \text{poids inorganique}) \times 100) / \text{poids inorganique}$$

$$3) \text{ Carbone total (\%)} = \text{Pourcentage en matière organique} / 2$$

Tableau 4 : Caractéristiques des sols utilisés lors des expériences de biodégradation du PCP en bioréacteur rotatifs

Sols	Description	Contaminant	Carbone organique (%)	Matières organiques (%)	Humidité (%)	pH
ITB	Sablonneux	180 mgPCP/kg <sub>sol</sub> , créosote (750 mgHAP/kg <sub>sol</sub> )	6,3	12,5	7,6	6,9
MS1* et MS2**	Sablonneux	Non	3,1	6,2	7,8	6,8
TS	Sol de surface	Non	9,3	18,5	43,4	n.d.
RIM	Sablonneux	1 mg <sub>PCP</sub> /kg <sub>sol</sub>	1,6	3,2	8,2	n.d.

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; n.d. : Non déterminé

\* 50 % sable, 37 % silt, 13 % argile

\*\* : Les sols MS1 et MS2 ont été prélevés au même endroit à environ 2 ans d'intervalle

Les différents sols utilisés lors des expériences visant la recherche du genre *Desulfitobacterium* et de l'espèce *D. frappieri* ont été obtenus de la banque de sols de l'Institut de Recherche en Biotechnologie de Montréal, ainsi que du groupe de recherche en microbiologie environnementale de l'Institut Armand-Frappier. Tous ces sols ont été conservés à l'obscurité à 4°C.

## 5.0 Essais en bioréacteurs rotatifs anaérobies

### 5.1 Bioréacteurs rotatifs

Des bouteilles en verre de 1 l (10 X 15 cm) servant à la culture de cellules (Fisher scientific co., Montréal, Qc) ont été utilisées comme bioréacteurs. Des bouchons en Téflon ont été utilisés avec ces bouteilles. Les bioréacteurs utilisés lors des différentes expériences contenaient généralement 200 g de sol et 250 ml de milieu LMA supplémenté (LMAS) avec 0,1 % d'extrait de levure (Gibco laboratories, Madison, WI), 0,5 g/l de glucose (Anachemia Canada, Montréal, Qc) et 1,1 g/l de formiate de sodium (Aldrich, Milwaukee, WI). Également, 10 g/l d'azoture de sodium (J.T. Baker, Philipsburg, NJ) était ajouté aux contrôles abiotiques. Ces produits provenaient de solutions stock anaérobies 20 % p/v (azoture de sodium) ou 40 % p/v (glucose ou formiate de sodium) stérilisées par filtration (0,2 µm).

La préparation des bioréacteurs était effectuée en plusieurs étapes. D'abord, le milieu LMA était préparé, puis distribué dans les bouteilles utilisées comme réacteur. Puis, ces bouteilles étaient introduites dans une chambre anaérobie où les autres composantes étaient ajoutées. Dans la plupart des cas, les sols utilisés ont été mis sous conditions anaérobies avant le début de l'expérience. Pour ce faire, une quantité de 200 g de sol (poids humide) était pesée pour chacun des bioréacteurs, puis déposée dans des erlenmeyers en verre. Les erlenmeyers étaient ensuite mis en présence d'une atmosphère

de 10 % de H<sub>2</sub>, 10 % de CO<sub>2</sub> et 80 % de N<sub>2</sub> (Praxair, Mississauga, Ont.) dans le sas de la chambre anaérobie pendant une période de 24 à 48 heures. Les erlenmeyers étaient bouchés avec de la ouate afin d'empêcher la contamination de ces sols avec des spores de la souche PCP-1 qui pourraient être présents dans l'atmosphère de la chambre anaérobie. Généralement, les sols utilisés pour les contrôles abiotiques étaient autoclavés (121°C) deux fois pendant une heure à 24 heures d'intervalle.

Puis, toujours dans la chambre anaérobie, le glucose, le formiate de sodium, l'azotate de sodium et le PCP étaient ajoutés. Dans le cas du PCP (Aldrich, Milwaukee, WI), celui-ci était ajouté à la concentration désirée à partir d'une solution stock anaérobie de 5 mg/ml stérilisée par filtration (0,2 µm), sauf lors de certaines expériences où le sol utilisé était déjà contaminé par ce produit. Suite à l'ajout de ces produits, les bioréacteurs étaient fermés, sortis de la chambre anaérobie, puis incubés pendant une heure à 30°C à l'obscurité sous agitation continue (1 rotation/min) à l'aide d'un appareil Bello-Corbeil TM culture system (Belco Glass Inc., Vineland, NJ).

Ensuite, les bioréacteurs étaient à nouveau introduits dans la chambre anaérobie où des échantillons servant à l'analyse des chlorophénols étaient prélevés (jour 0). Des échantillons de phase liquide variant entre 5 et 15 ml et des échantillons de sol variant entre 5 et 15 g étaient prélevés dans des tubes vissés en verre. Le prélèvement des échantillons de phase liquide était effectué à l'aide de pipettes en verre de 10 ml, alors que les échantillons de sol étaient prélevés à l'aide d'une spatule en métal. Certains bioréacteurs étaient ensuite inoculés avec la souche PCP-1 (généralement 10<sup>7</sup> bactéries par ml de milieu LMAS) prélevée à partir d'une culture en phase exponentielle. Puis, tous les bioréacteurs étaient sortis de la chambre anaérobie et incubés de nouveau pendant 1 heure selon les conditions déjà décrites.

Suite à cette seconde incubation, les bioréacteurs étaient introduits une fois de plus dans la chambre anaérobie où des échantillons servant aux analyses de biologie moléculaire étaient prélevés. Des échantillons de phase liquide (1 ml) et solide (environ 2 g) ont été prélevés à l'aide des mêmes instruments que les échantillons servant à l'analyse des chlorophénols et déposés dans des tubes de 1,5 ml. Les bioréacteurs étaient alors sortis de la chambre anaérobie, puis incubés de nouveau selon les mêmes conditions. Les échantillons prélevés des bioréacteurs étaient ensuite centrifugés pendant 2 minutes à 350 g. Le surnageant était alors jeté et l'ADN était ensuite directement extrait à partir du culot dans le cas des échantillons de phase liquide, alors que dans le cas des échantillons de phase solide, l'ADN était extrait à partir d'un aliquot de 400 mg de sol déposé dans un nouveau tube de 1,5 ml.

Des échantillons servant aux analyses chimiques et de biologie moléculaire étaient ensuite prélevés périodiquement selon les techniques déjà décrites.

## 5.2 Calcul du poids sec

Le poids sec des échantillons de phase solide (sol) servant aux analyses des chlorophénols était ensuite déterminé (sauf dans le cas de l'expérience sur l'effet de l'agitation sur la biodégradation du PCP). Pour ce faire, une cupule d'aluminium était d'abord pesée. Puis, environ 1 g de sol humide était pesé dans cette cupule. La cupule contenant le sol humide était alors incubée à 100°C pendant environ 24 heures. Suite à cette incubation, la cupule contenant le sol sec était pesée à nouveau. La soustraction du poids de la cupule vide du poids de la cupule contenant le sol humide permettait alors de trouver le poids du sol humide. Le même calcul devait être effectué afin de déterminer le poids du sol sec. Le rapport sol humide sur sol sec permettait alors d'ajuster la concentration de PCP en mg/kg de sol sec.

### 5.3 Suivi de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs contenant différentes doses de PCP

Les cinq bioréacteurs utilisés au cours de cette expérience étaient constitués de 200 g de sol MS1 et de 250 ml de milieu LMAS. Le sol MS1 utilisé lors de cette expérience a d'abord été mis en présence d'une atmosphère de 10 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> et 80 % N<sub>2</sub> pendant 24 heures avant d'être ajouté dans les bioréacteurs. Du PCP a été ajouté aux cinq bioréacteurs afin d'obtenir des doses de 0, 100, 300, 500 et 750 mg PCP/kg de sol humide. Tous ces bioréacteurs ont été inoculés avec 38,9 ml d'une culture de la souche PCP-1 en phase exponentielle afin d'obtenir un compte de 10<sup>6</sup> bactéries PCP-1/ml de milieu LMAS. Le compte bactérien a été évalué par cytométrie en flux et par mesure de la densité optique à 600 nm (0,395). Aucun bioréacteur abiotique n'a été effectué au cours de cette expérience. Seules des analyses de PCR et de PCR quantitatif ont été effectuées périodiquement (jours 0, 3, 7, 12 et 21) lors de cette expérience afin de détecter *D. frappieri* PCP-1. Les analyses de PCR quantitatif n'ont été effectuées qu'avec les échantillons provenant du bioréacteur contaminé par 750 mg PCP/kg de sol (jours 0, 3, 7 et 12) et avaient pour but de quantifier la population de *D. frappieri* PCP-1 présente.

### 5.4 Effet de l'agitation sur la dégradation du PCP

Cette expérience a nécessité l'utilisation de six bioréacteurs contenant 200 g de sol MS1 et 250 ml de milieu LMAS. Le sol MS1 a été mis en présence d'une atmosphère de H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 48 heures avant son utilisation dans cette expérience et le PCP a été ajouté à partir d'une solution stock (voir section 5.1) puisque ce sol n'était pas initialement contaminé avant le début de l'expérience. Trois de ces bioréacteurs ont été agités pendant 1 heure par jour, alors que les trois autres ont été agités de manière continue. La vitesse de rotation pour les deux séries de bioréacteurs était de 1 rotation/min. Chacune des séries était composée d'un témoin abiotique (100 mg PCP/kg sol humide) et de deux bioréacteurs inoculés avec 10,1 ml d'une culture de bactéries PCP-1 en phase

exponentielle afin d'obtenir  $10^6$  bactéries PCP-1/ml de milieu LMAS. Ces deux bioréacteurs étaient contaminés respectivement par 100 et 750 mg PCP/kg sol humide. Le compte bactérien de la culture de bactéries PCP-1 utilisée comme inoculum a été effectué par cytométrie en flux et par énumération sur milieu solide. La mesure de la densité optique à 600 nm de la culture était de 0,531. Des analyses chimiques ont été effectuées périodiquement (jours 0, 7, 13 et 21) lors de cette expérience afin de quantifier les chlorophénols présents. Des analyses de PCR (jours 0, 3, 7, 13 et 21) et de PCR quantitatif ont également été effectuées périodiquement afin de détecter et de quantifier *D. frappieri* PCP-1. Les analyses de PCR quantitatif (jours 0 et 13) n'ont été effectuées qu'à partir des échantillons provenant des bioréacteurs contaminés par 100 mg PCP/kg de sol humide et ensemencés avec la souche PCP-1.

### 5.5 Effet de la taille de l'inoculum de bactéries PCP-1 sur la dégradation du PCP

Quatre bioréacteurs contenant 200 g de sol MS2 et 250 ml de milieu LMAS ont été utilisés lors de cette expérience. Le sol MS2 a été mis en présence d'une atmosphère de  $H_2/CO_2/N_2$  24 heures avant son utilisation dans cette expérience. Les bioréacteurs consistaient en un témoin abiotique, un bioréacteur non inoculé et deux bioréacteurs inoculés avec la souche PCP-1 provenant d'une culture en phase exponentielle. Deux concentrations en bactéries PCP-1 ont été utilisées, soit  $10^7$  et  $10^4$  bactéries PCP-1/ml de milieu LMAS (inoculés avec 1,5 ml de la culture de PCP-1 en phase exponentielle et avec 1,5 ml d'une dilution  $10^{-3}$  de cette même culture, respectivement). Le compte bactérien de la culture servant d'inoculum a été évalué par énumération sur milieu solide. L'inoculum utilisé avait une densité optique de 0,391 à 600 nm. Du PCP a été ajouté dans tous les bioréacteurs afin d'obtenir une concentration de 105 mg PCP/kg de sol sec. Des analyses chimiques (jours 0, 3, 7 et 9) visant la détection des chlorophénols ont été effectués. Également, des analyses par PCR ont été effectuées (jours 0 et 7) afin de déterminer la présence de *D. frappieri* PCP-1 dans les différents bioréacteurs.

## 5.6 Essai de biodégradation du PCP avec le sol TS

Le sol TS utilisé au cours de cet essai n'a pas subi de séjour sous atmosphère de  $H_2/CO_2/N_2$  avant son utilisation, ceci afin d'éviter que la flore indigène anaérobie de ce sol commence la dégradation du PCP. Ce sol a été préparé selon la procédure suivante : 1250 g de ce sol ont d'abord été tamisés, puis un volume de 478,1 ml d'eau distillée et un volume de 21,9 ml de PCP (provenant d'une solution stock de 6,8 mg/ml) ont été ajoutés à ce sol et le tout a été mélangé manuellement jusqu'à homogénéisation. Ce sol a ensuite été incubé pendant 40 jours à 4°C avant d'être utilisé dans cette expérience afin de simuler un sol contaminé vieilli. Le sol TS contaminé contenait environ 189 mg de PCP/kg de sol sec et possédait un pourcentage de carbone organique de 9,9 %, un pourcentage de matières organiques de 19,8 % et une teneur en eau de 60,2 %.

Deux séries de bioréacteurs ont été préparés pour effectuer cette expérience afin d'évaluer en même temps l'effet de la quantité de milieu liquide sur la biodégradation du PCP. Les bioréacteurs de la première série contenaient 200 g de sol TS et 250 ml de milieu LMAS alors que les bioréacteurs de la deuxième série contenaient 200 g de sol TS et 25 ml de milieu liquide. Trois bioréacteurs composaient la première série, soit un témoin abiotique, un bioréacteur non inoculé et un bioréacteur inoculé avec environ  $1,2 \times 10^7$  bactéries PCP-1/g de sol TS humide. Deux bioréacteurs composaient la seconde série, soit un bioréacteur non inoculé et un bioréacteur inoculé avec environ  $1,2 \times 10^7$  bactéries PCP-1/g de sol TS humide. L'inoculum de bactéries PCP-1 provenait d'une culture en phase exponentielle et le compte bactérien a été évalué par comparaison de la densité optique de cette culture à 600 nm (0,512) selon les analyses d'énumération bactérienne effectuées antérieurement sur milieu solide. Des analyses chimiques (jours 0, 4, 9 et 18) pour la quantification des chlorophénols ont été effectuées périodiquement au cours de cette expérience. Également, des analyses de PCR (jours 0, 9, 18 et 25) ont été effectuées périodiquement afin de détecter la présence *D. frappieri* PCP-1.

### 5.7 Essai de biodégradation du PCP avec le sol RIM

Trois bioréacteurs ont été utilisés au cours de cette expérience, soit un témoin abiotique, un bioréacteur inoculé avec  $10^7$  bactéries PCP-1/ml de milieu LMAS (provenant d'une culture en phase exponentielle) et un bioréacteur non inoculé. Le compte bactérien de la culture de bactéries PCP-1 a été évalué selon les mesures de la densité optique à 600 nm (0,720) de la culture ayant servi d'inoculum. Les bioréacteurs contenaient 187,5 ml de milieu liquide et 150 g de sol RIM, sauf le témoin abiotique qui contenait 250 ml de milieu et 200 g de sol RIM. Le sol RIM n'a pas subi de séjour sous atmosphère de  $H_2/CO_2/N_2$  avant son utilisation dans l'expérience, pour les mêmes raisons que le sol TS (voir section 5.6). Du PCP a été ajouté afin que la concentration en PCP dans les bioréacteurs soit d'environ 224 mg PCP/kg sol sec. Des analyses chimiques (jours 0, 7, 14 et 21) ayant pour but la quantification des chlorophénols ont été effectuées périodiquement. Également, des analyses de PCR (jours 0, 4, 8, 14 et 21) ont été effectuées périodiquement afin de détecter la présence de *D. frappieri* PCP-1.

### 5.8 Essai de biodégradation du PCP avec le sol ITB

Cinq bioréacteurs ont été utilisés lors de cette expérience, soit un témoin abiotique, un bioréacteur nonensemencé et trois bioréacteurs inoculés avec 0,4 ml d'une culture de bactéries PCP-1 en phase exponentielle (densité optique de 0,610) afin d'obtenir  $10^7$  bactéries PCP-1/ml de milieu LMAS. Les bioréacteurs contenaient 250 ml de milieu LMAS et 200 g d'un mélange de sol MS2 et ITB. Le bioréacteur abiotique, le bioréacteur non inoculé et un des bioréacteurs inoculé avec la souche PCP-1 contenaient 17 % de sol ITB et 83 % de sol MS2 (rapport 1/5). Les deux autres bioréacteurs inoculés avec la souche PCP-1 contenaient 50 % de sol ITB et 50 % de sol MS2 (rapport 1/1) ou 100 % de sol ITB. Puisque le sol ITB était déjà contaminé par environ 180 mg PCP/kg

de sol sec, du PCP a été ajouté dans les bioréacteurs contenant du sol ITB dilué avec du sol MS2 afin d'obtenir la même concentration en PCP dans tous les bioréacteurs. Les sols ITB et MS2 n'ont pas subi de séjour sous atmosphère de  $H_2/CO_2/N_2$  avant leur utilisation dans cette expérience. Des analyses chimiques ont été effectuées périodiquement (jours 0, 4, 8, 14, 21 et 33) afin de déterminer la quantité de chlorophénols dans les bioréacteurs. Également, des analyses de PCR ont été effectuées périodiquement (jours 0, 4, 8, 14 et 21) afin de détecter la présence de *D. frappieri* PCP-1 dans les différents bioréacteurs.

## 6.0 Recherche du genre *Desulfitobacterium* et de *D. frappieri* sp. dans différents sols

### 6.1 Enrichissements de la flore anaérobie d'échantillons de sols

L'enrichissement de la flore anaérobie des divers échantillons de sols a été effectué avec des bouteilles sérologiques en verre de 70 ml. Chacune de ces bouteilles contenait une quantité de sol variant entre 0,5 et 5 g, ainsi que 20 ml de milieu LMA supplémenté avec 25 mM de pyruvate (Sigma, St-Louis, MO), 9 mM de sulfite (J.T. Baker, Philipsburg, NJ), 15  $\mu$ M de 2,4,6-TCP (Aldrich, Milwaukee, WI), 0,1 % d'extrait de levures (Gibco laboratories, Madison, WI), 0,1 ml de la solution vitaminée et 0,1 ml de la solution minérale (section 2.3). Les bouteilles sérologiques ont ensuite été incubées à 30°C à l'obscurité pendant 11 à 14 jours. Le contenu de chacune de ces bouteilles a ensuite été transféré dans un tube à centrifuger en Téflon et a été centrifugé pendant 10 minutes à 5300 g. Le surnageant a ensuite été jeté et l'ADN a été extrait (section 8.1) à partir d'échantillons de culot de 400 mg déposés dans des tubes de 1,5 ml. Si le culot n'était pas assez important (poids inférieur à 1 g), le culot était resuspendu dans 5 ml d'eau distillée stérile et l'ADN était extrait (section 8.1) à partir d'un échantillon de 1 ml de suspension disposé dans un tube de 1,5 ml. L'ADN extrait a ensuite été amplifié par PCR (voir sections 8.2). Certains échantillons ont également été analysés par polymorphisme conformationnel de l'ADN simple brin (section 8.4).

Parallèlement à ces enrichissements, la flore indigène anaérobie de certains des sols testés a été enrichie dans un milieu spécifique aux bactéries réductrices de sulfate. Ce milieu contenait, par litre, les composés suivants: 0,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (Fisher, Montréal, Qc), 1,0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (J.T. Baker, Philipsburg, NJ), 1,0 g de  $\text{CaSO}_4$  (American Chemicals Ltd., Montréal, Qc), 2,0 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (J.T. Baker, Philipsburg, NJ), 3,5 g de lactate de sodium 60 % (American Chemicals Ltd., Montréal, Qc), 1,0 g d'extrait de levures (Gibco laboratories, Madison, WI), 0,1 g d'acide ascorbique (J.T. Baker, Philipsburg, NJ), 0,1 g d'acide thioglycolique (Sigma chemicals co., St-Louis, MO), et 0,5 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Le milieu était bouilli pendant 1 heure avec une colonne réfrigérante limitant l'évaporation. Le milieu était ensuite transféré dans des bouteilles sérologiques de 70 ml (Can Lab, Pointe-Claire, Qc), à raison de 35 ml par bouteille, et était barboté avec un mélange gazeux contenant 10 % d'hydrogène, 10 % de gaz carbonique et 80 % d'azote (Praxair, Mississauga, Ont.). Les bouteilles étaient alors scellées avec des bouchons de butyle et stérilisées à l'autoclave (121 °C pendant 20 minutes). Un volume de 20 ml de ce milieu était alors ajouté à un échantillon de sol de 0,5 g dans une bouteille sérologique en verre de 70 ml. Les bouteilles étaient alors scellées comme décrit précédemment et incubées à 30°C pendant 11 à 14 jours. C'est la formation d'un précipité noir dans ce milieu qui permet de confirmer la présence de bactéries réductrices de sulfate dans l'échantillon de sol. La flore indigène anaérobie de 20 des 34 sols utilisés a été enrichie dans ce milieu.

## 7.0 Analyses chimiques lors des expériences en bioréacteur

### 7.1 Extraction des chlorophénols dans les bioréacteurs

Les analyses ont été effectuées en duplicata sur des échantillons provenant des phases liquides et solides. Des échantillons de phase liquide variant entre 5 et 15 ml de milieu et des échantillons de sol variant entre 5 et 15 g ont été prélevés régulièrement.

Ces échantillons étaient ensuite centrifugés à 5300 g pendant 10 minutes. La phase liquide était éliminée dans le cas des échantillons de phase solide et des aliquots variant entre 1 et 6 g de sol étaient alors disposés dans des tubes en verre vissables servant à l'extraction. Dans le cas des échantillons de phase liquide, le surnageant était prélevé et disposé en aliquots (variant entre 1 et 6 ml) dans des tubes en verre de même type. Les bouchons utilisés avec les tubes vissables possédaient une membrane en Téflon. Les aliquots étaient alors acidifiés par l'ajout de 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (BDH, Toronto, Ont) et conservés à 4°C jusqu'au moment de l'extraction.

Au moment de l'extraction, un volume de 2 ml d'une solution de *n*-propylparaben (0,1 mg/ml) servant comme standard interne a été ajouté à chacun des aliquots. Ensuite, un volume de 10 ml d'éther diéthylique (EM Science, Gibbstown, NJ) leur a été ajouté, les tubes ont été agités au vortex pendant 1 minute, puis centrifugés à 5500 g pendant 5 minutes. La phase organique de chaque tube a alors été prélevée. L'extraction à l'éther a été effectuée deux autres fois avec la phase aqueuse de chacun des tubes. Comme la phase organique contenait les chlorophénols, mais également des huiles et graisses, une extraction en condition basique a ensuite été effectuée. Les phases organiques recueillies de chaque échantillon ont donc été rassemblées et déposées dans une ampoule à décanter. Un volume de 5 ml de NaOH 0,3 M (J.T. Baker, Philipsburg, NJ) a alors été ajouté et les ampoules ont été agitées manuellement pendant environ 30 secondes. Après quelques minutes de décantation, la phase inférieure de chacun des échantillons a été recueillie. Ce type d'extraction a été répété deux autres fois avec 5 ml de NaOH 0,03 M (J.T. Baker, Philipsburg, NJ) et les phases inférieures contenant les chlorophénols ont été rassemblées (volume total d'environ 15 ml) dans une fiole jaugée de 25 ml. Puis, un volume de 8,3 ml d'une solution d'acétonitrile (EM Science, Gibbstown, NJ) acidifié avec 0,1 % d'acide acétique (Mallinckrodt, Paris, KY) était alors ajouté, ainsi qu'un volume de 1,5 ml de HCl concentré (BDH, Toronto, Ont). De l'eau déionisée était ensuite ajoutée afin de compléter le volume total à 25 ml. Cette solution fut agitée manuellement et un volume de 1,5 ml a été recueilli et centrifugé 5 minutes à 16 000 g. Puis, un volume de 1

ml a été prélevé et son contenu en chlorophénols a été analysé et quantifié par chromatographie liquide à haute pression (CLHP).

Aussi, les chlorophénols de certains échantillons de l'expérience avec le sol TS ont été extraits par la méthode du soxhlet. Pour ce faire, une quantité d'environ 2 g de sulfate de magnésium (Anachemia, Montréal, Qc) préalablement chauffé pendant 12 heures à 650°C était mélangée à environ 400 mg d'échantillon de phase solide (poids humide) et à quelques gouttes de HCl concentré (BDH, Toronto, Ont). Le mélange était ensuite déposé dans une cupule qui était alors déposée dans le soxhlet. Un volume de 25 ml de solvant (éther diéthylique provenant de la compagnie EM Science, Gibbstown, NJ) était ensuite ajouté dans le système. Le chauffage du système était ensuite réglé afin d'obtenir un cycle de vidage/remplissage en une période d'environ 2 à 3 minutes. Puis, lorsque le système avait effectué environ 80 cycles, le solvant contenant les chlorophénols était récupéré. Un volume de 5 ml de NaOH 0,3 M (J.T. Baker, Philipsburg, NJ) était alors ajouté à un aliquot de 10 ml de solvant et l'extraction chimique se poursuivait alors comme décrit ci-haut.

## 7.2 Dosage des chlorophénols par chromatographie liquide à haute pression

L'appareil utilisé est de marque Waters 600 (Mississauga, Ont.) équipé d'un spectrophotomètre (modèle Waters 486) et d'un injecteur automatique (Waters Millipore, modèle 717 plus). Une colonne de type Nova-pack C<sub>18</sub> (3,9 x 150 mm) a été utilisée. L'appareil était relié à un ordinateur Pentium Digital Celebris 590, et le logiciel Millennium version 2.15.01 a été utilisé.

Deux phases mobiles étaient utilisées pour le dosage des chlorophénols, soit une phase A composée d'eau déionisée (99,9 %) et d'acide acétique (0,1 %) et une phase B

composée d'acétonitrile (99,9 %) et d'acide acétique (0,1 %). La colonne était d'abord équilibrée pendant au moins 5 minutes dans un mélange de 70 % de phase A et 30 % de phase B à un débit de 2 ml/min. Le programme d'analyse utilisé avait une durée de 13 minutes et le débit était maintenu constant à 2 ml/min. Après injection de l'échantillon, un gradient d'acétonitrile était appliqué pendant 4 minutes, faisant passer sa concentration de 30 % à 55 %. Au cours de cette période, la concentration de phase B était graduellement diminuée à 45 %. Ces conditions étaient maintenues constantes jusqu'à la dixième minute. Par la suite, au cours des trois dernières minutes, les concentrations en phases mobiles A et B étaient ramenées aux conditions initiales, selon un gradient concave. Les différents chlorophénols étaient quantifiés par leur absorbance à une longueur d'onde de 220 nm. Les courbes d'étalonnages et les temps de rétention des chlorophénols ont été vérifiés périodiquement.

## 8.0 Analyses de biologie moléculaire

### 8.1 Extraction et purification d'ADN

La technique d'extraction d'ADN présentée ici est la même que celle décrite par Lévesque *et al.* (1997), sauf que la colonne de Sephadex G-200 a été remplacée par une colonne de polyvinylpyrrolidone (PVPP). À chacun des tubes de 1,5 ml contenant un échantillon (solide ou liquide) dont l'ADN devait être extrait était d'abord ajouté 300 mg de billes de verre d'un diamètre variant entre 0,4 mm et 0,5 mm (B.Braun Biotech, Allemagne), ainsi que 1 ml de tampon d'extraction TEP (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, PVPP 1 % à pH 8,0). Ce tampon était préparé à partir d'une solution stock de Tris 1 M dont le pH avait préalablement été ajusté à 8,0 avec du HCl concentré et d'une solution stock de EDTA 0,5 M dont le pH avait préalablement été ajusté à 8,0 avec du NaOH concentré. Les différents échantillons étaient alors homogénéisés pendant 4 minutes à l'aide d'un homogénéisateur et centrifugés à 16 000 g pendant 15 minutes.

L'ADN contenu dans le surnageant a ensuite été purifié par l'ajout de 200  $\mu$ l d'acétate d'ammonium 10 N, puis incubé à 4°C pendant 30 minutes et centrifugé à 16 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu a alors été mélangé par inversion avec un volume d'une solution de phénol/alcool isoamylique (49:1) (American Chemicals Ltd., Montréal, Qc) et centrifugé 10 minutes à 16 000 g. L'alcool isoamylique permet d'inhiber la formation de mousse à cause de la présence de protéines. Cette dernière étape a été répétée et ensuite, le surnageant a été mélangé par inversion à un volume d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (50:49:1) (American Chemicals Ltd., Montréal, Qc) et centrifugé pendant 5 minutes à 16 000 g. Le phénol utilisé lors de ces manipulations avait été préalablement équilibré avec du tampon Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8). Puis, les échantillons ont été mélangés à 2 ml d'éthanol 95 %, incubés à -70°C pendant 20 minutes (ou à -20°C pendant une quinzaine d'heures) et centrifugés 15 minutes à 16 000 g. Le surnageant a alors été rejeté et le culot resuspendu dans 200  $\mu$ l d'eau distillée, puis purifié par chromatographie à l'aide d'une colonne de PVPP (American Chemicals Ltd., Montréal, Qc) centrifugée 2 minutes à 500 g. La colonne de PVPP était d'abord préparée dans une seringue de polycarbonate de 1 ml. La colonne était alors remplie de PVPP resuspendu dans du tampon phosphate de potassium 20 mM (pH 7,4) et centrifugée pendant 2 minutes à 500 g, ce qui permettait d'obtenir un volume de PVPP variant entre 0,5 et 1 ml dans la colonne. Le PVPP utilisé pour les colonnes avait été préalablement traité avec une solution de HCl 0,75 M (BDH, Toronto, Ont) pendant 12 à 16 heures, puis lavé abondamment avec de l'eau distillée et du tampon phosphate de potassium 20 mM (pH 7,4), jusqu'à ce que le pH du PVPP soit d'environ 7,4. Le PVPP était ensuite séché par filtration sous vide.

Un volume de 10  $\mu$ l d'ADN recueilli suite à la chromatographie était ensuite quantifié grossièrement par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %). Cette quantification a été effectuée par la comparaison de la migration de l'ADN contenu dans les échantillons avec des quantités de 100 ng, 200 ng et 400 ng d'ADN d'*Escherichia coli* XL-1 digéré

par les enzymes de restriction *EcoRI* et *PstI*. L'électrophorèse a été effectuée à 80-100 mA dans du tampon TAE 1 X (Tris-HCl 40 mM pH 8,0, EDTA 1mM) et le colorant LB (6X) a été utilisé pour tous les échantillons. Le gel était ensuite coloré pendant 15 minutes dans une solution de 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium.

Les extractions d'ADN à partir de cultures pures en milieu liquide de *D. dehalogenans* JW/U-DC1 et de *D. frappieri* PCP-1 ont été effectuées selon le protocole suivant. D'abord, un volume de 1 ml de la culture à analyser était prélevé stérilement, puis déposé dans un tube en plastique de 1,5 ml. Ce tube était alors centrifugé pendant 30 secondes à 16 000 g afin d'obtenir un culot de bactéries. Puis, le culot était resuspendu dans 450 µl de tampon TEN (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0) contenant 5 µg/ml de lysozyme fraîchement dissout, et incubé à 37°C pendant 15 minutes. Un volume de 40 µl d'une solution de SDS 20 % et un volume de 5 µl de β-mercaptoéthanol étaient ajoutés, et un choc thermique était effectué (incubation de 10 minutes dans un mélange de glace sèche/éthanol, suivie d'une incubation de 5 minutes à 65°C). Puis, un volume de 10 µl de protéinase K à une concentration de 1,25 mg/ml était ajouté et le tube était alors incubé à 45°C pendant 60 minutes. Suite à cette incubation, le contenu du tube était mélangé par inversion avec un volume d'une solution de phénol (American Chemicals Ltd., Montréal, Qc) et centrifugé 2 minutes à 16 000 g. Le surnageant obtenu était alors mélangé par inversion à un volume d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) (American Chemicals Ltd., Montréal, Qc) et centrifugé pendant 2 minutes à 16 000 g. Puis, le surnageant obtenu était alors mélangé à une solution de chloroforme/alcool isoamylique (24/1), puis centrifugé 2 minutes à 16 000 g. Le phénol utilisé lors de ces manipulations avait été préalablement équilibré avec du tampon Tris-HCl 1,5 M (pH 8,0). Suite à ces manipulations, un volume de 1 µl de ribonucléase A à une concentration de 10 mg/ml était ajouté, et le tube était incubé pendant 5 minutes à 37°C. L'ADN était alors précipité par l'ajout de 2 volumes d'éthanol 94 % et une incubation de 15 minutes à -70°C suivie d'une centrifugation de 15

minutes à 16 000 g. Le surnageant était alors jeté et le culot d'ADN resuspendu dans un volume de 200 µl d'eau distillée.

## 8.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR servant à l'amplification de l'ADN déjà extrait a été décrite par Lévesque *et al.* (1997). Les solutions servant au PCR contenaient 10 mM de tampon Tris/HCl (pH 9,0), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 50 mM de KCl (tous de Pharmacia Biotech, USA). Également, 200 µM de nucléotides (Pharmacia Biotech, USA), deux amorces (10 pmol chacune), 0,5 µg/µl d'albumine de sérum bovin (BSA), 2,5 U d'enzyme ADN *Taq* polymérase (Pharmacia Biotech, Canada) et 1 à 10 µl d'ADN à amplifier (l'ADN était parfois dilué jusqu'à 1/10 dans de l'eau distillée stérile) étaient ajoutés, ceci pour un volume total de 50 µL. Trois types d'amorces amplifiant l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S ont été utilisés pour l'amplification de l'ADN extrait. La séquence des amorces eubactériennes universelles était basée sur l'article de Bruce *et al.* (1992) : pA, 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' (se liant aux bases 8 à 27 de la séquence d'ADN codant pour l'ARN 16 S de *E. coli*) et pH 3' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3' (bases 1541 à 1522). Les amorces spécifiques à l'ADN codant pour l'ARN 16 S de *D. frappieri* qui ont été utilisées sont : 1G 5' CGAACGGTCCAGTGTCTA 3' (se liant aux bases 56 à 73 de la séquence d'ADN codant pour le gène 16 S ribosomal de *D. frappieri*) et 4D 3' AGGTACCGTCATGTAAGTAC 5' (bases 580 à 599). Les amorces spécifiques à l'ADN codant pour l'ARN 16 S ribosomal du genre *Desulfitobacterium* qui ont été utilisées sont : De1 5' GCTATCGTTA(G)TG(A)GATGGAT 3' (se liant aux bases 327 à 347) et De2 3' TTCAGACCACACTTTTGGATCC 5' (se liant aux bases 710 à 732). Les différentes amorces ont été synthétisées à l'aide de l'appareil Gene Assembler (Pharmacia Biotech, USA) par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

La spécificité des amorces utilisées (pA/pH, De1/De2, 1G/4D) a été vérifiée. Pour ce faire, 50 ng d'ADN extrait d'une culture pure de *D. dehalogenans* JW/IU-DC1 et d'une culture pure de *D. frappieri* PCP-1 a été amplifié avec chacune des paires d'amorces (sauf dans le cas des amorces 1G/4D, où des quantités d'ADN de 25 ng, 50 ng et 75 ng ont été utilisées pour l'amplification). Les solutions servant au PCR étaient identiques à ce qui a été décrit dans le paragraphe précédent, et l'amplification a été effectuée selon le protocole décrit au paragraphe suivant.

Les amplifications ont été effectuées avec un appareil DNA thermal cycler 480 (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.). Les échantillons d'ADN à amplifier ont été ajoutés pendant une phase de départ correspondant à une exposition de 5 à 10 minutes à 80°C. Cette phase était suivie d'une exposition à 94 °C pendant 5 minutes et d'une autre à 55 °C pendant 5 minutes. Puis, les solutions de PCR ont été soumises à 30-35 cycles d'amplification constitués de 2 minutes à 72 °C, 40 secondes à 94 °C et 1 minute à 55 °C. Enfin, ces cycles étaient suivis d'une exposition de 10 minutes à 72 °C. Dans le cas des amplifications effectuées à l'aide des amorces De1 et De2 spécifiques au genre *Desulfitobacterium*, la température d'hybridation de 55°C a été diminuée à 50°C pour faciliter l'attachement des amorces à l'ADN extrait. L'ADN amplifié (échantillons de 10 µl) était ensuite examiné par électrophorèse sur gel d'agarose (1,2 %) (voir section 6.1). Le marqueur de poids moléculaire utilisé correspondait au plasmide Bluescript digéré par *Sau3AI* (fragments de 1 030 paires de bases ou pb, 734 pb, 341 pb, 258 pb, 192 pb, 105 pb, 78-75 pb, 46-36 pb, 18-17 pb, 12-11-8 pb).

### 8.3 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative

La concentration en bactéries PCP-1 a été estimée par la technique de PCR quantitatif basée sur la méthode de Zachar *et al.* (1993) telle que décrite par Lévesque *et al.* (1998). Les conditions servant au PCR quantitatif sont les mêmes qu'à la section 6.2 et

évidemment, seules les amorces spécifiques à *D. frappieri* (1G et 4D) ont été utilisées pour l'amplification. Pour chaque échantillon dont la concentration en bactéries PCP-1 devait être déterminée, cinq réactions devaient être effectuées, chacune avec une quantité différente de standard interne. Habituellement des quantités de  $10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$  et  $10^8$  molécules de standard interne par réaction étaient utilisées. L'ADN à amplifier était ajouté en même temps que le standard interne, c'est-à-dire lors de la phase de départ (exposition de 5 à 10 minutes à  $80^\circ\text{C}$ ).

La préparation du standard interne a déjà été décrite par Lévesque *et al.* (1998). Le standard interne utilisé correspondait à un fragment de 544 pb provenant du gène ribosomal 16 S de la souche PCP-1 cloné dans le vecteur plasmidique pCRII. Le standard interne qui a été utilisé avait la même séquence que les fragments d'ADN à amplifier, sauf qu'il contenait un site de restriction pour l'enzyme *EcoRV*. Ce site a été introduit par mutagenèse dirigée.

Les échantillons ayant subi un PCR quantitatif ont nécessité une étape de purification supplémentaire. Le volume de 50  $\mu\text{l}$  a été entièrement prélevé de chacun des échantillons et mélangé à 100  $\mu\text{l}$  d'eau, pour un volume total de 150  $\mu\text{l}$ . Un volume d'une solution de phénol/alcool isoamylique (49:1) (voir section 6.1) a été ajouté, la solution fut agitée par inversion et centrifugée 10 minutes à 16 000 g. La phase aqueuse (surnageant) a été mélangée par inversion à un volume d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (50:49:1; voir section 6.1) et centrifugée pendant 5 minutes à 16 000 g. La phase aqueuse (surnageant) obtenu a été mélangée à 0,1 volume d'une solution d'acétate de sodium 3 M (pH 7,0; American Chemicals Ltd., Montréal, Qc) et à 2 volumes d'éthanol 95 %. Cette solution a été mélangée par inversion, incubée 15 minutes à  $-70^\circ\text{C}$  et centrifugée 10 minutes à 16 000 g. Le culot a été lavé avec un volume d'une solution d'éthanol 70 % et centrifugé 5 minutes à 16 000 g. Ce culot d'ADN a été resuspendu dans 45  $\mu\text{l}$  d'eau distillée. Puis, un volume de 10  $\mu\text{l}$  d'ADN a été prélevé pour chacun des

échantillons et mis en présence de tampon de digestion et d'enzyme *EcoRV* (Pharmacia Biotech, USA). Ces échantillons ont été incubés à 37 °C pendant au moins 3 heures. La digestion permettait de cliver le standard interne en deux fragments (408 pb et 136 pb), alors que le fragment provenant de l'ADN extrait n'était pas digéré. Enfin, un volume de 10 µl d'ADN digéré a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (2 %) pour chacun des échantillons (voir section 6.1).

Le gel a ensuite été digitalisé à l'aide d'un densitomètre (Bio-Rad gelDoc, Bio-Rad, Hercules, CA) et l'intensité lumineuse des bandes obtenues suite à l'électrophorèse a été analysée à l'aide du logiciel Molecular Analyst version 1.3 (Bio-Rad, Hercules, CA). Pour chaque amplification effectuée, le rapport de l'intensité lumineuse de la bande correspondant au standard interne (408 pb) sur l'intensité lumineuse de la bande correspondant au fragment à amplifier à partir de l'ADN extrait (543 pb) était calculée. Un graphique de ce rapport en fonction de la quantité de standard interne ajouté était ensuite construit. Le point correspondant à un rapport de 1 était donc égal au nombre de copies du gène codant pour l'ARN ribosomal 16 S de la souche PCP-1 présents dans le volume d'ADN extrait qui a été ajouté à la solution d'amplification. La concentration en bactéries PCP-1 pouvait ensuite être déterminée à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Nombre de bactéries PCP-1/ml ou g} = (N \times v^{-1} \times V) \times B / 3 \times b$$

où N correspond au nombre de copies du gène ribosomal 16 S de la souche PCP-1 selon le graphique, v correspond au volume d'ADN extrait qui a été amplifié, V correspond au volume dans lequel l'ADN a été resuspendu avant d'être amplifié, B correspond au volume total du bioréacteur (g ou ml), 3 correspond au nombre de copies du gène ribosomal 16 S chez la souche PCP-1 (Lévesque *et al.* 1997) et b correspond au volume (g ou ml) à partir duquel l'extraction d'ADN a été effectuée.

#### 8.4 Polymorphisme conformationnel de l'ADN simple brin

La technique de polymorphisme conformationnel de l'ADN simple brin (PCSB), mieux connue sous le nom de "single strain conformational polymorphism", permet de séparer des brins d'ADN dénaturés selon leur séquence en bases azotées. Ceci permet donc de déterminer si des séquences différentes ont été obtenues suite à l'amplification par PCR avec un seul type d'amorces. Ainsi, pour chacune des séquences différentes du gène amplifié, trois bandes sont obtenues sur gel, soit deux bandes correspondant à de l'ADN simple brin, et une seconde bande correspondant à de l'ADN double brin.

L'ADN extrait a été préalablement amplifié avec les amorces De1 et De2 selon les conditions décrites à la section 8.2. Puis, l'ADN contenu dans le volume de produits de PCR (entre 30 et 35  $\mu$ l) a été précipité avec 0,25 volume d'acétate d'ammonium 10 M, 2 volumes d'éthanol 95 % et une exposition à  $-70^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 15 minutes à 16 000 g et le culot resuspendu dans 10  $\mu$ l d'eau distillée. Des volumes de 1  $\mu$ l (échantillons extraits à partir d'une culture pure) ou 3  $\mu$ l d'ADN (échantillons extraits à partir de sol enrichi) ont ensuite été mis en présence de 5  $\mu$ l de colorant LB PAGE et le volume final complété à 8  $\mu$ l avec de l'eau distillée. Le colorant LB PAGE a été préparé le jour même et était composé de 99  $\mu$ l d'une solution stock LB et de 1  $\mu$ l de NaOH 1N. La solution stock LB contenait, pour un volume total de 10 ml, 9,5 ml de formamide, 0,4 ml d'EDTA 500 mM, 1 mg de bleu de bromophénol et 1 mg de xylène cyanol.

L'ADN des échantillons a ensuite été dénaturé par une incubation de 10 minutes à  $95^{\circ}\text{C}$  suivie d'une exposition à  $4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à ce qu'ils soient déposés sur gel. Le gel utilisé pour la séparation de l'ADN selon sa séquence était composé, pour un volume de 5 ml, de 0,5 ml d'acrylamide 50 %, de 1 ml de TBE 5X, de 0,5 ml de glycérol, de 40  $\mu$ l de persulfate d'ammonium 10 % et de 5  $\mu$ l de TEMED. Le volume a été complété à 5 ml

avec de l'eau distillée. Le TBE 5X était composé de 54 g de tris, 275 g d'acide borique et de 20 ml d'EDTA 0,5 M dans un volume total de 1 l (complété avec de l'eau distillée). Les échantillons ont ensuite été déposés sur le gel et migrés à 150 V pendant 1h30 dans le même tampon de migration que décrit précédemment. Le gel a ensuite été mis en présence d'acide acétique 20 % pendant 20 minutes, puis lavé trois fois pendant 2 minutes en présence d'eau distillée. Le gel a ensuite été coloré avec une solution de nitrate d'argent (1 g/l) et de formaldéhyde (1,5 ml/l) pendant 30 minutes, puis lavé avec de l'eau distillée pendant 20 secondes. Le gel a alors été mis en présence d'une solution révélatrice pendant 2 à 5 minutes. Cette solution était composée de 30 g/l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1,5 ml/l de formaldéhyde et de 2 mg/l de thiosulfate. Enfin, le gel a été déposé dans une solution d'acide acétique 10 % jusqu'à ce qu'il soit séché.

## **RÉSULTATS**

## 1.0 Courbe de croissance de *D. frappieri* PCP-1

La croissance de la souche PCP-1 a été étudiée dans des bouteilles de sérum de 70 ml contenant 35 ml de milieu liquide. Cette expérience avait pour but de déterminer la densité optique correspondant à une culture en phase exponentielle, ceci afin de toujours avoir un inoculum de bactéries PCP-1 en phase de croissance logarithmique lors des expériences suivantes. Les résultats obtenus suite à la lecture de la densité optique et du pH de différents échantillons au cours du temps sont présentés à la figure 1. La croissance de la souche PCP-1 a été relativement rapide et la phase stationnaire a été atteinte après environ 30 heures d'incubation à 37°C. Pour sa part, le pH de la culture a diminué au cours de la croissance, passant d'environ 7,4 à 6,8.

## 2.0 Essais en bioréacteurs rotatifs anaérobies

### 2.1 Suivi par PCR et PCR quantitatif de la souche PCP-1

Cette expérience avait pour but de déterminer le niveau de contamination par le PCP que la souche PCP-1 pouvait tolérer en bioréacteur contenant un mélange de sol et de milieu liquide. Les différentes doses de PCP utilisées ont été choisies en fonction de travaux antérieurs effectués en microcosmes (bouteilles sérologiques contenant 2g de sol et 20 ml de milieu LMA) et démontrant que la dégradation du PCP par la souche PCP-1 pouvait être effectuée jusqu'à des doses de 500 mg PCP/kg sol. Les résultats obtenus suite aux analyses par PCR sont présentés au tableau 5. L'amplification de l'ADN extrait avec les amorces universelles a été possible pour tous les échantillons étudiés. Également, l'ADN de la souche PCP-1 a été détecté par PCR dans tous les bioréacteurs, sauf au jour 21 dans le bioréacteur contaminé par 750 mg de PCP/kg de sol humide (phases solide et liquide).

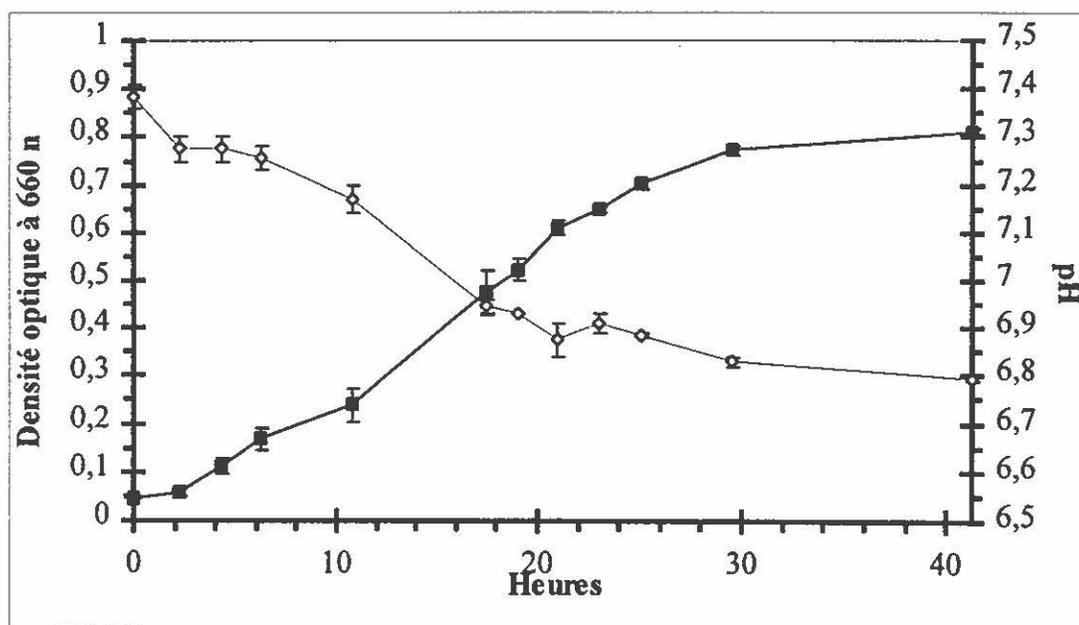


Fig. 1 : Courbe de croissance de la souche PCP-1 en milieu de culture LMA contenant 55 mM de pyruvate, 10 mg/l de 2,4,6-TCP et 0,1 % d'extrait de levures. La densité optique (■) et le pH (◇) sont la moyenne de duplicatas.

Tableau 5 : Détection par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol MS1 contaminé par différentes doses de PCP lors de l'expérience sur le suivi de la souche PCP-1

PCP (mg/kg sol humide)	Phase	Jour 0		Jour 3		Jour 7		Jour 12		Jour 21	
		Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>
0	Solide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Liquide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100	Solide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Liquide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
300	Solide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Liquide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
500	Solide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Liquide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
750	Solide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Liquide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Univ. : amorces universelles ; *frapp.* : amorces *D. frappieri*

Le but du PCR quantitatif consistait en la quantification de la population de bactéries PCP-1 suite à une exposition à une dose toxique de PCP. Il était impératif d'utiliser la technique du PCR quantitatif, puisqu'un dénombrement sur milieu solide était impossible, car aucun milieu sélectif pour la souche PCP-1 n'a encore été mis au point. L'utilisation de milieux de culture de type Columbia anaérobies n'aurait également pas été pertinente, à cause de l'interférence causée par la flore indigène présente dans le sol MS1. Le suivi par PCR quantitatif n'a donc été effectué que sur le bioréacteur contaminé par 750 mg PCP/kg sol, car aucun signal de PCR n'a été détecté pour *D. frappieri* au temps 21 jour dans ce bioréacteur. Ces résultats (tableau 6) démontrent que la population de bactéries PCP-1 a diminué graduellement dans la phase solide, passant de  $1,33 \times 10^9$  bactéries PCP-1/g de sol humide au jour 0 à  $2,71 \times 10^4$  bactéries PCP-1/g de sol humide au jour 12, puis à aucune bactérie PCP-1 détectable au jour 21. Dans le cas de la phase liquide, la population de bactéries PCP-1 a augmenté légèrement, passant de  $1,90 \times 10^7$  bactéries PCP-1/ml au jour 0 à  $1,65 \times 10^8$  bactéries PCP-1/ml au jour 3. La population est alors restée stable au jour 7 ( $2,60 \times 10^8$  PCP-1/ml), puis a disparue au jour 12. La population totale de bactéries PCP-1 est donc restée plutôt stable, passant de  $2,71 \times 10^{11}$  bactéries PCP-1 au jour 0 à  $8,64 \times 10^{10}$  bactéries PCP-1 au jour 3 et à  $8,52 \times 10^{10}$  bactéries PCP-1 au jour 7, puis a décliné à  $5,42 \times 10^6$  bactéries PCP-1 au jour 12 et à 0 bactéries PCP-1 au jour 21. Aussi, une grande différence (environ 1000 fois) existe entre le nombre de bactéries PCP-1ensemencées dans ce bioréacteur au jour 0 selon la cytométrie en flux ( $2,5 \times 10^8$  bactéries PCP-1) et le nombre retrouvé selon la technique de PCR quantitatif au jour 0 ( $2,71 \times 10^{11}$  bactéries PCP-1). Un exemple d'analyse par la cytométrie en flux d'un échantillon d'une culture de bactéries PCP-1 en phase exponentielle de croissance est présenté à la figure 2, alors qu'un exemple de gel obtenu suite à un PCR quantitatif est présenté à la figure 3.

Puisque les valeurs de population de bactéries PCP-1 obtenues à l'aide de la cytométrie en flux et du PCR quantitatif différaient, des énumérations bactériennes ont été effectuées sur milieu solide et par cytométrie en flux à partir d'une culture de

Tableau 6 : Suivi par PCR quantitatif de la population de bactéries PCP-1 dans un bioréacteur rotatif contenant du sol MS1 contaminé par 750 mg de PCP/kg de sol humide

Phase	PCP-1	Jour 0	Jour 3	Jour 7	Jour 12
Solide	PCP-1/g	$1,33 \times 10^9$	$2,26 \times 10^8$	$1,01 \times 10^8$	$2,71 \times 10^4$
	PCP-1 total *	$2,66 \times 10^{11}$	$4,52 \times 10^{10}$	$2,02 \times 10^{10}$	$5,42 \times 10^6$
Liquide	PCP-1/ml	$1,90 \times 10^7$	$1,65 \times 10^8$	$2,60 \times 10^8$	-
	PCP-1 total *	$4,75 \times 10^9$	$4,13 \times 10^{10}$	$6,5 \times 10^{10}$	-
Solide et liquide	PCP-1 total *	$2,71 \times 10^{11}$	$8,64 \times 10^{10}$	$8,52 \times 10^{10}$	$5,42 \times 10^6$
Inoculum selon le cytomètre en flux	PCP-1 total	$2,5 \times 10^8$	-	-	-

\* : Calculé sur la base que le bioréacteur contient 200 g de sol et 250 ml de milieu liquide

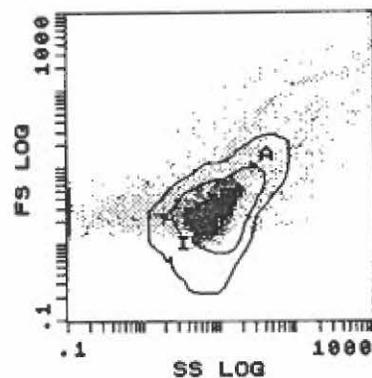


Fig. 2 : Analyse par cytométrie en flux d'une culture de *D. frappieri* souche PCP-1 ayant servi d'inoculum. Cet échantillon a préalablement été dilué (1/20) dans du tampon PBS et un volume de 20  $\mu$ l a été injecté dans le cytomètre en flux. Les valeurs de FS log représentent la grosseur des particules et les valeurs de SS log représentent leur granulosité. Les valeurs de la région A ont été utilisées pour les calculs, puisque cette région renfermait 94,5 % des événements totaux (soit 22 479 événements).

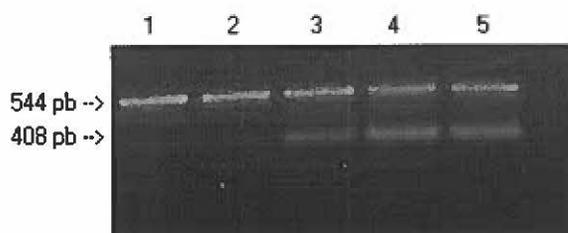


Fig. 3 : Quantification par PCR de l'ADN de *D. frappieri* PCP-1 extrait à partir d'un échantillon de phase liquide prélevé au treizième jour dans le bioréacteur contaminé par 750 mg de PCP/kg de sol et agité pendant 1 heure par jour (1 rot./min) lors de l'expérience portant sur l'effet de l'agitation sur la biodégradation du PCP. Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,7 % et colorés avec une solution de bromure d'éthidium 0.5 µg/ml. Les puits 1 à 5 contiennent respectivement les échantillons amplifiés avec  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  copies de standard interne et 1 µl d'ADN extrait.

bactéries PCP-1 en phase de croissance logarithmique. L'énumération bactérienne sur milieu solide a permis de quantifier la population de la culture à  $1,16 \times 10^9$  CFU/ml, alors que la cytométrie en flux a quantifié la même population à  $8,45 \times 10^6$  bactéries PCP-1/ml, soit une valeur environ 137 fois inférieure.

## 2.2 Effet de l'agitation sur la dégradation du PCP

Le but de cette expérience consistait à déterminer si une agitation continue des différents bioréacteurs avait un impact sur la dégradation du PCP et sur la survie de la souche PCP-1 comparativement à une agitation d'une heure par jour. Les résultats portant sur la biodégradation du PCP total (phases solide et liquide) sont présentés à la figure 4 pour les bioréacteurs contenant 100 mg de PCP/kg de sol humide et à la figure 5 pour les bioréacteurs contaminés par 750 mg de PCP/kg de sol humide. La disparition complète du PCP a été observée en moins de 7 jours pour la première série de bioréacteursensemencés avec la souche PCP-1, qu'ils soient agités de manière continue ou non. Aucune dégradation du PCP n'a été observée pour les bioréacteurs abiotiques et une très faible dégradation a été observée pour les bioréacteurs contaminés par 750 mg PCP/kg de sol, malgré les fluctuations observées lors des analyses. À aucun moment, le PCP ou ses intermédiaires de dégradation n'ont été détectés à plus de 5 mg/l dans la phase liquide. Du 3,4,5-TCP, du 2,4-DCP et du 3-MCP ont été détectés dans les bioréacteurs contaminés avec 100 mg de PCP/kg de sol et inoculés avec la souche PCP-1, alors que des traces de 3,4,5-TCP, de 2,4,6-TCP, de 3,5-DCP et de 2,4-DCP ont été détectés dans les bioréacteurs contaminés par 750 mg de PCP/kg de sol et inoculés avec la souche PCP-1. Du 3-MCP (quantité totale) a été détecté aux jours 0 (0,434  $\mu\text{mol}$ ), 7 (20,99  $\mu\text{mol}$ ), 13 (8,63  $\mu\text{mol}$ ) et 21 (5,95  $\mu\text{mol}$ ) dans le bioréacteur contaminé par 100 mg de PCP/kg de sol et agité 1 heure par jour. Dans le cas du bioréacteur contaminé par la même dose de PCP, mais agité de manière continue, du 3-MCP a également été détecté aux jours 7 (45,62  $\mu\text{mol}$ ), 13 (41,18  $\mu\text{mol}$ ) et 21 (18,69  $\mu\text{mol}$ ), suggérant une meilleure efficacité de la déshalogénéation des chlorophénols. Des rendements d'extraction variant entre environ 55 et 80 % ont été obtenus par rapport à la quantité de PCP additionnée au jour 0.

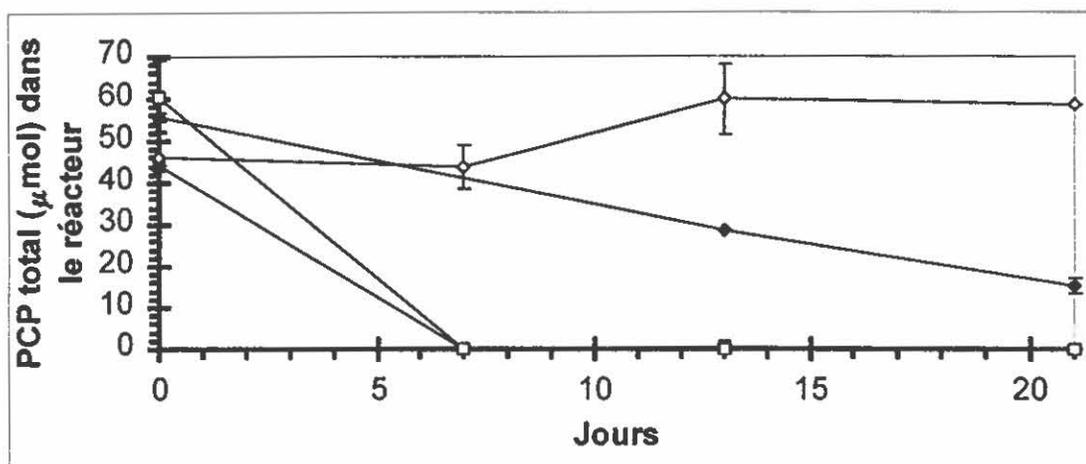


Fig. 4 : Effet de l'agitation sur la dégradation du PCP en bioréacteur rotatif contenant du sol MS1 contaminé par 100 mg PCP/kg de sol humide. Bioréacteurs agités de manière continue (symboles à l'intérieur noir) ou pendant 1 heure par jour (symboles à l'intérieur blanc). Bioréacteurs abiotiques ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ) ou ensemencés avec  $10^6$  bactéries PCP-1/ml ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ). Le PCP total représente la sommation du PCP extrait à partir des analyses effectuées sur des échantillons de sol et de liquide.

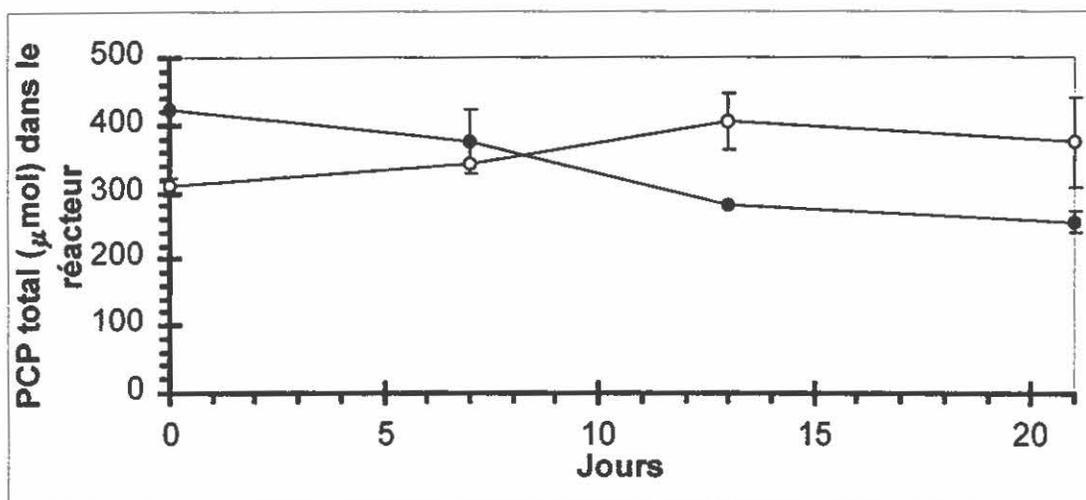


Fig. 5 : Effet de l'agitation sur la dégradation du PCP en bioréacteur rotatif contenant du sol MS1 contaminé par 750 mg PCP/kg de sol humide. Bioréacteurs agités de manière continue (●) ou pendant 1 heure par jour (○). Les bioréacteurs ont été ensemencés avec  $10^6$  bactéries PCP-1/ml. Le PCP total représente la sommation du PCP extrait à partir des analyses effectuées sur des échantillons de sol et de liquide.

En ce qui concerne les analyses par PCR, les résultats sont présentés au tableau 7. Généralement, un signal a été obtenu suite à l'amplification de l'ADN par les amorces universelles avec tous les échantillons. Généralement, un signal a été obtenu suite à l'amplification avec les amorces spécifiques à *D. frappieri* pour les échantillons provenant des bioréacteurs inoculés avec la souche PCP-1 et contaminés par 100 mg de PCP/kg de sol. En ce qui concerne les bioréacteurs inoculés avec la souche PCP-1 et contaminés par 750 mg de PCP/kg de sol, un signal pour *D. frappieri* a été généralement obtenu au jour 0 et 3, et aucun signal n'a été obtenu par la suite dans ces bioréacteurs (sauf un signal faible au jour 13 dans le bioréacteur agité de manière continue). Aucun signal de PCR n'a été obtenu avec les amorces spécifiques à *D. frappieri* dans les bioréacteurs abiotiques.

Dans le cas des analyses de PCR quantitatif (voir tableau 8), les populations de bactéries PCP-1 restent plutôt stables pour les bioréacteurs contaminés par 100 mg PCP/kg de sol. En effet, la population de bactéries PCP-1 dans la phase solide du bioréacteur agitée de manière continue est passée de  $7,33 \times 10^7$  à  $1,37 \times 10^8$  bactéries PCP-1/g en 13 jours, alors que dans la phase liquide de ce bioréacteur, la population de bactéries PCP-1 est passée de  $1,64 \times 10^8$  à  $7,49 \times 10^8$  bactéries PCP-1/ml au cours de ce même intervalle de temps. La population totale de bactéries PCP-1 de ce bioréacteur a donc légèrement augmentée au cours des 13 jours d'incubation et est passée de  $5,57 \times 10^{10}$  à  $2,15 \times 10^{11}$  bactéries PCP-1. La population de bactéries PCP-1 du bioréacteur agité 1 heure par jour est passée de  $3,07 \times 10^7$  à  $2,12 \times 10^8$  bactéries PCP-1/g en 13 jours, alors que dans la phase liquide la population est passée de  $7,24 \times 10^7$  à  $8,20 \times 10^7$  bactéries PCP-1/ml. La population totale de bactéries PCP-1 dans ce réacteur est donc restée stable, passant de  $2,12 \times 10^{10}$  à  $6,28 \times 10^{10}$  bactéries PCP-1 au cours de ces 13 jours.

Tableau 7 : Suivi par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol MS1 contaminé par différentes doses de PCP lors d'une expérience visant à déterminer l'effet de l'agitation sur la biodégradation du PCP

Réacteur Agitation	PCP (mg/kg sol humide)	Phase	T = 0		T = 3		T = 7		T = 13		T = 21	
			Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>
Abiotique Continue	100	Solide	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
		Liquide	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
PCP-1 Continue	100	Solide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Liquide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCP-1 Continue	750	Solide	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
		Liquide	+	+	+	+	+	-	+	f	+	-
Abiotique 1h/jr	100	Solide	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
		Liquide	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
PCP-1 1h/jr	100	Solide	+	+	+	+	+	-	+	+	+	f
		Liquide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f
PCP-1 1h/jr	750	Solide	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
		Liquide	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-

Univ. : amorces universelles ; *frapp.* : amorces *D. frappieri* ; f : faible

Tableau 8 : Suivi par PCR quantitatif de la population de bactéries PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol MS1 contaminé par 100 mg PCP/kg de sol humide lors d'une expérience visant à déterminer l'effet de l'agitation sur la biodégradation du PCP

Agitation	Phase	PCP-1	Jour 0	Jour 13
Continue	Solide	PCP-1/g	$7,33 \times 10^7$ /g	$1,37 \times 10^8$ /g
		PCP-1 total	$1,47 \times 10^{10}$	$2,74 \times 10^{10}$
	Liquide	PCP-1/ml	$1,64 \times 10^8$ /ml	$7,49 \times 10^8$ /ml
		PCP-1 total	$4,10 \times 10^{10}$	$1,87 \times 10^{11}$
	Solide et liquide	PCP-1 total	$5,57 \times 10^{10}$	$2,15 \times 10^{11}$
	1 heure/jour	Solide	PCP-1/g	$3,07 \times 10^7$ /g
PCP-1 total			$6,14 \times 10^9$	$4,24 \times 10^{10}$
Liquide		PCP-1/ml	$7,24 \times 10^7$ /ml	$8,20 \times 10^7$ /ml
		PCP-1 total	$1,81 \times 10^{10}$	$2,05 \times 10^{10}$
Solide et liquide		PCP-1 total	$2,12 \times 10^{10}$	$6,28 \times 10^{10}$
		Inoculum selon le cytomètre en flux	PCP-1 total	$2,5 \times 10^8$
	Inoculum selon l'ensemencement sur milieu solide	PCP-1 total	$3,18 \times 10^9$	

Des différences ont été observées au niveau de la quantité de bactéries totales inoculées selon la méthode d'énumération bactérienne utilisée, soit la cytométrie en flux ( $2,5 \times 10^8$  bactéries PCP-1 pour l'inoculum) et l'étalement sur milieu solide ( $3,18 \times 10^9$  CFU pour l'inoculum). Par contre, les quantités de bactéries *D. frappieri* détectées par la technique de PCR quantitatif au jour 0 sont de  $5,57 \times 10^{10}$  et  $2,12 \times 10^{10}$  bactéries PCP-1. Les résultats obtenus par PCR quantitatif démontrent donc une surestimation d'environ 7 fois par rapport au compte bactérien sur milieu solide, alors que le résultat obtenu par cytométrie en flux démontre une sous-estimation d'environ 13 fois par rapport à ce même compte bactérien.

### 2.3 Effet de la taille de l'inoculum de bactéries PCP-1 sur la dégradation du PCP

Cette expérience avait pour but de déterminer l'impact de la taille de l'inoculum de bactéries PCP-1 inoculées au jour 0 sur la vitesse de dégradation du PCP dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol MS1. Les résultats obtenus suite aux analyses chimiques sont présentés à la figure 6. La disparition complète du PCP a été observée en moins de 7 jours pour trois des quatre bioréacteurs, soit le bioréacteur non inoculé et les deux bioréacteurs inoculés avec la souche PCP-1. La dégradation très rapide du PCP et des écarts importants obtenus dans la quantité de PCP mesurée au jour 3 n'ont pas permis de déterminer des vitesses de dégradation du PCP au cours de cette expérience. Pour le bioréacteur abiotique, une faible récupération du PCP a été observée au jour 3 et la quantité de PCP obtenue est demeurée constante pour les autres analyses (jour 7 et 9). Une récupération d'environ 70 % du PCP a été obtenue au jour 0 par rapport à la quantité de PCP ajouté. À aucun moment le PCP ou ses intermédiaires de dégradation n'ont été détectés à plus de 5 mg/l dans la phase liquide. Les intermédiaires de dégradation retrouvés sont le 3-MCP, le 3,5-DCP, le 2,4,6-TCP et le 3,4,5-TCP dans les bioréacteurs inoculés avec la souche PCP-1 et le bioréacteur non inoculé. Aucun intermédiaire de dégradation n'a été détecté dans le bioréacteur abiotique. Des quantités de 3-MCP de

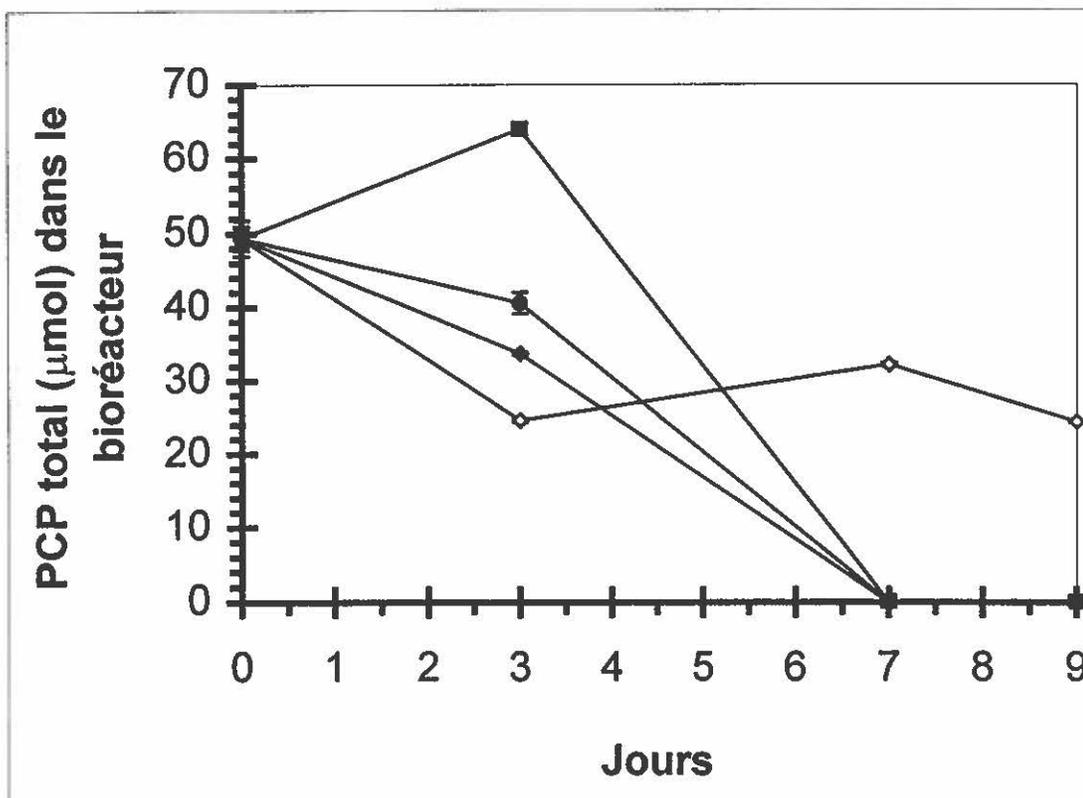


Fig. 6 : Effet de la taille de l'inoculum de bactéries PCP-1 sur la dégradation du PCP en bioréacteur rotatif contenant du sol MS1 contaminé par 105 mg PCP/kg sol sec. Réacteur non inoculé (■) ou réacteur inoculé avec 10<sup>4</sup> bactéries PCP-1/ml (◆) ou 10<sup>7</sup> bactéries PCP-1/ml (●) ; Réacteur abiotique (◇). Le PCP total représente la sommation du PCP extrait à partir des analyses effectuées sur des échantillons de sol et de liquide.

10,0  $\mu\text{mol}$  et de 16,5  $\mu\text{mol}$  aux jours 7 et 9 respectivement, ont été détectées dans le bioréacteur non inoculé. Des quantités de 3-MCP de l'ordre de 8,5  $\mu\text{mol}$  et de 15,3  $\mu\text{mol}$  ont été détectées aux jours 7 et 9 respectivement dans le bioréacteur inoculé avec  $10^4$  bactéries PCP-1/ml, alors que des quantités de 3,9  $\mu\text{mol}$  et de 15,9  $\mu\text{mol}$  ont été détectées aux jours 7 et 9 respectivement dans le bioréacteur inoculé avec  $10^7$  bactéries PCP-1/ml.

Les résultats obtenus suite aux analyses par PCR sont présentés au tableau 9. Généralement, l'amplification de l'ADN extrait à partir des divers échantillons a été possible avec les amorces universelles. Toutefois, en ce qui concerne l'amplification avec les amorces spécifiques à *D. frappieri*, l'amplification a été possible au jour 0 avec le bioréacteur inoculé avec  $10^7$  bactéries PCP-1/ml et au jour 7 avec les bioréacteurs non inoculé et inoculés avec la souche PCP-1. Malheureusement, aucun résultat n'a été obtenu pour la phase liquide, car le pH trop acide de la solution de PVPP nouvellement préparée et utilisée lors de cette extraction a entraîné la dégradation de l'ADN

#### 2.4 Essai de biodégradation du PCP avec le sol TS

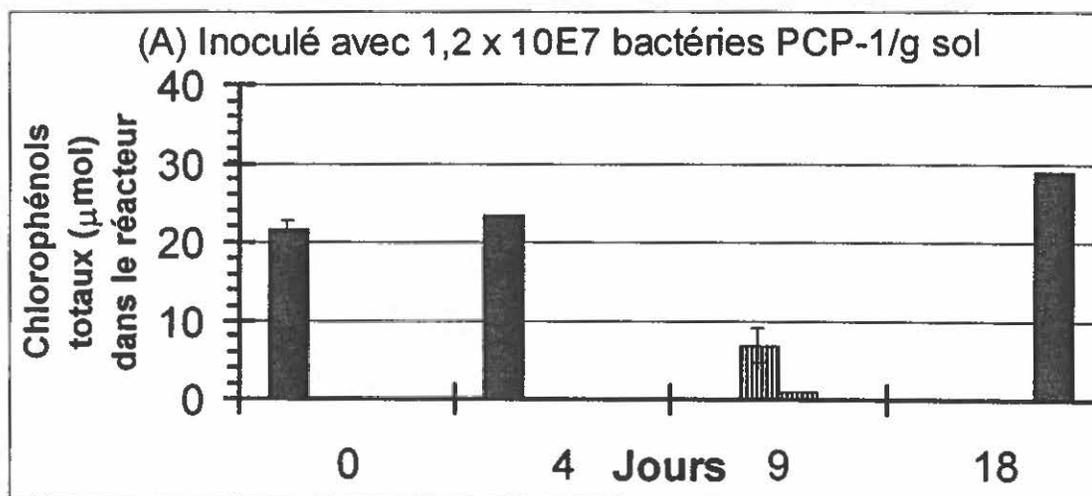
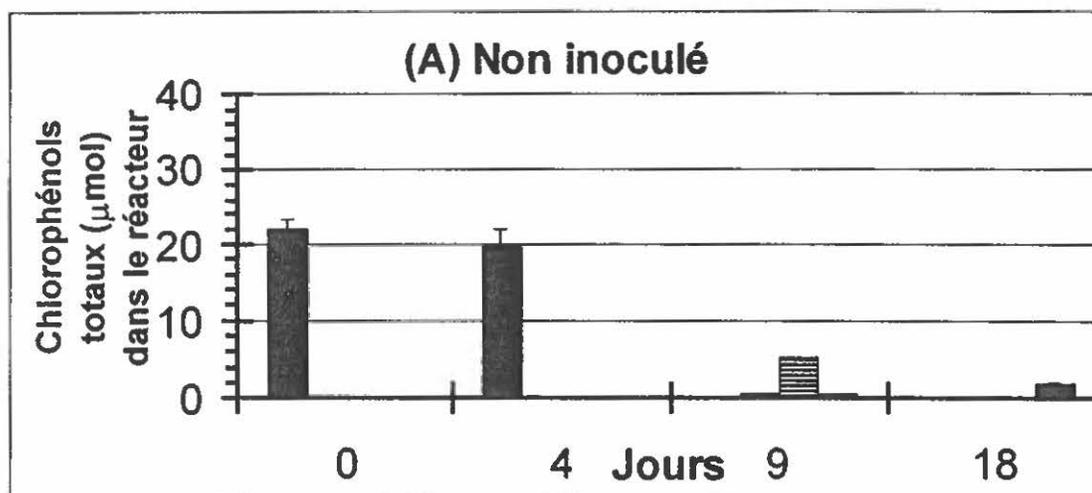
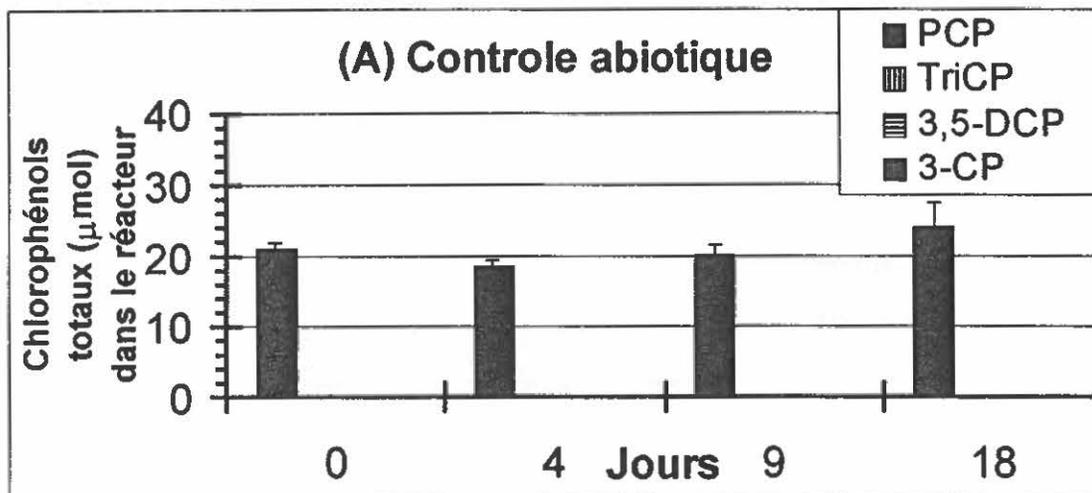
Cet essai a été effectué avec le sol TS contaminé par environ 189 mg de PCP/kg de sol sec et vieilli pendant 40 jours à 4°C. Un sol vieilli correspond à un sol ayant été en contact longtemps avec un contaminant, ce qui favorise l'adsorption des contaminants. La température de vieillissement de 4°C a été retenue afin de mimer les conditions climatiques pouvant être retrouvées à l'extérieur dans des endroits tempérés et également afin d'inhiber l'activité de dégradation de la flore indigène. Deux volumes de milieu liquide ont été utilisés, soit 25 ml et 250 ml. Les résultats obtenus suite aux analyses chimiques sont présentés à la figure 7. En ce qui concerne la série de bioréacteurs contenant 250 ml de milieu liquide, le PCP est disparu en moins de 9 jours pour le bioréacteur inoculé avec  $1,2 \times 10^7$  bactéries PCP-1/g de sol humide et également dans le bioréacteur non inoculé. Les deux intermédiaires de dégradation qui ont été détectés sont

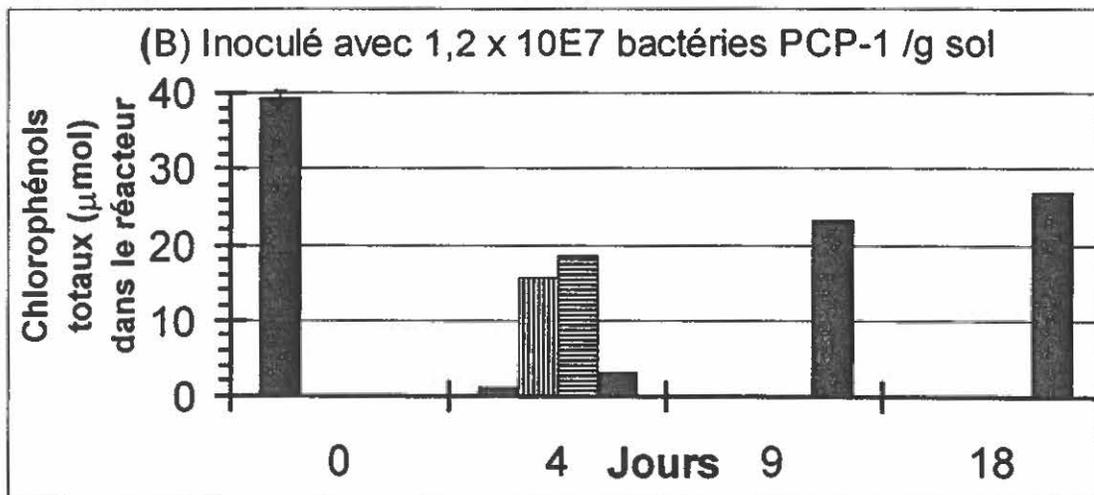
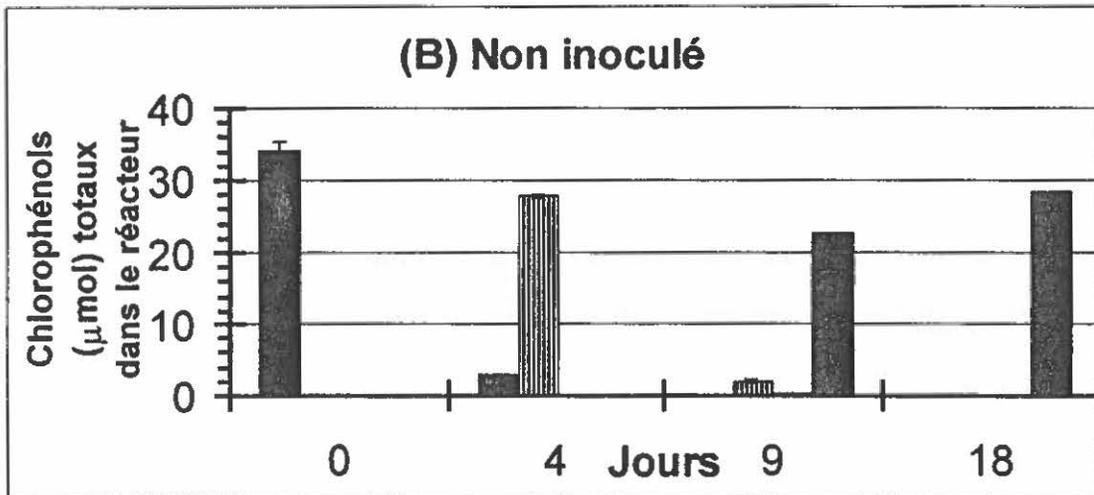
Tableau 9 : Détection par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol MS1 contaminé par 100 mg PCP/kg de sol sec lors d'une expérience visant à déterminer l'effet de la taille de l'inoculum de bactéries PCP-1 sur la dégradation du PCP

Bioréacteur	Phase	Jour 0		Jour 7	
		Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>
Abiotique	Solide	+	-	-	-
Non inoculé	Solide	+	-	+	+
10 <sup>4</sup> PCP-1/ml	Solide	+	-	+	+
10 <sup>7</sup> PCP-1/ml	Solide	+	+	+	+

Univ. : amorces universelles ; *frapp.* : amorces *D. frappieri*

Fig. 7 : Déshalogénéation du PCP dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol TS contaminé par environ 189 mg PCP/kg sol sec et vieilli pendant 40 jours. Les bioréacteurs de la série (A) contenaient 250 ml de milieu de culture liquide alors que ceux de la série (B) contenaient 25 ml du même milieu. Chaque valeur représente la sommation des chlorophénols extrait à partir des analyses effectuées sur des échantillons de sol et de liquide.





le 3,5-DCP et le 3-MCP. La biodégradation du PCP dans le bioréacteur non inoculé et le bioréacteur inoculé avec la souche PCP-1 s'est donc effectué à une vitesse semblable. Aucune dégradation n'a été observée dans le bioréacteur abiotique. Dans le cas des bioréacteurs de la seconde série, c'est-à-dire contenant 25 ml de milieu liquide, la dégradation du PCP a également eu lieu, mais plus rapidement. En effet, au quatrième jour le PCP est presque déjà complètement disparu dans le bioréacteur inoculé avec la souche PCP-1 et également dans le bioréacteur non inoculé. De plus, certains intermédiaires de la dégradation du PCP ont été détectés, dont du 3,4,5-TCP, du 2,4,6-TCP, du 3,5-DCP et du 3-MCP, ces deux derniers étant retrouvés seulement dans le bioréacteur inoculé avec la souche PCP-1. La dégradation du PCP s'effectue donc légèrement plus rapidement dans le bioréacteur inoculé avec la souche PCP-1 dans les bioréacteurs de cette série. Enfin, le 3-MCP, un intermédiaire qui n'est pas déshalogéné par la souche PCP-1, a fortement diminué dans le bioréacteur non inoculé contenant 250 ml de milieu, suggérant qu'il aurait été dégradé. C'est le seul bioréacteur où la quantité de 3-MCP récupéré au jour 18 est beaucoup plus faible que la quantité de PCP mesurée au jour 0. À aucun moment le PCP ou ses intermédiaires de dégradation n'ont été détectés à plus de 5 mg/l dans la phase liquide dans tous les bioréacteurs. Le rendement des extractions au cours de cette expérience est d'environ 50 % par rapport à la quantité de PCP ajouté au départ.

Afin d'obtenir de meilleurs rendements d'extraction des chlorophénols, la technique d'extraction au soxhlet a été utilisée à partir de quelques échantillons de phase solide. Les rendements d'extraction obtenus (résultats non présentés) grâce à cette technique étaient toutefois comparables aux rendements obtenus avec la technique d'extraction habituelle, soit environ 50 %.

En ce qui concerne les analyses par PCR (tableau 10), un signal avec les amorces universelles a généralement été obtenu avec tous les échantillons, sauf pour plusieurs des

Tableau 10 : Détection par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol TS contaminé par environ 189 mg PCP/kg de sol sec

Réacteur Volume de milieu	Phase	Jour 0		Jour 9		Jour 18		Jour 25	
		Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>
Abiotique 250 ml	Solide	+	-	f	-	+	-	+	-
	Liquide	f	-	-	-	-	-	-	-
Non inoculé 25 ml	Solide	+	-	+	+	+	f	+	+
Non inoculé 250 ml	Solide	+	-	+	+	+	f	+	-
	Liquide	f	-	-	-	-	-	-	-
PCP-1 25 ml	Solide	+	f	+	f	+	f	f	-
PCP-1 250 ml	Solide	+	+	+	+	+	f	f	-
	Liquide	f	f	+	+	-	-	-	-

Univ. : amorces universelles ; *frapp.* : amorces *D. frappieri* ; f : faible

échantillons provenant de la phase liquide des bioréacteurs abiotiques et du bioréacteur non ensemencé contenant 250 ml de milieu liquide. Généralement, un signal a été obtenu avec les amorces spécifiques à *D. frappieri* dans les bioréacteurs inoculés avec cette bactérie, ainsi que dans les bioréacteurs non inoculés au jour 9. Aux jours 18 et 25, un signal pour *D. frappieri* a généralement été obtenu (phase solide). Toutefois, plusieurs des échantillons étaient de couleur jaunâtre, suggérant la présence d'une forte concentration en acides humiques, des inhibiteurs de la polymérase *Taq*.

## 2.5 Essais de biodégradation du PCP avec le sol RIM

Le sol RIM utilisé ici est de type sablonneux et provient d'un site industriel faiblement contaminé par le PCP. Du PCP a donc été ajouté dans les bioréacteurs afin d'augmenter la dose de PCP dans ce sol à environ 224 mg PCP/kg de sol. Les résultats obtenus suite aux analyses chimiques sont présentés à la figure 8. Aucune dégradation du PCP n'a été observée dans ces bioréacteurs. Également, la majorité du PCP (plus de 100 mg/l) se situe dans la phase liquide pour les trois bioréacteurs. Le rendement des extractions chimiques du PCP était supérieur à 95 % par rapport à la quantité de PCP ajoutée au jour 0.

Les analyses de PCR effectuées au cours de cette expérience (voir tableau 11) ont permis d'amplifier l'ADN extrait avec des amorces universelles dans tous les cas. Par contre, un signal avec les amorces spécifiques à *D. frappieri* n'a été obtenu que dans les échantillons de phase liquide prélevés aux jours 0 et 7 dans le bioréacteur inoculé avec la souche PCP-1. Aucun signal n'a été obtenu pour les échantillons de la phase solide et liquide aux jours 14 et 21.

Fig. 8 : Biodégradation du PCP dans des bioréacteurs contenant du sol RIM contaminé par environ 224 mg PCP/kg sol sec. (A) Bioréacteur abiotique, (B) bioréacteur non inoculé et (C) bioréacteur inoculé avec  $10^7$  bactéries PCP-1/ml. (■) mg PCP/kg sol sec et (□) mg PCP/l.

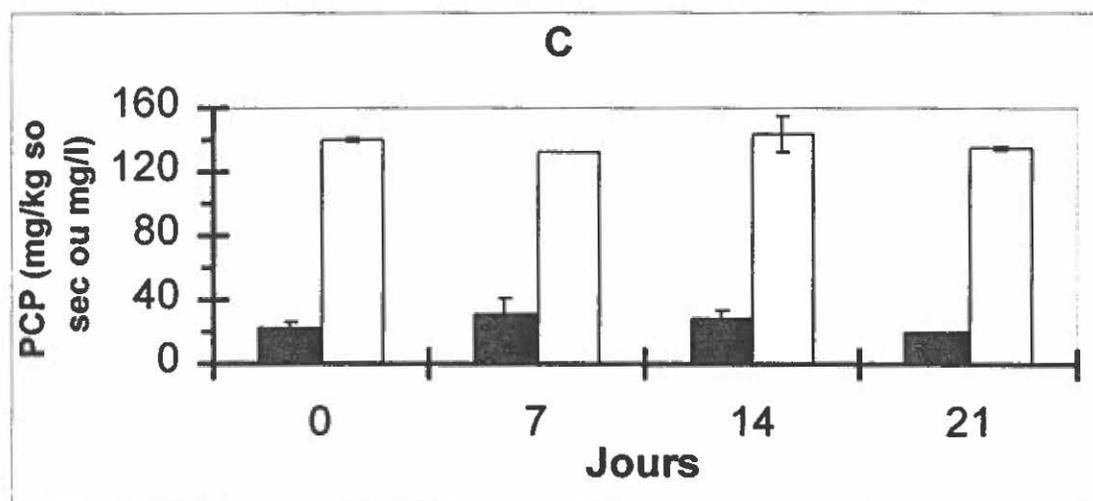
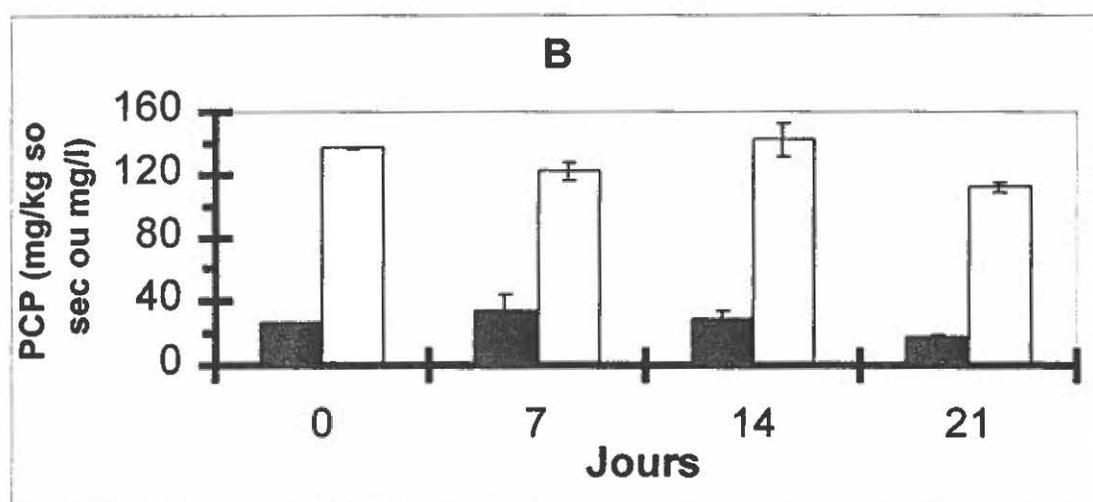
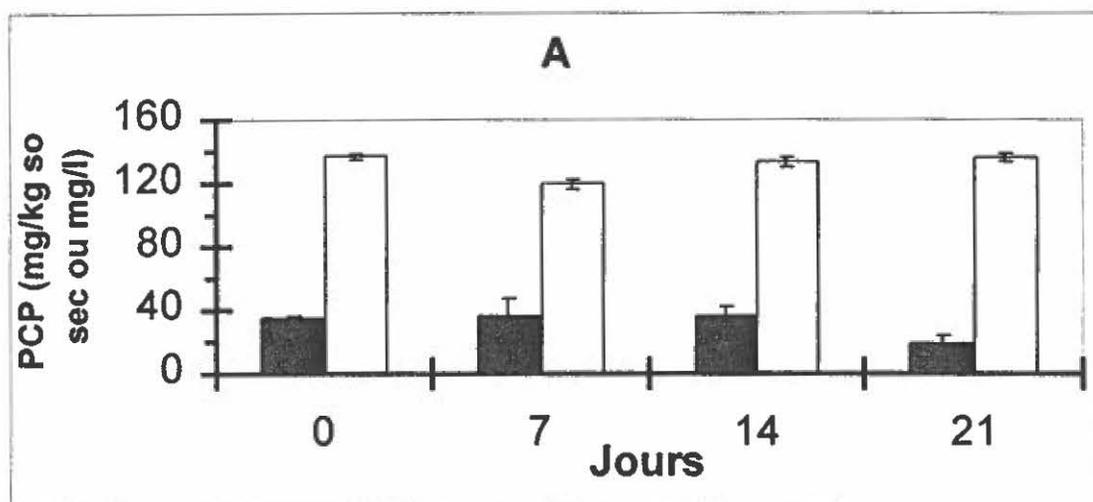


Tableau 11 : Détection par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol RIM contaminé par environ 224 mg PCP/kg de sol sec

Réacteur	Phase	Jour 0		Jour 7		Jour 14		Jour 21	
		Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>
Abiotique	Solide	+	-	+	-	+	-	+	-
	Liquide	+	-	+	-	+	-	+	-
Non inoculé	Solide	+	-	+	-	+	-	+	-
	Liquide	+	-	+	-	+	-	+	-
PCP-1	Solide	+	-	+	-	+	-	+	-
	Liquide	+	+	+	+	+	-	+	-

Univ. : amorces universelles ; *frapp.* : amorces *D. frappieri*

## 2.6 Essai de biodégradation du PCP avec le sol ITB

Un essai de dégradation du PCP a été effectué dans un sol fortement contaminé par du PCP et du crésote, soit un sol provenant d'un site de traitement du bois. Comme le sol provenant de ce site contenait de fortes concentrations en crésote et PCP et que ces concentrations risquaient d'être toxiques pour la souche PCP-1, divers mélanges de sol ITB avec le sol MS2 (non contaminé) ont été effectués (rapports de 1:0, 1:1 et 1:5 de sol ITB et MS2). Les résultats obtenus suite aux analyses chimiques sont présentés à la figure 9. Aucune dégradation du PCP n'a été observée dans les différents bioréacteurs, même ceux contenant du sol ITB mélangé avec le sol MS2 selon le rapport 1:5 et inoculé avec la souche PCP-1. À aucun moment le PCP n'a été détecté à plus de 5 mg/l dans la phase liquide. Il est à noter que dans certains cas, de grandes variations ont été observées au niveau des concentrations de PCP récupérées au cours de ces essais. Les rendements d'extraction obtenus au jour 0 par rapport à la quantité de PCP ajoutée étaient d'environ 75 %, sauf pour le bioréacteur contenant 100 % de sol ITB où un rendement d'environ 50 % a été obtenu. Pour le bioréacteur non inoculé contenant un rapport de 1:5 de sol ITB et de sol MS2, le rendement d'extraction a été d'environ 99 %.

En ce qui concerne les analyses de biologie moléculaire (tableau 12), l'amplification d'ADN avec les amorces universelles a été possible avec tous les échantillons. Toutefois, l'amplification de l'ADN extrait avec les amorces spécifiques à *D. frappieri* n'a été possible que dans les bioréacteurs inoculés avec cette souche et aucun signal n'a été observé après 8 jours d'incubation. Malheureusement, aucun résultat n'a été obtenu pour la phase liquide, car le pH trop acide de la solution de PVPP nouvellement préparée et utilisée lors de cette extraction a entraîné la dégradation de l'ADN

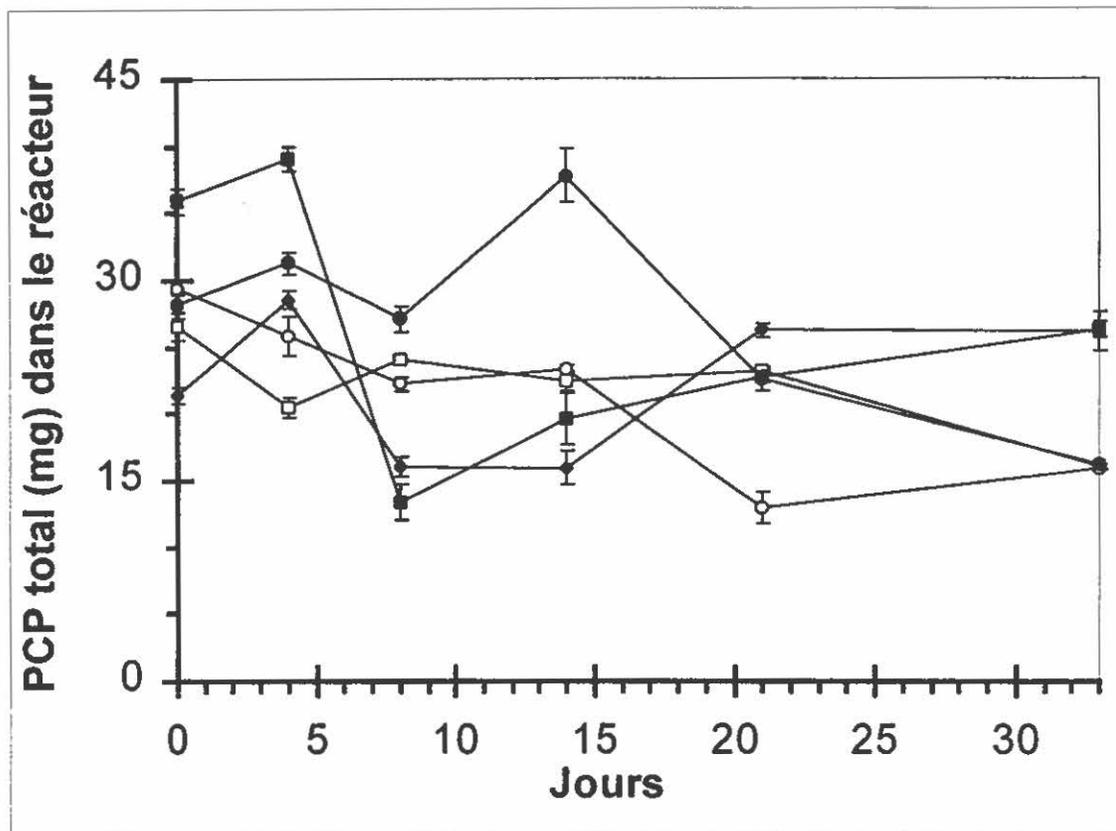


Fig. 9 : Biodégradation du PCP dans des bioréacteurs contaminés par environ 180 mg PCP/kg sol sec et contenant du sol ITB ou un mélange de sol ITB et MS2. Le bioréacteur abiotique (□) et le bioréacteur non inoculé (■) contenaient 17 % de sol ITB et 83 % de sol MS (1:5). Les réacteurs inoculés avec  $10^7$  bactéries PCP-1/ml contenaient 17 % de sol ITB et 83 % de sol MS (1:5) (○), 50 % de sol ITB et 50 % de sol MS (1:1) (●), ou 100 % de sol ITB (◆).

Tableau 12 : Détection par PCR de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant un mélange de sol ITB (contaminé au PCP et au créosote) et MS2 (non contaminé) dont la concentration en PCP a été ajustée à environ 180 mg PCP/kg de sol sec

Réacteur Rapport ITB:MS2	Phase	Jour 0		Jour 4		Jour 8		Jour 14		Jour 21	
		Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>	Univ.	<i>frapp.</i>
Abiotique 1:5	Solide	+	-	+	-	f	-	+	-	+	-
Non inoculé 1:5	Solide	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
PCP-1 1:0	Solide	+	+	+	+	+	f	+	-	+	-
PCP-1 1:1	Solide	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
PCP-1 1:5	Solide	+	+	+	+	+	f	+	-	+	-

Univ. : amorces universelles ; *frapp.* : amorces *D. frappieri*

### 3.0 Recherche du genre *Desulfitobacterium* et de *D. frappieri* sp. dans différents sols

Puisque la flore indigène des sols MS1 et TS (bioréacteurs non inoculés) a réussi à dégrader presque aussi rapidement le PCP que les bioréacteurs inoculés avec la souche PCP-1, certaines expériences ont été effectuées dans le but de rechercher la présence de micro-organismes appartenant au genre *Desulfitobacterium* et à l'espèce *D. frappieri* dans différents sols après enrichissement de la flore indigène.

#### 3.1 Test des sondes moléculaires

Les amorces pA/pH, De1/De2 et 1G/4D ont été testées afin de vérifier leur efficacité et leur spécificité. Avec les conditions d'amplification utilisées, un signal a été détecté suite à l'amplification de l'ADN extrait d'une culture pure de *D. dehalogenans* avec les amorces pA/pH et De1/De2, mais pas avec les amorces 1G/4D, peu importe le volume d'ADN (25 ng/ $\mu$ l) mis dans la solution de PCR (1, 2 ou 3  $\mu$ l). De plus, un signal a également été détecté suite à l'amplification de l'ADN extrait d'une culture pure de *D. frappieri* PCP-1 amplifié avec les amorces pA/pH, De1/De2 et avec les amorces 1/G/4D, peu importe le volume d'ADN mis dans la réaction de PCR (1, 2 ou 3  $\mu$ l) (voir figure 10).

#### 3.2 Analyse des sols par PCR

Suite à l'enrichissement de la flore indigène des différents sols, l'ADN a été extrait de chacun des enrichissements et amplifié par PCR avec des amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium* et à *D. frappieri* sp. Les résultats qui ont été obtenus sont présentés aux tableaux 13 et 14. Le tableau 13 contient les réponses positives obtenues suite à l'amplification de l'ADN avec un ou les deux types d'amorces, alors que le tableau 14 présente les réponses négatives obtenues suite à l'amplification de l'ADN avec les

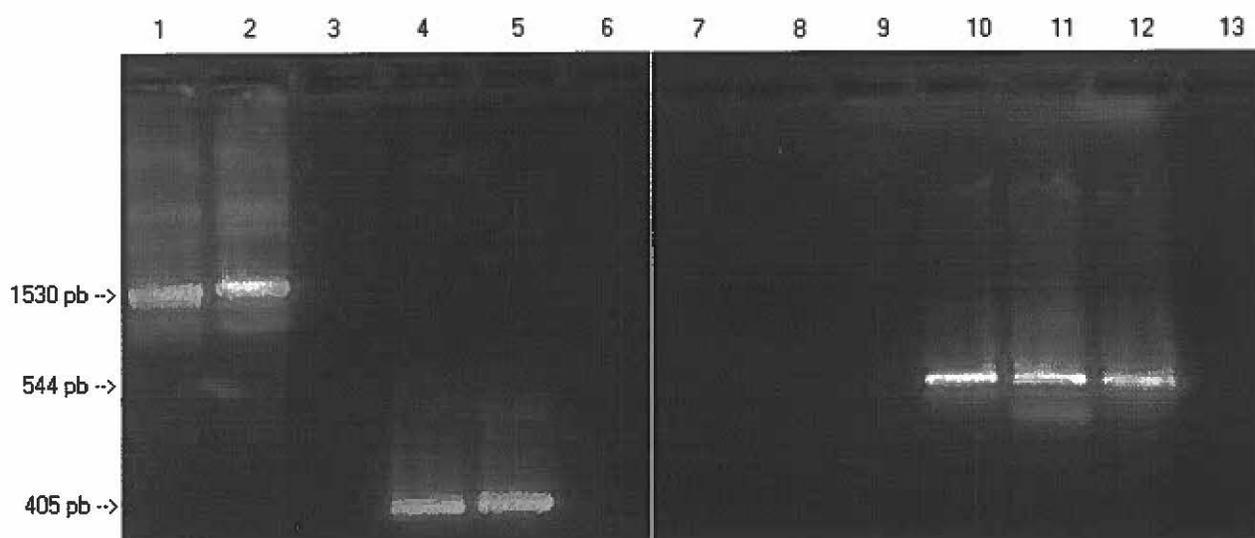


Fig. 10 : Test des amorces pA/pH, De1/De2 et 1G/4D avec de l'ADN extrait de cultures pures de *D. dehalogenans* JW/IU-DC1 (1, 4, 7, 8, 9) et de *D. frappieri* PCP-1 (2, 5, 10, 11, 12). Des volumes de 1  $\mu$ l d'ADN ont été amplifiés pour toutes les réactions, sauf celles des puits 8 et 11 (2  $\mu$ l) et des puits 9 et 12 (3  $\mu$ l). Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % et colorés avec une solution de bromure d'éthidium 0.5  $\mu$ g/ml. L'ADN extrait a été amplifié avec les amorces universelles pA/pH, des amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium* De1/De2 et des amorces spécifiques à l'espèce *D. frappieri* 1G/4D. Les puits 3, 6 et 13 contenaient les contrôles négatifs respectifs de chacun des types d'amorces.

Tableau 13 : Réponses positives obtenues suite aux essais de détection par PCR du genre *Desulfotobacterium* et de *D. frappieri* sp. à partir d'échantillons de sol dont la flore indigène anaérobie a été enrichie pendant 11 à 14 jours

Échantillon de sol		Polluant	Amorces		
			Universelles	<i>Desulfito-</i> <i>bacterium</i>	<i>D.</i> <i>frappieri</i>
Site					
Delson (Qc)	Ind. trait. bois, éch. #1	HAP, PCP	+	+	+
	Éch. #2	HAP, PCP	+	+	-
l'Assomption (Qc)	Sablière polluée	HAP, H&G	+	-	f
Laval (Qc)	Boisé (IAF)	n.d.	+	+	+
	Sol surface (TS) (IAF)	n.d.	+	-	f
	Terre à jardin	n.d.	+	+	+
	Près poteau bois (IAF)	n.d.	+	-	f
	Près poteau bois	n.d.	+	+	+
	Sédiments marais	n.d.	+	+	+
	Terre noire	n.d.	+	+	+
	Sol sablonneux (MS1)	n.d.	+	+	+
	Même sol sablonneux, 2 ans plus tard (MS2)	n.d.	+	+	+
Montréal (Qc)	Centrale électrique #1	PCP	+	+	f
St-André est (Qc)	Contrôle	n.d.	+	+	f
St-Canut (Qc)	Centrale électrique	PCP	+	+	+
Ste-Croix (Qc)	Site industriel	Phénols, métaux lourds	+	f	-
Ste-Thérèse (Qc)	Entrepôt poteaux traités PCP, éch. #1	PCP, CP	+	+	+
	Éch. #2	PCP, CP	+	+	+
Tracy (Qc)	Ind. trait. bois (ITB)	HAP, PCP	+	-	f
Val-David (Qc)	Forêt	n.d.	+	+	-

CP : chlorophénols ; HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; H&G : Huiles et graisses ; IAF : Campus de l'Institut Armand-Frappier ; n.d. : non déterminé ; PCP : Pentachlorophénol ; f : signal faible

Tableau 14 : Réponses négatives obtenues suite aux essais de détection par PCR du genre *Desulfotobacterium* et de *D. frappieri* sp. à partir d'échantillons de sol dont la flore indigène anaérobie a été enrichie pendant 11 à 14 jours

Échantillon de sol		Polluant	Amorces		
			Universelles	<i>Desulfito-</i> <i>bacterium</i>	<i>D.</i> <i>frappieri</i>
Site					
Calgary (Al)	Près poteau bois	n.d.	+	-	-
Halifax (NE)	Près poteau bois	n.d.	+	-	-
La Tuque (Q)	Site industriel	n.d.	+	-	-
	Contrôle	n.d.	+	-	-
Mascouche (Qc)	Ancien dépotoir	H&G, HAP, BTEX, AC	+	-	-
Mont-Laurier (Qc)	Ind. trait. bois	PCP	+	-	-
Montréal (Qc)	Ancienne aciérie	Phénols	+	-	-
	Centrale électrique #2	H&G, BPC	+	-	-
New Westminster (CB)	Ind. trait. bois	n.d.	+	-	-
Rimouski (Qc)	Site industriel	PCP	+	-	-
St-André-Est (Qc)	Ind. trait. bois	PCP	+	-	-
St-Bernard-de- Beauce (Qc)	Site industriel	PCB	+	-	-
Ste-Marie- Salomé (Qc)	Décharge contrôlée	BTEX, HAP, phénols, H&G	+	-	-
St-Eugène-de- Grantham (Qc)	Site industriel	H&G, métaux lourds	+	-	-

AC : Produits aliphatiques chlorés ; BPC : Biphényles polychlorés ; BTEX : Benzène, toluène, éthylbenzène, xylène ; HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; H&G : Huiles et graisses ; n.d. : non déterminé ; PCP : Pentachlorophénol

deux types d'amorces. Une carte géographique présentant les réponses obtenues pour les échantillons prélevés dans les différentes villes du Québec est présentée à la figure 11. L'ADN extrait de tous les échantillons était amplifiable, car un signal a toujours été obtenu avec les amorces universelles. Un exemple typique de gel obtenu suite à la migration d'échantillons d'ADN amplifiés avec les trois types d'amorces est présenté à la figure 12.

Tous les échantillons où ont été détectés *D. frappieri* sp. proviennent de la province de Québec et, plus spécifiquement, de la région de la vallée du St-Laurent (tableau 13). Les seuls échantillons où cette espèce n'a pas été détectée sont les échantillons les plus éloignés de la région de Montréal (le site industriel à Ste-Croix et l'échantillon prélevé en forêt près de Val-David, dans les Laurentides) et un des échantillons prélevés sur le site d'une industrie de traitement du bois à Delson. L'ADN extrait des échantillons présentés au tableau 13 a pu être amplifié avec les amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium*, sauf quelques exceptions. En fait, aucune amplification n'a été obtenue avec ces amorces dans le cas des échantillons provenant de la sablière polluée à l'Assomption, de l'industrie de traitement du bois à Tracy et deux des échantillons provenant de Laval, soit un échantillon de sol TS et un échantillon récolté près d'un poteau de bois d'Hydro-Québec sur le campus de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Toutefois, l'absence d'amplification avec les amorces spécifiques à *D. frappieri* sp. n'a pas empêché l'amplification avec les amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium*, et vice-versa.

Également, plusieurs des échantillons testés n'ont pu être amplifiés avec les deux types d'amorces (tableau 14). Pour la plupart, ces échantillons ont été prélevés à différents endroits de la province de Québec, dont la région de la Beauce, de Joliette, de Lachute, de La Tuque, de Mont-Laurier, de Montréal et de Rimouski. Aussi, trois échantillons prélevés hors de la province de Québec (Calgary, Alberta, Halifax, Nouvelle-

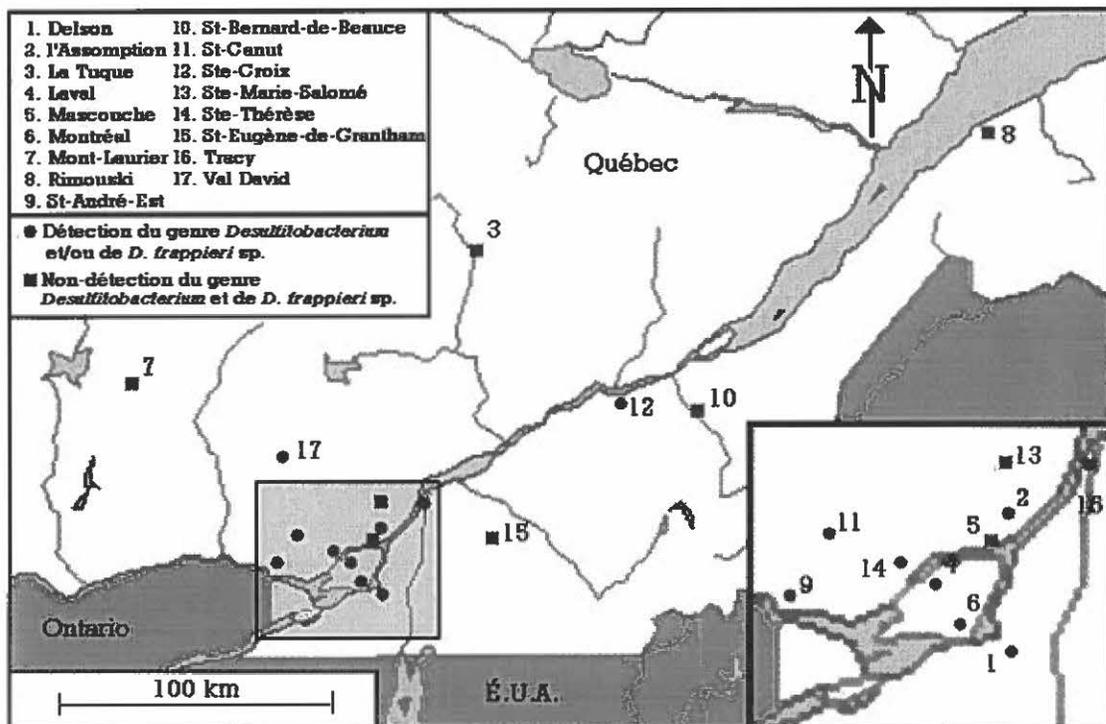


Fig. 11 : Carte géographique de la section sud de la province de Québec, Canada, présentant les villes où des échantillons de sol ont été prélevés pour la détection par PCR du genre *Desulfotobacterium* et de *D. frappieri* sp. (après enrichissement de la flore anaérobie des échantillons). Chacun des points peut représenter plus d'un échantillon. Les cercles indiquent qu'une réponse positive pour le genre *Desulfotobacterium* ou *D. frappieri* sp. a été obtenue pour au moins un des échantillons prélevés à cet endroit. Également, d'autres échantillons ont été prélevés dans trois autres provinces canadiennes.

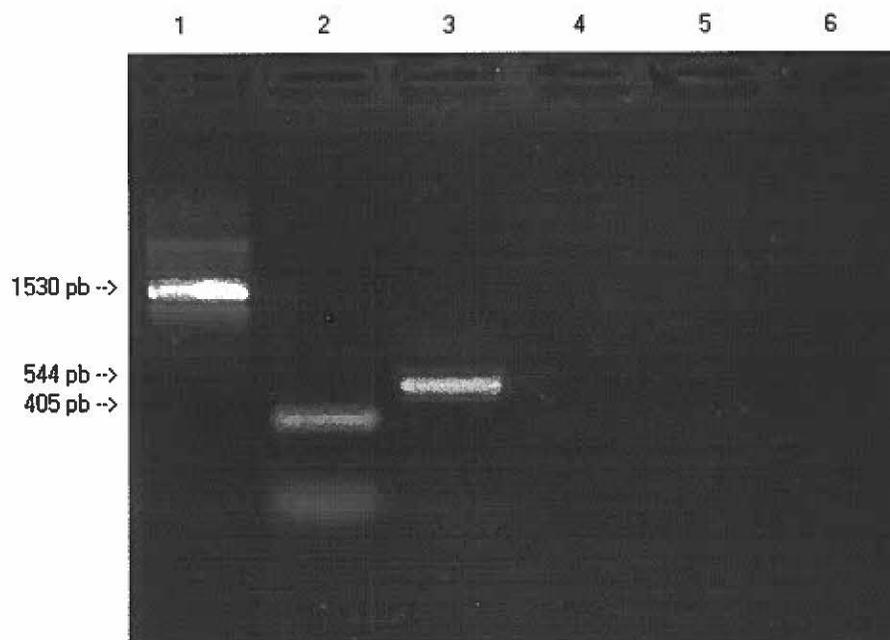


Fig. 12 : Détection par PCR du genre *Desulfitobacterium* et de *D. frappieri* sp. dans un échantillon de sol non contaminé (sol MS1) dont la flore indigène anaérobie a été enrichie. Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % et colorés avec une solution de bromure d'éthidium 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . L'ADN extrait a été amplifié avec des amorces universelles (1), des amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium* (2) et des amorces spécifiques à l'espèce *D. frappieri* (3). Les puits 4 à 6 contenaient les contrôles négatifs respectifs de chacun des types d'amorces.

Écosse et New Westminster, Colombie-Britannique) ont été testés sans qu'un signal ait été obtenu avec les amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium* et à *D. frappieri* sp.

### 3.3 Enrichissement des bactéries réductrices de sulfate

Sur les 20 sols dont la flore indigène a été enrichie avec ce milieu, un précipité noir a été formé dans 10 bouteilles, suggérant la présence de bactéries réductrices de sulfate dans ces sols, alors que chez les 10 autres bouteilles, aucun précipité noir n'a été formé en 14 jours (tableau 15). Pour 14 des sols testés, la présence ou l'absence de bactéries réductrices de sulfate coïncide avec une réponse identique au signal de PCR (amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium* et à l'espèce *D. frappieri*). Par contre, pour les 6 autres sols testés, la présence d'un signal PCR mais pas de réduction de sulfate a été observé pour 4 sols et l'inverse pour 2 sols.

### 3.4 Polymorphisme conformationnel de l'ADN simple brin

Comme un signal a été obtenu avec les amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium* et à *D. frappieri* sp. pour plusieurs des échantillons testés, une expérience de PCSB a été effectuée afin de déterminer si des souches ou espèces du genre *Desulfitobacterium* autres que *D. frappieri* sp. avaient été enrichies dans ces échantillons de sols. Le résultat est présenté à la figure 13. Plusieurs bandes sont observées au niveau des puits 1 à 8, des bandes correspondant à de l'ADN extrait d'échantillons de sol dont la flore indigène a été préalablement enrichie. Par contre, seulement quelques bandes sont observées au niveau des puits 9 et 10, correspondant à de l'ADN extrait d'une culture pure de *D. frappieri* souche PCP-1 (puits 9) et de *D. dehalogenans* souche DC1 (puits 10). Ces résultats suggèrent donc que plusieurs espèces du genre *Desulfitobacterium* ou souches de l'espèce *D. frappieri* sont présente dans ces sols.

Tableau 15 : Résultats de l'enrichissement des bactéries réductrices de sulfate chez 20 des 34 sols sur lesquels des essais de détection par PCR de l'espèce *frappieri* et du genre *Desulfitobacterium* ont été effectués parallèlement après enrichissement de la flore anaérobie

Site de prélèvement de l'échantillon de sol		Polluant	Présence d'un dépôt noir	Amplification par PCR*
Calgary (Al)	Près poteau bois	n.d.	Non	Non
Delson (Qc)	Éch. #2	HAP, PCP	Oui	Oui
Halifax (NE)	Près poteau bois	n.d.	Non	Non
La Tuque (Qc)	Site industriel	n.d.	Oui	Non
	Contrôle	n.d.	Oui	Non
Laval (Qc)	MS2	n.d.	Oui	Oui
	TS	n.d.	Oui	Oui
Mascouche (Qc)	Ancien dépotoir	H&G, HAP, BTEX, AC	Non	Non
Mont-Laurier (Qc)	Ind. trait. bois	n.d.	Non	Non
Montréal (Qc)	Ancienne aciérie	Phénols	Non	Non
	Centrale électrique #1	PCP	Non	Oui
	Centrale électrique #2	H&G, BPC	Non	Non
St-André-Est (Qc)	Ind. trait. bois	PCP	Oui	Non
	Contrôle	n.d.	Oui	Oui
St-Bernard-de-Beauce (Qc)	Stie industriel	BPC	Non	Non
St-Canut (Qc)	Centrale électrique	PCP	Oui	Oui
Ste-Croix (Qc)	Site industriel	Phénols, métaux lourds	Oui	Oui
St-Eugène-de-Grantham (Qc)	Site industriel	H&G, métaux lourds	Oui	Non
Ste-Marie-Salomé (Qc)	Décharge contrôlée	BTEX, HAP, phénols, H&G	Non	Non
Val-David (Qc)	Forêt	n.d.	Non	Oui

AC : Produits aliphatiques chlorés ; BTEX : Benzène, toluène, éthylbenzène, xylène ; BPC : Biphényles polychlorés ; HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; H&G : Huiles et graisses ; n.d. : Non déterminé ; PCP : Pentachlorophénol ; \* : Avec les amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium* ou à l'espèce *D. frappieri*

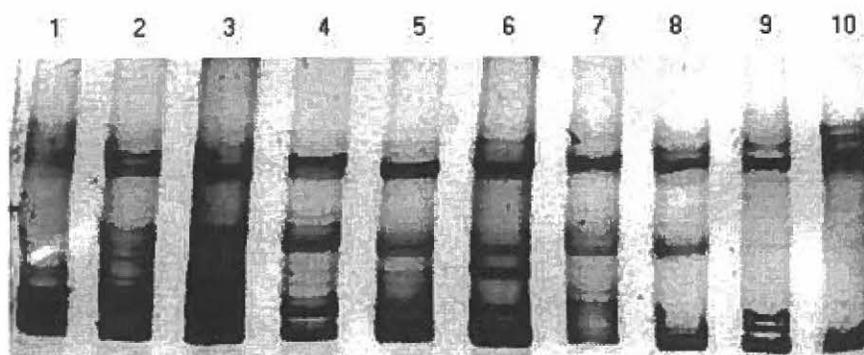


Fig. 13 : Analyse par PCSB de l'ADN extrait à partir d'échantillons de sol dont la flore indigène a été enrichie et l'ADN extrait amplifié par PCR à l'aide des amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium*. Les produits de PCR ont été dénaturés par exposition à la chaleur, puis migrés sur gel d'acrylamide 50 % et coloré au nitrate d'argent. Les échantillons de sol proviennent de Laval (terre à jardin, puits 1 ; boisé IAF, puits 2 ; sol sablonneux MS1, puits 5, sédiments de marais, puits 7 ; terre noire, puits 8), de Ste-Thérèse (site entreposage de poteaux traités au PCP, échantillon 1, puits 3 ; échantillon 2, puits 4) et de Delson (industrie de traitement du bois, échantillon 1, puits 6). Les puits 9 et 10 contiennent respectivement de l'ADN extrait à partir de cultures pures de *D. frappieri* souche PCP-1 et de *D. dehalogenans* souche DC1, respectivement, et ayant subies les mêmes manipulations que les échantillons d'ADN de sol.

## **DISCUSSION**

## 1.0 Essais en bioréacteurs rotatifs anaérobies

### 1.1 Énumération bactérienne de la souche PCP-1

Plusieurs expériences ont permis de confirmer que les valeurs de population bactérienne obtenues suite aux analyses par cytométrie en flux ne concordaient pas avec les valeurs obtenues par ensemencement sur milieu solide et par PCR quantitatif. En fait, les valeurs obtenues par PCR quantitatif d'échantillons prélevés dans les réacteurs au jour 0 étaient supérieures d'environ 1000 fois par rapport aux valeurs obtenues par cytométrie en flux à partir de l'inoculum. De plus, les résultats obtenus par la cytométrie en flux suite à l'analyse d'échantillons d'une culture de bactéries PCP-1 en phase de croissance logarithmique étaient également inférieurs (d'un facteur de 137 fois dans une expérience et d'un facteur de 13 fois dans une autre) aux résultats obtenus par énumération bactérienne sur milieu solide effectuées à partir de la même culture. La méthode d'énumération bactérienne par cytométrie en flux a donc été abandonnée et remplacée par des énumérations bactériennes sur milieu solide et également par corrélation avec les valeurs de densité optique de la culture à une longueur d'onde de 600 nm.

La sous-estimation du compte bactérien par cytométrie en flux comparativement aux ensemencements sur milieu solide suggère que la souche PCP-1 aurait tendance à former des agrégats de cellules lorsque présente à forte densité. Or, ces agrégats ne seraient comptabilisés que comme une seule cellule par le cytomètre en flux, ce qui aurait pour effet de sous-estimer le compte bactérien comparativement à l'ensemencement sur milieu solide. Thomas *et al.* (1997) avaient pourtant obtenu une bonne corrélation pour la souche PCP-1 entre les résultats de quantification par cytométrie en flux et les étalements sur milieu solide, mais avaient souligné la possibilité de sous-estimation du compte bactérien dû à la formation d'agrégats.

Une bonne corrélation a été obtenue entre les énumérations de l'inoculum obtenues par ensemencement sur milieu solide et les valeurs déterminées par la technique de PCR quantitatif à partir d'échantillons prélevés au jour 0 dans le bioréacteur après inoculation de la souche PCP-1. En fait cette dernière technique a surestimé le compte bactérien d'un facteur d'environ 7 fois comparativement au compte bactérien sur milieu solide. La surestimation du compte bactérien par PCR quantitatif a déjà été observée par Lévesque *et al.* (1998). Ils ont remarqué que les résultats obtenus avec la technique de PCR quantitatif étaient supérieurs d'environ 6 fois par rapport au compte bactérien sur milieu solide (mais ont tout de même considéré les résultats comme étant relativement semblables). Ils ont suggéré que cette surestimation pourrait être causée par la formation de molécules hétéroduplexes entre l'ADN ribosomal 16S cible et le standard interne lors du PCR. Ces molécules seraient alors résistantes à la digestion par l'enzyme *EcoRV* et, de ce fait, augmenterait la quantité d'ADN cible amplifié. Cette hypothèse a également été émise par Lee *et al.* (1996) lors de certaines expériences visant à quantifier par PCR une bactérie non-cultivable se retrouvant dans le sol. Également, Lévesque *et al.* (1998) ont suggéré que cette surestimation pourrait être causée par l'amplification de l'ADN ribosomal 16S provenant de bactéries mortes, mais cette explication semble peu plausible, puisque l'ADN est probablement dégradé très rapidement par la flore bactérienne présente dans les bioréacteurs. Il est également possible qu'une fraction de la population de bactéries PCP-1 ayant servi d'inoculum lors de cette expérience ait été viable, mais non cultivable sur milieu solide. Ce phénomène aurait donc diminué le compte bactérien sur milieu solide par rapport au nombre de bactéries détectées par PCR quantitatif. Toutefois, Johnsen *et al.* (1999) ont obtenu de bonnes corrélations (coefficient de corrélation de 0,60, correspondant à un niveau de confiance de 0,001) entre les valeurs obtenues suite à l'ensemencement sur milieu solide d'une espèce indigène de *Pseudomonas* et les valeurs obtenues par PCR quantitatif, suggérant que la précision de la technique utilisée pour la souche PCP-1 pourrait être améliorée.

Bien que les valeurs obtenues par PCR quantitatif soient légèrement supérieures aux valeurs obtenues par ensemencement sur milieu solide, cette technique a tout de même été utilisée dans les expériences subséquentes.

## 1.2 Survie de la souche PCP-1 dans les bioréacteurs contenant des sols contaminés au PCP

Les résultats obtenus ont montré que la souche PCP-1 pouvait être détectée et se maintenir sans diminution de l'intensité des bandes pendant au moins 21 jours dans des bioréacteurs rotatifs contaminés jusqu'à 500 mg de PCP/kg de sol humide. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Beudet *et al.* (1998) dans des essais effectués en microcosmes composés de 10 % de sol contenus dans des bouteilles sérologiques où la souche PCP-1 pouvait dégrader des concentrations de PCP pouvant aller jusqu'à 500 mg de PCP/kg et, par le fait même, pouvait survivre, du moins temporairement, dans de telles conditions. Toutefois, une deuxième inoculation de bactéries PCP-1 était nécessaire pour compléter la dégradation si les concentrations en PCP étaient de 300 mg de PCP/kg de sol ou plus, car la quantité de PCP dégradé dans ces microcosmes stagnait après 18 jours, suggérant une disparition de la population de bactéries PCP-1 causée par la toxicité associée au PCP. Toutefois, la plus forte teneur de sol utilisée lors de nos essais sur la survie de la souche PCP-1 a probablement favorisé une meilleure adsorption du PCP aux particules de sol et une plus faible toxicité de ce dernier.

Dans le cas du bioréacteur contaminé par 750 mg de PCP/kg de sol, les analyses par PCR quantitatif ont montré que la population de bactéries PCP-1 restait plutôt stable au cours des 7 premiers jours, puis commençait à chuter entre le septième et le douzième jour, pour finalement disparaître au jour 21. Ce résultat suggère que les concentrations de PCP utilisées sont très toxiques pour la souche PCP-1 et provoquerait son élimination du

bioréacteur. Une plus forte concentration de PCP se retrouve probablement dans la phase liquide, ce qui entraîne une plus forte toxicité pour la souche PCP-1.

Ruckdeschel *et al.* (1987) ont étudié le seuil d'inhibition de la croissance par le PCP chez différentes bactéries. Ces chercheurs ont pu déterminer que le seuil d'inhibition de la croissance variait pour les bactéries étudiées (30 souches) entre environ 8,7 mg/l et plus de 1000 mg/l, mais qu'il ne semblait pas exister de relation entre la susceptibilité des bactéries Gram positives et Gram négatives, entre les cocci et les bâtonnets et entre les aérobies et les anaérobies, laissant croire que cette susceptibilité était plutôt associée à l'espèce. Ces auteurs signalent également que les produits de dégradation peuvent jouer un rôle au niveau de la toxicité associée au PCP. La croissance de la souche PCP-1 en milieu liquide est inhibée à des doses voisines de 10 mg de PCP/l et son activité de déshalogénéation est fortement ralentie à des doses supérieures à 30 mg/l (Bouchard 1996, résultats non publiés). Ces résultats suggèrent que la présence de sol dans les bioréacteurs joue un rôle important pour la diminution de la toxicité du PCP.

### 1.3 Essais de biodégradation du PCP

#### 1.3.1 Rendements d'extraction chimique des chlorophénols

Lors des expériences effectuées en bioréacteurs, les rendements d'extraction chimique des chlorophénols ont varié selon les sols utilisés. Comme le suggèrent plusieurs auteurs (Bellin *et al.*, 1990; Lagas 1988; Schellenberg *et al.*, 1984; Klein et Scheunert, 1982; Salminen *et al.*, 1995), la quantité de matière organique présente dans chacun de ces sols est probablement en cause. En effet, ces auteurs affirment que le PCP a tendance à s'adsorber à la matière organique. Donc, plus la quantité de matière organique est élevée dans un sol et plus la quantité de PCP adsorbée sera importante. Cette hypothèse explique donc les rendements d'extraction plutôt faibles obtenus lors de

certaines expériences en bioréacteur rotatif. En effet, les sols utilisés contenant le plus de matières organiques ont généré les pourcentages d'extraction chimique des chlorophénols les plus faibles (au jour 0). Par exemple, les sols TS, ITB, MS1, MS2 et RIM possèdent des pourcentages de matière organique respectifs de 18,5 %, 12,5 %, 6,2 %, 6,2 % et 3,2 %. Or, le pourcentage d'extraction chimique des chlorophénols obtenu au jour 0 pour chacun de ces sols est d'environ 50 %, 50 à plus de 95 %, 55 à 80 %, 70 % et plus de 95 %, respectivement. Le pourcentage d'extraction chimique corrèle donc de manière grossière avec la quantité de matières organiques présente dans ces sols.

Également, certains essais d'extraction chimique effectués avec un soxhlet sur des échantillons provenant de l'expérience avec le sol TS ont donné les mêmes résultats que ceux obtenus avec la technique habituelle, suggérant que les chlorophénols étaient sorbés de manière irréversible aux particules de sol. L'incubation du sol TS en présence du PCP pendant 40 jours à 4°C pour simuler le vieillissement d'un sol contaminé a probablement favorisé l'adsorption irréversible du PCP au sol et contribué au faible rendement d'extraction. Cette possibilité est suggérée par Lagas (1988), McFarland *et al.* (1994) et Scheunert *et al.* (1995) qui ont observé que dès l'ajout de PCP dans le sol, il y avait formation de résidus inextractables et que la quantité de ces résidus augmentait avec le temps, suggérant alors qu'une partie du PCP était initialement sorbée de manière réversible, mais que cette sorption devenait irréversible avec le temps. Ce facteur a probablement aussi joué un rôle au niveau des faibles rendements d'extraction observés pour les autres sols. La formation de résidus inextractables peut avoir été causée par certains organismes vivants (dont des champignons microscopiques et des bactéries), tel que suggéré par Boyd *et al.* (1989) et McFarland *et al.* (1994).

### 1.3.2 Essais où la biodégradation du PCP a été obtenue

La biodégradation du PCP a été possible en moins de 9 jours dans les bioréacteurs contenant du sol MS1 et du sol TS contaminé jusqu'à 189 mg PCP/kg de sol et la détection d'intermédiaires de dégradation au cours de ces essais confirme qu'il y a bien eu biodégradation du PCP dans ces sols. De plus, la flore indigène de ces sols a réussi à dégrader complètement le PCP et ce, presque aussi rapidement que dans les bioréacteurs inoculés avec la souche PCP-1, suggérant que l'ajout de la souche PCP-1 dans ces sols n'est pas vraiment utile. Toutefois, lorsqu'un sol ne contient pas de micro-organismes dégradeurs Beudet *et al.* (1998) ont déjà montré que l'addition de la souche PCP-1 était nécessaire pour obtenir la dégradation du PCP.

Ces résultats recourent ceux obtenus par El Fantroussi *et al.* (1997a et b), puisque ces chercheurs ont obtenu en 15 jours la dégradation complète du 3-chlorobenzoate (2,5 mM) en microcosmes "slurry" (50 g de sol et 80 ml de milieu de culture) inoculés avec  $10^7$  bactéries *Desulfomonile tiedje*. Ces chercheurs ont également réussi à dégrader 6 mM de 3-Cl-4-OHPA en moins de 4 jours dans des microcosmes de même type, mais ensemencés avec *D. dehalogenans*. Toutefois, une activité de dégradation (dégradation complète en moins de 11 jours) par la flore indigène n'a été remarquée que chez les microcosmes contaminés par le 3-Cl-4-OHPA. Par contre, dans certains cas la taille de l'inoculum a été importante pour la biodégradation aérobie du PCP. En effet, des travaux effectués par Middeldorp *et al.* (1990) ont révélé que l'inoculation de *Rhodococcus chlorophenolicus* à 500 cellules/g de sol ne permettait pas de dégradation dans un sol tourbeux, alors que l'ajout de  $8 \times 10^4$  cellules/g de sol a permis de dégrader 15 % du PCP (630 mg PCP/kg sol) et que l'ajout de  $10^8$  cellules/g de sol a permis de dégrader 10 % du PCP (30 mg PCP/kg sol). Également, les travaux effectués par Edgehill et Finn (1983) ont permis à ces chercheurs de déterminer que des doses de  $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$  bactéries *Arthrobacter sp.* permettaient de diminuer de 90 % le PCP présent dans le sol en 100, 40 et 24 heures, respectivement. Enfin, Edgehill (1994) a déterminé que le temps nécessaire à *Arthrobacter sp.* pour dégrader de moitié le PCP présent (77 mg/ml) était dépendant de

la taille de l'inoculum, puisqu'un inoculum de  $10^6$  bactéries/g de sol a dégradé la moitié du PCP en 3 heures, alors qu'un inoculum de  $6,6 \times 10^4$  cellules/g de sol a dégradé la moitié du PCP en 19 heures et qu'un inoculum de 656 cellules/g de sol a dégradé la moitié du PCP en 42 heures.

En ce qui concerne l'effet de l'agitation sur la biodégradation du PCP, les conditions utilisées n'ont pas permis de démontrer une différence entre les taux de dégradation des bioréacteurs agités de manière continue et ceux agités pendant 1 heure par jour. L'agitation continue a été retenue pour les expériences subséquentes afin de maximiser l'homogénéisation des phases solides et liquides du bioréacteur.

La dégradation du PCP a été légèrement plus rapide dans les bioréacteurs contenant moins de milieu liquide lors de l'expérience avec le sol TS. Ceci implique donc que les bactéries responsables de la dégradation du PCP ne nécessitent pas l'ajout d'une grande quantité de milieu liquide pour être capable de dégrader le PCP. Il est également possible qu'une plus faible quantité de milieu liquide favorise le contact entre les bactéries PCP-1 et les particules de sol contaminé, accélérant alors le processus de dégradation.

La dégradation du 3-MCP est survenue dans un des bioréacteurs contenant du sol TS (bioréacteur non inoculé contenant 250 ml de milieu liquide) et aussi chez les bioréacteurs contenant du sol MS1 (inoculés avec la souche PCP-1 et non inoculés) de l'expérience sur l'effet de l'agitation. En effet, lors de cette dernière expérience, du 3-MCP a été détecté, en concentration décroissante du jour 7 au jour 21. Par contre, lors de l'expérience sur l'effet de la taille de l'inoculum (également avec le sol MS1), du 3-MCP a bien été détecté aux jours 7 et 9, mais l'expérience n'a pas duré assez longtemps pour remarquer une diminution de la concentration en 3-MCP dans les bioréacteurs. Ces

résultats suggèrent que des bactéries pouvant dégrader le 3-MCP seraient présentes parmi la flore indigène de ces sols. Des résultats semblables ont déjà été obtenus par Beaudet *et al.* (1998), qui ont remarqué une lente dégradation du 3-MCP par la flore indigène d'un sol contaminé par le PCP. Toutefois, le fait que la biodégradation du 3-MCP se soit seulement effectué dans un seul des bioréacteurs contenant du sol TS suggère que les bactéries indigènes responsables de cette activité sont fragiles et nécessitent probablement des conditions très particulières afin de pouvoir dégrader ce produit. Des repiquages en milieux nutritifs effectués à partir d'échantillons de ce bioréacteur n'ont pas permis de maintenir l'activité de dégradation, ce qui soutient cette hypothèse. Juteau *et al.* (1995a et b) ont observé que la déshalogénéation du 3-MCP était l'étape la plus lente lors de la dégradation du PCP par un consortium méthanogène. Ils ont également montré que des bactéries méthanogènes ou syntrophes étaient responsables de l'activité de dégradation du 3-MCP. Il est bien connu que les bactéries méthanogènes sont sensibles à la toxicité associée au PCP et à d'autres polluants, ce qui rend difficile la dégradation du 3-MCP dans les sols contaminés.

La survie de la souche PCP-1 dans les sols MS1 et TS est très bonne, puisque cette souche a été généralement détectée par PCR dans tout les bioréacteurs contaminés par 189 mg PCP/kg sol sec et moins où cette bactérie avait été inoculée. L'absence de signal au jour 0 pour la souche PCP-1 dans le bioréacteur inoculé avec  $1 \times 10^4$  bactéries PCP-1/ml lors de l'expérience avec le sol MS1 s'explique par le fait que la quantité de bactéries PCP-1 utilisées pour inoculer ce réacteur était sous le seuil de détection par la technique de PCR ( $4 \times 10^4$  bactéries PCP-1/g de sol) (Lévesque *et al.*, 1997). Également, la souche PCP-1 s'est maintenue à des niveaux détectables par PCR plusieurs jours après avoir terminé la dégradation du PCP, et des essais par PCR quantitatif ont démontré que la population de bactéries PCP-1 restait plutôt stable (aux environs de  $1 \times 10^{10}$  bactéries par bioréacteur) dans les bioréacteurs contaminés par 100 mg de PCP/kg de sol MS1 au cours de l'expérience sur l'effet de l'agitation ce qui confirme que cette souche s'implante facilement dans les sols MS1 et TS sous les conditions étudiées. Aussi, la faible

concentration en chlorophénols de la phase liquide dans ces bioréacteurs a sûrement facilité l'implantation rapide de la souche PCP-1. En effet, la quantité de chlorophénols dans la phase liquide chez ces bioréacteurs était généralement inférieure à 15 mg/l, suggérant que les chlorophénols étaient adsorbés aux particules de sol. Enfin, il est peu probable que l'ADN des bactéries mortes soit détecté par PCR, car ces molécules sont probablement rapidement dégradées par les autres micro-organismes présents dans le sol. Des essais effectués dans le but de déterminer le temps que l'ADN de bactéries PCP-1 autoclavées pouvait subsister dans des microcosmes (résultats non présentés) n'a pas permis d'obtenir de signal PCR pour la souche PCP-1 pour les échantillons prélevés au jour 0.

Dans le cas des bioréacteurs non inoculés avec la souche PCP-1 et contenant du sol MS1 ou du sol TS, il est étonnant qu'après quelques jours d'incubation, un signal pour l'espèce *D. frappieri* ait été obtenu par PCR. En effet, des analyses effectuées par Lévesque *et al.* (1998) n'avaient pourtant pas révélé la présence de cette souche dans le sol MS1, mais l'analyse par PCR avait été effectuée directement à partir de l'ADN extrait d'un échantillon de sol alors qu'ici, la détection s'est toujours effectuée à partir d'échantillons prélevés après au moins 7 jours d'incubation. De plus, la présence de bactéries PCP-1 dans ces bioréacteurs ne semble pas être le fruit d'une contamination, puisque toutes les solutions utilisées étaient stérilisées. Également, une contamination des bioréacteurs dans la chambre anaérobie par des spores de bactérie PCP-1 se retrouvant dans l'atmosphère est peu plausible, puisque les bioréacteurs n'étaient ouverts qu'un minimum de temps lors de leur préparation et de la prise d'échantillons. Aussi, les bioréacteurs n'étaient jamais disposés debout lorsque le bouchon était enlevé. Enfin, les amorces 1G/4D ont été conçues selon un alignement de séquences des gènes 16 S ribosomiaux de tous les membres connus du genre *Desulfitobacterium*, ceci afin d'obtenir des amorces spécifiques à *D. frappieri*. Leur spécificité a ensuite été confirmée par comparaison à des séquences de gènes 16 S ribosomiaux contenues dans des banques de données. Il semble donc peu plausible que ces amorces ne soient pas spécifiques qu'à *D.*

*frappieri*. Il est donc vraisemblable de considérer que l'espèce *D. frappieri* soit présente à l'état indigène (sous le seuil de détection de la technique de PCR) dans les sols MS1 et TS et que la présence de conditions favorables à sa croissance permette sa détection quelques jours après le début des expériences.

La dégradation du PCP observée dans les bioréacteurs non inoculés avec la souche PCP-1 pourrait avoir été causée par *D. frappieri* sp. indigène dans ces sols et/ou encore par une ou plusieurs autres bactéries de la flore indigène de ce sol. En effet, la contamination des sols par le PCP n'est pas nécessaire à la présence d'une activité de dégradation par les micro-organismes composant la flore indigène (et vice-versa). Les travaux de Kuwatsuka *et al.* (1975) ont démontré que la flore indigène anaérobie de sols non contaminés par le PCP pouvait dégrader ce produit, mais que cette dégradation s'effectuait plus lentement que si le sol avait déjà été exposé à ce produit.

L'ADN extrait à partir des échantillons prélevés des bioréacteurs contenant du sol TS a été plutôt difficile à amplifier par PCR. En effet, à plusieurs reprises, une absence de signal ou un signal de faible intensité ont été obtenus suite à l'amplification par PCR (avec les amorces universelles ou spécifiques à l'espèce *D. frappieri*) de l'ADN extrait. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le sol TS possède un pourcentage élevé en matières organiques (18,5 %), comparativement aux autres sols utilisés. Or, les substances humiques (telles les acides humiques et les acides fulviques) sont des molécules organiques présentes dans les sols et ont des caractéristiques chimiques qui favorisent leur co-extraction avec l'ADN. Les substances humiques sont reconnues pour inhiber l'enzyme *Taq* polymérase et diminuer l'efficacité d'hybridation de l'ADN, causant alors de faux-négatifs (Tsai et Olson 1992; Tebbe et Vahjen 1993). Malgré les étapes de purification de l'ADN, il est possible que des traces de ces produits soient encore présentes lors de la réaction de PCR, même si l'ADN a été préalablement dilué. La présence de telles substances dans l'ADN extrait se traduit fréquemment par une

coloration jaune, semblable à celle obtenue pour plusieurs des échantillons extraits lors de cette expérience.

Très peu d'articles scientifiques faisant état d'ADN extrait à partir de sol ou de sédiments contenant plus de 10 % de carbone organique ou de matières organiques ont été publiés. Dans le cas des travaux effectués par Ogram *et al.* (1987), les auteurs ont réussi à extraire de l'ADN à partir de sédiments contenant 16,5 % de carbone organique, mais la coloration de l'ADN extrait était brunâtre. Ces auteurs n'ont pas réussi à amplifier cet ADN par PCR. Dans le cas de Lévesque *et al.* (1997), un sol contenant de grandes quantités de matières organiques (46 %) a été utilisé afin de développer une technique d'extraction d'ADN permettant l'amplification de cet ADN par PCR. La seule différence entre le protocole utilisé par ces auteurs et le protocole décrit dans la section matériel et méthodes de ce mémoire consiste en l'utilisation par ces auteurs d'une colonne de Sephadex G-200 au lieu d'une colonne de PVPP. La technique d'extraction utilisée a effectivement permis l'extraction de l'ADN de ce sol, mais cet ADN bien que sans couleur, ne pouvait être quantifié par densité optique à cause des contaminants présents.

Peu de travaux faisant état de la détection par PCR de bactéries introduites dans des microcosmes et pouvant dégrader le PCP ont déjà été publiés. Des travaux effectués sur la détection de *Mycobacterium chlorophenolicum* souche PCP-1 (une bactérie aérobie pouvant dégrader le PCP) dans des microcosmes ont permis la quantification de cette souche avec un "most-probable-number PCR" et par immunofluorescence dans différents sols. Selon les résultats obtenus, la population de cette souche reste plutôt stable à  $10^6$  bactéries *M. chlorophenolicum* PCP-1/g de sol (même niveau que l'inoculum de départ). Toutefois, le suivi n'a été effectué que sur une courte période (14 jours), ne permettant pas de tirer de véritables conclusions sur la survie de cette souche dans le sol. De plus, seulement un des cinq sols testés était contaminé par le PCP, mais très faiblement (0,6 mg de PCP/kg de sol) (Van Elsas *et al.*, 1997).

Pour leur part, El Fantroussi *et al.* (1997a et b) rapportent le suivi par PCR de *D. dehalogenans* et de *Desulfomonile tiedjei* dans des microcosmes (50 g de sol et 80 ml de milieu de culture), ainsi que de leur capacité à dégrader dans de telles conditions du 3-Cl-4-OHPA (6 mM) ou du 3-chlorobenzoate (2,5 mM). Ces chercheurs ont réussi à détecter par PCR ces deux bactéries au cours d'expériences en microcosmes "slurry" avec une limite de détection de  $10^4$  et de  $5 \times 10^3$  cellules/g de "slurry", respectivement. L'inoculation de *D. tiedjei* ( $10^7$  bactéries /ml) a permis la dégradation du 3-chlorobenzoate en moins de 15 jours chez les microcosmes supplémentés avec de l'acétate et de l'acide formique et en moins de 30 jours chez les microcosmes n'ayant pas été supplémentés avec ces produits. Par contre, l'inoculation de *D. dehalogenans* ne faisait que diminuer le temps nécessaire à la dégradation du 3-Cl-4-OHPA comparativement aux microcosmes non inoculés, le faisant passer de 11 à 4 jours. Les travaux de Van Elsas *et al.* (1997) et de El Fantroussi *et al.* (1997a et b) n'ont pas permis de détecter les bactéries étudiées dans les sols non inoculés.

À la lumière des résultats obtenus, il semble que l'inoculation de la souche PCP-1 dans les bioréacteurs n'ait que peu d'effet comparativement à l'activité de dégradation de la flore indigène. En effet, la flore indigène des sols MS1 et TS possède une activité de dégradation du PCP, mais cela n'implique pas nécessairement qu'une telle activité de dégradation sera présente dans tous les sols à traiter. De plus, même si une telle activité de dégradation est présente dans certains sols, il est possible que les conditions ne soient pas compatibles avec les paramètres d'activité de la flore indigène et que le PCP ne soit pas dégradé. L'inoculation de ces sols avec *D. frappieri* PCP-1 offre donc des avantages étant donné sa capacité à déshalogéner le PCP jusqu'au 3-MCP, ainsi que son spectre d'activité vis-à-vis différentes substances chlorées (Dennie *et al.*, 1998). De plus, la souche PCP-1 est facilement cultivable en milieu liquide, ce qui permet la production de la biomasse nécessaire.

### 1.3.3 Essais où la biodégradation du PCP n'a pas été obtenue

Bien que la dégradation du PCP ait été effectuée avec succès dans les sols MS1 et TS, il n'en fût pas de même pour tous les sols testés. Dans le cas des expériences effectuées avec le sol RIM ou avec différents mélanges de sol ITB et MS2, aucune dégradation n'a été observée. Goldstein *et al.* (1985) ont suggéré plusieurs raisons pouvant expliquer l'absence de dégradation lorsqu'un inoculum est ajouté au sol : concentration trop faible des produits à dégrader ne pouvant supporter la croissance ; présence de substances toxiques inhibant la croissance et l'activité des micro-organismes inoculés ; haut taux de prédation (ex. : protozoaires) ; utilisation de d'autres substrats que le polluant visé ; les micro-organismes ne peuvent pénétrer les particules de sol et atteindre les molécules à dégrader. Du à la présence de sources de carbone complémentaires et à la disparition rapide du signal PCR pour la souche PCP-1, l'hypothèse la plus plausible pour expliquer l'absence de dégradation dans les sols ITB et RIM est la toxicité des polluants retrouvés dans les phases liquides et solides. En fait, le sol ITB contenait environ 750 mg de HAP/kg de sol, une quantité élevée de produits très toxiques. Les différentes dilutions de ce sol effectuées avec un sol non contaminé (MS2) n'ont pas permis d'obtenir la dégradation du PCP, suggérant que les conditions étaient toxiques pour les micro-organismes dégradeurs du PCP. Aussi, dans le cas de l'expérience avec le sol RIM, une très grande quantité de PCP (plus de 100 mg/l) a été retrouvée dans la phase liquide de tous les bioréacteurs. Cette concentration élevée en PCP dans la phase liquide était probablement toxique pour *D. frappieri* PCP-1. Cette forte concentration en PCP dans la phase liquide pourrait être expliquée par le faible pourcentage en matières organiques de ce sol (3,2 %), limitant ainsi la quantité de PCP pouvant être adsorbée à la matière organique. La présence de conditions toxiques pour la souche PCP-1 a été confirmée par les résultats obtenus par PCR où aucun signal pour la souche PCP-1 n'a été obtenu après 8 jours dans les bioréacteurs contenant du sol RIM et après 7 jours dans les bioréacteurs contenant du sol ITB.

Ainsi, la sorption du PCP aux particules de sol (et donc la quantité de matières organiques dans le sol à traiter) afin de limiter la quantité de PCP dans la phase liquide, ainsi que la présence d'autres polluants dans le sol à traiter (pouvant inhiber les micro-organismes dégradeurs de PCP) semblent être des facteurs limitant la biodégradation du PCP.

## 2.0 Recherche du genre *Desulfitobacterium* et de *D. frappieri* sp. dans différents sols

Comme un signal PCR a été obtenu dans 17 sols sur 34 pour *D. frappieri* sp. et dans 16 sols sur 34 pour le genre *Desulfitobacterium*, et que la plupart des signaux ont été obtenus à partir d'échantillons de sol provenant de Montréal et sa banlieue, ceci suggère que le genre *Desulfitobacterium* et l'espèce *D. frappieri* sont plutôt répandues dans cette région. De plus, quelques échantillons positifs provenant de villes en bordure du fleuve St-Laurent (Tracy et Ste-Croix), suggèrent que le genre *Desulfitobacterium* et l'espèce *D. frappieri* sont également retrouvés à plusieurs endroits dans la vallée du St-Laurent. Ces hypothèses sont confirmées par l'absence de signal à partir des échantillons prélevés à Rimouski (située en bordure du St-Laurent, mais beaucoup plus au nord), à partir des échantillons prélevés au nord de Val-David (Mont-Laurier et La Tuque) et à partir des échantillons prélevés sur la rive sud, à l'est de Montréal (St-Bernard-de-Beauce et St-Eugène-de-Grantham).

Le seul échantillon ayant fourni un résultat positif suite à l'analyse par PCR et n'ayant pas été prélevé dans la vallée du St-Laurent provient de la région de Val-David dans les Laurentides. En effet, un signal confirmant la présence du genre *Desulfitobacterium* (mais pas de l'espèce *D. frappieri*) a été obtenu suite à l'analyse par PCR de cet échantillon. Ceci n'est pas étonnant, puisqu'il est fortement possible que l'aire

de présence du genre *Desulfitobacterium* ne soit pas la même que celle de l'espèce *D. frappieri*. En effet, d'autres échantillons, prélevés dans la région de Montréal ont révélé la présence du genre *Desulfitobacterium* mais pas de l'espèce *D. frappieri*, comme l'échantillon provenant de Ste-Croix, et un des échantillons prélevés à Delson.

Lors de ces essais, aucune bactérie appartenant au genre *Desulfitobacterium* ou à l'espèce *D. frappieri* n'a été détectée à partir d'échantillons de sols provenant de l'extérieur du Québec, car aucun signal n'a été obtenu par PCR avec les échantillons provenant de Calgary (Alberta), Halifax (Nouvelle-Écosse) et New Westminster (Colombie-Britannique). Toutefois, la présence du genre *Desulfitobacterium* a déjà été détectée à l'extérieur de la province de Québec, puisque plusieurs souches de ce genre bactérien ont déjà été isolées. En effet, *D. dehalogenans* a été isolé à partir de sédiments d'eau douce prélevé d'un étang du Sandy Creek Nature Park d'Athens en Georgie, États-Unis (Utkin *et al.*, 1994) et *D. chlororespirans* a été isolé à partir de compost prélevé à East Lansing au Michigan, États-Unis (Sanford *et al.*, 1996). Ce genre bactérien a également été détecté en Europe, puisque *D. hafniense* a été isolée à partir d'un consortium provenant de boues municipales à Copenhague, au Danemark (Christiansen et Ahring, 1996a) et que la souche PCE1 a été isolée à partir d'un enrichissement effectué à partir de sol contaminé par le PCE, aux Pays-Bas (Gerritse *et al.*, 1996). En ce qui concerne la détection de *D. frappieri* sp. à l'extérieur du Québec, des chercheurs du Royaume-Uni ont extrait l'ADN d'un échantillon de sol et ont amplifié et cloné différents gènes ribosomaux 16S à partir de l'ADN extrait. Deux de ces gènes ont été associés au genre *Desulfitobacterium*, dont un étant identique à plus de 99 % au gène ribosomal 16S de la souche PCP-1 (Hutson *et al.*, 1996). *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S, isolée d'un sol contaminé au TCE en Allemagne, appartiendrait également à l'espèce *D. frappieri* (Miller *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1998), ce qui laisse croire que cette espèce serait également présente en Europe. Les micro-organismes appartenant au genre *Desulfitobacterium* et à *D. frappieri* sp. se retrouvent donc dans plusieurs endroits du monde, mais d'autres études devront être

effectuées afin de préciser les conditions favorisant leur survie dans l'environnement (ex. : type de sol ou sédiment, contenu en matières organiques, climat).

Des signaux de PCR ont été obtenus à partir des sols prélevés au site d'entreposage des poteaux traités au PCP à Ste-Thérèse avec les amorces spécifiques à l'espèce *D. frappieri*. Ce résultat est intéressant puisque ces sols (ainsi que des boues activées) ont servi d'inoculum de départ au bioréacteur à flux continu d'où la bactérie PCP-1 a été isolée. Bien qu'aucun PCR n'ait été effectué à partir de ces boues activées, il est probable que la souche PCP-1 provient originellement de ces sols.

Puisqu'un signal obtenu avec les amorces spécifiques à l'espèce *D. frappieri* génèrent également un signal pour le genre *Desulfitobacterium*, une analyse par PCSB a confirmé que plusieurs souches ou espèces différentes du genre *Desulfitobacterium* se retrouvent dans ces sols, vu la grande quantité de bandes obtenues sur gel (fig.12). Cette variété entre les échantillons s'explique par le fait que des flores indigènes différentes étaient présentes selon des échantillons. Également, la variété de souches ou d'espèces semble plus grande au niveau des échantillons prélevés à Ste-Thérèse, justement sur un site d'entreposage de poteaux traités au PCP. La faible concentration de PCP retrouvée, de même que la longue période d'utilisation de ce site (30 à 40 ans) ont peut être favorisé la diversification bactérienne et l'adaptation des micro-organismes à déshalogéner plus efficacement le PCP. La survie de ces bactéries composant ce genre pourrait être meilleure lorsqu'elles se retrouvent dans des habitats faiblement contaminés par des produits halogénés, où ces substances sont utilisées comme accepteurs d'électrons, favorisant ainsi la croissance par halorespiration.

Quelques-uns des échantillons de sol à partir desquels un signal a été obtenu par PCR étaient contaminés par le PCP, mais la plupart ne l'était pas, suggérant qu'il n'existe

pas de relation entre les sols contaminés au PCP et la présence du genre *Desulfitobacterium* ou de l'espèce *D. frappieri*. Toutefois, la présence de polluants dans la plupart des sols où aucun signal PCR n'a pu être obtenu laisse penser que ces produits pourraient être toxiques dans certains cas et empêcher l'enrichissement de bactéries du genre *Desulfitobacterium* ou encore causer la disparition de ces bactéries lors de la contamination de ces sols, particulièrement dans les sols provenant de Montréal et sa banlieue où aucun signal n'a été obtenu. En effet, les sols provenant de Mascouche, certains sols de Montréal, un des échantillons provenant de St-André-Est, ainsi que l'échantillon provenant de Ste-Marie-Salomé étaient tous contaminés par différents polluants qui auraient pu effectivement causer de tels effets. Il est également possible que ces bactéries n'aient simplement pas été présentes dans ces sols. Une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence de signal suite à l'enrichissement de la flore anaérobie de ces sols consiste en le fait que plusieurs de ces sols ont été prélevés en conditions aérobies, ce qui a peut être fait disparaître des échantillons certains micro-organismes anaérobies strictes. Toutefois, certains des micro-organismes du genre *Desulfitobacterium* sont sporulant (par exemple, *D. frappieri*, *D. hafniense* et *D. chlororespirans*), ce qui pourrait avoir facilité leur survie sous conditions aérobies (Bouchard *et al.*, 1996 ; Christiansen et Ahring, 1996a ; Sanford *et al.*, 1996).

L'enrichissement de bactéries réductrices de sulfate présentes parmi la flore indigène de 20 sols différents a confirmé la présence de micro-organismes anaérobies dans 10 des sols testés. Un signal positif au PCR pour le genre *Desulfitobacterium* et l'espèce *D. frappieri* a été obtenu dans certains échantillons ne pouvant réduire le sulfate, ce qui suggère que les bactéries réductrices de sulfate ne sont pas présentes dans tous les sols testés et ne sont pas de bons indicateurs de la présence de micro-organismes anaérobies. Comme les bactéries du genre *Desulfitobacterium* ne réduisent pas le sulfate, aucune corrélation n'a été trouvée entre la présence de ces deux groupes bactériens.

Malgré le fait que toutes les bactéries du genre *Desulfitobacterium* isolées jusqu'à présent peuvent déshalogéner des molécules halogénées, rien ne prouve que les signaux obtenus au cours de cette expérience pour le genre *Desulfitobacterium* ou pour l'espèce *D. frappieri* correspondaient à des bactéries ayant la capacité de déshalogéner le PCP. Pour vérifier cette hypothèse, il aurait fallu amplifier l'ADN extrait des différents échantillons de sol avec des amorces spécifiques aux gènes codant pour les déshalogénases de ces bactéries. Malheureusement, au moment de la réalisation de ce travail, aucune des séquences en acides aminés de ces enzymes n'était disponible, empêchant la synthèse de telles amorces. Leur capacité de déshalogénéation, de même que leur spectre d'activité pourraient être différents d'une souche à l'autre. Or, comme le démontrent les résultats obtenus suite aux essais effectués par PCR, il semble que les bactéries de ce genre bactérien ne soient pas nécessairement présentes dans les sols pollués par le PCP ou d'autres substances chlorées. Bien que l'avantage de pouvoir déshalogéner certains polluants soit évident lorsque de telles bactéries se retrouvent dans un environnement contaminé par des molécules halogénées, il n'en est pas de même si elles se retrouvent dans un sol non contaminé. Toutefois, un avantage possible qu'auraient alors ces bactéries à posséder une capacité de déshalogénéation lorsqu'elles se trouvent dans des sols non pollués serait que ces enzymes pourraient servir à déshalogéner des molécules chlorées formées naturellement par certains champignons, par exemple (Gribble, 1992; Siuda et DeBernardis, 1973). Il est également probable que les bactéries du genre *Desulfitobacterium* jouent un rôle au niveau du cycle du soufre, puisque ces bactéries peuvent utiliser le sulfite, le thiosulfate et le soufre comme accepteur d'électrons et utiliser l'énergie produite par halorespiration pour leur croissance. D'autres études devront être effectuées afin d'évaluer l'implication de ces bactéries à ce niveau.

## **CONCLUSION**

L'utilisation de grandes quantités de PCP par l'industrie de traitement du bois a mené à la contamination des sols environnants ces usines. Plusieurs micro-organismes anaérobies possèdent la capacité de dégrader des polluants chlorés, ce qui offre des possibilités intéressantes pour le traitement des sols contaminés par des procédés *in situ* ou *ex situ*. La capacité des micro-organismes anaérobies à déshalogéner le PCP dans des bioréacteurs rotatifs contenant des sols contaminés a été évaluée après inoculation de bactéries *D. frappieri* souche PCP-1. La présence de micro-organismes appartenant au genre *Desulfitobacterium* et à l'espèce *D. frappieri* a également été recherchée dans différents échantillons de sol.

*D. frappieri* souche PCP-1 est capable de survivre pendant au moins de 21 jours dans des bioréacteurs rotatifs contenant du sol MS1 contaminé par 500 mg de PCP/kg de sol humide. Par contre, la population de bactéries PCP-1 diminue rapidement à des doses de 750 mg de PCP/kg de sol humide, pour finalement disparaître sous le seuil de détection du PCR après 21 jours. La biodégradation du PCP a été obtenue en moins de 9 jours dans des bioréacteurs contenant du sol MS1 ou TS contaminés jusqu'à 189 mg de PCP/kg de sol sec. Aucune différence au niveau de la dégradation du PCP n'a été observée entre les bioréacteurs agités une heure par jour ou de manière continue. La quantité de milieu liquide dans le réacteur n'a eu qu'un effet minime sur la dégradation du PCP. L'étape limitante de la dégradation du PCP est la déshalogénéation du 3-MCP, ce dernier étant généralement peu ou pas dégradé dans les conditions utilisées.

La taille de l'inoculum de bactéries PCP-1 a eu peu d'effet sur la dégradation du PCP, puisque la flore indigène des sols MS1 et TS a également été capable de dégrader le PCP et ce, avec des rendements très comparables à ceux obtenus avec les bioréacteurs inoculés avec la souche PCP-1. La détection par PCR de *D. frappieri* sp. dans les bioréacteurs non inoculés avec cette souche suggère que cette bactérie pourrait être

présente parmi la flore indigène de ces sols, mais n'implique pas nécessairement que cette souche soit responsable de la dégradation du PCP observée dans ces bioréacteurs.

Aucune dégradation n'a été observée dans les bioréacteurs rotatifs contenant du sol RIM ou un mélange de sol ITB et MS2. Dans les deux cas, la toxicité du milieu semble en cause. En effet, dans le cas du sol RIM, la quantité de matière organique dans le sol semble importante, ceci afin de permettre l'adsorption du PCP et diminuer la toxicité de la phase. Par contre, dans le cas du sol ITB, la présence de créosote dans le sol semble inhiber la dégradation du PCP par la souche PCP-1, probablement à cause que ce produit est composé en grande partie de HAP, des substances très toxiques.

La recherche du genre *Desulfitobacterium* et de l'espèce *D. frappieri* dans différents sols a montré qu'un signal PCR était obtenu dans 17 sols sur 34 pour *D. frappieri* sp. et dans 16 sols sur 34 pour le genre *Desulfitobacterium*. Plusieurs sols provenant de différentes régions du Québec, ainsi que trois sols provenant d'autres provinces canadiennes ont été testés, mais tous les signaux ont été obtenus à partir de sols provenant de la région de la vallée du St-Laurent (sauf le sol provenant de Val-David dans les Laurentides). Bien que ces résultats suggèrent que ces bactéries sont fréquemment retrouvées dans les sols de cette région, les bactéries constituant ce genre bactérien ont été isolées à partir de différents endroits dans le monde, dont les États-Unis ainsi que plusieurs pays européens, ce qui suggère plutôt une dispersion plus générale. Aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence de certains polluants dans les sols testés et la présence de ces bactéries. Toutefois, la présence d'un signal de PCR plus intense à partir des sols prélevés à Ste-Thérèse et une plus grande quantité de bandes sur gel PCSB suggère que la faible concentration en PCP retrouvée à ce site et la longue période d'exposition ont peut être favorisé la diversification de ces bactéries, ainsi que leur adaptation à déshalogéner plus efficacement le PCP. Enfin, une analyse par PCSB de certains échantillons a permis de confirmer que plusieurs espèces ou souches différentes

du genre *Desulfitobacterium* étaient présentes dans ces échantillons. D'autres études devront être effectuées afin d'évaluer la dispersion et le rôle de ces bactéries dans l'environnement.

Suite à ces travaux, plusieurs avenues de recherches sont possibles. Par exemple, les travaux en bioréacteurs pourraient être poussés plus loin, peut être par des expériences visant à effectuer un « scale-up » du système afin d'obtenir un procédé se rapprochant de l'industrie. Des travaux pourraient également explorer les possibilités offertes par un traitement *in situ* mettant à profit la capacité de déshalogénéation de la flore indigène anaérobie retrouvée chez certains sols. Également, d'autres expériences pourraient être effectuées afin d'approfondir les résultats obtenus sur la dispersion de *D. frappieri* et du genre *Desulfitobacterium*. La flore indigène d'autres sols provenant de la province de Québec, mais également de l'extérieur pourraient être analysés. Aussi, l'ADN obtenu à partir de l'amplification avec les amorces spécifiques au genre *Desulfitobacterium* de certains échantillons pourrait être cloné et séquencé, ceci afin de comparer les séquences obtenues avec les séquences de gènes ribosomiaux 16 S retrouvées dans les banques de données.

L'utilisation de procédés anaérobies *in situ* ou *ex situ* mettant à profit l'activité de dégradation des micro-organismes dégradeurs de la flore indigène pour le traitement de certains sols contaminés par le PCP semble envisageable. Par contre, lorsque la flore indigène ne démontre aucune activité de dégradation, l'inoculation de *D. frappieri* PCP-1 dans ces sols pourrait éventuellement permettre la biodégradation du PCP lorsque les conditions sont favorables à sa survie.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Ahlborg, U.G., Thunberg, T.M. 1980. Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism, and environmental impact. *CRC Crit Rev Toxicol* 7: 1-36.

Abrahamson, K., Klick, S. 1991. Degradation of halogenated phenols in anoxic natural marine sediments. *Marine Pollut Bull* 22: 227-233.

Arsenault, R.D. 1976. Pentachlorophenol and contained chlorinated dibenzodioxins in the environment. *Proc Ann Amer Wood Preservers Assoc* 72: 122

Bajpai, R., Banerji, S. 1992. Bioremediation of soils contaminated with pentachlorophenol. *Ann New York Acad Sci* 665: 423-434.

Beaudet, Lévesque, M.J., Villemur, R., Lanthier, M., Chénier, M., Lépine, F., Bisailon, J.-G. 1998. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a contaminated soil inoculated with a methanogenic consortium or with *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1. *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 135-141.

Beaudet, R., McSween, G., Lépine, F., Milot, S., Bisailon, J.-G. 1997. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a liquor obtained after extraction of contaminated chips and wood powder. *J Appl Microbiol* 82: 186-190.

Bechold, H., Ehrlich, P. 1906. Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Desinfektionswirkung. *Z Physiol Chem* 47: 173-199.

Bellin, C.A., O'Connor, G.A. 1990. Plant uptake of pentachlorophenol from sludge-amended soils. *J Environ Qual* 19: 298-302.

Bellin, C.A., O'Connor, G.A., Jin, Y. 1990. Sorption and degradation of pentachlorophenol in sludge-amended soils. *J Environ Qual* 19: 603-608.

Bevenue, A., Beckman, H. 1967. Pentachlorophenol: a discussion of its properties and its occurrence as a residue in human and animal tissues. *Res Rev* 19: 83-134.

Bouchard, B., Beaudet, R., Villemur, R., McSween, G., Lépine, F., Bisailon, J.-G. 1996. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *Int J Syst Bacteriol* 46: 1010-1015.

Boyd, S.A., Mikesell, M.D., Lee, J. 1989. Chlorophenols in soils. *Dans: Reactions and movement of organic chemicals in soils. Spec Pub 22. Éditeurs: Sawhney, B.L., Brown, K. Soil Science Society of America, Madison, pp 209-228.*

Boyd, S.A., Shelton, D.R., Berry, D., Tiedje, J.M. 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl Environ Microbiol* 46: 50-54.

Bruce, K.D., Hiorns, W.D., Hobman, J.L., Osborn, A.M., Strike, P., Ritchie, D.A. 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 3413-3416.

Brudermann, G.E., Richardson, N.G., Watson, R.L. 1982. Dioxins and the Canadian pressure wood preserving industry. *Canadian institute of treated wood, pp 1-35.*

Bryant, F.O., Hale, D.D., Rogers, J.E. 1991. Regiospecific dechlorination of pentachlorophenol by dichlorophenol-adapted microorganisms in freshwater, anaerobic sediment slurries. *Appl Environ Microbiol* 57: 2293-2301.

Butte, W., Denker, J., Kirsch, M., Höpner, T. 1985. Pentachlorophenol and tetrachlorophenol in Wadden sediment and clams *Mya arenaria* of the Jadebusen after 14-year period of wastewater discharge containing pentachlorophenol. *Environ Pollut (Ser B)* 9: 29-39.

Cascorbi, I., Ahlers, J. 1989. Correlation between the lipophilicity of substituted phenols and their inhibition of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of chinese hamster ovary cells. *Toxicology* **58**: 197-210.

Cascorbi, I., Forêt, M. 1991. Interaction of xenobiotics on the glucose-transport system and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of human skin fibroblats. *Ecotoxicol Environ Saf* **21**: 38-46.

Chaudry, G.R. et Chapalamadugu, S. 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol Rev* **55**: 59-79.

Chénier, M. 1997. Étude de la biodégradation du pentachlorophénol en conditions aérobies et anaérobies. Mémoire de maîtrise, université du Québec, Institut Armand-Frappier. 194 p.

Christiansen, N., Ahring, B.K. 1996a. *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 442-448.

Christiansen, N., Ahring, B.K. 1996b. Introduction of a *de novo* bioremediation activity into anaerobic granular sludge using the dechlorinating bacterium DCB-2. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**: 61-66.

Cirelli, D. P. 1978. Patterns of pentachlorophenol usage in the United States of America - an overview. *Dans: Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Éditeur: Rao, K. R. Plenum Press, New York, 402 p.*

Cole, J.R., Cascarelli, A.L., Mohn, W.W., Tiedje, J.M. 1994. Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3536-3542.

Crosby, D.G. 1981. Environmental chemistry of pentachlorophenol. International Union of Pure and Applied Chemistry. Applied Chemistry Division. Commission on Pesticide Chemistry. IUPAC reports on Pesticides 14

Davis, A. J., Campbell, J., Gilbert, C., Ruby, M. V., Bennett, M., Tobin, S. 1994. Attenuation and biodegradation of chlorophenols in ground water at a former wood treating facility. *Origine inconnue* 32: 248-257.

De Jong, E., Field, J. A., Spinnler, H.-E., Wijberg, J. B. P. A., De Bont, J. A. M. 1994. Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. *Appl Environ Microbiol* 60: 264-270.

DeLaune, R.D., Gambrell, R.P., Reddy, K.S. 1983. Fate of pentachlorophenol in estuarine sediments. *Environ Pollut (Series B)* 6: 297-308.

Dennie, D., Gladu, I., Lépine, F., Villemur, R., Bisailon, J.-G., Beaudet, R. 1998. Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl Environ Microbiol* 64: 4603-4606.

Desaiah, D. 1978. Effect of pentachlorophenol on the ATPases in rat tissues. *Dans: Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Éditeur: Rao, K. R. Plenum Press, New York, 402 p.*

Dolfing, J. 1990. Reductive dechlorination of 3-chlorobenzoate is coupled to ATP production and growth in an anaerobic bacterium, strain DCB-1. *Arch Microbiol* 153: 264-266.

Dolfing, J., Tiedje, J.M. 1991. Influence of substituents on reductive dehalogenation of 3-chlorobenzoate analogs. *Appl Environ Microbiol* 57: 820-824.

Drong, K., Lamprecht, I. 1993. Toxicological studies of energy flows in ecological systems. *Pure Appl Chem* **65**: 1967-1972.

Edgehill, R.U. 1994. Pentachlorophenol removal from slightly acidic mineral salts, commercial sand, and clay soil by recovered *Arthrobacter* strain ATCC 33790. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**: 142-148.

Edgehill, R.U., Finn, R.K. 1983. Microbial treatment of soil to remove pentachlorophenol. *Appl Environ Microbiol* **45**: 1122-1125.

El Fantroussi, S., Mahillon, J., Naveau, H., Agathos, S.N. 1997a. Introduction and PCR detection of *Desulfomonile tiedjei* in soil slurry microcosms. *Biodegradation* **8**: 125-133.

El Fantroussi, S., Mahillon, J., Naveau, H., Agathos, S.N. 1997b. Introduction of anaerobic dechlorinating bacteria into soil slurry microcosms and nested-PCR monitoring. *Appl Environ Microbiol* **63**: 806-811.

Gebefügi, I., Parlar, H., Korte, F. 1979. Occurrence of pentachlorophenol in enclosed environments. *Ecotoxicol Env Safety* **3**: 269-300.

Gerritse, J., Renard, V., Pedro Gomes, T.M., Lawson, P.A., Collins, M.D., Gottschal, J.C. 1996. *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. *Arch Microbiol* **165**: 132-140.

Gilbert, F. I., Minn, C. E., Duncan, R.C., Wilkinson, J. 1990. Effects of pentachlorophenol and other chemical preservatives on the health of wood treating workers in Hawaii. *Arch Environ Contam Toxicol* **19**: 603-609.

Goldstein, R.M., Mallory, L.M., Alexander, M. 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl Environ Microbiol* **50**: 977-983.

Gribble, G. W. 1992. Naturally occurring organohalogen compounds - a survey. *J Nat Prod (Lloydia)* **55**: 1353-1395.

Gruttke, H., Kratz, W., Weigmann, G., Haque, A. 1988. Terrestrial model food chain and Environmental Chemicals. I. Transfer of  $^{14}\text{C}$  pentachlorophenolate between springtails and carabids. *Ecotoxicol Environ Saf* **15**: 253-259.

Guthrie, M.A., Kirsh, E.J., Wukash, R.F., Grady, C.P.L.Jr. 1984. Pentachlorophenol biodegradation II: anaerobic. *Water Res* **18**: 451-461.

Hagblom, M.M. 1990. Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds. *J Basic Microbiol* **2**: 115-141.

Hakulinen, R., Salkinoja-Salonen, M. 1982. Treatment of pulp and paper industry wastewaters in an anaerobic fluidised bed reactor. *Process Biochem* **17**: 18-22.

Hale, D.D., Reineke, W., Wiegel, J. 1994. Chlorophenol degradation. *Dans: Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals. Éditeur: Chaudry, G.R. Dioscorides Press, Portland, Oregon* pp 74-91.

Hardman, D.J. 1991. Biotransformation of halogenated compounds. *Crit Rev Biotechnol* **11**: 1-40.

Hendriksen, H.V., Ahring, B.K. 1992. Metabolism and kinetics of pentachlorophenol transformation in anaerobic granular sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 662-666.

Hendriksen, H.V., Ahring, B.K. 1993. Anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in fixed-film and upflow anaerobic sludge blanket reactors using different inocula. *Biodegrad* 3: 399-408.

Hendriksen, H.V., Larsen, S., Ahring, B.K. 1991. Anaerobic degradation of PCP and phenol in fixed-film reactors: the influence of an additional substrate. *Wat Sci Technol* 24: 431-436.

Hendriksen, H.V., Larsen, S., Ahring, B.K. 1992. Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 58: 365-370.

Hoos, R. A. W. 1978. Patterns of PCP usage in Canada - an overview. *Dans: Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Éditeur: Rao, K. R. Plenum Press, New York, 402 p.*

Hutson, R.A., Gerritse, J., Collins, M.D. 1996. National Center for Biotechnology Information [En ligne]. Adresse HTTP : [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Ide, A., Niki, Y., Sakamoto, F., Watanabe, I., Watanabe, H. 1972. Decomposition of pentachlorophenol in paddy soil. *Agr Biol Chem* 36: 1937-1944.

Jacobs, L. W., O'Connor, G. A., Overcash, M. R., Zabek, M. J., Rygwicz, P. 1987. Effects of trace organics in sewage sludges on soil-plant systems and assessing their risk to human. *Dans: Land application of sludge. Éditeurs: Page, A. L. et al. Lewis publishers, Chelsea, MI.*

Jensen, J. 1996. Chlorophenols in the terrestrial environment. *Rev Environ Contamin Toxicol* 146: 25-51.

Johnsen, K., Enger, O., Jacobsen, C., Thirup, L., Torsvik, V. 1999. Quantitative selective PCR of 16S ribosomal DNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas* spp. in soil hot spots. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1786-1789.

Jones, P. A. 1984. Chlorophenols and their impurities in the canadian environment: 1983 supplement. Ottawa. Environnement Canada. 93 p.

Jones, A., Zabel, T. 1988. Information related to potential 'Red List' substances. Water Research Centre, Report PRS 1901/m/1.

Juteau, P., Beaudet, R., McSween, G., Lépine, F., Milot, S., Bisailon, J.-G. 1995a. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**: 218-224.

Juteau, P., Beaudet, R., McSween, G., Lépine, F., Bisailon, J.-G. 1995b. Study of the reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Can J Microbiol* **41**: 862-868.

Kennes, C., Wu, W.-M., Bhatnagar, L., Zeikus, J.G. 1996. Anaerobic dechlorination and mineralization of pentachlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol by methanogenic pentachlorophenol-degrading granules. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**: 801-806.

Kitunen, V.H., Valo, R.J., Salkinoja-Salonen, M.S. 1987. Contamination of soil around wood-preserving facilities by polychlorinated aromatic compounds. *Environ Sci Technol* **21**: 101

Klein, W., Scheunert, I. 1982. Bound pesticide residues in soil. Plant and food with particular emphasis on the application of nuclear techniques. *Dans: Agrochemicals: fate in food and the environment. Éditeur: Proc Symp Rome. IAEA, Vienna, pp 177-205.*

Konasewich, D.E., Henning, F.A. 1988. Installations de préservation du bois au pentachlorophénol (PCP). Rapport SPE 2/WP/2, Environnement Canada, pp 1-108.

Kuwatsuka, S., Igarashi, M. 1975. Degradation of PCP in soils. II. The relationship between the degradation of PCP and the properties of soils, and the identification of the degradation products of PCP. *Soil Sci Plant Nutr* **21**: 405-414.

Lagas, P. 1988. Sorption of chlorophenols in the soil. *Chemosphere* **17**: 205-216.

Larsen, S., Hendriksen, H.V., Ahring, B.K. 1991. Potential for thermophilic (50°C) anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in different ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2085-2090.

Lee, S.-Y., Bollinger, J., Bezdieck, D., Ogram, A. 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3787-3793

Lévesque, M.-J., La Boissière, S., Thomas, J.-C., Beaudet, R., Villemur, R. 1997. Rapid method for detecting *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1 in soil by the polymerase chain reaction. *Appl Microbiol Biotechnol.* **47**: 719-725.

Lévesque, M.-J., Beaudet, R., Bisailon, J.-G., Villemur, R. 1998. Quantification of *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1 and *Clostridium*-like strain 6 in mixed bacterial populations by competitive polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods* **32**: 263-271.

Linkfield, T.G., Tiedje, J.M. 1990. Characterization of the requirements and substrates for reductive dehalogenation by strain DCB-1. *J Ind Microbiol* **5**: 9-16.

Loubier, N. 1996. Évaluation des technologies de restauration des sols contaminés par le pentachlorophénol. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Montréal, 122 p.

Lu, P.-Y., Metcalf, R.L., Cole, L.K. 1978. The environmental fate of <sup>14</sup>C-pentachlorophenol in laboratory model ecosystems. Dans: Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Éditeur: Rao, K. R. Plenum Press, New York, 402 p.

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

McAllister, K. A., Lee, H., Trevors, J. T. 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. Biodegrad **7**: 1-40.

McFarland, M.J., Ramaprasad, A., Muraka, I. 1994. Physicochemical limitations to the biotransformation of pentachlorophenol in soil. Haz Waste Haz Material **11**: 479-489.

Middledorp, P.J.M., Briglia, M., Salkinoja-Salonen, M.S. 1990. Biodegradation of pentachlorophenol in natural soil by inoculated *Rhodococcus chlorophenolicus*. Microb Ecol **20**:123-139.

Mikesell, M.D., Boyd, S.A. 1985. Reductive dechlorination of the pesticides 2,4-D, 2,4,5-T, and pentachlorophenol in anaerobic sludges. J Environ Qual **14**: 337-340.

Mikesell, M.D., Boyd, S.A. 1986. Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. Appl Environ Microbiol **52**: 861-865.

Mikesell, M.D., Boyd, S.A. 1988. Enhancement of pentachlorophenol degradation in soil through induced anaerobiosis and bioaugmentation with anaerobic sewage sludge. *Environ Sci Technol* **22**: 1411-1414.

Miller, E., Wohlfarth, G., Diekert, G. 1997. Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. *Arch Microbiol* **168**: 513-519.

Miller, E., Wohlfarth, G., Diekert, G. 1998. Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S. *Arch Microbiol* **169**: 497-502.

Mohn, W.W., Kennedy, K.J. 1992. Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1367-1370.

Mohn, W.W., Tiedje, J. M. 1990. Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. *Arch Microbiol* **153**: 267-271.

Mohn, W. W., Tiedje, J. M. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol Rev* **56**: 482-507.

Mueller, J.G., Chapman, P.J., Pritchard, P.H. 1989. Creosote-contaminated sites. Their potential for bioremediation. *Environ Sci Technol* **23**: 1197-1201.

Murthy, N.B.K., Kaufman, D.D., Fries, G.F. 1977. Degradation of pentachlorophenol (PCP) in aerobic and anaerobic soil. *J Environ Sci Health* **B14**: 1-14.

Neilson, A.H. 1990. The biodegradation of halogenated organic compounds. *J Appl Bacteriol* **69**: 445-470.

Neilson, A.H. 1996. An environmental perspective on the biodegradation of organochlorine xenobiotics. *Intern Biodeterior Biodegrad* 37: 3-21.

Nicholson, D.K., Woods, S.L., Istok, J.D., Peek, D.C. 1992. Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol* 58: 2280-2286.

Nilson, C-A, Norström, Å, Andersson, K., et Rappe, C. 1978. Impurities in commercial products related to pentachlorophenol. *Dans: Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Éditeur: Rao, K. R. Plenum Press, New York, 402 p.*

Öberg, L. G., Glas, B., Swanson, S. E., Rappe, C., Steglich, W. 1990. Peroxidase catalyzed oxidation of chlorophenols to polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Arch Environ Contamin Toxicol* 19: 930-938.

Ogram, A., Sayler, G.S., Barkay, T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods* 7: 57-66.

Ottou, J. M. 1991. Revue de la littérature sur la biodégradation du pentachlorophénol dans le bois. Rapport présenté à l'Association Canadienne de l'Électricité, 53 p.

Peyton, T.O. 1984. Biological disposal of hazardous waste. *Enzyme Microb Technol* 6: 146-154.

Pignatello, J.J., Johnson, L.K., Martinson, M.M., Carlson, R.E., Crawford, R.L. 1986. Response of the microflora in outdoor experimental streams to pentachlorophenol: environmental factors. *Can J Microbiol* 32: 38-46.

Providenti, M.A., Lee, H., Trevors, J.T. 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *J Indus Microbiol* **12**: 379-395.

Puhakka, J.A., Mäkinen, P.M., Lundin, M., Ferguson, J.F. 1994. Aerobic and anaerobic biotransformations and treatment of chlorinated pulp bleach waste constituents. *Wat Sci Technol* **29**: 73-80.

Quémarais, B., Lemieux, C., Lum, K.R. 1994. Distribution and fate of chlorophenols in the St-Lawrence river basin, Canada. *Chemosphere* **28**: 1943-1960.

Rao, K. R. 1978. Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. *Dans: Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Éditeur: Rao, K. R. Plenum Press, New York, 402 p.*

Ravel, P., Taillandier, G., Tissut, M., Benoit-Guyod, J.L. 1985. Effects of chlorophenols on isolated plant mitochondrial activities: a QSAR study. *Ecotoxicol Environ Saf* **9**: 300-320.

Ruckdeschel, G., Renner, G., Schwarz, K. 1987. Effects of pentachlorophenol and some of its metabolites on different species of bacteria. *Appl Env Microbiol* **53**: 2689-2692.

Ryding, J.M., Puhakka, J.A., Strand, S.E., Ferguson, J.F. 1994. Degradation of chlorinated phenols by a toluene enriched microbial culture. *Wat Res* **9**: 1897-1906.

Salkinoja-Salonen, M.S. 1990. Biochemistry and ecology of the clean-up of pentachlorophenol from contaminated soils. Fifth colloquium on pulp and paper mill effluents.

Salkinoja-Salonen, M.S., Hakulinen, R., Valo, R., Apajalathi, J. 1983. Biodegradation of recalcitrant organochlorine compounds in fixed film reactors. *Wat Sci Tech* **15**: 309-319.

Salminen, J., Haimi, J., Sironen, A., Ahtiainen, J. 1995. Effects of pentachlorophenol and biotic interactions on soil fauna and decomposition in humus soil. *Ecotox Env Saf* **31**: 250-257.

Samson, R. 1994. Biorestauration des sites contaminés. 1- Les technologies *ex situ*. La filière biomasse. Éditeur: Centre québécois de valorisation de la biomasse, Sainte-Foy. 19 p.

Sanford, R.A., Cole, J.R., Löffler, F., Tiedje, J.M. 1996. Characterization of *Desulfotobacterium chlororespirans* sp. nov., wich grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3800-3808.

Schellenberg, K., Leuenberger, C., Schwarxenbach, R.P. 1984. Sorption of chlorinated phenols by natural sediments and aquifer materials. *Environ Sci Technol* **18**: 652-657.

Scheunert, I., Qiao, Z., Korte, F. 1986. Comparative studies of the fate of atrazine-<sup>14</sup>C and pentachlorophenol-<sup>14</sup>C in various laboratory and outdoor soil-plant systems. *J Environ Sci Health* **B21**: 457-485.

Scheunert, I., Attar, A., Zelles, L. 1995. Ecotoxicological effects of soil-bound pentachlorophenol residues on the microflora of soils. *Chemosphere* **30**: 1995-2009.

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

Siuda, J.F. 1980. Natural production of organohalogenes. *Dans* : Water chlorination : Environmental impact and health effects. *Éditeurs* : Jolley, R.L., Brungs, W.A., Cumming, R.B. et Jacobs, V.A. Ann Arbor Science Publishers Inc. pp 63-72.

Siuda, J. F., DeBernardis, J.F. 1973. Naturally occurring halogenated organic compounds. *Lloydia (Cinci.)* **36**: 107-143.

Strömpl, C., Thiele, J.H. 1997. Comparative fate of 1,1-diphenylethylene (DPE), 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)-ethylene (DDE), and pentachlorophenol (PCP) under alternating aerobic and anaerobic conditions. *Arch Environ Contamin Toxicol* **33**: 350-356.

Stuart, S.L., Woods, S.L. 1998. Kinetic evidence for pentachlorophenol-dependent growth of a dehalogenating population in a pentachlorophenol- and acetate-fed methanogenic culture. *Biotechnol Bioengineer* **57**: 420-429.

Susarla, S., Yonezawa, Y., Masunaga, S. 1998. Reductive transformations of halogenated aromatics in anaerobic estuarine sediments: kinetics, products and pathways. *Wat Res* **32**: 639-648.

Tebbe, C.C. et Vahjen, W. 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2657-2665.

Thomas, J.-C., Desrosiers, M., St-Pierre, Y., Lirette, P., Bisailon, J.-G., Beudet, R., Villemur, R. Quantitative flow cytometric detection of specific microorganisms in soil samples using rRNA targeted fluorescent probes and ethidium bromide. *Cytometry* **27**: 224- 232.

Tsai, Y.-L. et Olson, B.H. 1992. Detection of low number of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**: 754-757.

Utkin, I., Woese, C., Wiegel, J. 1994. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 612-619.

Utkin, I., Dalton, D.D., Wiegel, J. 1995. Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. *Appl Environ Microbiol* **61**: 346-351.

Van Elsas, J.D., Mäntynen, V., Wolters, A.C. 1997. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable number PCR and immunofluorescence. *Biol Fertil Soils* **24**: 188-195.

Van Gestel, C.A.M., Ma, W. 1988. Toxicity and bioaccumulation of chlorophenols in earthworms, in relation to bioavailability. *Ecotoxicol Environ Saf* **15**: 289-297.

Veningerová, M., Prachar, V., Kovacicova, J., Uhnák, J. 1998. Levels of chlorinated phenols in Danube River water. *Fresenius Envir Bull* **7**: 224-231.

Virtanen, M.T., Hattula, M.L. 1982. The fate of 2,4,6-trichlorophenol in an aquatic continuous-flow system. *Chemosphere* **11** : 641-649.

Wang, Y.-T., Muthukrishnan, S., Wang, Z. 1998. Reductive dechlorination of chlorophenols in methanogenic cultures. *J Environ Engineer* **124**: 231-238.

Wedding, R.T., Hansch, C., Fukuto, T.R. 1967. Inhibition of malate dehydrogenase by phenols and the influence of ring substituents on their inhibitory effectiveness. *Arch Biochem Biophys* **121**: 9-21.

Weinbach, E.C., Garbus, J. 1965. The interaction of uncoupling phenols with mitochondria and with mitochondrial protein. *J Biol Chem* **240**: 1811-1819.

Weiss, U.M., Scheunert, I., Klein, W., Korte, F. 1982. Fate of pentachlorophenol-<sup>14</sup>C in soil under controlled conditions. *J Agric Food Chem* **30**: 1191-1194.

Wester, R.C., Maibach, H.I., Sedik, L., Melendres, J., Wade, M., Dizio, S. 1993. Percutaneous absorption of pentachlorophenol from soil. *Fundam Appl Toxicol* **20**: 68-71.

Wiegel, J., Zhang, X., Wu, Q. 1999. Anaerobic dehalogenation of hydroxylated polychlorinated biphenyls by *Desulfitobacterium dehalogenans*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2217-2221.

Wild, S.R., Harrad, S.J., Jones, K.C. 1993. Chlorophenols in digested U.K. sewage sludges. *Wat Res* **27**: 1527-1534.

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

Woods, S.L., Ferguson, J.F., Benjamin, M.M. 1989. Characterization of chlorophenol and chloromethoxybenzene biodegradation during anaerobic treatment. *Environ Sci Technol* **23**: 62-68.

World Health Organization. 1987. Pentachlorophenol. Environmental health criteria 71. *Éditeur*: United Nations Environment Programme, International Labour Organization et World Health Organization, Finland, 236 p.

World Health Organization. 1989. Pentachlorophenol health and safety guide. IPCS international programme on chemical safety. Health and safety guide No. 19. *Éditeur*: World Health Organization for the International Programme on Chemical Safety, Finland, 44 p.

Wu, W.-M., Bhatnagar, L., Zeikus, J.G. 1993. Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. *Appl Environ Microbiol* **59**: 389-397.

Zachar, V., Thomas, R.A., Goutin, A.S. 1993. Absolute quantification of target DNA: a simple competitive PCR for efficient analysis of multiple samples. *Nucleic Acids Res* **21**: 2017-2018.