

INRS-Institut Armand- Frappier

**Visualisation de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 dans des biofilms
anaérobies par hybridation *in situ***

Par

Martin Lanthier

Thèse présentée

pour l'obtention

du grade de Philosophiae doctor (Ph. D.)

en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury Réjean Beaudet, INRS-Institut Armand-Frappier

et examinateur interne

Examinateur interne Charles Dozois, INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur externe Charles Greer

Groupe de recherche en microbiologie
environnementale

Institut de Recherche en Biotechnologie

Examinateur externe Caroline Duchaine

Centre de Recherche

Hôpital Laval

Directeur de recherche Richard Villemur, INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Martin Lanthier, 2004

Résumé

Le pentachlorophénol (PCP) est un produit toxique qui a été grandement utilisé pour la préservation du bois et comme biocide, ce qui a donné lieu à d'importants problèmes de pollution. L'utilisation de bioréacteurs anaérobies pourrait permettre de décontaminer les sites pollués par le PCP. Ce type de traitement pourrait être amélioré par l'étude des consortiums microbiens retrouvés dans ces réacteurs et par la bioaugmentation de souches bactériennes ayant des capacités de dégradation spécifiques. *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 est la seule bactérie anaérobie isolée pouvant déshalogéner de manière réductrice le PCP en position *ortho*, *meta* et *para*, ce qui en fait une candidate idéale pour l'inoculation de ce type de bioréacteurs. L'objectif de ce projet de recherche consistait à visualiser à l'aide de la technique d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) *D. frappieri* PCP-1 directement dans les biofilms retrouvés dans un réacteur à boues granulaires (UASB) et des réacteurs à film fixe (FF).

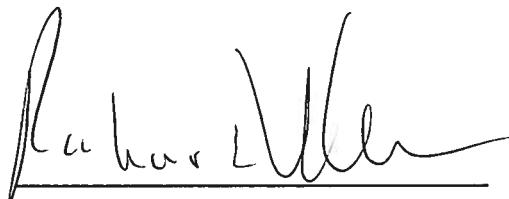
Un bioréacteur UASB a été supplémenté avec du PCP et bioaugmenté avec la souche PCP-1. Une couche externe dense composée de bactéries PCP-1 a été observée sur la surface des granules à l'aide du FISH après 9 semaines d'opération. Cette disposition a été confirmée par l'utilisation d'un modèle mathématique simulant le processus de colonisation et a permis de montrer que cette disposition permettait de protéger les micro-organismes situés dans les couches plus internes de la toxicité du PCP.

Deux réacteurs anaérobies à FF (Pf, P0) ont été supplémentés avec du PCP et un de ces deux réacteurs a été bioaugmenté avec la souche PCP-1 (Pf). Les charges en PCP dégradées par les deux réacteurs étaient similaires ($312 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R \text{ j}^{-1}$). Le réacteur Nf (supplémenté avec du nitrate et inoculé avec la souche PCP-1) possédait une activité méthanogène et pouvait réduire le nitrate ($476 \text{ mg}_{\text{NO}_3} \text{ l}_R \text{ j}^{-1}$). Un réacteur contrôle (0f; inoculé avec la PCP-1 mais n'ayant pas été supplémenté avec du PCP ou du nitrate) a également été utilisé. L'analyses par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) des gènes codant pour l'ARNr 16S provenant d'échantillons de ces réacteurs a permis de révéler d'importantes modifications dans les profils des *Eubacteria* et des *Archaea* comparativement à la boue ayant servi à l'inoculation et entre les différents bioréacteurs, sauf dans le cas des profils de diversité des deux réacteurs supplémentés avec du PCP qui étaient très similaires.

La structure et la composition du biofilm présent dans les quatre réacteurs anaérobies à FF ont été investiguées à l'aide du FISH et de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM). Ces analyses ont permis de déterminer que les cellules de *D. frappieri* PCP-1 étaient présentes de manière dispersée dans le biofilm des réacteurs supplémentés avec du PCP et étaient relativement abondantes (17-19 %) après 257 jours d'opération. Les cellules de *D. frappieri* PCP-1 étaient présentes en faible quantité (<1 %) dans le biofilm des bioréacteurs P0 et Nf. Ceci suggère que les cellules de *D. frappieri* PCP-1 prolifèrent dans le biofilm seulement si cette association est avantageuse pour la communauté.



Étudiant



Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le docteur Richard Villemur, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son appui constant, sa grande disponibilité ainsi que ses nombreux conseils judicieux en matière de biologie moléculaire m'ont grandement aidé à la réussite de mon projet.

J'aimerais également remercier le docteur Réjean Beaudet, pour ses multiples conseils et suggestions, et aussi pour m'avoir permis de pratiquer mes talents d'enseignant.

Je dois aussi remercier le docteur Pierre Juteau, pour son aide précieuse quant au design et au suivi des bioréacteurs à film-fixe.

Ce projet n'aurait pu être mené à terme sans l'aide et les nombreux conseils de plusieurs chimistes, dont le docteur François Lépine et monsieur Sylvain Milot à l'INRS-Institut Armand-Frappier et messieurs Alain Corriveau et Stéphane Deschamps à l'Institut de Recherche en Biotechnologie. Merci à vous tous !

Ma gratitude va également à monsieur Marcel Desrosiers, pour les multiples discussions et ses nombreux conseils sur les différentes facettes de l'imagerie digitale

Je ne peux passer sous silence l'aide et les nombreux conseils apportés par les agents techniques Rita Alary et Louis Racine. Merci à vous deux !

Merci également aux docteurs Serge Guiot et Boris Tartakovsky pour m'avoir gracieusement accueilli dans leur laboratoire lors des travaux sur les boues granulaires et pour m'avoir fait partager leur grande expérience en matière de bioréacteurs anaérobies.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Marie-Josée Lévesque, pour m'avoir si bien intégré au groupe de recherche du Dr Guiot et aussi pour les innombrables discussions sur la technique d'hybridation *in situ*.

Merci également aux nombreuses autres personnes qui ont contribué à rendre mon séjour à l'INRS-Institut Armand-Frappier et à l'Institut de Recherche en Biotechnologie si agréable.

Finalement, j'aimerais remercier le Fonds FCAR ainsi que la Fondation Armand-Frappier pour leur appui financier.

Table des matières

Résumé	v
Remerciements	vii
Table des matières	viii
Liste des figures	xiii
Liste des tableaux	xv
Liste des abréviations.....	xvi
Introduction	1
Partie 1: Revue de littérature	5
1.1 Le pentachlorophénol.....	7
1.1.1 Propriétés physico-chimiques.....	9
1.1.2 Fabrication du PCP	9
1.1.3 Niveaux de contamination dans l'environnement	11
1.1.4 Toxicité.....	12
1.2 Les bioréacteurs	13
1.2.1 Biotraitements anaérobies.....	13
1.2.2 Bioréacteurs anaérobies	14
1.2.3 Bioréacteurs anaérobies dégradant des molécules halogénées.....	15
1.2.4 Bioaugmentation de bioréacteurs anaérobies pour la dégradation de molécules halogénées	16
1.3 Biodégradation du PCP en bioréacteurs anaérobies	17
1.4 Techniques permettant l'examen des biofilms	21
1.4.1 Immunofluorescence	21
1.4.2 Hybridation <i>in situ</i> de sondes fluorescentes	22
1.4.2.1 Fluorochromes.....	25
1.4.3 Coupes minces	25
1.4.4 Microscopie	27
1.4.4.1 Microscopie électronique à balayage	27
1.4.4.2 Microscopie à épifluorescence	27
1.4.4.3 Microscopie confocale à balayage laser.....	28
1.5 Les biofilms	31

1.5.1 Biofilms sur matrices solides	32
1.5.1.1 Structure et composition	32
1.5.1.2 Processus de formation	33
1.5.1.3 Différences phénotypiques entre les bactéries sessiles et planctoniques.....	38
1.5.2 Biofilms anaérobies sur matrices solides	41
1.5.2.1 Formation et structure	41
1.5.2.2 Composition en micro-organismes et dynamique.....	43
1.5.3 Boues granulaires	45
1.5.3.1 Composition.....	45
1.5.3.2 Composition en micro-organismes	47
1.5.3.3 Associations synthrophiques au sein des boues granulaires	48
1.5.3.4 Structure.....	49
1.5.3.5 Processus de formation	54
1.5.4 Biofilms dénitrifiants.....	55
1.6 <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	56
Partie 2: Articles scientifiques	61
2.1 Mise en contexte de l'article 1	63
2.2 Contribution de l'étudiant à l'article 1.....	63
2.3 Article 1: Microstructure of anaerobic granules bioaugmented with <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1.....	65
2.3.1 Résumé	66
2.3.2 Abstract	67
2.3.3 Introduction	68
2.3.4 Materials and methods	69
2.3.4.1 Microorganisms and enrichment conditions of the UASB bioreactor.....	69
2.3.4.2 Oligonucleotide probes	69
2.3.4.3 FISH	71
2.3.4.4 Multispecies biofilm model	73
2.3.5 Results	77
2.3.5.1 FISH	77
2.3.5.2 Modeling of biofilm colonization by <i>D. frappieri</i> PCP-1.....	79

2.3.6 Discussion.....	86
2.3.7 Acknowledgement	91
3.1 Mise en contexte de l'article 2	92
3.2 Contribution de l'étudiant à l'article 2	92
3.3 Article 2: Anaerobic fixed-film bioreactors supplemented with pentachlorophenol or nitrate I: methanogenesis, denitrification and biodegradation activities	93
3.3.1 Résumé	94
3.3.2 Abstract.....	95
3.3.3 Introduction	96
3.3.4 Materials and methods.....	97
3.3.4.1 Microorganisms.....	97
3.3.4.2 Anaerobic FF bioreactors	98
3.3.4.3 Reactor monitoring.....	100
3.3.4.4 Detection of <i>Desulfitobacterium</i> bacteria in anaerobic granular sludge... ..	104
3.3.4.5 DNA extraction, PCR and DGGE profiling.....	104
3.3.5 Results	107
3.3.5.1 Reactor monitoring.....	107
3.3.5.2 PCP biodegradation capacities	114
3.3.5.3 Denitrification activity	114
3.3.5.4 PCR monitoring of <i>D. frappieri</i> PCP-1 in bioreactors.....	116
3.3.5.5 <i>Archaea</i> and <i>Eubacteria</i> population profiles.	119
3.3.5.5.1 <i>Eubacteria</i> population profiles.	119
3.3.5.5.2 <i>Archaea</i> population profiles.....	123
3.3.6 Discussion.....	129
3.3.6.1 Reactor monitoring.....	129
3.3.6.2 PCP biodegradation capacities	133
3.3.6.3 Denitrification activity	137
3.3.6.4 PCR monitoring of <i>D. frappieri</i> PCP-1 in bioreactors.....	138
3.3.6.5 <i>Archaea</i> and <i>Eubacteria</i> population profiles	140
3.3.6.5.1 <i>Eubacteria</i> population profiles	140
3.3.6.5.2 <i>Archaea</i> population profile	144

3.3.7 Conclusion.....	146
3.3.8 Acknowledgements	146
4.1 Mise en contexte de l'article 3.....	147
4.2 Contribution de l'étudiant à l'article 3.....	147
4.3 Article 3: Anaerobic fixed-film bioreactors fed with pentachlorophenol or nitrate II: spatial arrangement of bacterial communities in biofilms.....	148
4.3.1 Résumé	149
4.3.2 Abstract	150
4.3.3 Introduction	151
4.3.4 Materials and methods	154
4.3.4.1 Microorganisms, reactor design and monitoring	154
4.3.4.2 FISH on pure culture samples	154
4.3.4.3 FISH on biofilm samples	157
4.3.5 Results	159
4.3.5.1 Optimization conditions of FISH for <i>D. frappieri</i> PCP-1.....	159
4.3.5.2 FISH on biofilm samples from the reactors.....	161
4.3.5.3 FISH of biofilm samples from the P0 reactor	163
4.3.5.4 FISH of biofilm samples from the Of reactor	163
4.3.5.5 FISH of biofilm samples from the Nf reactor	166
4.3.5.6 Quantification of the microbial population in biofilm.....	166
4.3.6 Discussion	168
4.3.6.1 FISH of pure cultures of <i>D. frappieri</i> PCP-1	168
4.3.6.2 FISH of biofilm samples from the reactors under study	172
4.3.7. Conclusion.....	179
4.3.8. Acknowledgements	180
Conclusion	181
Appendices: Autre article publié.....	187
Article A: Strategies for augmenting the pentachlorophenol degradation potential of UASB anaerobic granules.....	189
A1. Résumé	190
A2. Abstract	191

A3. Introduction	192
A4. Materials and methods.....	192
A4.1 Operating conditions	192
A4.1.1 Inocula.....	192
A4.1.2 Reactors.....	192
A4.2 Analytical methods.....	193
A4.3 DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR)	193
A4.4 Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (FISH) of granule cross sections	194
A5. Results and discussion	195
A5.1 Enrichment by optimal selective stress	195
A5.2 Bioaugmentation with a pure strain.....	198
A5.3 Topography of the bioaugmented granule.....	199
A6. Conclusions	201
A7. Acknowledgement	201
Liste des références	202

Liste des figures

Fig. 1.1. Voie empruntée par le laser dans un microscope confocal à balayage laser.....	29
Fig. 1.2. Structure d'un biofilm (CBE ressource library, 2004).....	34
Fig. 1.3. Modèle de développement d'un biofilm.....	35
Fig. 1.4. Système-type de « quorum sensing » pour la formation des biofilms.	39
Fig. 1.5. Structure des populations de micro-organismes dans des boues granulaires nourries avec du glucose et utilisation des différents produits de dégradation dans les boues granulaires.....	50
Fig. 2.1. Images of anaerobic granules taken from a UASB reactor augmented with <i>D. frappieri</i> PCP-1 and hybridized with fluorescent probes coupled to Cy3 (red) or Cy5 (red) and counterstained with DAPI (blue).	78
Fig. 2.2. Profiles of specific areas hybridized with S-S-D.frap-327(<i>D. frappieri</i>)-a-A-19 probe after 1 (A), 5 (B), and 9 (C) weeks of reactor operation.	81
Fig. 2.3. Images of anaerobic granules taken from a UASB reactor augmented with <i>D. frappieri</i> PCP-1, after 9 weeks of operation.	82
Fig. 2.4. Distribution of strain PCP-1 (x1), acidogenic (x2), and methanogenic (x3) bacteria (A) and of substrates and intermediates (B) predicted by the biofilm model.	84
Fig. 2.5. The effect of specific growth rate and bacterial diffusion on the distribution of strain PCP-1 in the biofilm.....	85
Fig. 3.1. Schematic overview of the fixed-film bioreactors.	99
Fig. 3.2. Gas production by the anaerobic FF bioreactors.....	110
Fig. 3.3. VFA degradation in the anaerobic FF bioreactors.	112
Fig. 3.4. Biodegradation of CPs in the anaerobic FF bioreactors.....	115
Fig. 3.5. Transformation of nitrate in nitrite by a pure culture of <i>D. frappieri</i> PCP-1...117	
Fig. 3.6. PCR-DGGE migration profiles of the anaerobic FF bioreactors after 56 days of operation.....	121
Fig. 3.7. <i>Eubacteria</i> PCR-DGGE migration profiles of the Pf reactors during the first two months of operation. A: liquid phase, B: biofilm,.....	122
Fig. 3.8. <i>Archaea</i> PCR-DGGE migration profiles of FF reactors during the first two months of operation. A: Of reactor, B: Nf reactor.	127

Fig. 4.1. Denaturation curves of fluorescent probes following FISH with pure cultures of <i>D. frappieri</i> PCP-1. Probes were coupled to A) CY3 and B) CY5.....	160
Fig. 4.2. Images of <i>D. frappieri</i> PCP-1 cells grown in pure culture	162
Fig. 4.3. CLSM cross-section images of the anaerobic biofilm present in the P0 reactor.	
.....	164
Fig. 4.4. CLSM cross-section images of the anaerobic biofilm present in the O _f reactor.	
.....	165
Fig. 4.5. CLSM cross-section images of the anaerobic biofilm present in the Nf reactor fed with nitrate and inoculated with <i>D. frappieri</i> PCP-1.....	167
Fig. A.1. Volumetric PCP load and methane production in the PCP-fed UASB reactor (first run, non-augmented), as a result of the operation with on-line feedback control.	
.....	197
Fig. A.2. Average intensity profiles of granules hybridized with Cy3-PCP-1-4 after one (A) and 9 weeks (B) of reactor operation.....	200

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Propriétés physico-chimiques du PCP.....	10
Tableau 1.2. Dégradation du PCP dans des bioréacteurs anaérobies.	18
Tableau 1.3. Caractéristiques de quelques fluorochromes communément utilisés pour la technique du FISH en écologie microbienne.	26
Table 2.1. Sequences of oligonucleotide probes targeting 16S rDNA sequences	70
Table 2.2. Model parameters.....	76
Table 2.3. Comparison of UASB granules bioaugmented with dehalogenating anaerobic strains.	88
Table 3.1. Start-up and operation conditions of anaerobic FF bioreactors.	101
Table 3.2. Sequence of PCR primers used.	105
Table 3.3. PCR detection of <i>D. frappieri</i> PCP-1 in the anaerobic FF bioreactors.....	118
Table 3.4. Number of bands detected after DGGE profiling of samples taken from the bioreactors after 56 days of operation.	124
Table 3.5. Number of comigrating <i>Eubacteria</i> DGGE DNA fragments between the four FF bioreactors after 56 days of operation.....	125
Table 3.6. Number of comigrating <i>Archaea</i> DGGE DNA fragments between the four FF bioreactors after 56 days of operation	128
Table 4.1. Characteristics of the oligonucleotide probes.	155
Table 4.2. Proportion of <i>Eubacteria</i> , <i>Archaea</i> and <i>D. frappieri</i> in the bioreactor biofilm.	169

Liste des abréviations

- AI: autoinductrice
- ARDRA: Analyse de restriction de l'ADN ribosomal amplifié / amplified ribosomal DNA restriction analysis
- ATIA: acide 5-amino-2,4,6-triiodoisophtalique / 5-amino-2,4,6-triiodoisophthalic acid
- AU: unités arbitraires / arbitrary units
- bp: paires de bases / base pairs
- CLSM: microscope confocal à balayage laser / confocal laser scanning microscope
- COD: demande chimique en oxygène / chemical oxygen demand
- CB: chlorobenzoate
- CP: chlorophénol / chlorophenol
- DCP: dichlorophénol / dichlorophenol
- DDT: dichloro-diphényl-trichloroéthane (1,1,1-trichloro-2,3-di-[4-chlorophényl]éthane)
- DGGE: électrophorèse sur gel à gradient dénaturant / denaturing gradient gel electrophoresis
- EPS: exopolysaccharides
- FF: film-fixe / fixed-film
- FISH: hybridation *in situ* de sondes fluorescentes / fluorescent *in situ* hybridization
- GC-FID: chromatographie en phase gazeuse-ionisateur à flamme / gas chromatography-flame ionisation device
- HPLC: chromatographie liquide à haute pression / high pressure liquid chromatography
- HRT temps de rétention hydraulique / hydraulic retention time
- HSL: homosérine lactone / homoserine lactone
- IF: Immunofluorescence
- LPS: lipopolyssacharides
- MCP : monochlorophénols / monochlorophenols
- NA: ouverture numérique / numerical aperture
- NED: N-1-naphtylethylenediamine dihydrochloride
- nt : nucléotide / nucleotide
- OD: densité optique / optical density
- PBS: tampon phosphate salin / phosphate buffered saline

PCB: biphenyl polychlorés / polychlorinated biphenyls

PCE : perchloroéthylène, tétrachloroéthylène / perchloroethylene, tetrachloroethylene

PCP: pentachlorophénol / pentachlorophenol

PCR: réaction de polymérisation en chaîne / polymerase chain reaction

PEC: polymères extra-cellulaires/ extracellular polymers

PVPP: polyvinylpolypyrrolidone

QS: “quorum sensing” / quorum sensing

rDNA: ADN ribosomal / ribosomal DNA

RFLP: restriction fragment length polymorphism / polymorphisme de longueur des fragments de restriction

rRNA : ARN ribosomal / ribosomal RNA

SEM: microscopie électronique à balayage / scanning electron microscopy

SRB: bactéries sulfato-réductrices / sulfate-reducing bacteria

TCP: trichlorophénol / trichlorophenol

TCE: trichloroéthène / trichloroethene

TeCP: tétrachlorophénol / tetrachlorophenol

TOC: carbone organique total / total organic carbon

UASB: lit de boues anaérobies à flux ascendant ou réacteur à boues granulaires / upflow anaerobic sludge bed

VSS: solides volatils en suspension / volatile suspended solids

VFA: acides gras volatils / volatile fatty acids

Introduction

C'est avec la parution du livre « Silent Spring » de Rachael Carson en 1962 que le grand public autant que les scientifiques sont appelés à se poser d'importantes questions sur l'utilisation à grande échelle des composés organiques chlorés sur l'environnement. Bien que ce livre dénonce tout particulièrement l'utilisation abusive du DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane ou 1,1,1-trichloro-2,3-di-[4-chlorophényl]éthane), plusieurs autres produits organiques synthétiques sont utilisés à cette époque à grande échelle sans égard à leurs effets sur l'environnement. Parmi ces produits, on retrouve notamment les biphenyls polychlorés (PCBs), le tétrachloroéthylène (PCE) ainsi que le pentachlorophénol (PCP).

Le PCP est utilisé depuis les années 1930 pour la préservation du bois ainsi que comme biocide. Il est aussi retrouvé dans des effluents de l'industrie des pâtes et papiers. Des millions de tonnes de PCP ont donc été relâchées dans l'environnement et ce produit a contaminé les sols, les sédiments et les eaux souterraines. Le PCP est extrêmement毒ique, s'accumule dans la chaîne alimentaire et est suspecté avoir un pouvoir carcinogène. Cette molécule apparaît sur la liste des polluants prioritaires de la U.S. Environmental Protection Agency (Bajpai et Banerji, 1992).

Il existe plusieurs types de traitements pour la décontamination des environnements pollués par le PCP. Des traitements physico-chimiques ou thermiques existent déjà mais possèdent plusieurs désavantages malgré leur grande efficacité. Par exemple, leur utilisation est généralement très coûteuse et peut modifier de manière importante l'environnement à décontaminer. Ces problèmes peuvent être surmontés par l'utilisation de traitements biologiques, appelés aussi biotraitements. Ces traitements sont basés sur les capacités de dégradation des micro-organismes. Les biotraitements peuvent être divisés en deux groupes, soit les biotraitements *in situ* (directement sur le site contaminé) et *ex situ* (nécessitant le transport des matières contaminées au site de traitement). Les micro-organismes effectuant la dégradation peuvent également être divisés en deux groupes, soit les micro-organismes aérobies et anaérobies.

L'utilisation de micro-organismes anaérobies pour la décontamination des sites pollués comporte plusieurs avantages, comparativement à l'utilisation de micro-organismes aérobies. Par exemple, les coûts d'opération de systèmes anaérobies peuvent

être inférieurs aux systèmes aérobies, car ils ne nécessitent pas de système d'aération et le méthane produit peut être récupéré (Angelidaki *et al.*, 2003). Également, les bactéries anaérobies sont reconnues pour être capables de dégrader certains produits fortement chlorés plus facilement que les bactéries aérobies (Wang *et al.*, 1995). Un autre avantage non négligeable des biotraitements anaérobies est leur plus grande applicabilité dans les traitements *in situ*, puisque beaucoup de sites contaminés sont des environnements anaérobies (sols, sédiments, eaux souterraines).

L'utilisation de bioréacteurs anaérobies est également avantageuse pour la dégradation du PCP. Les bioréacteurs peuvent être classés en deux types, soit les réacteurs à biofilm et les réacteurs à croissance en suspension (Skiadas *et al.*, 2003). Les biofilms, tels que définit par Costerton *et al.* (1995), sont des populations bactériennes incluses dans une matrice et adhérents entre-elles et/ou à des surfaces ou interfaces. L'utilisation des réacteurs à biofilms est avantageuse comparativement aux systèmes exploitant des bactéries en suspension. Par exemple, les bioréacteurs à biofilms peuvent contenir une biomasse plus importante et peuvent être opérés à des temps de rétention hydrauliques (HRT) plus élevés sans lessivage de la biomasse. Également, l'absence de système mécanique d'agitation diminue les coûts d'opération (Skiadas *et al.*, 2003). Bien que des bioréacteurs aérobies à biofilm existent également, les bioréacteurs anaérobies possèdent plusieurs avantages, dont la production d'une plus faible quantité de biomasse dans le système, ce qui réduit le colmatage (Kosaric et Blaszczyk, 1990; Skiadas *et al.*, 2003).

Il existe toutefois certains désavantages à l'utilisation de bactéries anaérobies dans les systèmes de biotraitement. D'abord, les micro-organismes anaérobies fonctionnent souvent en consortium. Les interactions entre les différents membres de ces consortiums sont complexes et le manque de connaissances à leur propos limite l'utilisation des traitements anaérobies. Également, plusieurs bactéries anaérobies croissent très lentement, ce qui peut ralentir le démarrage des traitements anaérobies. Enfin, les bactéries anaérobies sont souvent sensibles aux variations dans les conditions de cultures (présence de nouveaux produits dans l'influent, concentrations des produits dans l'effluent, température, etc.) et nécessitent un certain temps pour s'y adapter. Toutefois, la bioaugmentation de souches bactériennes ayant des capacités de dégradation

spécifiques peut accélérer l'adaptation de ces consortiums anaérobies à de nouveaux produits à dégrader. Aussi, l'étude de ces consortiums microbiens permettrait de mieux comprendre leur fonctionnement et ainsi améliorer de manière générale l'efficacité des traitements anaérobies.

Les chercheurs du groupe de microbiologie de l'environnement de l'INRS-Institut Armand-Frappier ont isolé, à partir d'un consortium méthanogène dégradant complètement le PCP, une bactérie possédant la capacité de déshalogénérer le PCP en 3-monochlorophénol (3-MCP). Nommée *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, cette souche bactérienne constitue le seul micro-organisme anaérobie pouvant déshalogénérer le PCP en position *ortho*, *meta* et *para* (Bouchard *et al.*, 1996). Les travaux de Dennie *et al.* (1998) ont permis de démontrer que cette souche possédait un spectre d'activité large, puisqu'elle peut déshalogénérer, en plus de différents chlorophénols (CPs), plusieurs autres molécules halogénées. Également, des outils moléculaires tels que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Lévesque *et al.*, 1997) et le PCR compétitif (Lévesque *et al.*, 1998) ont déjà été mis au point afin de détecter et quantifier la souche PCP-1 dans différents environnements. Un protocole d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) a aussi été mis au point afin de détecter et quantifier la souche PCP-1 par cytométrie en flux dans un milieu liquide (Da Silva, 2000).

La souche PCP-1 est capable de compétitionner avec les micro-organismes retrouvés dans les flores mixtes de différents environnements suite à son inoculation. Par exemple, il a déjà été démontré que cette souche pouvait s'implanter dans des bioréacteurs rotatifs contenant des sols contaminés (Lanthier *et al.*, 2000) ainsi que dans des bioréacteurs à boues granulaires (Tartakovsky *et al.*, 1999) et y effectuer la dégradation du PCP. L'inoculation de la souche PCP-1 dans le bioréacteur à boues granulaires (UASB) a permis d'augmenter la charge en PCP entrant dans le réacteur de 5 à 80 mg_{PCP} l_R⁻¹ j⁻¹. La population de bactéries PCP-1 a également augmenté suite à son inoculation, passant de 10⁶ à 10¹⁰ cellules par g de solides volatils en suspension (VSS) (Tartakovsky *et al.*, 1999). Toutefois, ces travaux n'ont pas permis de déterminer la disposition de la souche PCP-1 dans les granules anaérobies. L'utilisation de la technique de FISH pourrait permettre de déterminer la disposition de la souche PCP-1 non seulement dans les boues granulaires, mais également dans d'autres types de biofilms.

Le but de ce projet de recherche consiste donc à déterminer la disposition spatiale de la souche PCP-1 dans différents biofilms retrouvés dans des bioréacteurs anaérobies. Ces connaissances permettront de mieux comprendre le fonctionnement des micro-organismes anaérobies fonctionnant en consortium, d'acquérir des connaissances sur les biofilms anaérobies et aussi de mieux connaître le comportement des bactéries ayant des capacités de dégradation dans les biofilms. Ces connaissances permettront d'améliorer les performances des biotraitements anaérobies.

Les différents objectifs spécifiques associés à ce projet de recherche sont:

- 1- Adapter le protocole de FISH pour la détection de la souche PCP-1 en milieu liquide pour son application à des biofilms ;
- 2- Déterminer la disposition de la souche PCP-1 dans les boues granulaires du bioréacteur UASB inoculé par Tartakovsky *et al.* (1999) et exposés à du PCP à l'aide de la technique de FISH ;
- 3- Déterminer la disposition de la souche PCP-1 dans des bioréacteurs à film-fixe (FF) inoculés avec des boues granulaires désagrégées et supplémentés avec du PCP ou du nitrate ;
- 4- Quantifier la souche PCP-1 dans les bioréacteurs à FF à l'étude par une technique d'imagerie digitale.

Cette thèse est présentée sous la forme d'une thèse par articles. Elle est donc divisée en deux parties distinctes, selon les modalités et règles de présentation des mémoires et thèses à l'INRS. La première partie est constituée d'une revue de littérature alors que la seconde partie présente trois articles scientifiques publiés au cours de ce doctorat ou qui seront soumis sous peu pour publication. Un dernier article publié en collaboration avec d'autres chercheurs lors de ce doctorat est présenté à l'appendice A.

Partie 1: Revue de littérature

1.1 Le pentachlorophénol

Le PCP a été introduit sur le marché dès 1936 (Jensen, 1996). D'abord utilisé comme antiseptique, les qualités de biocide non-spécifique de ce produit ont favorisé son utilisation généralisée (Rao, 1978; Crosby, 1981). Ainsi, le PCP a été utilisé comme biocide dans plusieurs produits, dont les adhésifs, le caoutchouc, les huiles, les nettoyants à tapis, les peintures et les textiles. Ce produit a également été ajouté à l'eau de plusieurs systèmes de refroidissement industriels. Le PCP a aussi été utilisé dans plusieurs procédés industriels, comme le blanchiment des pâtes et papiers. Aussi, jusqu'à récemment le PCP était le pesticide le plus utilisé de la planète (Bevenue et Beckman, 1967; Cirelli, 1978; Crosby, 1981; Brudermann, 1999).

La plus grande partie du PCP fabriqué a été utilisée pour le traitement du bois (Rao, 1978; Crosby, 1981). Le traitement du bois avec du PCP permet d'augmenter sa durée de vie, pouvant la faire passer de 5 à 40 ans, dépendamment du procédé utilisé pour l'imprégnation, de l'essence choisie et de l'utilisation (Crosby, 1981; Brudermann, 1999). Cette efficacité est occasionnée par l'effet de biocide généralisé du PCP qui élimine les agents biologiques responsables de la dégradation du bois (insectes, champignons et autres micro-organismes ou xylophages marins). 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 de chemins de fer (Hoos, 1978; Brudermann, 1999). Différents procédés sont utilisés pour le traitement du bois, soit l'imprégnation, sous pression ou par un procédé thermique. En Amérique du Nord, le bois est surtout traité par des procédés sous pression. Le PCP doit d'abord être dissout dans de l'huile de pétrole à une concentration de 5-8 % avant de traiter le bois. Cette huile sert de vecteur au PCP et protège également le bois de l'humidité (Brudermann, 1999).

La production annuelle mondiale de PCP entre 1981 et 1987 variait entre 25 000 et 100 000 tonnes (Crosby, 1981; Butte *et al.*, 1985; World Health Organization, 1987). Au Canada, la production annuelle était d'environ 1 770 tonnes par an au cours de la même période (Jones, 1984). Stephens *et al.* (1994) font mention de 1 442 tonnes de PCP utilisées au Canada lors de l'année 1992. Cirelli (1978) et Brudermann (1999) ont évalué que la fraction de PCP utilisé au Canada pour le traitement du bois variait entre 80

% et 90 %. En 1982, la quantité de bois traité au Canada était estimée à 253 000 m³ (Brudermann *et al.*, 1982). En 1978, il y avait plus de 150 millions de poutres traitées qui étaient 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 fabriqués au Canada, dont 5 % à 10 % servait au remplacement des poteaux endommagés (Hoos, 1978). Pour la province de Québec seulement, la compagnie Hydro-Québec comptait à elle seule en 1991 plus de 1,5 millions de poteaux traités pour la plupart au PCP. Ce réseau nécessite environ 80 000 nouveaux poteaux chaque année pour son entretien et son amélioration (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). À cause de la grande toxicité associée à ce produit, l'utilisation du PCP dans les produits de consommation a été interdite en 1984 (Bajpai et Banerji, 1992). Le PCP est donc maintenant utilisé au Canada exclusivement pour les poteaux de ligne et pour la préservation du bois extérieur (Brown *et al.*, 1999; Brudermann, 1999). Le Canada a cessé la fabrication du PCP en 1983 suite à des études entreprises par Environnement Canada (Konasewich et Henning, 1988; Brudermann, 1999). Même s'il n'est plus fabriqué au Canada, le PCP est toujours utilisé et provient de fournisseurs américains (Brudermann, 1999), mais son utilisation au Canada est en diminution depuis 1981. En effet, le bois traité au PCP a été graduellement remplacé par un traitement à l'arséniate de cuivre et de chrome pour les poteaux utilisés par les services publics alors que le bois servant à la fabrication de chemins de fer est maintenant traité avec un mélange huile-créosote (Brudermann, 1999). 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, sans compter les sédiments de plusieurs cours d'eau contaminés par les effluents industriels.

1.1.1 Propriétés physico-chimiques

Le PCP est un composé halogéné semi-volatile se présentant sous la forme d'un cristal chamois et correspondant à la structure chimique C_6Cl_5OH . Bien que peu soluble dans l'eau ($0,014 \text{ g l}^{-1}$, à pH 7,0 et 20°C), sa solubilité augmente avec la température et le pH. Le PCP sous forme de sel de sodium (PCP-Na) est plus soluble dans l'eau que la forme originale ($22,4 \text{ g l}^{-1}$, à 20°C). Le PCP est aussi soluble dans plusieurs solvants organiques, dont l'acétone, le benzène, l'éthanol et le méthanol. Le PCP est également soluble dans les huiles et les lipides. Sa capacité d'adsorption aux solides organiques comme la cellulose en fait une de ses principales qualités pour la préservation du bois (World Health Organization, 1987; Ottou, 1991; Davis *et al.*, 1994; Loubier, 1996; Brudermann, 1999). Les propriétés physico-chimiques du PCP sont présentées au Tableau 1.1.

1.1.2 Fabrication du PCP

Le PCP est produit par la chloruration de molécules de phénol en présence d'un catalyseur. La première étape consiste en un chauffage de ces molécules à 105°C , ce qui permet de créer des isomères de trichlorophénol (TCP) et de tétrachlorophénol (TeCP). La seconde étape consiste à augmenter graduellement la température de la réaction afin de maintenir les réactifs en état de fusion et ainsi poursuivre la chloruration des molécules de TCP et TeCP en PCP. Le PCP de grade technique contient plusieurs impuretés, dont du TeCP (4 à 12 %), des phénoxyphénols chlorés (1 à 5 %) et des traces de chlorodioxines, de chlorofurannes, de diphenyles éthers chlorés, de dibenzofurannes et de dihydroxybiphényles (Cirelli, 1978; Nilsson *et al.*, 1978; Brudermann, 1999).

Il est maintenant connu que plusieurs milliers d'organismes vivants dont des micro-organismes, des algues, des champignons, des lichens, des plantes et des organismes supérieurs tels que les mammifères peuvent produire des molécules chlorées. Plus de 1 500 métabolites organochlorés produits naturellement sont maintenant connus. Bien que la plupart de ces produits ne possèdent pas d'activité xénobiotique, il est possible que ces molécules subissent différentes transformations dans l'environnement et que certaines de ces transformations mènent à la formation de molécules plus toxiques (Siuda et DeBernardis, 1973; Oberg *et al.*, 1990; De Jong *et al.*, 1994; Oberg, 2002). En

Tableau 1.1. Propriétés physico-chimiques du PCP.

Propriété	Condition	Valeur
Formule moléculaire		C ₆ Cl ₅ OH
Structure chimique		
Coefficient de partition <i>n</i> -octanol/eau (log P)	pH 7,2	3,32
Densité relative	Air = 1	9,2
	Eau = 1	2,0
pKa	25°C	4,7
Poids moléculaire		266,35 g mol ⁻¹
Point d'ébullition		310°C (décomposition)
Point de fusion		188 - 191°C
Pression de vapeur	20°C	2 x 10 ⁻⁶ kPa (1,5 x 10 ⁻⁵ mm _{Hg})
Solubilité		
Acétone	25°C	500 g _{PCP} l _{solvant} ⁻¹
Benzène	25°C	150 g _{PCP} l _{solvant} ⁻¹
Éthanol (95 %)	25°C	1 200 g _{PCP} l _{solvant} ⁻¹
Eau	20°C pH 7	2 g _{PCP} l _{solvant} ⁻¹
	20°C pH 10	15 g _{PCP} l _{solvant} ⁻¹
Gras	37°C	213 g kg ⁻¹
Méthanol	25°C	1 800 g _{PCP} l _{solvant} ⁻¹
Tension de vapeur	20°C	1,1 - 1,7 x 10 ⁻⁴ mm _{Hg}

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

ce qui concerne les chlorophénols (CPs), certaines espèces de champignons sont capables d'en produire naturellement. Par exemple, *Penicillium* spp. est capable de synthétiser du 2,4-dichlorophénol (DCP) (Ando *et al.*, 1970). Aussi, des bromophénols sont produits naturellement par différentes espèces d'éponges marines (Ahn *et al.*, 2003) et différentes espèces de vers et même des tiques produisent différents phénols halogénés (Mogensen *et al.*, 2003). Dans le cas du PCP, les travaux d'Arsenault (Arsenault, 1976) n'ont pas permis de déterminer clairement qu'il existait un niveau basal de PCP dans l'environnement et les travaux de Siuda (Siuda, 1980) avec des enzymes n'ont pas permis de synthétiser du PCP. Ces travaux laissent donc croire que le PCP n'est pas produit naturellement (Brudermann, 1999).

1.1.3 Niveaux de contamination dans l'environnement

Certaines limites sur les concentrations de PCP pouvant être retrouvées dans l'environnement sont imposées au Canada. Dans le cas de l'eau, la concentration acceptable maximale de PCP pour l'eau potable est de $60 \mu\text{g l}^{-1}$ et l'objectif est de réduire cette concentrations à moins de $30 \mu\text{g l}^{-1}$ (Conseil canadien des ministres de l'environnement, 2002). L'objectif à long terme est de réduire les concentrations de PCP environnementales à $0,4 \mu\text{g l}^{-1}$ pour les Grands Lacs (Comité des objectifs des écosystèmes aquatiques, 1980). Les normes pour les concentrations en PCP dans le sol au Canada sont de $7,6 \text{ mg kg}^{-1}$ pour les sols (Conseil canadien des ministres de l'environnement, 2002) et de $0,4 \text{ ppm}$ dans les sols servant à l'agriculture (Webber et Singh, 2003).

Les concentrations en PCP retrouvées dans les eaux de surface varient entre 0,1 et $1,0 \mu\text{g l}^{-1}$ avec des valeurs maximales de $11 \mu\text{g l}^{-1}$. Près des usines de traitement du bois, les concentrations en PCP peuvent varier entre 0,07 et $31,9 \mu\text{g l}^{-1}$ pour les eaux de surface et de 3 à $23 \mu\text{g l}^{-1}$ pour les eaux souterraines, mais des concentrations de l'ordre du mg l^{-1} ont déjà été détectées près de décharges industrielles (World Health Organization, 1987). Des concentrations en PCP de 25 à 150 mg l^{-1} (Crosby, 1981) et de plus de $200 \mu\text{g l}^{-1}$ (Jones et Zabel, 1988) ont déjà été détectées dans les effluents d'usines de traitement du bois et des effluents de l'industrie de pâtes et papiers, respectivement. L'analyse

d'échantillons de sédiments prélevés dans le fleuve St-Laurent a révélé des concentrations en PCP de 46 ng g⁻¹ (Quémaraïs *et al.*, 1994).

Des analyses d'échantillons de sols prélevés près d'usines de traitement du bois ont révélé des concentrations en PCP allant jusqu'à 45,6 mg kg⁻¹. Près des usines de fabrication du PCP, ces concentrations atteignaient près de 100 µg kg⁻¹ (World Health Organization, 1987). D'autres recherches ont permis de déterminer que les sols de certaines usines de traitement du bois renfermaient des concentrations en CPs dépassant les 10 000 mg kg⁻¹ (Salkinoja-Salonen, 1990), mais que ces sols peuvent également être contaminés par les impuretés du PCP tel que des phén oxyphénols polychlorés (de 1 à 50 mg kg⁻¹) et des dibenzofurannes polychlorés (de 0,2 à 5 mg kg⁻¹) (Kitunen *et al.*, 1987).

1.1.4 Toxicité

Il existe une bonne corrélation entre la lipophilicité et la toxicité des molécules. Dans le cas des CPs, leur lipophilicité dépend du nombre et de l'emplacement des atomes de chlore sur le cycle benzénique. Le PCP est donc le plus toxique des chlorophénols, car il est le plus lipophile. La toxicité des molécules lipophiles telles le PCP est principalement associée au bris des membranes cellulaires. Le mécanisme d'action consiste en l'accumulation des molécules lipophiles dans les membranes cellulaires, ce qui augmente la fluidité des domaines fonctionnels de la bicouche lipidique et mène à l'inhibition des protéines associées à la membrane (par exemple les ATPases ou encore le système de transport du glucose) (Ravanel *et al.*, 1985; Cascorbi et Ahlers, 1989; Cascorbi et Foret, 1991).

Selon Weinbach et Garbus (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 (Desaiyah, 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. 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 MCPs augmente selon la

position des atomes de chlore par rapport à la fonction hydroxyle, soit *ortho* < *meta* < *para* (Ruckdeschel *et al.*, 1987).

Aussi, selon Crosby (Crosby, 1981) 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 cardio-vasculaire. Par contre, il y a peu de preuves menant à la conclusion que le PCP cause des effets défavorables pour la santé chez les personnes qui y ont été exposées de manière chronique (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).

1.2 Les biotraitements

Contrairement aux processus abiotiques basés sur des principes physiques ou chimiques, les biotraitements (ou bioprocédés) tirent parti des capacités de biodégradation des micro-organismes. Les biotraitements peuvent être divisés en deux groupes : les biotraitements *in situ* (directement sur le site contaminé) et les biotraitements *ex situ* (nécessitant le transport des matières contaminées au site de traitement). L'utilisation de biotraitements comporte plusieurs avantages comparativement aux traitements abiotiques : les biotraitements sont généralement moins dispendieux, ils possèdent l'avantage de dégrader efficacement les contaminants, ils sont plus facilement utilisables *in situ*, l'environnement traité n'est pas affecté de manière majeure et le risque de produire des molécules intermédiaires aussi néfastes, sinon plus, que le polluant original est beaucoup moins élevé. De plus, l'opinion publique est plus favorable à l'utilisation des bioprocédés plutôt que des traitements abiotiques pour décontaminer l'environnement (Providenti *et al.*, 1993; Samson, 1994).

1.2.1 Biotraitements anaérobies

Deux groupes de micro-organismes peuvent être utilisés dans les procédés de biodégradation, soit les micro-organismes aérobies et les micro-organismes anaérobies. L'utilisation de micro-organismes anaérobies peut être avantageuse comparativement à

l'utilisation de micro-organismes aérobies. Par exemple, les coûts d'opération de systèmes anaérobies peuvent être inférieurs aux systèmes aérobies, car ils ne nécessitent pas de système d'aération et le méthane produit peut être récupéré (Angelidaki *et al.*, 2003). Également, les bactéries anaérobies sont reconnues pour avoir plus de facilité à dégrader les molécules fortement chlorées que les bactéries aérobies (Wang *et al.*, 1995). Un autre avantage non négligeable des biotraitements anaérobies est leur plus grande applicabilité dans les traitements *in situ*, puisque beaucoup de sites contaminés sont des environnements anaérobies (sols, sédiments, eaux souterraines) (King *et al.*, 1992; Romantschuk *et al.*, 2000; Harayama, 2001).

Il existe toutefois certains désavantages à l'utilisation de bactéries anaérobies dans les systèmes de biotraitements. D'abord, les micro-organismes anaérobies fonctionnent souvent en consortium. Les interactions entre les différents membres de ces consortiums sont complexes et le manque de connaissances à leur propos limite l'utilisation des traitements anaérobies (Wang *et al.*, 1995; Hofman-Bang *et al.*, 2003). Également, plusieurs bactéries anaérobies croissent très lentement (Morris, 1994), ce qui peut ralentir le démarrage des traitements anaérobies. Enfin, les bactéries anaérobies sont souvent sensibles aux variations dans les conditions de cultures (présence de nouveaux produits dans l'influent, concentrations des produits dans l'effluent, température, etc.) et nécessitent un certain temps pour s'y adapter. Aussi, l'étude de ces consortiums microbiens permettrait de mieux comprendre leur fonctionnement et ainsi améliorer de manière générale l'efficacité des traitements anaérobies (King *et al.*, 1992; Angelidaki *et al.*, 2003).

1.2.2 Bioréacteurs anaérobies

Les bioréacteur anaérobies sont utilisés de manière routinière pour la dégradation des eaux usées industrielles et municipales contenant une forte charge en matière organique, mais ces traitements peuvent être adaptés pour la dégradation des xénobiotiques. Les bioréacteurs anaérobies peuvent être groupés en deux catégories, soit les bioréacteurs à biofilm et les bioréacteurs à culture en suspension. Les bioréacteurs basés sur les biofilms ont plusieurs avantages comparativement aux bioréacteurs basés sur des cultures en suspension (réacteur en agitation continue ou « continuously stirred-tank

reactor »). Par exemple, les bioréacteurs à biofilm peuvent supporter une plus grande quantité de biomasse, peuvent être opérés à un temps de rétention hydraulique (HRT) faible sans occasionner le lessivage de la biomasse et ne nécessitent pas de système d'agitation mécanique. Ces avantages permettent de diminuer considérablement le coût d'opération de ces systèmes (Pind *et al.*, 2003b; Skiadas *et al.*, 2003).

Il existe plusieurs types de bioréacteurs anaérobies basés sur des biofilms. Le plus utilisé et le mieux connu est sans aucun doute le lit de boues anaérobies à flux ascendant, mieux connu sous le nom de réacteur à boues granulaires (« upflow anaerobic sludge bed » ou UASB). Dans ce bioréacteur, la biomasse est retenue sous la forme de petits granules denses. Cet arrangement permet aux bactéries d'être très résistantes à des charges élevées de produits toxiques et également au lessivage. Le filtre anaérobie ou réacteur à film-fixe (FF) est basé sur la formation d'un biofilm sur un support compact dans le réacteur. Comparativement aux autres réacteurs anaérobies à biofilm, les bioréacteurs à FF sont avantageux puisqu'ils ont généralement une plus courte période de démarrage, n'ont pas besoin d'espace pour l'expansion du lit fluidisé et il n'y a aucun risque de lessivage accidentel de la biomasse. Un autre type de bioréacteur anaérobie basé sur les biofilms est le lit fluidisé. Ce type de réacteur est basé sur l'utilisation d'un support très fin qui est constamment remis en suspension par l'influent (Pind *et al.*, 2003b; Skiadas *et al.*, 2003).

1.2.3 Bioréacteurs anaérobies dégradant des molécules halogénées

Les bactéries anaérobies peuvent dégrader des molécules halogénées grâce à un processus nommé « déshalogénéation réductrice ». Lors de ce processus, un atome halogène est éliminé de la molécule halogénée alors que des électrons sont ajoutés à cette molécule. Il existe deux types de déshalogénéation réductrice, soit l'hydrogénolyse et la réduction vicinale. Lors de l'hydrogénolyse, l'atome halogène est remplacé par un atome d'hydrogène et du HCl est produit. Lors de la réduction vicinale (ou dihaloélimination), deux atomes halogènes adjacents sont éliminés et un lien supplémentaire est créé entre les atomes de carbone et deux atomes de Cl⁻ sont relachés (Mohn et Tiedje, 1992).

Les bioréacteurs anaérobies ont déjà été utilisés avec succès pour la dégradation de produits halogénés. Dans le cas des bioréacteurs UASB, ceux-ci ont déjà été utilisés

avec succès pour le traitements d'influents contaminés par du 3-chlorobenzoate (Ahring *et al.*, 1992), du PCE (Horber *et al.*, 1998), et différents CPs, dont le PCP (Woods *et al.*, 1989; Hendriksen *et al.*, 1992; Hendriksen et Ahring, 1993; Christiansen *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 1995; Christiansen et Ahring, 1996b; Droste *et al.*, 1998; Atuanya *et al.*, 2000; Tartakovsky *et al.*, 2001).

En ce qui concerne les bioréacteurs à FF, ceux-ci ont déjà démontré la capacité de dégrader plusieurs produits halogénés, dont le PCE (Vogel et McCarty, 1985; Fathepure et Tiedje, 1994; Noftsker et Watwood, 1997), l'acide 5-amino-2,4,6-triiodoisophtalique (ATIA) (Lecouturier *et al.*, 2003), le chloroforme, des chlorocatéchols, des chloroguaiaacols, des chlorovératroles, des résines acides chlorées (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1983), du 1-naphtol, du 2-nitrophénol (El Fantroussi *et al.*, 1998), du phénol (Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen et Ahring, 1993), des CPs (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1983; Krumme et Boyd, 1988; Themel *et al.*, 1996; El Fantroussi *et al.*, 1998), et du PCP (Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen et Ahring, 1993; Juteau *et al.*, 1995b; Beaudet *et al.*, 1997).

Les réacteurs à lit fluidisé ont été jusqu'ici peu utilisés pour la dégradation de produits xénobiotiques halogénés. Seulement les CPs et du PCP ont été testés avec succès (Hakulinen et Salkinoja-Salonen, 1982; Fahmy *et al.*, 1994; Khodadoust *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1999; Vallecillo *et al.*, 1999; Koran *et al.*, 2001).

1.2.4 Bioaugmentation de bioréacteurs anaérobies pour la dégradation de molécules halogénées

La biodégradation des polluants est influencée par divers facteurs, notamment les conditions environnementales, la présence des gènes de dégradation nécessaires, et le nombre de micro-organismes possédant ces gènes. Or, si l'activité de dégradation dans le biotraitemet n'est pas présente ou est très faible, il peut s'avérer nécessaire d'ajouter des micro-organismes possédant cette activité. Ce processus se nomme bioaugmentation (Mogensen *et al.*, 2003). Dans le cas des bioréacteurs anaérobies, l'adaptation à la dégradation de nouvelles substances peut s'avérer lente ou encore la dégradation peut s'avérer incomplète. Or, la bioaugmentation de souches bactériennes ayant des capacités

de dégradation spécifiques peut accélérer l'adaptation de ces consortiums anaérobies ou encore permettre de compléter la dégradation des xénobiotiques.

Certains travaux de bioaugmentation de bioréacteurs anaérobies avec des souches pures pour la dégradation de produits halogénés ont déjà été publiés. Un bioréacteur UASB inoculé avec *Sulfurospirillum* (anciennement *Dehalospirillum* (Luitjen *et al.*, 2003)) *multivorans* a permis de dégrader le PCE en dichloroéthylène, une amélioration comparativement à un réacteur contrôle n'ayant pas été inoculé avec cette souche et dégradant le PCE en trichloroéthène (TCE) (Horber *et al.*, 1998). Ahring *et al.* (1992) ont également étudié la bioaugmentation d'un bioréacteur UASB. Ces chercheurs ont bioaugmenté leur réacteur à l'étude avec *Desulfomonile tiedje* DCB-2, une bactérie ayant la capacité de dégrader le 3-chlorobenzoate, ce qui a permis au réacteur d'acquérir la capacité de dégrader ce produit. Aussi, Christiansen et Ahring (Christiansen et Ahring, 1996b) ont démontré que la bioaugmentation d'un bioréacteur UASB avec *Desulfitobacterium hafniense* contenant des granules stérilisés acquérait la capacité de dégrader le PCP. Cette souche est capable de déshalogénérer le PCP en 3,4,5-TCP. Ils ont opéré le réacteur avec une charge maximale de $42 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ j}^{-1}$ et ont obtenu 99 % de dégradation du PCP avec le 3,4,5-TCP comme intermédiaire, comparativement à aucune dégradation avec un réacteur ne contenant que des granules stérilisés (Tableau 1.2).

Pour leur part, Natarajan *et al.* (1996; 1997) ont bioaugmenté un bioréacteur UASB dégradant le PCP avec des échantillons de sédiments enrichi pour la dégradation des PCBs, ce qui a permis d'obtenir des boues granulaires dégradant à la fois le PCP et les PCBs, incluant la déshalogénération en position *ortho* (Natarajan *et al.*, 1996; Natarajan *et al.*, 1997). Il a également été démontré que ces granules peuvent minéraliser les biphenyles en méthane et dioxyde de carbone (Natarajan *et al.*, 1999).

1.3 Biodégradation du PCP en bioréacteurs anaérobies

Les divers travaux publiés sur la dégradation du PCP en bioréacteur anaérobie sont résumés au Tableau 1.2.

De tous les bioréacteurs anaérobies, le bioréacteur UASB a été le plus fréquemment adapté pour la dégradation du PCP. Les premiers travaux portant sur la dégradation de ce polluant en bioréacteur UASB ont été publiés par Woods *et al.* (1989).

Tableau 1.2. Dégradation du PCP dans des bioréacteurs anaérobies.

Bioréacteur	[PCP] nourrice (mg l ⁻¹)	Charge maximale (mg _{PCP} l _R ⁻¹ j ⁻¹)	HRT (j)	Volume réacteur (l)	Dégénération PCP (%)	Intermédiaires	Références
UASB	2,5	2,25	2	2	99	Surtout des DCPs (moins de 20 % du PCP total)	(Hendriksen <i>et al.</i> , 1992)
UASB	10-22,5	1,4	2	2	95	20 % de déchloruration complète	(Hendriksen et Ahring, 1993)
UASB	72,5	62	1,17	5	95	Moins de 5 % de 3-CP résiduel et 5 % de PCP résiduel	(Tartakovsky <i>et al.</i> , 1999)
UASB	0,51 0,10	Mixture de CPs contenant une charge en PCP maximale de 0,93 0,19	0,55	6,6	94,9 95-97	3-CP, 2,3-DCP, 3,5 DCP comme intermédiaires majeurs 2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TCP	(Woods <i>et al.</i> , 1989) (Woods <i>et al.</i> , 1989)
UASB	40-60	88-97	10.8-15h		99		(Wu <i>et al.</i> , 1993)
UASB	3	1	3	6		Concentration de 3-CP décroissante	(Duff <i>et al.</i> , 1995)
UASB	10,7	42	0,25	0,2	99	3,4,5-TCP	(Christiansen et Ahring, 1996b)
UASB		65	1,17	5	99	3,4,5-TCP, 3,5-DCP, 3-CP	(Tartakovsky <i>et al.</i> , 2001)
FF	3	1,5	2	0,250	98	20-40 % de déchloruration complète du PCP	(Hendriksen <i>et al.</i> , 1991; Hendriksen et Ahring, 1993)
FF	11,1	15,9	0,7	0,46	99	3,4-DCP, 3,5-DCP, 3-MCP	(Juteau <i>et al.</i> , 1995b)
FF	9,0-10,8	18,0	0,5-0,6	0,7	99	Aucun CPs ni phénol	(Beaudet <i>et al.</i> , 1997)

Lors de ces travaux, ces chercheurs ont démontré qu'un bioréacteur UASB pouvait dégrader une mixture de CPs contenant une charge maximale de $0.93 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ j}^{-1}$. Lors de cette expérience, plusieurs intermédiaires ont été retrouvés dans l'influent, mais les principaux produits de dégradation étaient le 2,3-DCP, le 3,5-DCP et le 3-CP, suggérant une activité de dégradation principalement en position *ortho*. Les atomes de chlore en position *meta* ont également été dégradés après une période d'adaptation de quatre semaines. Aucun MCP n'a été dégradé par le réacteur. De plus, ces chercheurs ont également répété la même expérience mais avec un influent ne contenant que du PCP. Ils ont remarqué la présence de 2,3,4,5-TeCP et de 3,4,5-TCP, démontrant encore une fois que l'activité de dégradation se situait principalement en position *ortho*.

Hendriksen *et al.* (1992) se sont également intéressés à la dégradation du PCP en bioréacteur UASB. Ces chercheurs ont démontré qu'un bioréacteur UASB supplémenté avec 0.9 g l^{-1} de glucose et exposé à une charge de $2.25 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ j}^{-1}$ avait une activité de dégradation du PCP supérieure à un bioréacteur contrôle n'ayant pas été supplémenté. En effet, le bioréacteur supplémenté avec du glucose a obtenu une performance de 99 % de dégradation du PCP (94 % de dégradation complète), comparativement au contrôle qui a obtenu une performance de dégradation du PCP variant entre 32 et 77 % (20 % de dégradation complète). Surtout des DCPs (mais aucun MCP) ont été détectés dans l'effluent du réacteur supplémenté alors qu'une mixture de PCP, TeCP et TCP ont été détectés dans le réacteur n'ayant pas été supplémenté. Ces chercheurs ont expliqué cette variation par la plus grande quantité de biomasse dans le réacteur supplémenté et par un effet stimulant du glucose sur l'activité de dégradation.

Les meilleures performances de biodégradation du PCP en bioréacteur anaérobie ont été obtenues avec un bioréacteur UASB (Wu *et al.*, 1993). Ce bioréacteur pouvait effectuer la dégradation de 99 % du PCP entrant dans le réacteur ($40 \text{ à } 60 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ j}^{-1}$ ou $88 \text{ à } 97 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ j}^{-1}$). Les temps de rétention hydraulique variaient entre 10,8 et 15 heures. De plus, aucun CP n'a été détecté dans l'effluent, suggérant une déchloruration complète du PCP. Des essais de minéralisation ont confirmé la transformation du [^{14}C]PCP en $^{14}\text{CH}_4$ et $^{14}\text{CO}_2$. 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 CO₂ et CH₄.

Duff *et al.* (1995) ont étudié le traitement d'eaux usées contenant du phénol et du PCP par un bioréacteur UASB. Ces chercheurs ont utilisé une charge maximale en PCP de 1 mg_{PCP} l_R⁻¹ j⁻¹ et ont remarqué la présence de 3-CP seulement comme intermédiaire de dégradation après 50 jours d'opération. Ils ont également avancé que ce réacteur aurait possiblement atteint une minéralisation complète du PCP s'il avait été opéré plus longtemps, puisque la concentration de 3-CP était en décroissance.

Tartakovsky *et al.* (2001) se sont également intéressés à la dégradation du PCP en bioréacteur UASB. Ces chercheurs ont effectué un enrichissement automatisé des boues granulaires pour la dégradation du PCP couplé à la production de méthane. Grâce à cette stratégie, la charge de PCP entrant dans le réacteur est passée de 2 à 65 mg_{PCP} l_R⁻¹ j⁻¹ avec un pourcentage de dégradation de plus de 99 %. La présence de 3-CP comme intermédiaire principal et de faibles quantités de 3,4,5-TCP, 3,5-DCP ont été détectés dans l'effluent.

D'autres chercheurs (Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen et Ahring, 1993) ont comparé la dégradation du PCP en conditions anaérobies dans un bioréacteur UASB et un bioréacteur à FF. Ces deux réacteurs ont été exposés à une charge maximale en PCP de 1,4-1,5 mg_{PCP} l_R⁻¹ j⁻¹. Ces chercheurs ont remarqué que la voie de dégradation était différente dépendamment du réacteur étudié. Toutefois, ces réacteurs ont été inoculés avec des inoculums différents, ce qui pourrait expliquer en partie les différences dans les voies de dégradation. Le réacteur UASB a été inoculé avec des boues granulaires provenant d'un réacteur UASB traitant des eaux usées contenant des sucres, alors que le réacteur à FF a été inoculé avec des boues d'épuration. Ces chercheurs ont également remarqué que l'activité de dégradation était supérieure et plus stable dans le réacteur UASB. Un pourcentage de dégradation du PCP variant entre 95 % et 98 % a été obtenu pour les deux réacteurs, mais seulement de 20 à 40 % de déchloruration complète a eu lieu dans le réacteur à FF, comparativement à 20 % dans le réacteur UASB. De plus, le HRT était beaucoup plus élevé dans le cas du réacteur à FF. En effet, l'activité de

dégradation est restée stable pendant 18 mois dans le réacteur UASB alors que dans le réacteur à FF, l'activité a diminué subitement après 15,5 mois d'opération. Toutefois, l'ajout d'extrait de levure dans l'influent du réacteur à FF a permis de restaurer l'activité et l'ajout de glucose dans l'influent des deux réacteurs a permis d'améliorer la stabilité de dégradation dans les deux réacteurs. Ces chercheurs suggèrent donc de choisir judicieusement l'inoculum de départ afin d'obtenir les meilleures performances.

Juteau *et al.* (1995b) se sont également intéressés à la capacité de dégradation d'un réacteur à FF pour la dégradation du PCP en conditions anaérobies. Ils ont obtenu plus de 99 % de dégradation du PCP avec une charge de $18 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ j}^{-1}$. Les principaux intermédiaires de dégradation étaient le 3,4-DCP, le 3,5-DCP ainsi que le 3-MCP. Ces chercheurs ont aussi remarqué que l'activité de dégradation était plus stable si le réacteur était supplémenté avec un mélange de glucose et de formate, recouvrant ainsi les travaux de Hendriksen *et al.* (1992).

Les travaux de Beaudet *et al.* (1997) ont permis de démontrer que le PCP et les différents CPs extrait du bois traité pouvaient être directement traité par un bioréacteur anaérobie à FF. Les meilleures performances du réacteur ont été observées suite à l'ajout de glucose et de formate, recouvrant ainsi les travaux de Hendriksen *et al.* (1992) et de Juteau *et al.* (1995b). Ce réacteur a permis de traiter une charge maximale en PCP de $18 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ j}^{-1}$ avec une capacité de dégradation du PCP de plus de 99 %. De plus, aucun CP ni phénol n'a été détecté dans l'effluent. Ces travaux ont donc pu démontrer clairement que le PCP extrait des poteaux de bois traités pouvait être éliminé de manière efficace par un bioréacteur anaérobie à FF.

1.4 Techniques permettant l'examen des biofilms

1.4.1 Immunofluorescence

L'immunofluorescence (IF) est une technique qui favorise l'utilisation d'anticorps fluorescents. Bien que cette technique ait déjà été utilisée avec succès pour la détection de bactéries dans des biofilms (Buswell *et al.*, 1998) ou des granules (Ahring *et al.*, 1992; Christiansen et Ahring, 1996b; Horber *et al.*, 1998), elle comporte plusieurs désavantages. D'abord, la production d'anticorps monoclonaux nécessite l'isolement de la bactérie que l'on veut visualiser. De plus, il est très difficile de produire des anticorps monoclonaux

spécifiques à un groupe bactérien, ce qui veut dire qu'il faut pratiquement produire un nouvel anticorps à chaque fois que l'on veut visualiser un nouveau micro-organisme. Aussi, il est fréquent que la technique d'IF ne permette pas l'obtention de signaux intenses, ceci à cause de faibles titres en antigènes dans les échantillons (Schut *et al.*, 1998).

1.4.2 Hybridation *in situ* de sondes fluorescentes

Cette technique a été appliquée à des échantillons environnementaux pour la première fois en 1988 par Giovannoni *et al.* (1988) et Stahl *et al.* (1988) qui ont utilisé des sondes radioactives. Toutefois, la première utilisation de sondes fluorescentes pour la visualisation de bactéries a été publiée en 1989 par DeLong *et al.* (1989). La technique d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) est basée sur la tendance qu'a l'ADN ou l'ARN à s'hybrider de manière spécifique à son complément sous conditions non-dénaturantes. En microbiologie, la technique du FISH nécessite l'utilisation d'oligonucléotides d'une longueur de 15 à 25 nucléotides et qui sont associés à une molécule fluorescente. Ces oligonucléotides, nommés « sondes moléculaires », sont généralement complémentaires à l'ARN ribosomal 16S ou 23S. Pour la technique du FISH, il est important d'utiliser des sondes composées d'environ 20 nucléotides. En fait, des sondes trop courtes (10 nucléotides ou moins) ne sont pas assez spécifiques alors que des sondes plus longues (50 nucléotides ou plus) vont diminuer l'impact des mauvais appariements entre les nucléotides de la sonde et sa cible. Dans ce dernier cas, cela ne va pas permettre une forte diminution de la température de dissociation des complexes sondes/mauvaise séquences (Schut *et al.*, 1998).

L'avantage d'utiliser des sondes moléculaires complémentaires à l'ARN ribosomal réside dans le fait qu'il y a habituellement plusieurs dizaines de milliers de ribosomes par cellules lorsqu'elles sont en croissance, ce qui permet l'obtention d'un signal de forte intensité et reflète l'activité métabolique des cellules. Également, l'utilisation de l'ARN ribosomal comme cible permet de synthétiser des sondes possédant différents degrés de spécificité, puisque le gène codant pour l'ARNr 16S est très utilisé comme marqueur phylogénétique ou taxonomique. En effet, les molécules d'ARNr contiennent à la fois des séquences hypervariables et des séquences conservées, ainsi que

des séquences de variation intermédiaire, ce qui permet de synthétiser des sondes ciblant différentes régions, dépendamment du niveau de spécificité requis et ainsi cibler des micro-organismes de manière spécifique dans les échantillons (Amann *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1998). Aussi, plus de 86 000 séquences de gènes 16S de différentes souches bactériennes sont disponibles dans les banques de données comme GenBank ou le Ribosomal Database Project, ce qui facilite le choix des séquences à utiliser (Cole *et al.*, 2003), sans compter qu'une banque de sondes visant l'ARNr 16S bactérien ayant déjà été publiées est également disponible (Loy *et al.*, 2003). De plus, puisque la technique de FISH ne requiert que la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S du micro-organisme à hybrider, il est possible de cibler des micro-organismes n'ayant pas été isolés en culture pure. D'autres avantages de la technique du FISH sont également soulignés par Wagner *et al.* (1998). Par exemple, ces auteurs affirment que le FISH permet la détection de un à trois ordres de grandeur de plus comparativement à la culture sur milieu solide dans le cas d'échantillons environnementaux. Un autre avantage souligné par ces auteurs est le fait que le FISH permet d'étudier la composition exacte d'une communauté microbienne, en évitant le biais causé par les cultures sur milieu solides qui peuvent sur- ou sous-estimer certaines populations microbiennes. Enfin, ces auteurs mettent en valeur le fait que le FISH permet d'étudier l'arrangement tridimensionnel de populations bactériennes dans des échantillons environnementaux comme les biofilms.

Le principal défaut de la technique de FISH est qu'elle est dépendante du nombre de ribosomes dans les cellules; si les cellules ne possèdent pas un niveau élevé de ribosomes, la technique de FISH ne permettra pas d'obtenir des signaux de fluorescence intenses. La recherche de nouvelles molécules fluorescentes ayant des intensités de plus en plus fortes permet toutefois d'améliorer le niveau de détection pour les cellules ayant un faible niveau métabolique (Bouvier et del Giorgio, 2003).

L'utilisation de la technique du FISH nécessite préalablement la perméabilisation des cellules à hybrider, afin de permettre l'entrée des sondes fluorescentes. Plusieurs protocoles décrivant des techniques pour la fixation et la perméabilisation des cellules ont déjà été publiés (Amann *et al.*, 1990b; Amann, 1995b; Jansenn, 1996), mais en général une fixation à la paraformaldéhyde est suffisante dans le cas de bactéries à Gram négatif, alors que les bactéries à Gram positif sont plus facilement perméabilisées par des

traitements à l'éthanol. La fixation à la paraformaldéhyde des échantillons a également été utilisée avec succès par plusieurs chercheurs (Amann *et al.*, 1990a; Amann *et al.*, 1990b; Rocheleau *et al.*, 1999; Fuchs *et al.*, 2000). Toutefois, dans certains cas, la perméabilisation des bactéries à Gram positif nécessite un traitement enzymatique supplémentaire (Wagner *et al.*, 1998). L'utilisation d'autres prétraitements est possible afin de diminuer l'intensité de l'autofluorescence des échantillons ou l'hybridation non-spécifique des sondes. Par exemple, les échantillons peuvent être traités avec une solution permettant l'acétylation des protéines afin de diminuer les interactions non-spécifiques entre les sondes moléculaires et les protéines. De plus, l'utilisation de la solution de Denhardt peut permettre de diminuer l'intensité de l'autofluorescence des échantillons. Toutefois, la nécessité de tels prétraitements doit être évaluée de manière empirique (Angerer et Angerer, 1992; Emson et Gait, 1992). Suite à la fixation et à la perméabilisation des cellules, il est possible de passer à l'étape de l'hybridation. Les conditions d'hybridation doivent être strictes afin de permettre seulement l'hybridation de séquences complémentaires. Pour ce faire, les conditions d'hybridations telles que la température (qui permet d'augmenter la spécificité de la sonde en fonction de la température d'hybridation), la concentration en formamide (ce produit permet le relâchement de la structure tertiaire de l'ARNr 16S) et la concentration en sels peuvent être ajustées (Schut *et al.*, 1998). Selon Schut *et al.* (1998), la meilleure façon de déterminer les conditions optimales d'hybridation et de lavage (dissociation des hybrides sondes-ADN qui sont non-spécifiques) consiste à utiliser des tests empiriques, puisqu'il est possible que des interactions de l'ARNr 16S avec des protéines ribosomales ou encore la structure secondaire ou tertiaire de l'ARNr 16S empêche l'hybridation des sondes au site choisi (Fuchs *et al.*, 1998). Toutefois, Fuchs *et al.* (2000) ont utilisé des oligonucléotides auxiliaires en combinaison avec leurs sondes afin d'améliorer le signal de fluorescence. Ces oligonucléotides auxiliaires ne sont pas fluorescents et vont s'hybrider aux sites adjacents à la sonde fluorescente, ce qui permet d'améliorer le signal en ouvrant le site d'hybridation auparavant inaccessible.

L'examen d'échantillons ayant été hybridés avec des sondes fluorescentes par la technique de FISH peut être effectué avec un microscope à épifluorescence pour les échantillons bidimensionnels ou encore avec un microscope confocal à balayage laser

(CLSM) pour les échantillons tridimensionnels. La technique de FISH permet de quantifier les cellules ayant été hybridées. Pour des cultures pures, l'utilisation de logiciels de comptage automatisé permet à la fois d'obtenir un compte cellulaire et une intensité de fluorescence reliée au niveau métabolique des micro-organismes (Steenstrup *et al.*, 2000; Pernthaler *et al.*, 2003). Les cellules en culture pure peuvent également être comptées par cytométrie en flux (Amann *et al.*, 1990a; Thomas *et al.*, 1997). En ce qui concerne les échantillons plus complexes comme les biofilms, la quantification peut s'effectuer en utilisant des tranches individuelles de biofilm et en effectuant un ratio de la surface hybridée avec une sonde spécifique avec la surface totale de la biomasse colorée avec un fluorochrome non-spécifique (Manz *et al.*, 1999).

1.4.2.1 Fluorochromes

Plusieurs centaines de fluorochromes différents sont maintenant disponibles sur le marché. Les plus utilisés pour la technique du FISH ou la coloration de l'ADN dans les cellules en écologie microbienne sont présentés au Tableau 1.3. Par exemple, l'acridine orange, le Hoechst 33258, l'iodure de propidium et le DAPI sont parmi les plus utilisés pour la coloration des cellules et ciblent l'ADN et/ou l'ARN (Wagner *et al.*, 1998), alors que la fluorescéine, Cy3 et Cy5 sont généralement associés à des sondes moléculaires. L'utilisation de certains de ces fluorochromes comporte des désavantages comme, par exemple, un pic d'émission plutôt large (ex.: iodure de propidium) ou une faible photostabilité (ex.: fluorescéine) et sont, par le fait même, moins intéressants. Récemment, de nouveaux fluorochromes synthétisés à partir de cyanure ont vu le jour et possèdent l'avantage d'être photostables et d'avoir une bande étroite d'émission. De plus, ces fluorochromes sont disponibles en différents modèles couvrant le spectre d'émission du bleu au rouge lointain (Wagner *et al.*, 1998).

1.4.3 Coupes minces

Comme l'épaisseur des biofilms peut varier entre une simple monocouche de cellules et plusieurs centaines de microns (Beveridge *et al.*, 1997), il peut s'avérer nécessaire d'effectuer des coupes minces afin d'observer les biofilms au microscope. Deux techniques sont utilisées pour la préparation de coupes. La première est basée sur la

Tableau 1.3. Caractéristiques de quelques fluorochromes communément utilisés pour la technique du FISH en écologie microbienne.

Fluorochrome	Couleur de la fluorescence	Maximum d'absorption (nm)	Maximum d'émission (nm)
Acridine orange	Orange	500	526
Carboxytétraméthyl-rhodamine	Orange	550	576
Cy3	Orange	550	570
Cy5	Rouge lointain	649	670
DAPI	Bleu	358	461
Fluorescéine	Vert	495	519
Hoechst 33258	Bleu	352	461
Iodure de propidium	Orange	535	617
Tétraméthylrhodamine	Orange	555	580
Texas Red	Rouge	589	615
YOYO-1	Vert	491	509

Wagner *et al.* (1998), Haugland (1996)

congélation rapide de l'échantillon suivi de la production de cryosections ayant entre 5 et 20 µm d'épaisseur grâce à l'utilisation d'un microtome à basse température (cryostat). La seconde technique est basée sur l'enrobage des échantillons dans de la paraffine et le coupage à température pièce. Les blocs de paraffine contenant les échantillons peuvent ensuite être coupés en sections variant entre 2 et 20 µm à l'aide d'un microtome. Toutefois, les deux techniques peuvent donner lieu à des artefacts. Par exemple, les coupes à la paraffine doivent d'abord être déparaffinées par des trempages dans du xylène et nécessitent ensuite une déshydratation complète. La déshydratation est effectuée par plusieurs trempages dans des solvants (généralement de l'éthanol), et les échantillons doivent ensuite être réhydratés, ce qui peut occasionner la déformation des cellules. Dans le cas des cryosections, la nécessité de travailler à basse température peut affecter potentiellement l'échantillon (Wagner *et al.*, 1998).

1.4.4 Microscopie

1.4.4.1 Microscopie électronique à balayage

Les premiers travaux de visualisation des biofilms ont été effectués en microscopie électronique. Malheureusement, la préparation des échantillons pour l'examen en microscopie électronique nécessite des étapes drastiques de déshydratation, ce qui a résulté en la perte de la structure tridimensionnelle des biofilms, les réduisant ainsi à un empilement aléatoire de bactéries (Costerton *et al.*, 1995; O'Toole *et al.*, 2000). Également, l'examen en microscopie électronique est limité par la morphologie peu diversifiée des micro-organismes et ne permet donc pas d'établir hors de tout doute la présence ou l'absence de micro-organismes spécifiques.

1.4.4.2 Microscopie à épifluorescence

Le microscope à épifluorescence est généralement équipé d'une lampe au mercure ou au xénon. La lampe au mercure possède des pics d'intensité majeurs à 365, 405, 436 et 546 nm, alors que la lampe au xénon émet un signal plus uniforme et permet une excitation plus intense que la lampe au mercure dans l'ultraviolet. C'est l'utilisation de filtres qui permet de laisser passer des longueurs d'ondes spécifiques qui vont permettre d'exciter les fluorochromes de manière optimale. Ce type de microscopie permet

l'examen de couches minces ou de cellules individuelles sur lames de verre. La microscopie à épifluorescence peut être couplée à une caméra numérique afin de quantifier la fluorescence, les micro-organismes ou encore visualiser des signaux de fluorescence faibles par l'accumulation de signal. Toutefois, une exposition prolongée des échantillons peut réduire l'intensité de la fluorescence émise par les fluorochromes (« photo-bleaching »). Certains produits permettant d'améliorer la photo-stabilité des fluorochromes sont maintenant disponibles commercialement et peuvent être ajoutés à la préparation (Haugland, 1996; Lawrence *et al.*, 1997).

1.4.4.3 Microscopie confocale à balayage laser

Le CLSM est né de la fusion de la microscopie optique traditionnelle avec la technologie des lasers et l'imagerie numérique. Le principal avantage de l'utilisation du CLSM comparativement à un microscope à épifluorescence réside dans le fait que cet appareil permet d'examiner des échantillons en trois dimensions, hydratés et même vivants.

En microscopie conventionnelle, l'échantillon est illuminé de manière uniforme, peu importe le plan sur lequel l'objectif est au focus. Les régions au-dessus et en dessous du plan au focus émettent donc un signal flou, ce qui diminue la résolution et le contraste. Lors de l'examen avec un CLSM, l'illumination se fait de manière séquentielle (point par point) et non de manière simultanée comme en microscopie conventionnelle, ce qui réduit la quantité d'information hors focus. De plus, le CLSM est basé sur le principe de Minsky, qui stipule que l'obtention d'images claires nécessite que l'illumination et le système de détection soient au focus sur le même élément de volume dans le spécimen. Le signal provenant du volume illuminé est échantillonné de manière à ce que la presque totalité du signal détecté soit au focus et l'information hors foyer est éliminée par un filtre, réduisant davantage l'information hors focus. Donc, l'illumination, le spécimen et le détecteur ont tous le même focus, ils sont donc « confocaux » (Matsumoto, 1993).

L'examen en trois dimensions est possible grâce à une technique connue sous le nom de «sectionnement optique», qui remplace le sectionnement mécanique des échantillons au microtome ou au cryostat (Figure 1.1). Lors du sectionnement optique, le faisceau laser va balayer l'échantillon point par point et les informations qui sont hors du

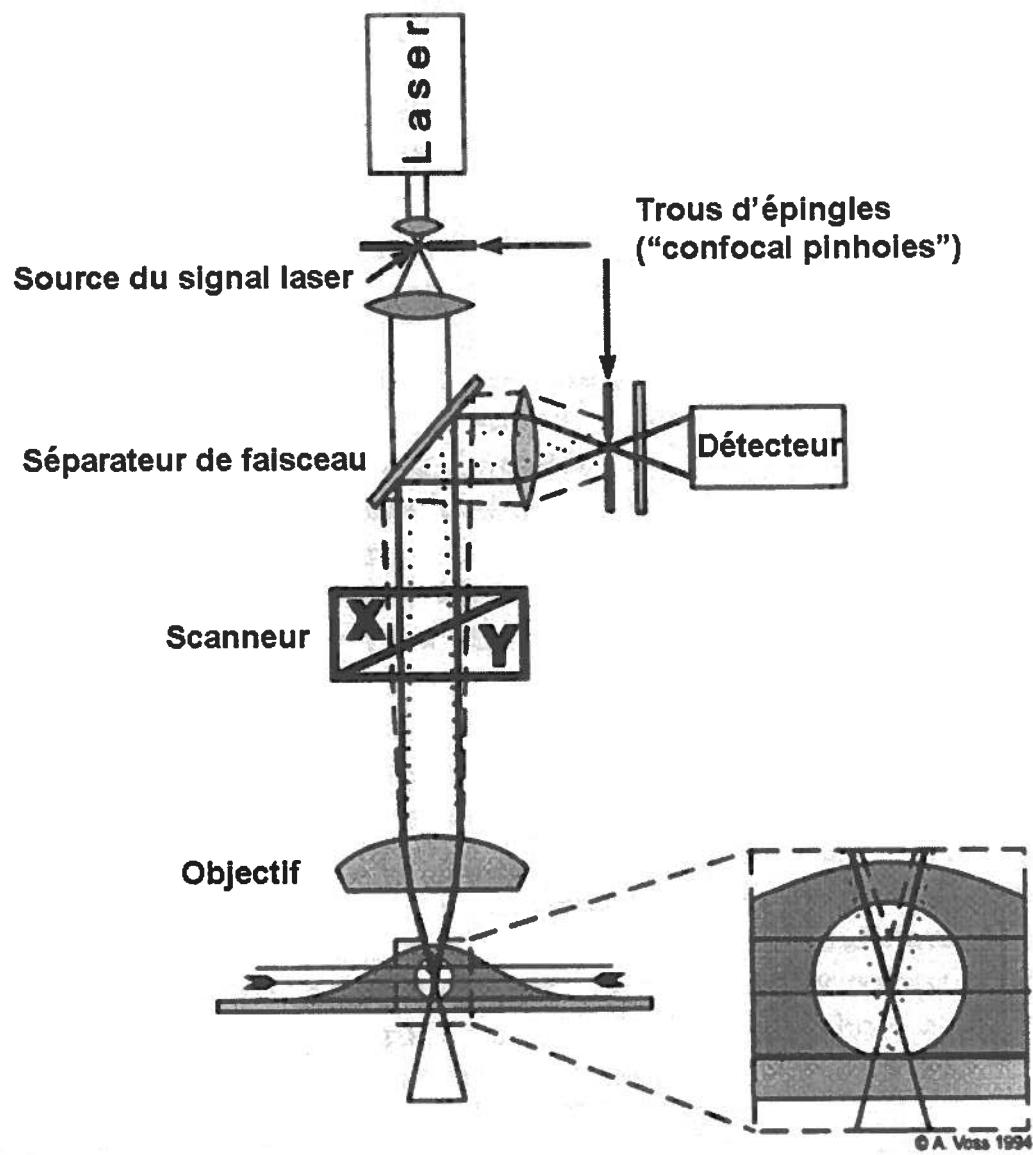


Fig. 1.1. Voie empruntée par le laser dans un microscope confocal à balayage laser.
Modifié de Wagner *et al.* (1998).

foyer vont être éliminées grâce à la présence de trous d'épingles (« pinholes ») positionnés de manière confocale en avant du photomultiplicateur et du faisceau laser incident. Ce positionnement permet ainsi l'obtention d'images claires, avec des résolutions xy et xz améliorées. Le signal de fluorescence va ensuite être accumulé dans un photomultiplicateur et être retransmis à un système informatique d'imagerie. Les images acquises sont digitalisées, elles peuvent ensuite être améliorées et analysées à l'aide de programmes informatiques ou encore utilisées afin de construire une image tridimensionnelle de l'échantillon examiné et ainsi révéler la disposition spatiale des micro-organismes (Lawrence *et al.*, 1997).

Quelques désavantages sont associés à l'utilisation du CLSM. D'abord, comme la vitesse de balayage est inversement proportionnelle à la résolution de l'image, il y a un compromis à faire au cours de l'acquisition. De plus, l'intensité du signal laser étant assez élevée, il peut s'avérer nécessaire d'utiliser des solutions d'enrobage (« anti-fade ») afin de diminuer la perte du signal de fluorescence (Lawrence *et al.*, 1997). Également, la distance de pénétration du CLSM est limitée à 100 μm , mais les échantillons plus épais peuvent quand même être examinés à l'aide de cet appareil, à condition de les couper à l'aide des mêmes techniques histologiques que celles utilisées pour la microscopie à épifluorescence (Lawrence *et al.*, 1991; Lawrence *et al.*, 1998b; Wagner *et al.*, 1998; Lawrence et Neu, 1999). Le choix des fluorochromes peut également être restreint par le type de laser couplé au CLSM. Enfin, l'examen d'échantillons avec le CLSM standard illumine l'échantillon point par point, mais la partie d'échantillon se trouvant au-dessus du point d'illumination est également excitée, ce qui peut mener à une perte de signal causée par du « photo-bleaching ». Toutefois, l'utilisation d'un type plus récent de CLSM, soit le microscope à deux photons, permet d'illuminer de manière spécifique seulement le point à illuminer dans l'échantillon, permettant ainsi de mieux préserver le signal de fluorescence (Paddock, 1999).

Les caractéristiques du CLSM en font un outil très intéressant pour l'étude des biofilms et des granules microbiens (Lawrence *et al.*, 1998a; Wagner *et al.*, 1998). En fait, cet appareil a déjà été utilisé avec succès pour l'étude de différents types de populations microbiennes, dont des boues granulaires anaérobies (Harmsen *et al.*, 1996a; Harmsen *et al.*, 1996b), des biofilms épiphytes de plantes (Wagner *et al.*, 1996), la

rhizosphère du blé (Assmus *et al.*, 1995), des boues activées (Wagner *et al.*, 1994a; Wagner *et al.*, 1994b; Amann *et al.*, 1996; Schuppler *et al.*, 1998), des particules prélevées dans des marécages (Ghiorse *et al.*, 1996), des biofilms provenant de «trickling filters» (Schramm *et al.*, 1996) et aussi des biofilms dégradant des polluants (Moller *et al.*, 1996).

1.5 Les biofilms

Selon Costerton *et al.* (1995), les biofilms sont définis comme étant des populations bactériennes adhérentes entre elles et/ou à des surfaces ou interfaces. L'importance des biofilms s'est accrue depuis qu'ils ont été décrits pour la première fois au cours des années 1930 par Henrici (Henrici, 1933) et Zobell et Anderson (Zobell et Anderson, 1936) et que leur ubiquité a été prouvée en 1978 par Costerton *et al.* (1978). En effet, il est devenu de plus en plus clair que les biofilms constituent une phase de croissance distincte de la croissance planctonique étudiée depuis Pasteur (Costerton *et al.*, 1995). De plus, l'utilisation du CLSM appliqué pour la première fois en 1991 (Lawrence *et al.*, 1991) à l'observation des biofilms a permis de déterminer que les biofilms sont des agencements bactériens complexes et structurés. Cette observation a révolutionné l'image des biofilms que les microbiologistes avaient, car ceux-ci ont longtemps pensé que les biofilms étaient des agencements aléatoires de micro-organismes et sans structure précise.

Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces en contact avec de l'eau ou de l'humidité. Ces surfaces incluent également des tissus retrouvés chez les organismes vivants, comme les dents, les poumons, les intestins (Costerton *et al.*, 1995) et même les racines des plantes (Walker *et al.*, 2003). Des biofilms peuvent également se développer sur diverses prothèses utilisées dans le domaine médical (Costerton *et al.*, 1995). Aussi, les biofilms peuvent se développer aux interfaces, comme par exemple à l'interface air-liquide (Spiers *et al.*, 2003) ou même à l'interface milieu de culture-huile dans le cas de biotraitements biphasiques (Villemur *et al.*, 2000; Gauthier *et al.*, 2003). Toutefois, certains types de biofilms ne semblent pas nécessiter de surfaces pour croître, comme dans le cas des boues granulaires retrouvées dans les bioréacteurs UASB (Guiot *et al.*, 1992).

Comparativement à la vie sous forme planctonique, la vie sous forme de biofilm comporte plusieurs avantages pour les micro-organismes. D'abord, le biofilm constitue une protection contre les conditions hostiles. En effet, le biofilm permet une protection contre les antibiotiques, les biocides, la dessication, le système immunitaire (Costerton *et al.*, 1995; Costerton *et al.*, 1999) et les prédateurs. Ce serait la présence de grandes quantités de polysaccharides extracellulaires (EPS) qui serait responsable de la résistance des biofilms aux conditions hostiles (O'Toole *et al.*, 2000). La vie sous forme de biofilm permet également aux bactéries qui le composent d'augmenter et de faciliter les échanges génétiques (Stoodley *et al.*, 2002). Le biofilm permet aussi de concentrer les nutriments (Costerton *et al.*, 1995), ce qui avantage encore une fois les bactéries qui s'y retrouvent.

Les biofilms multi-espèces permettent une coopération physiologique entre les différents micro-organismes qui le composent; chaque micro-organisme ayant une activité spécialisée dans le biofilm. Cette facette permet de comparer les biofilms à des systèmes circulatoires eucaryotes primitifs, à cause de la présence de canaux (Costerton *et al.*, 1995). Par exemple, il a déjà été démontré que des régions aérobies et anaérobies pouvaient se former dans les biofilms dont l'épaisseur limite la diffusion de l'oxygène (Stoodley *et al.*, 2002). Aussi, les sporophores (« fruiting bodies ») produits par différentes espèces bactériennes comme *Bacillus subtilis* (Branda *et al.*, 2001) et par les myxobactéries (Stoodley *et al.*, 2002) sont également considérés comme des régions spécialisées d'un biofilm, puisqu'elles produisent des spores.

1.5.1 Biofilms sur matrices solides

1.5.1.1 Structure et composition

Il existe deux types de biofilms : les biofilms mono-espèces et les biofilms multi-espèces. Les biofilms mono-espèces sont surtout un phénomène de laboratoire mais peuvent également se retrouver dans diverses infections et sur les surfaces de prothèses médicales. Les biofilms multi-espèces comme leur nom l'indique sont composés de plusieurs espèces bactériennes et prédominent dans l'environnement (O'Toole *et al.*, 2000). Divers autres micro-organismes tels que des algues, des protozoaires, des champignons et des levures peuvent également se retrouver au sein de biofilms multi-espèces (Costerton *et al.*, 1995; Palmer et White, 1997; Stoodley *et al.*, 2002). Le

contenu en cellules des biofilms peut varier grandement; des valeurs de carbone organique total ayant révélé que la quantité de matériel cellulaire dans un biofilm pouvait varier entre 2 et 15 %, le reste provenant de substances extracellulaires (Sutherland, 2001). Les biofilms contiennent également une forte quantité d'EPS, qui constituent généralement entre 50 et 90 % du carbone organique du biofilm. Toutefois, la majeure partie des biofilms est composée d'eau. En effet, l'eau peut représenter de 50 à 97 % du volume d'un biofilm (Costerton *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 1998b; Sutherland, 2001). Diverses macromolécules peuvent également se retrouver dans le biofilm: des protéines (moins de 1 à 2 %), des acides nucléiques (moins de 1 à 2 %), des polysaccharides (de 1 à 2 %), des phospholipides, des ions et même diverses composantes cellulaires provenant de cellules lysées (Sutherland, 2001).

L'épaisseur d'un biofilm mature peut varier entre une simple monocouche de cellules et une épaisseur de plusieurs centaines de μm (Beveridge *et al.*, 1997). Certains biofilms peuvent même atteindre une épaisseur de plus de 400 mm (Costerton *et al.*, 1995). La structure tridimensionnelle d'un biofilm classique est similaire à la forme d'un champignon et est entrecoupée de canaux (Figure 1.2). Ces canaux permettent l'entrée des nutriments et la sortie des déchets. Les bactéries y sont disposées sous forme de microcolonies. Cette structure est affectée par plusieurs facteurs physiques (propriété de la surface d'attachement ou de l'interface, hydrodynamique du système, disponibilité des nutriments) et biologiques (composition de la communauté bactérienne, motilité, taux de croissance des cellules, production d'EPS) (Stoodley *et al.*, 2002).

1.5.1.2 Processus de formation

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe se produisant en plusieurs étapes. La première étape consiste en l'attachement réversible des cellules sur la surface. Cette étape est suivie de l'attachement irréversible des cellules, puis de la maturation du biofilm. La dernière étape est le détachement des cellules. Les principales étapes de la formation d'un biofilm sont présentées à la Figure 1.3.

Les cellules doivent donc d'abord migrer vers la surface à coloniser. Plusieurs facteurs peuvent inciter les micro-organismes à s'attacher à une surface pour débuter la formation d'un biofilm, comme par exemple, la présence de nutriments adsorbés sur les

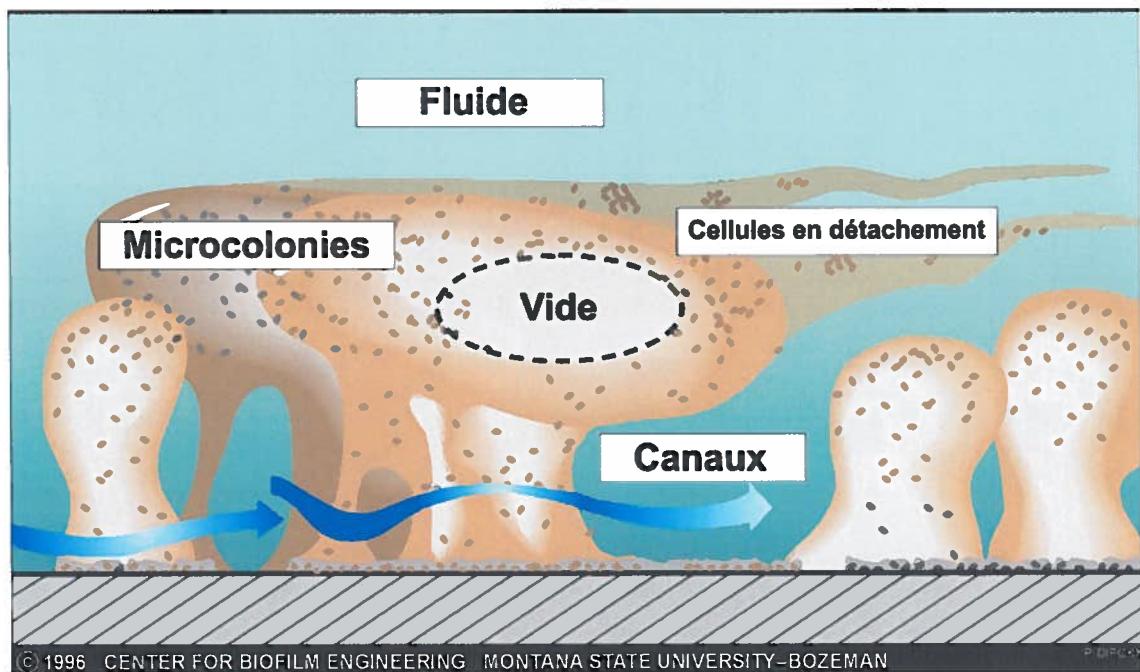


Fig. 1.2. Structure d'un biofilm (CBE ressource library, 2004).

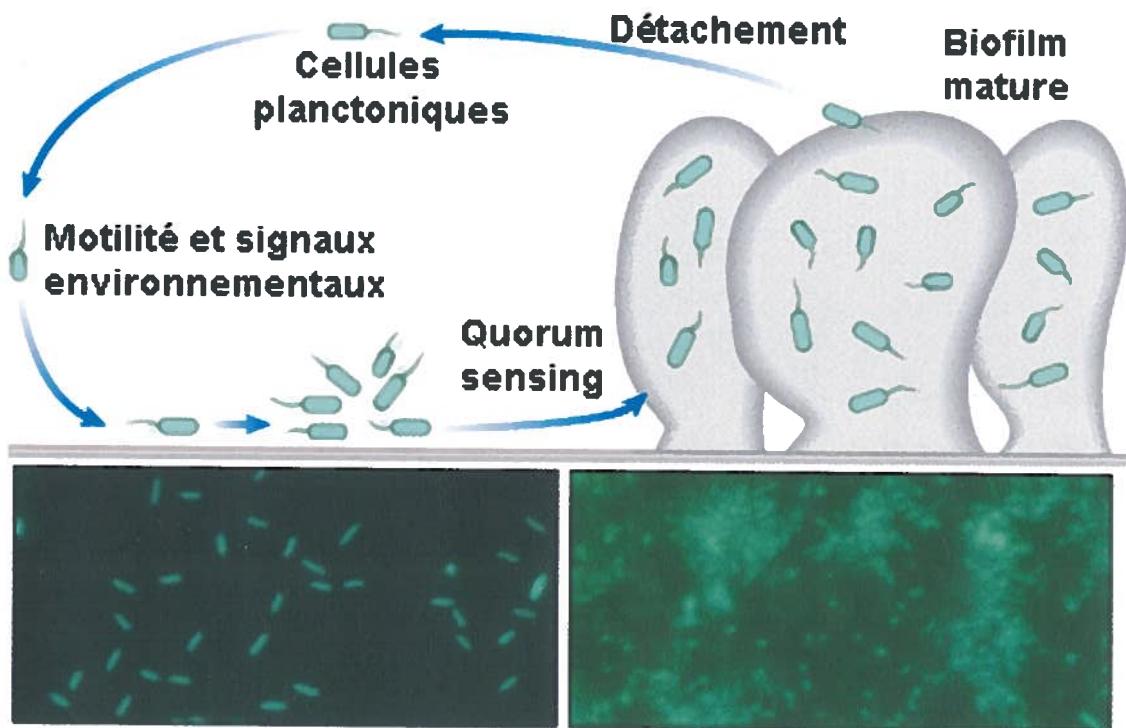


Fig. 1.3. Modèle de développement d'un biofilm. Modifié de Kolter et Losick (1998).

surfaces, différents signaux environnementaux (pH, concentration en ions fer ou en oxygène, température, osmolarité) et le type de surface (porosité, composition, etc.). Les différents signaux environnementaux nécessaires à l'initiation de la formation d'un biofilm varient d'une espèce à l'autre. Par exemple, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa* peuvent former des biofilms sous n'importe quelle condition de culture permettant la croissance, alors que d'autres espèces comme *Escherichia coli* K-12 ou *Vibrio cholerae* ne vont former des biofilms que si elles sont cultivées dans des milieux minimaux supplémentés avec des acides aminés (O'Toole et Kolter, 1998; Pratt et Kolter, 1998; Watnick et Kolter, 1999; O'Toole *et al.*, 2000). *E. coli* O157:H7 ne forme un biofilm que si le milieu de culture ne contient que peu de nutriments (Dewanti et Wong, 1995).

Les bactéries peuvent utiliser plusieurs modes de déplacement pour atteindre la surface à coloniser, comme la diffusion (mouvement Brownien), la convection, la motilité ou encore la sédimentation (Davey et O'Toole G, 2000; O'Toole *et al.*, 2000). L'adhésion des cellules à la surface peut ensuite se faire par l'intermédiaire de plusieurs appendices présents à la surface des micro-organismes, comme les fibrilles et les lipopolysaccharides (LPS) chez les bactéries à Gram négatif. Aussi, les pili et diverses protéines de surfaces comme les adhésines peuvent jouer un rôle dans l'attachement des cellules sur les surfaces (Costerton *et al.*, 1987; van Loosdrecht *et al.*, 1990; Davey et O'Toole G, 2000; O'Toole *et al.*, 2000). Les cellules peuvent ensuite se déplacer sur la surface à l'aide de la motilité de type « twitching » (O'Toole *et al.*, 2000).

Suite à l'attachement des cellules à la surface, la croissance du biofilm débute. Les bactéries vont donc se diviser, ce qui va donner lieu à la formation de microcolonies mono-espèces au départ. Puis, lors de la croissance du biofilm, les diverses microcolonies (de même espèce ou d'espèces différentes) vont se rejoindre sur la surface. Lors de la croissance, les bactéries vont consolider leurs liens (par la synthèse d'EPS) entre-elles et à la surface, ce qui va rendre leur attachement à la surface irréversible. Un des moyens utilisé à cette fin est l'augmentation du nombre de pili à la surface des cellules. Le phénotype des bactéries va ensuite changer: les bactéries vont perdre leurs flagelles et certaines bactéries vont exprimer à leur surface divers récepteurs spécifiques à certaines bactéries (Costerton *et al.*, 1987; van Loosdrecht *et al.*, 1990; Palmer et White,

1997; Davey et O'Toole G, 2000; O'Toole *et al.*, 2000; Stoodley *et al.*, 2002). Certains chercheurs ont également remarqué que la formation de biofilm nécessitait la présence d'ADN extracellulaire (Whitchurch *et al.*, 2002).

Le « quorum-sensing » (QS) est nécessaire pour l'obtention d'un biofilm mature. Le QS se définit comme étant la régulation de la transcription de certains gènes selon la densité bactérienne. Ce système permet la communication intra-espèce et possiblement inter-espèces. Le QS permet aux bactéries d'effectuer une action concertée et donc plus efficace. L'implication du QS dans la formation des biofilms a été décrite pour la première fois en 1998 par Davies *et al.* (1998) chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il a été démontré que le QS médie la synthèse des EPS ainsi que la formation des microcolonies et des structures tridimensionnelles et est soupçonné avoir un impact sur plusieurs autres aspects des biofilms, dont l'hétérogénéité, l'architecture, la résistance au stress, la maintenance, et le détachement cellulaire (Kjelleberg et Molin, 2002). Le QS est médié par l'intermédiaire de molécules autoinductrices (AI). Dans le cas des bactéries à Gram négatif, ces molécules sont des homosérines lactones (HSL), alors que chez les bactéries à Gram positif ce sont des peptides ou des butyrolactones. Des HSL ont déjà été détectées dans des biofilms naturels retrouvés dans l'environnement, suggérant que ces molécules sont utilisées comme mécanisme d'expression de gènes régulés par la densité bactérienne en milieu naturel (McLean *et al.*, 1997). Aussi, Park *et al.* (2003) ont obtenu des résultats suggérant que les bactéries puissent se déplacer sur les surfaces de manière à augmenter leur population localement et ainsi atteindre le quorum plus rapidement.

Le système de QS type est similaire au système de QS retrouvé chez *Vibrio fischeri*. Le QS nécessite la présence d'un système similaire à l'opéron *lux* retrouvé chez *V. fischeri*. Deux gènes sont présents dans cet opéron, soit le gène I et le gène R. Le gène I code pour une enzyme qui va synthétiser la molécule AI. Cette molécule va diffuser librement au travers des membranes dans le cas des HSL ou peut être excrétée activement dans le cas de peptides. Le gène R code pour une protéine activatrice R qui se lie à la molécule AI pour former un complexe R/AI. Comme il existe une activité basale de transcription du gène I, il y a toujours un niveau de base de molécule AI. Lorsque la population bactérienne augmente, il y a augmentation de la concentration de molécule AI dans le système, puis, lorsque la concentration de molécule AI atteint un seuil critique,

elle se lie au produit du gène R. Ce complexe va ensuite faciliter l'association de l'ARN polymérase avec le promoteur des différents opérons responsable de la formation des biofilms matures. Un schéma de ce mécanisme est présenté à la Figure 1.4.

Le biofilm mature est constitué de structures tridimensionnelles en forme de champignons et entrecoupées de canaux et de pores. À cette étape de maturation, des bactéries peuvent se détacher du biofilm pour aller coloniser d'autres endroits si les conditions locales ne sont plus adéquates à la croissance bactérienne (disponibilité des nutriments, etc.). Les bactéries peuvent moduler elles-mêmes leur détachement (« sloughing »). Dans le cas des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, les bactéries vont utiliser des alginates lyases pour se détacher du biofilm (l'alginate est un EPS produit par cette espèce et est présent en forte quantité dans les biofilms de cette espèce). Des signaux de type QS seraient également impliqués dans le détachement des cellules dans les biofilms. Des facteurs physiques tels que l'érosion causée par l'hydrodynamique du système peuvent aussi être impliqués dans le détachement des cellules. Le biofilm mature peut aussi être sujet à la prédation, ce qui peut affecter sa structure. Enfin, les biofilms matures peuvent également effectuer du recrutement à partir des bactéries en suspension (Costerton *et al.*, 1987; O'Toole *et al.*, 2000).

Cette juxtaposition des cellules combinée à la formation d'une matrice d'exopolysaccharides dans le biofilm conditionne le micro-environnement de chacune des bactéries. Des bactéries différentes répondent avec un taux de croissance différent à leur micro-environnement, ce qui permet le développement d'un biofilm à la structure complexe. En fait, des réseaux de canaux sont présents dans les biofilms, ce qui permet l'entrée de nutriments et la sortie des déchets (Costerton *et al.*, 1995; Potera, 1996).

1.5.1.3 Différences phénotypiques entre les bactéries sessiles et planctoniques

Plusieurs chercheurs ont avancé l'hypothèse que les bactéries présentes dans un biofilm possédaient un phénotype différent des bactéries en suspension, puisque les conditions dans le biofilm y sont très différentes (Costerton *et al.*, 1995; Kuchma et O'Toole, 2000). De plus, il a été avancé qu'à chacune des étapes de formation d'un biofilm, les cellules sont dans un état physiologique distinct (Sauer et Camper, 2001). Toutefois, des recherches effectuées par Whiteley *et al.* (2001) à l'aide de puces à ADN

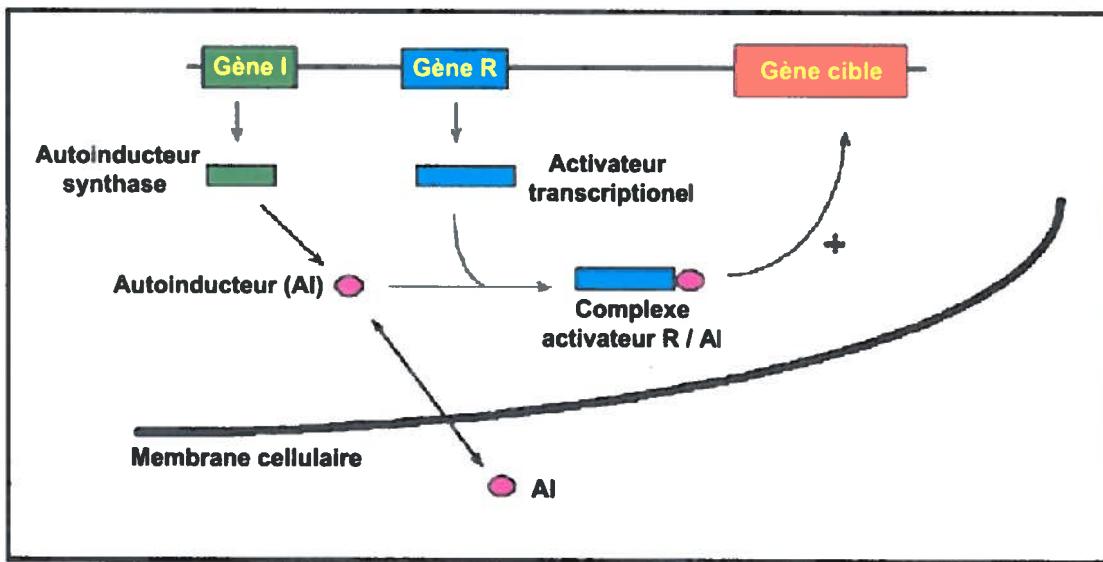


Fig. 1.4. Système-type de « quorum sensing » pour la formation des biofilms. Modifié de Van Delden et Iglewski (1998).

ont permis de démontrer que les différences transcriptionnelles étaient moins prononcées que ce qui avait été pensé au départ pour les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, sur 5 570 gènes présents chez cette souche, seulement une différence d'une trentaine de gènes exprimés ou réprimés entre les formes sessiles et planctoniques, comparativement à une différence pouvant aller jusqu'à une centaine de gènes exprimés ou réprimés lorsque cette souche se trouve dans d'autres conditions de culture. Hancock (Hancock, 2001) a toutefois avancé que ce nombre minime de gènes activés et réprimés pouvait être davantage causé par les conditions de cultures utilisées par Whitheley *et al.* (2001). Par contre, d'autres travaux du même type ont été effectués chez d'autres espèces bactériennes comme *Escherichia coli* K-12 (Prigent-Combaret *et al.*, 1999) et *Pseudomonas putida* (Sauer et Camper, 2001). Dans le cas de *E. coli*, l'analyse de mutants *LacZ* pour l'attachement a des surfaces a permis de déterminer que des changements apparaissaient lors de la phase d'attachement chez 38 % des 446 clones (Prigent-Combaret *et al.*, 1999). Dans le cas de *P. putida*, Sauer et Camper (2001) ont remarqué à l'aide d'une technique d'hybridation soustractive que l'expression de plus de 30 opérons a été altérée dans les 6 heures suivant l'attachement à une surface.

Toutefois, ce sont les travaux de protéomiques qui ont permis de mettre davantage en évidence les différences physiologiques entre les cellules sessiles et planctoniques. Il a été démontré que les cellules de *P. aeruginosa* retrouvées dans un biofilm mature voyaient l'expression de leurs protéines augmenter d'au moins six fois ou plus chez environ 50 % du protéome détectable (environ 800 protéines) comparativement à des cellules planctoniques. Aussi, plus de 300 protéines ont été détectées dans le biofilm mature qui n'étaient pas détectées chez les cellules planctoniques (Sauer *et al.*, 2002). Les recherches effectuées par Sauer *et al.* (2002) ont également démontré que le protéome de cellules de *P. aeruginosa* se détachant du biofilm était plus similaire à celui des bactéries planctoniques que celui des bactéries présentes dans le biofilm. Il semble donc que des changements phénotypiques se produisent lors du processus de formation des biofilms, mais leur intensité pourrait varier selon les espèces bactériennes et les conditions de culture. Il est difficile pour le moment de faire ressortir une tendance vu le manque d'information à ce sujet pour d'autres espèces bactériennes (Stoodley *et al.*, 2002).

1.5.2 Biofilms anaérobies sur matrices solides

Les connaissances que la communauté scientifique a acquises jusqu'ici sur les biofilms relèvent principalement de l'étude de micro-organismes aérobies. Comparativement à la littérature scientifique disponible sur les biofilms aérobies, bien peu de choses ont été publiées sur les biofilms anaérobies, exception faite des granules retrouvés dans les boues granulaires. Les articles portant sur l'étude des biofilms anaérobies sur surfaces fixes publiés jusqu'ici s'intéressent davantage à leurs capacités de biodégradation (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1983; Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen et Ahring, 1993) et à leurs capacités de détérioration de la tuyauterie (Goeres *et al.*, 1998; Jayaraman *et al.*, 1999), plutôt qu'à leur structure et leur composition. Également, quelques travaux font état de résultats obtenus suite à des études d'adhésion de bactéries anaérobies sur des surfaces (Meier-Schneiders *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1994; van Schie et Fletcher, 1999).

1.5.2.1 Formation et structure

Peu de travaux décrivant la structure de biofilms anaérobies ont été publiés jusqu'ici. Amann *et al.* (1992a) et Raskin *et al.* (1995) se sont intéressés à la détection de bactéries spécifiques dans des biofilms provenant de réacteurs à FF supplémentés avec du sulfate. Les bactéries sulfato-réductrices (SRB) ciblées étaient disposées sous forme de microcolonies (Amann *et al.*, 1992a). Raskin *et al.* (1995) ont réussi à visualiser une augmentation de SRB dans un bioréacteur méthanogène après l'ajout de sulfate au milieu de culture et une diminution des SRB suite à l'arrêt de l'ajout de sulfate dans un réacteur réduisant le sulfate. Poulsen *et al.* (1993) et Raskin *et al.* (1995) ont pour leur part utilisé la technique de FISH afin de quantifier le contenu cellulaire en ribosomes de SRB dans un biofilm anaérobie multi-espèces afin de déterminer leur temps de génération. Toutefois, tous ces travaux ont été effectués à l'aide de la microscopie à épifluorescence, ce qui ne permet pas de bien voir l'aspect tridimensionnel des biofilms contrairement aux observations pouvant être effectuées à l'aide de la CLSM.

Les seuls travaux publiés à ce jour examinant la structure de biofilm anaérobies à l'aide de la CLSM ont été publiés par Araujo *et al.* (2000). Ces chercheurs ont investigué l'effet de deux types de surfaces (verre et polypropylène) sur le développement d'un

biofilm anaérobie dans un système de chemostat à l'aide de la technique de FISH. L'inoculation de trois bactéries méthanogènes en culture pure (*Methanobacterium formicum*, *Methanosaeta concilii* et *Methanosarcina barkeri*) dans le système a permis de constater que les trois micro-organismes avaient colonisé les deux types de surfaces. Malgré une contamination par des *Eubacteria*, cette expérience a permis de déterminer que les populations d'*Archaea* diminuaient ou disparaissaient en moins de 9 jours sur la surface de polypropylène, mais qu'elles étaient plus stables sur la surface de polypropylène, démontrant ainsi que le type de substrat affecte les populations de micro-organismes dans le biofilm. Ces chercheurs ont également étudié un biofilm plus complexe formé à partir de boues granulaires désagrégées sur une surface de polypropylène. Des variations dans les populations formant le biofilm ont été observées au cours du suivi comparativement à l'inoculum de départ constitué de 13 % de SRB et de 93 % d'*Archaea* (surtout des *Methanobacterium*). Les auteurs avancent que le pourcentage total de plus de 100 % de micro-organismes hybridés dans ces échantillons pourrait être occasionné par de faux positifs ayant hybridé avec la sonde ARC915. Après 11 jours, la population de SRB avait diminué à 1,7 %, même si la population totale d'*Eubacteria* était toujours de 13 %. Pour les *Archaea*, la population de *Methanobacteriaceae* était passée de 74 à 85 % de la population totale, alors que la population de *Methanosarcinales* avait diminué, passant de 11 % à 4 %. L'observation au CLSM a permis de déterminer que le biofilm se formait également de manière inégale, avec des régions sans croissances et d'autres régions avec un biofilm de 9 µm d'épaisseur. Toutefois, ces travaux ont été effectués avec des biofilms jeunes et peu épais.

Juteau *et al.* (1995b) sont les seuls à avoir observé un biofilm provenant d'un bioréacteur à FF dégradant le PCP. Le biofilm prélevé après 163 jours d'opération a été observé à l'aide de la microscopie électronique à balayage et a révélé une grande diversité morphologique, montrant des coccis ou petits bâtonnets, des longs filaments minces ainsi que des larges bâtonnets similaires à *Methanosaeta* étaient détectés à la surface du biofilm, alors que divers types de bâtonnets et des micro-organismes similaires à *Methanosaeta* à la base du biofilm.

1.5.2.2 Composition en micro-organismes et dynamique

L'analyse des populations microbiennes présentes dans les bioréacteurs anaérobies à FF peut révéler des informations importantes sur les divers micro-organismes présents ainsi que sur les fluctuations dans leurs populations. Toutefois, la technique de FISH couplée à l'examen de biofilms prélevés de bioréacteurs anaérobies à FF a surtout été effectué pour la détection de bactéries SRB (Raskin *et al.*, 1995) et de méthanogènes (Raskin *et al.*, 1994).

Raskin *et al.* (1995; 1996) ont étudié à l'aide de la technique de transfert sur membrane (« slot-blot ») les populations dans quatre réacteurs à FF. Deux réacteurs ont été utilisés pour l'enrichissement d'une population de SRB et deux autres pour l'enrichissement d'une population méthanogène. Ces réacteurs ont été inoculés avec des bactéries provenant de réacteurs méthanogènes ou réduisant le sulfate déjà en fonction. Après 17 mois d'opération, du sulfate a été ajouté au milieu de culture d'un des réacteurs méthanogènes et, après 11 mois d'opération, l'ajout de sulfate a été arrêté dans un des réacteurs dégradant le sulfate. Les deux autres réacteurs n'ont pas été altérés et ont servi de contrôles. Ces chercheurs ont utilisé des sondes ciblant les populations méthanogènes et de SRB dans les biofilms de ces réacteurs afin d'évaluer l'impact de ces changements dans le milieu de culture. Dans le cas des réacteurs méthanogènes, ces réacteurs contenaient environ 25 % d'ARNr 16S méthanogène par rapport à l'ARNr 16S total retrouvés dans ces réacteurs. Les *Methanobacteriales* étaient les bactéries méthanogènes présentes en plus forte proportion (12,7 % de l'ARNr 16S total). Les *Methanosarcinales*, les *Methanococcales* et les *Methanomicrobiales* ont également été détectées en plus faible proportion (4-5 %). Des SRB ont également été détectées (16,2 % de *Desulfovibrio* et 2,8 % de *Desulfobacterium*). Les auteurs ont expliqué la présence de cette forte quantité de SRB malgré la faible présence de sulfate dans l'influent (0,02 mM) par le fait que ces bactéries peuvent utiliser d'autres substrats de manière synthrophe, comme par exemple le lactate, l'éthanol, le propionate et le pyruvate. La réduction de sulfate a débuté 6 heures après l'ajout de sulfate dans le réacteur méthanogène et s'est stabilisée à un niveau similaire aux autres réacteurs réduisant le sulfate à l'étude en quelques jours. Il a ensuite été déterminé que le niveau relatif de *Desulfovibrio* et de *Desulfobacterium* avait augmenté à 35 % et 4,5 %, respectivement. Cette augmentation de SRB a été visualisée

par FISH. La production de méthane a commencé à diminuer après l'ajout du sulfate, pour disparaître sous le seuil de détection après 24 h. Les populations de bactéries méthanogènes ont ensuite diminué graduellement dans le système, jusqu'à atteindre 7-9 %.

L'arrêt de l'ajout de sulfate dans un des deux réacteurs sulfidogène n'a pas causé de changement rapide vers la méthanogenèse, la production de méthane n'ayant été détectée que 50 jours après le changement. Après trois mois d'opération sous ces nouvelles conditions, les populations de SRB étaient en proportions similaires à ce qui avait été détecté dans le réacteur méthanogène et les populations méthanogènes avaient augmenté en proportion, surtout à cause d'une augmentation de *Methanobacteriales* (18 %). Encore une fois, ces changements ont été visualisés dans le biofilm à l'aide de la technique de FISH.

Liu *et al.* (2002) ont étudié la dynamique de la communauté microbienne dans deux réacteurs acidogènes, le premier étant opéré sous conditions mésophiles alors que le second était opéré sous conditions thermophiles. L'analyse des populations par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) a permis de démontrer que la plupart des populations d'*Archaea* et d'*Eubacteria* ont changé au cours des 13 premiers jours d'opération pour les deux réacteurs étudiés, surtout à cause d'une chute du pH. Des analyses effectuées par hybridation de type dot-blot ont permis de déterminer que les populations d'*Archaea* ont diminué, passant de 34,1 % à 8 % de l'ARNr 16S total et que les populations d'*Eubacteria* ont augmenté, passant de 63,1 % à 90,3 % de l'ARNr 16S total pour le réacteur mésophile après 13 jours d'opération. Des résultats similaires ont été obtenus avec le réacteur thermophile.

Lecouturier *et al.* (2003) ont découvert une faible diversité lors de l'analyse des populations de micro-organismes retrouvés dans un réacteur anaérobie à FF dégradant l'ATIA. Ces chercheurs ont utilisé une technique de PCR couplée à la technique de polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (RFLP). Les résultats ont montré la présence de seulement quatre types de phylotype dans le réacteur. Les auteurs expliquent leurs résultats par l'utilisation d'un milieu de culture peu riche et par une période d'enrichissement longue. Suite à la technique d'analyse de restriction de l'ADN ribosomal amplifié ("amplified ribosomal DNA restriction analysis" ou ARDRA), les

bandes ont été clonées puis séquencées. Les résultats obtenus ont démontré que 83 % des clones analysés faisaient parti du genre *Desulfitobacterium* (des bactéries reconnues pour avoir des capacités de déshalogénéation), suggérant ainsi que ces micro-organismes sont responsables de l'activité de dégradation. Seulement quatre clones différents ont été obtenus suivant le séquençage des bandes, soit deux premiers clones associés avec *Desulfitobacterium frappieri* TCE1 (98 % identité), un troisième proche de *Desulfitobacterium hafniense* et *D. frappieri* TCP-A, mais qui est probablement une nouvelle espèce de *Desulfitobacterium*, et un quatrième clone qui a été identifié comme faisant partie du groupe des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. Les auteurs expliquent la présence de ce micro-organisme dans le réacteur en avançant l'hypothèse que cette souche pourrait entretenir une relation étroite avec les autres membres du consortium responsables de la déiodination

1.5.3 Boues granulaires

L'utilisation de bioréacteurs UASB («upflow anaerobic sludge blanket») favorise la formation de granules bactériens. En effet, dans de tels bioréacteurs la biomasse est retenue sous forme d'agrégats nommés «granules». Ceux-ci sont formés grâce à la capacité naturelle qu'ont les bactéries à s'immobiliser. Dans le cas d'un bioréacteur UASB, aucun support n'est nécessaire pour l'immobilisation car les bactéries s'agrègent entre elles. L'utilisation de bioréacteurs de ce type comporte plusieurs avantages, dont celui de pouvoir retenir une grande quantité de biomasse en dépit de la grande vitesse de la partie liquide et permet également la production de biogaz. Le réacteur peut donc opérer avec des temps de rétention très courts, car la rétention de la boue granulaire est pratiquement indépendante du temps de rétention hydraulique (Schmidt et Ahring, 1995). Les sections suivantes traiteront exclusivement des granules anaérobies normalement retrouvés dans les bioréacteurs UASB.

1.5.3.1 Composition

La boue granulaire est généralement composée de minéraux inorganiques et de polymères extracellulaires. La composition des boues granulaires est dépendante de la température d'opération, de la composition de l'influent et de la composition en micro-

organismes. Les minéraux inorganiques composent de 10 à 90 % du poids sec des granules. Il semble que plusieurs paramètres affectent la quantité de minéraux dans les boues granulaires, tels que la température, le pH, la période d'opération, la charge en matière organique et la concentration en minéraux de l'influent. Les éléments généralement retrouvés sont le calcium, le potassium, le fer, le soufre, le sodium, le phosphore, le magnésium et des éléments en trace comme le nickel et le cobalt. L'accumulation de précipités inorganiques dans les boues granulaires pourrait servir à maintenir la densité élevée des granules et servirait également de support à la croissance bactérienne (Schmidt et Ahring, 1995, 1996; Skiadas *et al.*, 2003).

Pour leur part, les polymères extracellulaires (PEC) sont définis comme étant des structures d'origine bactérienne comprenant des polysaccharides et situés à l'extérieur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et du peptidoglycan des bactéries à Gram positif. Les bactéries comprises dans les granules bactériens sont entourées de PEC et il est généralement accepté que la formation de granules bactériens s'accompagne d'une production de PEC. Le contenu en PEC des granules bactériens varie entre 0,6 et 20 % des VSS. Les PEC comprennent principalement des EPS (1-3,5 % des VSS) et des protéines (3-16 % des VSS), mais également des lipides (0,02 à 0,05 % des VSS), des acides nucléiques, des phénols, ainsi que toutes autres molécules excrétées par les bactéries. Le ratio des EPS et des protéines varie généralement entre 2:1 et 6:1. La concentration des PEC dépend de plusieurs paramètres, dont la température d'opération du réacteur et la composition de l'influent (charge en carbone organique, présence de fer et d'extrait de levure dans l'influent, ratio C/N). La fonction des PEC consiste à emprisonner les nutriments, augmenter la pathogénicité, diminuer la susceptibilité à la phagocytose ou encore faciliter l'adhésion dans le cas de bactéries dans des écosystèmes. Également, la production de PEC peut altérer les charges à la surface des bactéries, facilitant alors leur agrégation. Toutefois, les recherches menées jusqu'ici n'ont pas permis de déterminer si une espèce spécifique produisait des PEC ou bien si la production de PEC était possible par toutes ou plusieurs espèces. Malgré tout, certains travaux permettent d'avancer que la production de PEC, en particulier la production de polysaccharides, est restreinte aux systèmes méthanogènes et acétogènes, alors que les

populations acidogènes auraient une influence sur la production (Schmidt et Ahring, 1996).

Évidemment, les boues granulaires contiennent aussi des micro-organismes. Des comptes directs de bactéries dans les granules font état de concentration variant entre 5×10^{10} à $1,4 \times 10^{12}$ cellules ml^{-1} de granules (Schmidt et Ahring, 1995, 1996; Skiadas *et al.*, 2003).

1.5.3.2 Composition en micro-organismes

Plusieurs espèces bactériennes se retrouvent parmi les granules bactériens. Parmi les genres identifiés figurent des bactéries méthanogènes telles que *Methanobrevibacter* spp., *Methanospirillum* spp., *Methanosaeta* spp. et *Methanosarcina* spp. Aussi, certaines bactéries synthropes ont déjà été identifiées, comme par exemple *Synthrophobacter* spp., *Synthrophomonas* spp., et *Pelobacter* spp. Également, quelques bactéries sulfato-réductrices ont été identifiées, comme *Desulfovibrio* sp. et *Desulfobulbus* sp. (Schmidt et Ahring, 1995).

Parmi les genres bactériens présents dans les granules anaérobies, *Methanosarcina* et *Methanosaeta* sont d'importants genres acéticlastes. Le genre *Methanosarcina* spp. croît généralement en formant de larges agrégats d'environ 1 à 3 mm de diamètre. Ces agrégats consistent en un grand nombre de cellules bactériennes entourées d'une épaisse cloison. Les bactéries composant ce genre bactérien sont capables d'utiliser différents substrats méthanogènes tels que l'acétate, le méthanol, les méthylamines et parfois le H_2/CO_2 . Les bactéries de ce genre bactérien sont faciles à identifier au microscope à cause de leur morphologie distincte (croissance en doubles paires) et également à cause de leur contenu élevé en cofacteur F₄₂₀. Ce cofacteur possède la capacité d'émettre une fluorescence bleue-verte lorsque excité par des longueurs d'ondes proches de 420 nm. Par contre, les bactéries composant le genre *Methanosaeta* sont des organismes filamentueux qui ne croissent qu'en présence d'acétate. Ces bactéries ne contiennent pas suffisamment de facteur F₄₂₀ pour émettre de l'autofluorescence (Schmidt et Ahring, 1995). Certains travaux font état que la population totale de granules ayant poussé en présence d'eau usées d'une industrie de fabrication de sucre serait composée à environ 20 % par des bactéries méthanogènes fluorescentes et à environ 20 à 30 % de bactéries

semblables à *Methanosaeta* spp (Dolfing *et al.*, 1985; Dolfing, 1986). Par contre, plusieurs autres études rapportées par Schmidt et Ahring (Schmidt et Ahring, 1996) ont démontré que le genre *Methanosaeta* tout autant que le genre *Methanosarcina* pouvaient dominer dans les boues granulaires.

L'analyse des différentes populations de micro-organismes présentes dans un bioréacteur UASB dégradant le PCP a été effectuée par Tartakovsky *et al.* (2001). Ces chercheurs ont trouvé à l'aide de la technique de DGGE que le profil de bandes obtenu suite à l'exposition du réacteur au PCP était encore similaire au profil du réacteur contrôle n'ayant pas été exposé au PCP, exception faite de quelques bandes mineures. Après 17 jours d'opération et d'exposition au PCP, l'intensité de plusieurs bandes a diminué, mais les bandes restantes sont restées stables jusqu'à la fin du suivi (137 jours) et l'intensité de certaines de ces bandes a même augmenté. Le séquençage de plusieurs de ces bandes a permis de confirmer la présence de différents genres bactériens, tels que *Clostridium*, *Synthrophomonas*, *Synthrophobacter*, *Synthrophus*, *Bacteroides*, *Geobacter*, *Planococcus* et *Bacillus*.

1.5.3.3 Associations synthropiques au sein des boues granulaires

La dégradation de la matière organique en CH₄ et CO₂ sous conditions anaérobies s'effectue selon un système d'interactions complexes entre différents groupes de bactéries. D'abord, les bactéries fermentaires hydrolysent les polymères organiques à l'aide d'enzymes extracellulaires. Les oligomères et monomères qui en résultent sont alors fermentés en acides gras volatiles (VFA; comme l'acétate, le propionate et le butyrate) et en H₂ et en CO₂. Puis, les bactéries acétogènes prennent la relève. Les bactéries acétogènes productrices d'hydrogène transforment le propionate, les acides gras à longues chaînes et les composés aromatiques en CO₂ et H₂ et acétate. Les bactéries acétogènes consommatoires d'hydrogène vont transformer le CO, le CO₂, le méthanol ainsi que les groupes méthoxyl des composés aromatiques en acétate et butyrate. Puis, les bactéries ayant des capacités de carboxylation réductrice vont transformer le propionate en butyrate. Ensuite, les bactéries méthanogènes sont responsables des étapes de dégradation suivantes : les bactéries méthanogènes utilisatrices d'hydrogène vont transformer le CO₂ en CH₄, alors que les bactéries méthanogènes acéticlastes vont

transformer l'acétate en CH₄ et CO₂. Enfin, les bactéries réductrices de sulfate vont transformer le H₂ en H₂S (Guiot *et al.*, 1992; Schmidt et Ahring, 1995).

1.5.3.4 Structure

Plusieurs types de boues granulaires ont déjà été décrits, tels que les granules, les boulettes («pellets»), les flocons («flocs») et la boue floconneuse («floculent sludge»). Toutefois, il n'existe pas de distinction claire entre les différents types de boues, bien que généralement les boulettes et les granules possèdent une structure plutôt dense, contrairement aux flocons et à la boue floconneuse, qui eux possèdent une structure plus relâchée. La dimension des granules peut varier entre 0,14 et 5 mm de diamètre, dépendamment du type d'influent et des conditions d'opérations et ils possèdent généralement une forme sphérique. Des pores sont présents dans les boues granulaires, ce qui permet l'entrée des nutriments et la sortie des différents gaz produits par la digestion anaérobie. La porosité et la taille des pores sont liées à la densité des PEC (Schmidt et Ahring, 1996; Skiadas *et al.*, 2003).

Plusieurs travaux de recherche ont déjà été publiés sur la structure des granules anaérobies. Les premiers travaux ont utilisé la microscopie électronique et l'immunofluorescence et ont réussi à démontrer une disposition structurée des micro-organismes à l'intérieur, généralement sous forme de couches ou de microcolonies (MacLeod *et al.*, 1990; Grotenhuis *et al.*, 1991; Macario *et al.*, 1991). La revue de littérature de Guiot *et al.* (1992) présente un modèle toujours valide de la structure interne des boues granulaires et qui a été confirmé depuis par la technique de FISH (Harmsen *et al.*, 1996a; Harmsen *et al.*, 1996b; Rocheleau *et al.*, 1999; Santegoeds *et al.*, 1999; Sekiguchi *et al.*, 1999; Imachi *et al.*, 2000; Tagawa *et al.*, 2000; Zheng et Raskin, 2000; Wu *et al.*, 2001). Dans le modèle proposé par Guiot *et al.* (1992), les granules nourris avec du glucose ont une structure composée de trois couches (Figure 1.5). La couche externe est composée de bactéries acidogènes, de bactéries réductrices de sulfate, de méthanogènes utilisant le H₂ et de *Methanosarcina* spp. La couche intermédiaire est composée de bactéries acétogènes hydrogénotrophes et de méthanogènes utilisant le H₂. Enfin, la couche interne est composée de *Methanosaeta* spp. L'association de ces divers micro-organismes en granules permet d'optimiser la coopération entre les différents

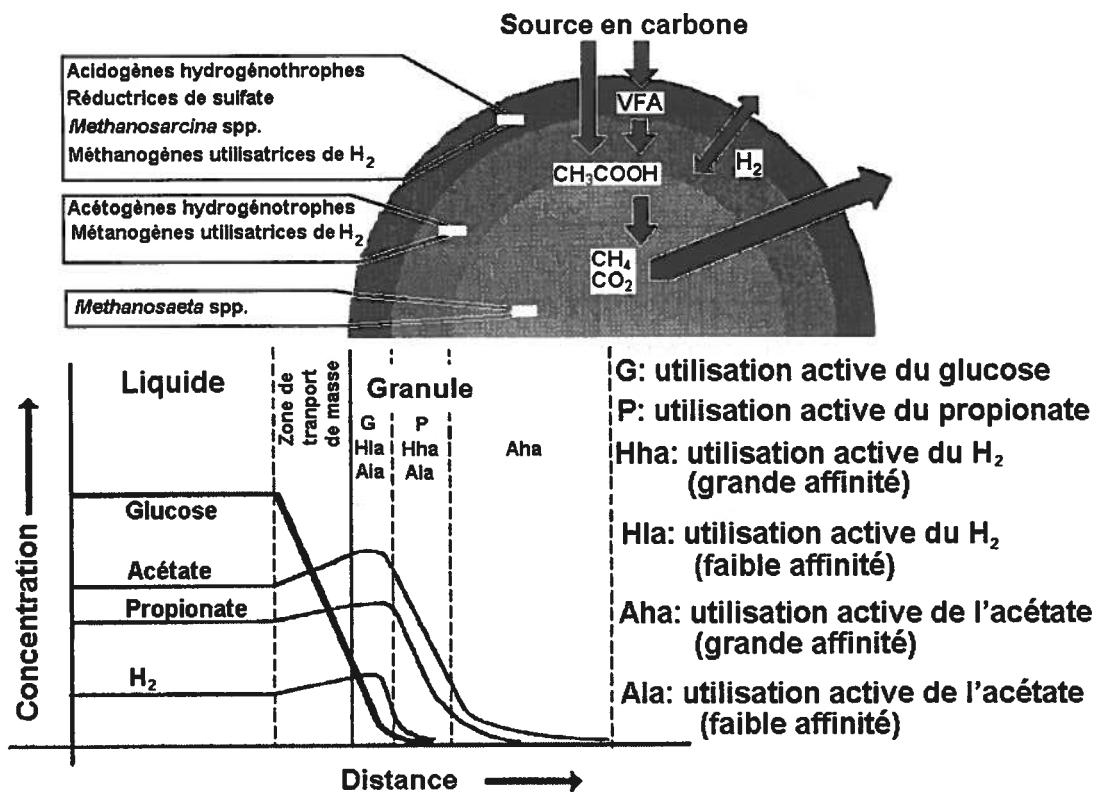


Fig. 1.5. Structure des populations de micro-organismes dans des boues granulaires nourries avec du glucose et utilisation des différents produits de dégradation dans les boues granulaires. Modifié de Guiot *et al.* (1992).

membres du consortium en réduisant la distance de transfert des métabolites et en disposant les cellules proches les unes des autres, ce qui est nécessaire pour la dégradation du propionate et du butyrate (Guiot *et al.*, 1992).

La composition de granules mésophiles a été d'abord étudiée par IF. Les recherches effectuées par Grotenhuis *et al.* (1991) ont démontré la présence de deux types d'amas bactériens dans des granules enrichis avec du propionate. Le premier groupe était composé de bactéries reliées selon des critères immunologiques à *Methanotherix* (maintenant *Methanosaeta*) *soehngenii*, alors que l'autre type d'amas était composé de bactéries réagissant avec un sérum anti-*Methanobrevibacter arboriphilus* et de micro-organismes oxydant le propionate mais n'étant pas en relation avec *Synthrophobacter wolinii*.

L'arrangement sous forme de couches des micro-organismes dans les boues granulaires a été observé directement avec la technique de FISH. Les premiers travaux à ce sujet ont été publiés par Harmsen *et al.* (1996b) avec des granules ayant été nourri avec du sucre ou un mélange de VFA. Dans le cas des granules nourris avec du sucre, ils ont réussi à démontrer que la couche externe des granules était constituée d'*Eubacteria* alors que plus profondément dans ces granules, les chercheurs ont retrouvé des microcolonies de méthanogènes en association intime avec des bactéries synthropes ainsi que des bactéries méthanogènes dans la couche centrale. Ces résultats ont démontré la présence de trois couches distinctes dans les boues. Dans le réacteur nourri avec un mélange de VFA, les chercheurs ont également détecté une couche externe d'*Eubacteria* suivie d'une épaisse couche de bactéries similaires à des *Methanosaeta* mélangées à des *Eubacteria* et suivie d'une troisième couche de bactéries méthanogènes suivie d'une couche de bactéries méthanogènes mélangées avec des bactéries synthropes. La présence d'une quatrième couche dans ce système a été expliquée par les auteurs par la forte concentration en acétate utilisée pour nourrir ce réacteur et qui sont inhibitrice des bactéries synthropes responsables de la dégradation du propionate. La présence de bactéries méthanogènes dans la troisième couche favoriserait donc la dégradation de l'acétate avant que celui-ci n'arrive en contact avec les bactéries synthropes.

Harmsen *et al.* (1996a) ont également étudié à l'aide la technique de FISH des boues granulaires provenant d'un réacteur industriel nourri avec des eaux usées d'une

industrie de la patate. Ces auteurs ont remarqué encore une fois la présence d'une couche externe constituée en majeure partie d'*Eubacteria* et contenant également une espèce de SRB, *Desulfobulbus*. Une couche plus interne contenant deux types de microcolonies disposées de manière concentrique a également été observée. Le premier type de microcolonie ne contenait que des bactéries méthanogènes, alors que le deuxième type contenait un mélange des méthanogènes filamenteuses ainsi que des *Eubacteria*. Les chercheurs ont ensuite tenté de modifier cette disposition en transférant des boues granulaires dans deux bioréacteurs UASB différents: le premier nourri avec du propionate dans le but d'y maintenir les micro-organismes sous conditions méthanogènes, alors que le deuxième a été nourri avec du propionate et du sulfate, afin d'y maintenir des conditions de sulfato-réduction. Après une période de 8 à 12 semaines sous ces conditions, la couche externe d'*Eubacteria* des granules avait été remplacée par deux types de microcolonies dans le cas du réacteur maintenu sous conditions méthanogènes. Le premier type de microcolonie contenait des bactéries synthrophes oxydant le propionate et des bactéries méthanogènes alors que le deuxième type de microcolonies ne contenait que des bactéries méthanogènes. Par contre, dans le réacteur opéré sous condition de sulfato-réduction, *Desulfobulbus* spp. a été détecté dans la couche externe, démontrant ainsi que les populations de micro-organismes peuvent se restructurer à l'intérieur des boues granulaires lorsqu'elles sont exposées à de nouveaux substrats.

Sekiguchi *et al.* (1999) ont également analysé la disposition des micro-organismes dans les boues granulaires par FISH et obtenus des résultats similaires. Ces chercheurs ont comparé la structure de granules mésophiles et thermophiles ayant été nourris avec un mélange de sucre, de VFA et de peptone ou d'extrait de levure. Dans les deux réacteurs, les granules possédaient une couche externe composée d'*Eubacteria* et ont également détecté la présence d'*Archaea* dans les couches plus internes. Des *Methanobacteriaceae* (en association intime avec des *Synthrophobacter*) ainsi que des *Methanomicrobiales* et des *Eubacteria* ont été détectées dans les couches plus internes, alors que des *Desulfobulbus* ont été détectées dans la couche externe pour les granules du réacteur mésophile. Dans le cas du réacteur thermophile, des *Methanobacteriaceae* et des *Methanosaericaea* ont été détectées dans les couches plus internes et des bactéries

filamenteuses faisant partie du groupe des bactéries vertes non soufrées (« Green non-sulfur ») dans la couche externe.

Rocheleau *et al.* (1999) ont ciblé différentes populations de bactéries méthanogènes dans des boues granulaires nourries avec des eaux usées riches en protéines ou avec du méthanol. Ces chercheurs ont réussi à démontrer clairement que la disposition des espèces était différente dépendamment de la source de carbone utilisée. Lorsque les boues étaient nourries avec du méthanol, les deux populations de bactéries méthanogènes étaient disposées sous forme de couches dans les boues, avec *Methanosaeta concilii* dans les couches plus internes. Dans le cas des boues nourries avec l'influent riche en protéines, *M. barkeri* et *M. concilii* étaient disposés au hasard. Ces auteurs ont conclu que la disposition de ces deux bactéries dans les granules dépendait de la provenance initiale des granules ainsi que du type d'enrichissement. Cette absence de couches a également été observées dans les boues granulaires provenant d'un réacteur dégradant le téraphthalate (Wu *et al.*, 2001).

La disposition des bactéries réductrices de sulfates dans des boues granulaires exposées à des conditions méthanogènes, sulfidogènes et les deux conditions à la fois a également été déterminée par Santegoeds *et al.* (1999). Dans les boues méthanogènes, peu de bactéries sulfato-réductrices ont été observées, alors que dans les boues exposées à du sulfate, ces bactéries formaient une couche de 300 µm à la surface des boues, alors que les méthanogènes étaient situées dans les couches internes et en association avec des bactéries synthropes. Sous les conditions hybrides, les bactéries sulfato-réductrices ont été détectées à la surface formant une couche moins épaisse (50-100 µm) que sous conditions exclusivement sulfidogènes. Toutefois, une couche intermédiaire de *Eubacterium* entre les bactéries méthanogènes et les bactéries réduisant le sulfate a été observée.

La localisation de souches ayant des capacités de biodégradation a déjà été effectuée dans des bioréacteurs UASB. Par exemple, des cellules de *Desulfomonile tiedje* ayant été inoculées dans un réacteur exposé à du 3-chlorobenzoate (3-CB) ont colonisé les granules méthanogènes en formant des microcolonies à la surface des boues et aussi dans les régions plus internes. Cette disposition a été observée par IF (Ahring *et al.*,

1992). Aussi, des cellules de *Sulfurospirillum multivorans* ayant été inoculées dans un réacteur exposé à du PCE ont formé des microcolonies à la surface de granules vivants, alors que dans des granules autoclavés, les microcolonies étaient retrouvées au centre des boues (Horber *et al.*, 1998). Dans le cas de *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2, cette bactérie a démontré qu'elle se disposait de manière uniforme (motif en forme de filet) dans des granules autoclavés disposés dans un réacteur UASB supplémenté avec du PCP. *D. hafniense* a également été visualisée par IF dans cette étude (Christiansen et Ahring, 1996b). Dans les trois études, la capacité de dégradation de la souche a été transposée avec succès au bioréacteur.

1.5.3.5 Processus de formation

Plusieurs modèles tentant d'expliquer la formation des boues granulaires ont été présentés jusqu'ici dans la littérature. Une excellente revue de la littérature a été effectuée sur le sujet par Liu *et al.* (2003). Les auteurs de cette revue ont évalué la littérature sur le sujet et présentent un modèle général expliquant la formation des boues granulaires. Selon ces auteurs, des facteurs physiques, chimiques et biologiques seraient impliqués dans les quatre étapes de formation des boues granulaires. Plusieurs de ces étapes sont similaires à la formation des biofilms présentés à la section 1.4.1.2.

La première étape du modèle proposé par Liu *et al.* (2003) consiste en l'initiation du processus d'agrégation des bactéries (entre elles ou sur une particule) par des facteurs physiques. Les différents processus pouvant être impliqués dans cette étape sont la diffusion, l'hydrodynamique du système, la force gravitationnelle, le mouvement Brownien et la motilité cellulaire. La deuxième étape consiste à conserver le contact initial des micro-organismes par des forces physiques, chimiques et biochimiques. Dans le cas des forces physiques, des processus comme les forces de Van der Waals, l'utilisation de charges opposées, les forces thermodynamiques (énergie libre de surface, tension de surface) et l'hydrophobicité pourraient être impliquées. Les bactéries filamenteuses pourraient également jouer un rôle à cette étape en servant de pont entre les cellules et en solidifiant l'agréagat initial. Dans le cas des forces chimiques, des liens hydrogènes, des liens ioniques ou encore des liens interparticulaires pourraient être impliqués à cette étape. Des forces biochimiques comme la déshydratation à la surface

des cellules, des fusions entre les membranes cellulaires et même de la signalisation cellulaire de type QS pourraient être impliquées. Même si la signalisation cellulaire n'a jamais été démontrée dans le cas des boues granulaires, l'agencement optimal des micro-organismes pour la dégradation de substrats à l'intérieur des boues laisse croire que ce type de mécanisme est possible. La troisième étape du modèle consiste en la maturation du système et donc l'obtention d'un système hautement structuré. Cette étape impliquerait la croissance en microcolonies ou en couches ainsi que des changements métaboliques et d'expression génétique induits par l'environnement et la synthèse de PEC par les micro-organismes. Comme les bactéries dispersées sont chargées négativement et se répulsent, la formation de PCE peut changer les charges à la surface des micro-organismes et permettre ainsi leur agrégation (Skiadas *et al.*, 2003). L'état d'équilibre au niveau de la structure est atteint à la quatrième étape, mais les forces hydrodynamiques, les espèces microbiennes et la force des interactions entre les différentes espèces ainsi que la disponibilité des substrats peuvent encore modeler la forme des granules.

1.5.4 Biofilms dénitritifiants

Les rejets industriels contenant de fortes charges en matière organique sont généralement traités avec un bioréacteur anaérobie méthanogène, qui transforme alors la matière organique en méthane, dioxyde de carbone, sulfide d'hydrogène et ammoniac. Ce premier traitement anaérobie est ensuite suivi par un traitement de nitrification aérobie afin d'oxyder la matière organique résiduelle en dioxyde de carbone et eau et transformer l'ammoniac en nitrate. La dénitritification est la dernière étape de ce traitement et est anoxique, et complète l'élimination du carbone et de l'azote (Akunna et Moletta, 1992; Quevedo *et al.*, 1996). Le nitrate sous conditions anaérobies est réduit par un processus respiratoire où le nitrate est utilisé comme accepteur terminal d'électron. Ceci peut s'effectuer par les processus de dénitritification ou d'ammonification. La dénitritification consiste en la réduction du nitrate en nitrite, puis le nitrite est réduit en azote ou en oxyde nitreux. Lors du processus d'ammonification, le nitrate est réduit en nitrite, puis en ammoniac (Akunna et Moletta, 1992; Quevedo *et al.*, 1996). Akkuna *et al.* (1994b) ont suggéré que le processus de méthanogenèse et de dénitritification pourraient s'effectuer dans le même réacteur, simplifiant alors le procédé. Cette suggestion a été appuyée par

les données publiées par Akkuna *et al.* (1992) et par Quevedo *et al.* (1996), qui ont démontré que les boues méthanogènes possédaient une activité de dénitrification. Toutefois, peu d'informations ont été publiées sur les effets de l'addition de nitrate à un procédé méthanogène (Quevedo *et al.*, 1996).

1.6 *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1

Un consortium méthanogène pouvant dégrader le PCP a été enrichi à partir de boues activées et de sols contaminés par le PCP et son activité de dégradation étudiée dans un bioréacteur à flux continu et dans un bioréacteur à FF (Juteau *et al.*, 1995a; Juteau *et al.*, 1995b). Dans le bioréacteur à flux continu, le PCP était ajouté de manière graduelle dans le bioréacteur, permettant la dégradation immédiate de concentration en PCP allant jusqu'à 50 mg l⁻¹ (Juteau *et al.*, 1995b). Dans le cas des performances de ce consortium dans un bioréacteur à FF, une dégradation de plus de 99 % a été observée avec des concentrations en PCP de l'ordre de 60 µmol l⁻¹ de volume de réacteur j⁻¹ (Juteau *et al.*, 1995b). De plus, ce réacteur a également été utilisé pour traiter le PCP extrait de copeaux de bois contaminés au PCP (Beaudet *et al.*, 1997).

La bactérie *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 a été isolée du consortium méthanogène dont il vient d'être question. Cette bactérie sporulante en forme de bâtonnet n'est pas mobile (quoiqu'un certain nombre de cellules en culture puisse avoir des flagelles) et peut utiliser plusieurs accepteurs d'électrons, dont le sulfite, le thiosulfate et le nitrate. Cette souche croît de manière optimale à 38°C et à un pH de 7,5. 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. La souche PCP-1 possède la capacité de déshalogénérer le PCP en 3-MCP, selon la voie de dégradation suivante : PCP → 2,3,4,5-TeCP → 3,4,5-TCP → 3,5-DCP → 3-MCP. Cette voie de dégradation correspond à l'élimination des atomes de chlore selon l'ordre *ortho*, *para*, *meta*, ce qui en fait le seul micro-organisme anaérobie connu pouvant déshalogénérer le PCP aux trois positions. Cette bactérie peut également déshalogénérer plusieurs chlorophénols à différentes positions, mais ne peut déshalogénérer aucun des MCP, ni le 2,3-DCP, le 2,5-DCP et le 3,4-DCP (Bouchard *et al.*, 1996). Au moins deux systèmes enzymatiques sont impliquées au niveau de la déshalogénéation chez cette souche, le

premier est inductible pour les déshalogénations en position *ortho*, alors que le second est inductible pour les déshalogénations en position *meta* et *para* (Dennie *et al.*, 1998). Le premier système enzymatique a été isolé et caractérisé (Boyer *et al.*, 2003) et la publication sur l'isolement et la caractérisation du second système enzymatique devrait être publiée sous peu. Il semble également que plusieurs autres gènes codant pour des déshalogénases soient présents chez *D. frappieri* (Villemur *et al.*, 2002).

La souche PCP-1 possède un spectre d'activité large. En effet, cette bactérie peut déshalogénérer (en position *ortho*, *meta* et/ou *para*) une vaste gamme de produits halogénés, dont des produits phénolés (2,4,6-tribromophénol, tétrachlorocatéchol, tétrachloroguaiacol, tétrachlorovératrole, pentachloroanisole, 3,5-dichloro-4-hydroxybiphényl), des produits aminés (penta-chloroaniline, 2,3,5,6-tétrachloroaniline, pentachloronitrobenzène, pentachloropyridine) et le TCE (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 $\text{g}_{\text{sol}}^{-1}$ (Lévesque *et al.*, 1997). Cette technique a été appliquée avec succès lors d'essais de biodégradation en microcosme contenant du sol contaminé par le PCP et inoculés avec la souche PCP-1. Une technique de PCR 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).

Des travaux effectués par Beaudet *et al.* (1998) ont montré que l'inoculation de la souche PCP-1 à des microcosmes contenant 10 % de sol permettait d'obtenir la dégradation de concentration en PCP de l'ordre de $100 \text{ mg kg}_{\text{sol}}^{-1}$ en moins de 7 jours. Des essais effectués par PCR quantitatif ont permis de déterminer que la population de bactéries PCP-1 était stable au cours du traitement. Par contre, dans des microcosmes contaminés par 300 mg et 500 mg de PCP $\text{kg}_{\text{sol}}^{-1}$, une deuxième inoculation était nécessaire afin d'obtenir une dégradation complète. Ceci implique donc que plusieurs inoculations de la souche PCP-1 pourraient être utilisées pour traiter des sols fortement contaminés. Également, Lanthier *et al.* (2000) ont effectué l'inoculation de bactéries

PCP-1 dans des bioréacteurs rotatifs contenant différents mélanges de sols contaminés au PCP et de milieu de culture. Ces chercheurs ont effectué le suivi par PCR et PCR quantitatif de la souche PCP-1 suite à son inoculation dans les différents bioréacteurs et ont remarqué que cette souche compétitionnait bien avec la flore indigène des sols testés, puisque la souche PCP-1 pouvait être détectée tout au long des expériences. Toutefois, si la contamination en PCP était trop élevée ($750 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ kg}_{\text{sol}}^{-1}$), si le sol était également contaminé par une forte concentration de créosote ($750 \text{ mg d'hydrocarbures aromatiques polycycliques kg}_{\text{sol}}^{-1}$), ou encore si le sol contenait peu de matière organique permettant l'adsorption du PCP, la population de bactéries PCP-1 diminuait rapidement et aucune dégradation n'était observée. Bien que l'ADN provenant de cellules mortes peut être détecté par PCR (Wintzingerode *et al.*, 1997), l'ADN des cellules mortes est généralement dégradé assez rapidement (Nielsen *et al.*, 2000).

Il a également été démontré que *D. frappieri* PCP-1 et les autres bactéries du genre *Desulfobacterium* étaient présentes dans plusieurs sols et sédiments de la Province de Québec. Divers échantillons de sols et de sédiments ont été récoltés, puis les bactéries présentes dans ces échantillons ont été enrichies pendant deux semaines. Une extraction d'ADN suivie d'un PCR a permis de détecter des bactéries du genre *Desulfobacterium* et *D. frappieri* PCP-1 dans plus de 60 % des 44 échantillons testés, suggérant que ce genre bactérien serait relativement important dans les sols et les sédiments. Aucune relation n'a pu être établie entre la présence de contaminants et la détection d'un signal positif pour ces micro-organismes (Lanthier *et al.*, 2001).

Des travaux effectués par Tartakovsky *et al.* (1999) ont permis de déterminer que la bioaugmentation d'un bioréacteur anaérobie à boues granulaires avec *D. frappieri* PCP-1 faisait passer les capacités de dégradation de ce bioréacteur de 5 à $80 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. L'ajout de la souche PCP-1 a également permis d'obtenir une efficacité de dégradation du PCP supérieur à 99 % et une efficacité de déchloruration de 90,5 %. L'attachement de la souche PCP-1 aux granules a été confirmé par PCR.

L'étude de la bioaugmentation de bioréacteurs anaérobies à boues granulaires et à FF avec la souche PCP-1 constitue donc un domaine intéressant, puisque les performances de dégradation semblent pouvoir être grandement améliorées. Ce projet de

recherche vise donc à déterminer la disposition spatiale de la souche PCP-1 dans ces deux types de bioréacteurs à l'aide de la technique de FISH.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quand à la disposition de la souche PCP-1 dans les boues granulaires et les biofilms. Dans le cas des boues granulaires, la souche PCP-1 pourrait se retrouver dans une ou plusieurs des trois couches retrouvées dans les boues granulaires et ce, sous forme de couche, de microcolonies, ou de bactéries dispersées. Les facteurs qui auront l'effet le plus important sur la disposition de la souche PCP-1 seront la charge en PCP, les interactions synthrophiques avec les autres membres du consortium (pour l'obtention du pyruvate, qui n'est pas présent dans l'influent) et la capacité de diffusion de la souche PCP-1 dans les boues, puisque la souche PCP-1 sera inoculée dans un bioréacteur contenant des boues matures et donc déjà formées.

En ce qui concerne la disposition de la souche PCP-1 dans les biofilms retrouvés dans des réacteurs à FF, celle-ci pourrait se retrouver sous forme de couche, de microcolonies ou de bactéries dispersées. Les facteurs affectant sa disposition seront la charge en PCP, la présence de nitrate et les interactions synthrophiques avec les autres membres du consortium pour l'obtention du pyruvate. La souche PCP-1 et des boues granulaires désagrégées seront inoculées en même temps dans les réacteurs à FF, alors le processus de diffusion sera probablement moins important.

Ces travaux permettront de mieux comprendre les interactions entre la souche PCP-1 et les bactéries composant les consortiums dans lesquels elle a été introduite. Également, ces travaux permettront d'acquérir des connaissances fondamentales sur les biofilms anaérobies, qui sont encore peu connus, et sur les micro-organismes responsables de la dégradation de polluants dans les biofilms et ultimement, d'améliorer les capacités de dégradation des bioréacteurs anaérobies.

Partie 2: Articles scientifiques

2.1 Mise en contexte de l'article 1

Le but de ce projet de recherche consistait à visualiser la souche PCP-1 dans des biofilms anaérobies. Le premier biofilm étudié était les boues granulaires provenant d'un bioréacteur UASB. Ce bioréacteur UASB a été inoculé avec *D. frappieri* PCP-1 par Tartakovsky *et al.* (1999) et cette inoculation a permis au bioréacteur d'acquérir une forte capacité de dégradation du PCP. Comme les auteurs avaient confirmé l'attachement de la souche PCP-1 aux boues granulaires par PCR, ceux-ci étaient intéressés à visualiser directement ce micro-organisme dans les granules. Nous avons donc décidé d'effectuer une collaboration afin de déterminer la disposition de la souche PCP-1 dans ces boues de ce bioréacteur à l'aide de la technique de FISH.

Les résultats obtenus suite aux expériences de FISH ont été publiés en 2002 dans la revue *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, p. 4035-4043. La disposition de *D. frappieri* PCP-1 dans les boues granulaires du réacteur UASB de Tartakovsky *et al.* (1999) y est présentée. Les résultats démontrent clairement la présence de microcolonies de bactéries PCP-1 à la surface des boues après trois semaines d'opération et une colonisation complète de la couche externe après neuf semaines d'opération. La disposition des *Eubacteria* et des *Archaea* est également présentée et concorde avec la littérature. Un modèle mathématique permettant la modélisation de la disposition des populations dans les boues granulaires y est également présentée.

2.2 Contribution de l'étudiant à l'article 1

Tous les travaux de FISH ont été effectués par l'étudiant sous la supervision des Drs Guiot, Tartakovsky et Villemur. Le protocole de départ était basé sur le protocole de Rocheleau *et al.* (1999). Plusieurs problèmes sont survenus lors de la mise au point de la technique. D'abord, le milieu d'enrobage utilisé initialement pour les boues granulaires et nécessaire au coupage au cryostat causait de l'autofluorescence dans les échantillons. Il a dû être changé pour de la paraffine, une cire ne causant pas ce problème. Aussi, divers problèmes reliés à l'hybridation non-spécifique des sondes fluorescentes ont du être réglés. L'ajustement de la température d'hybridation ainsi que la concentration en formamide du tampon d'hybridation ont finalement permis d'obtenir des signaux spécifiques et intenses. Le modèle mathématique a été mis au point par les Drs Guiot et

Tartakovsky, ainsi que par G. DeLuca, un étudiant à la maîtrise supervisé par le Dr. Tartakovsky.

2.3 Article 1: Microstructure of anaerobic granules bioaugmented with *Desulfobacterium frappieri* PCP-1

M. Lanthier¹, B. Tartakovsky², R. Villemur¹, G. DeLuca² and S. R. Guiot^{2*}

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

² Biotechnology Research Institute, NRC, Montréal, Québec, Canada H4P 2R2

Short title: Biogranules augmented with *D. frappieri*

Key words: *Desulfobacterium frappieri*, pentachlorophenol, FISH, biofilm model

Cet article a été publié dans Applied and Environmental Microbiology (2002), vol. 68, p. 4035-4043

* Corresponding author. Mailing address: Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Ave., Montréal, Québec, Canada H4P 2R2. Phone: (514) 496-6181. Fax (514) 496-6265. E-mail: serge.guiot@nrc.ca

2.3.1 Résumé

Des sondes nucléotidiques ont été utilisées afin d'étudier la structure de boues granulaires anaérobies provenant d'un réacteur à boues granulaires (UASB) supplémenté avec du pentachlorophénol (PCP) et bioaugmenté avec *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. La technique d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) a permis de démontrer que la souche PCP-1 était capable de coloniser les boues granulaires. Des microcolonies de souche PCP-1 dispersées à la surface des boues ont été détectées après trois semaines d'opération du réacteur, et une couche dense composée de bactéries PCP-1 a été observée après 9 semaines d'opération. L'hybridation avec des sondes spécifiques aux *Eubacteria* et aux *Archaea* a permis de voir que les *Eubacteria* avaient colonisé la couche externe des boues, alors que les *Archaea* ont été observées à l'intérieur des granules. Une distribution similaire à ce qui a été observé expérimentalement lorsqu'un taux de croissance spécifique de $2,2 \text{ j}^{-1}$ et une faible diffusion bactérienne de $10^{-7} \text{ dm}^2 \text{ j}^{-1}$ ont été utilisé lors de la simulation mathématique. Aussi, les simulations ont montré que la prolifération de la souche PCP-1 à la surface des boues permettait une protection des micro-organismes situés dans les couches plus internes envers la toxicité du PCP.

2.3.2 Abstract

Oligonucleotide probes were used to study the structure of anaerobic granular biofilm originating from a pentachlorophenol (PCP)-fed upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor augmented with *Desulfobacterium frappieri* PCP-1. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) demonstrated successful colonization of anaerobic granules by the strain PCP-1. Scattered microcolonies of strain PCP-1 were detected on the biofilm surface after three weeks of reactor operation, and a dense outer layer of strain PCP-1 was observed after nine weeks. Hybridization with probes specific for *Eubacteria* and *Archaea* probes showed that *Eubacteria* predominantly colonized the outer layer, while *Archaea* were observed in the granule interior. Mathematical simulations showed a distribution similar to that observed experimentally when using a specific growth rate of 2.2 d^{-1} and a low bacterial diffusion of $10^{-7} \text{ dm}^2 \text{ d}^{-1}$. Also, the simulations showed that strain PCP-1 proliferation in the outer biofilm layer provided excellent protection of the biofilm from pentachlorophenol toxicity.

2.3.3 Introduction

Bioaugmentation of a natural bacterial community is a potentially efficient approach for maximizing the degradation performance of a biological system. However, the fate of a newly introduced strain strongly depends on its interactions with the members of the indigenous bacterial consortium. As a result, the disappearance of introduced strains was observed as often as their retention (Christiansen and Ahring, 1996b; Bouchez *et al.*, 2000a; Bouchez *et al.*, 2000b). Bioaugmentation attempts are most successful when a newly introduced strain establishes commensal or mutualistic relationships within a natural consortium, e.g. by degrading substances otherwise toxic to the consortium.

The anaerobic degradation of chlorinated compounds by indigenous microorganisms often results in incomplete dechlorination and thus can benefit from bioaugmentation. In particular, bioaugmentation of an upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor with *Dehalospirillum multivorans* led to a transformation of perchloroethylene (PCE) to dichloroethylene, an improvement compared to a non-inoculated control, which only transformed PCE to trichloroethene (Horber *et al.*, 1998). Ahring *et al.* (1992) introduced a 3-chlorobenzoate dechlorination activity in an UASB reactor by bioaugmentation with *Desulfomonile tiedje*. Also, Christiansen and Ahring (Christiansen et Ahring, 1996b) demonstrated inoculation of an UASB reactor containing sterilized anaerobic granules with a PCP degrading strain of *Desulfitobacterium hafniense*.

In our previous work, an UASB reactor degrading PCP was successfully inoculated with the PCP degrading strain *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 (Tartakovsky *et al.*, 1999). This strain is the only isolated anaerobic microorganism capable of PCP dehalogenation to 3-chlorophenol (Bouchard *et al.*, 1996). Proliferation of strain PCP-1 allowed a substantial increase of the volumetric PCP load from 5 to 80 mg/liter of reaction volume/day with a PCP removal efficiency of 99 % and a dechlorination efficiency of not less than 91 %. Following inoculation, the density of strain PCP-1 was found to increase from 10^6 to 10^{10} cells g⁻¹ of volatile suspended solids (VSS) as observed by competitive PCR. This enumeration method, however, provided no

information on the spatial distribution of strain PCP-1 within the anaerobic granules and the colonization process.

The objectives of the present study were twofold: (i) to experimentally determine the distribution of strain PCP-1 within the anaerobic biofilm with regard to that of *Archaea* and *Eubacteria* using fluorescence *in situ* hybridization (FISH); (ii) to compare the visualized distribution of strain PCP-1 with computer simulations of strain PCP-1 proliferation in the biofilm based on a bacterial transport and growth biofilm model.

2.3.4 Materials and methods

2.3.4.1 Microorganisms and enrichment conditions of the UASB bioreactor

D. frappieri PCP-1 (ATCC 700357) was grown under strict anaerobic conditions at 37°C in a mineral salts medium supplemented with pyruvate (55 mM) and yeast extract (0.1 %), as described by Bouchard *et al.* (1996). Anaerobic sludge (62 g of VSS l⁻¹) was obtained from an industrial UASB reactor treating baby food industry wastewater (Champlain Industries Cornwall, Ontario, Canada). A 5 L UASB reactor was inoculated with 1.5 L of anaerobic sludge (93 g VSS) and 10 mL of the pure strain PCP-1 culture. The initial density of strain PCP-1 in the reactor was 10⁶ cells gvss⁻¹. The reactor was operated at a temperature of 35°C, which is considered optimal for operation of mesophilic anaerobic reactors (Speece, 1996). Other operational parameters were a pH of 7.3, and a retention time of 28 hours. It was fed with a 2 g l⁻¹ solution of PCP in NaOH, a nutrients solution which contained (in g l⁻¹) sucrose 304; butyric acid 96; yeast extract 7; ethanol (95 %) 70; KH₂PO₄ 6; K₂HPO₄ 7; NH₄CO₃ 68, and a chloride-free trace metal solution. A dilution stream contained (in g l⁻¹) NaHCO₃ 1.36; KHCO₃ 1.74. The PCP loading rate was related to methane production in the reactor, i.e. the toxicity of PCP towards the anaerobic consortium expressed as a normalized methane yield determined the PCP load. More details can be found in the work of Tartakovsky *et al.* (1999).

2.3.4.2 Oligonucleotide probes

The Cy3-labeled ARCH915 (Raskin *et al.*, 1994) and Cy3-labeled EUB338 (Amann *et al.*, 1990a) probes hybridized, respectively, to members of *Archaea* and most *Eubacteria*. Three probes (Table 2.1) were designed for the FISH detection of *D.*

Table 2.1. Sequences of oligonucleotide probes targeting 16S rDNA sequences^c.

Probe	Target organisms	Sequence (5'-3')	Position ^a
ARCH915	<i>Archaea</i>	G TGCTCCCCGCCAATTCCCT	915-934
EUB338	<i>Eubacteria</i>	GCTGCCCTCCCGTAGGAGT	338-355
S-S-D.frap-327(<i>D. frappieri</i>)-a-A-19 ^b	All strains of <i>D. frappieri</i> , <i>D. hafniense</i> , <i>D. chlororespirans</i>	GCGGATCCATCTACTAACCG	345-327
S-S-D.frap-86(<i>D. frappieri</i>)-a-A-20 ^b	All strains of <i>D. frappieri</i> except strain DP7	ATCCACCTATCTGCTCCTTA	105-86
S-S-D.frap-576(<i>D. frappieri</i>)-a-A-19 ^b	All strains of <i>D. frappieri</i> , <i>D. hafniense</i>	CCGTCAATGTAAGTACATTA	594-576
S-S-D.frap-555(<i>D. frappieri</i>)-a-A-21	Helpers for the S-S-D.frap-576(<i>D. frappieri</i>)-a-A-19 probe	T TTACATACITACCGTTTCGGTC	575-555
S-S-D.frap-595(<i>D. frappieri</i>)-a-A-18	Helpers for the S-S-D.frap-576(<i>D. frappieri</i>)-a-A-19 probe	GGGCTTCCCTCAGGTA	612-595

^aPosition relative to strain PCP-1 16S rDNA sequence

^bThese sequences are identical to the 16S rDNA sequence of the mentioned desulfobacteria.

^cAll oligonucleotides were labelled with Cy3 except S-S-D.frap-576(*D. frappieri*)-a-A-19 that was labelled with Cy5 and two helpers (unlabelled).

frappieri PCP-1 by comparing its 16S ribosomal RNA gene (rDNA) sequences with sequences from GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md) and the Ribosomal Database Project II (Michigan State University, East Lansing, MI). S-S-D.frap-327(*D. frappieri*)-a-A-19 is unique to the 16S rDNA sequences of the four *D. frappieri* strains (PCP-1, DP7, TCP-A, TCE1), of *Desulfitobacterium chlororespirans* and of *Desulfitobacterium hafniense*, but has at least two mismatches with other 16S rDNA of other *Desulfitobacterium* species. S-S-D.frap-86(*D. frappieri*)-a-A-20 sequence is located in the 128 nt insertion characteristic of *D. frappieri* 16S sequences (Bouchard *et al.*, 1996), and is unique to the 16S rDNA sequences of *D. frappieri* strains PCP-1, TCE1 and TPA but different to *D. frappieri* DP7 and other bacteria. S-S-D.frap-576(*D. frappieri*)-a-A-19 is unique to the 16S rDNA sequences of the four *D. frappieri* strains and of *Desulfitobacterium hafniense*, but has at least 2 mismatches with 16S rDNA sequences of other *Desulfitobacterium* species. S-S-D.frap-327(*D. frappieri*)-a-A-19 and S-S-D.frap-86(*D. frappieri*)-a-A-20 were both labelled with Cy3, while S-S-D.frap-576(*D. frappieri*)-a-A-19 was labelled with Cy5. Fluorescent probes were synthesized by Medicorps (Montreal, QC, Canada). Oligonucleotide helpers (Fuchs *et al.*, 2000) S-S-D.frap-555(*D. frappieri*)-a-A-21 and S-S-D.frap-595(*D. frappieri*)-a-A-18, synthesized by Hukabel Scientific LTD (Montreal, QC, Canada), were added to the hybridization solution to raise the fluorescent signal of S-S-D.frap-576(*D. frappieri*)-a-A-19.

2.3.4.3 FISH

Granular biomass was washed 3 times for 5 minutes each time in ice-cold filtered phosphate-buffered saline (PBS) buffer (NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄·H₂O 3 mM) and fixed for 3 hours in paraformaldehyde 4 %-PBS pH 7.2. Then the granules were dehydrated in a graded series of ethanol solutions of 50 %, 70 %, 95 %, and 100 %; incubated in pure xylene; and then incubated overnight at room temperature in a 50:50 preheated (at 60°C) solution of paraplast and xylene. Solidified samples were then incubated 3 times in pure paraplast wax at 60°C for 1 h and were transferred to plastic molds. Solidified blocks were cut in 7 µm slices and the slices were mounted on poly-L-

lysine slides (Polysciences, Niles, IL, USA). Blocks and mounted samples were kept at room temperature (Rocheleau *et al.*, 1999).

To eliminate the paraplast wax and permeabilize the cells, slices were soaked 2 times for 10 min each time in pure xylene and then 1 time for 10 min in 100 % ethanol (Jansenn, 1996). One ml of acetylation solution (triethanolamine 100 mM; acetic anhydride 0.25 %; NaCl 0.09 %; pH 7.2) was added to each slide. The slides were incubated for 10 minutes at room temperature and rinsed with deionized water. The acetylation step helped to lower non-specific binding of the probes to proteins (Emson et Gait, 1992). Then 10 µl of hybridization solution (deionized formamide 35 %; NaCl 0.9 M; Tris-HCl 0.02 M; SDS 0.01 %; final pH 7.2) containing 25 ng of fluorescent probe was directly added to each slide. Autofluorescence was verified by applying the hybridization buffer to a slice in the absence of a probe (Rocheleau *et al.*, 1999). To improve fluorescence signal with the S-S-D.frap-576(*D. frappieri*)-a-A-19 probe (labelled with Cy5), the two non-fluorescent helper oligonucleotides (25 ng each) were added to the hybridization buffer (Fuchs *et al.*, 2000). After addition of the hybridization solution, the slides were separately incubated in chambers humidified by paper towels saturated with 1 M NaCl (Stahl and Amann, 1991). Incubation was carried out in the dark at 46°C for 2 hours. Following hybridization, the slides were washed twice at 48°C in an agitated bath containing washing buffer (NaCl 0.04 M; Tris-HCl 1 M pH 7.2 0.02 M; SDS 0.01 %; EDTA 0.005 M) for 20 minutes each (Jansenn, 1996). The slides were then rinsed with deionized water or PBS and stained with DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride; 10 µg ml⁻¹) for 10 minutes at room temperature and in the dark. Subsequently, slides were rinsed with deionized water or PBS, and a cover slip was added and sealed with nail varnish. Slides were examined at magnifications of X100, X250 and X400 with an epifluorescence microscope (Leitz Laborlux S, Richmond Hill, On, Canada) equipped with filters for DAPI, Cy3 and Cy5 (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT, USA) and a mercury short arc photo optic lamp HBO 103 W/2 (OSRAM Sylvania Ltd., Mississauga, ON, Canada). Antifade was not used since initial experiments showed no significant difference between samples prepared with and without the antifade.

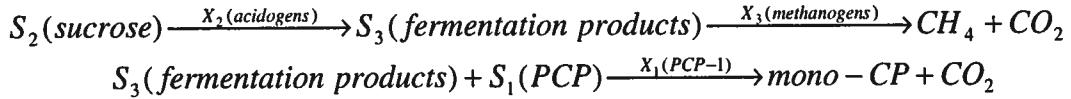
Images of granule cross sections were acquired using a CCD camera (Photometrics Coolsnap, Roper Scientific, Trenton, NJ, USA) with a filter and a Coolsnap V 1.0.0 software (Roper Scientific, Inc, Trenton, NJ, USA). The exposure time was 2 seconds for the DAPI and Cy3 probes and 8 seconds for the Cy5 probe. Adobe Photoshop (version 5.0; Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) software was used to construct two-color images of stained granule sections.

The hybridization procedure was repeated three to eight times using different samples for each probe and for each sampling time. For each probe, three representative hybridized granules, each obtained in a separate hybridization procedure, were used to analyze distribution of fluorescent areas. The analysis of images was carried out using NIH Image program (version 1.62; U.S. National Institutes of Health) according to the following sequence. The format of the images was converted to black and white by using a preset threshold value of signal intensity, i.e. white areas on the image represented hybridized cells. Then, the rectangular segments of the image were chosen. Each segment was typically 60 μm high and extended from an outer layer of a granule to its center. The segments were analyzed to determine the number of white pixels at each radial position. The resulting values were proportional to the specific area of hybridized cells. For each granule, at least five segments were selected, and the results were averaged. The results obtained from three different granules were also averaged.

2.3.4.4 Multispecies biofilm model

The multispecies biofilm model consisted of partial differential equations representing material balances on key substrates and bacterial trophic groups. The bacterial trophic groups of the model corresponded to those of the oligonucleotide probes used in this study: PCP-degrading bacteria (x_1), acidogenic bacteria (x_2), and methanogens (x_3). The substrates were PCP (s_1) and sucrose (s_2). For the sake of simplicity, intermediates of the anaerobic degradation of sucrose such as pyruvate, volatile fatty acids (VFAs), and acetate were grouped as a single entity, denoted as s_3 . Other simplifying assumptions used in the model are common in modeling of biofilms and can be found elsewhere (Wanner and Reichert, 1996; Tartakovsky and Guiot, 1997).

The overall interaction of substrates and bacterial species in the model is described by the following sequence of transformations:



Bacterial growth and substrate transformations were modeled using non-linear kinetic equations that accounted for substrate limitation of bacterial growth (e.g., sucrose-limited growth of acidogens, VFAs limited growth of methanogens, etc) as well as PCP toxicity. Substrate limitation was described using a Monod-like nonlinear dependence of the form $L(s)=s/(k_s+s)$ while the substrate inhibition dependence $I(s)$ was described by $I(s)= k_l / (k_l+s)$, where k_s and k_l are the limitation and the inhibition constants, respectively, and s is the substrate concentration.

Using these definitions, growth rates of PCP-degrading bacteria (μ_1), acidogenic bacteria (μ_2), and methanogenic bacteria (μ_3) were defined as follows:

$$\mu_1 = \mu_{\max 1} L(s_1) L(s_3) I(s_1) \quad (1)$$

$$\mu_2 = \mu_{\max 2} L(s_2) I(s_1) \quad (2)$$

$$\mu_3 = \mu_{\max 3} L(s_3) I(s_1) \quad (3)$$

where $\mu_{\max 1}$, $\mu_{\max 2}$, and $\mu_{\max 3}$ denote the specific growth rates of strain PCP-1, acidogenic, and methanogenic bacteria, respectively.

Specific consumption rates of PCP (q_1), sucrose (q_2), fermentation products by x_3 (q_3), fermentation products by x_1 (q_4) and production rate of fermentation products from sucrose (q_5) were defined as follows:

$$q_1 = q_{\max 1} L(s_1) L(s_3) I(s_1) \quad (4)$$

$$q_2 = q_{\max 2} L(s_2) I(s_1) \quad (5)$$

$$q_3 = q_{\max 3} L(s_3) I(s_1), \quad q_4 = q_{\max 4} L(s_1) L(s_3) I(s_1) \quad (6)$$

$$q_5 = q_{\max 5} L(s_2) I(s_1) \quad (7)$$

where q_{\max} denotes the maximal specific transformation rate.

Also, to account for cell transport in the biofilm, a diffusive flux of solids (i.e. bacterial cells) was introduced in agreement with the model formulation proposed by Wanner and Reichert (Wanner et Reichert, 1996).

To describe material balance on each bacterial and chemical species, a set of partial differential equations was defined as follows:

$$\frac{\partial x_i}{\partial t} = (\mu_i - k_d)x_i + D_x \frac{\partial^2 x_i}{\partial r^2}, \quad i=1, 2, 3 \quad (8)$$

$$\frac{\partial s_j}{\partial t} = -q_j x_j + D_s \frac{\partial^2 s_j}{\partial r^2}, \quad j=1, 2 \quad (9)$$

$$\frac{\partial s_3}{\partial t} = -q_3 x_3 - q_4 x_1 + q_5 x_2 + D_s \frac{\partial^2 s_3}{\partial r^2} \quad (10)$$

with the boundary conditions:

$$r = 0, \frac{\partial x_i}{\partial r} = 0, \frac{\partial s_j}{\partial r} = 0, \quad (11)$$

$$r = R, x_i = x_i^b, s_j = s_j^b \quad i=1, 2, 3, j=1, 2, 3 \quad (12)$$

where x^b and s^b are the bulk concentrations of bacterial species and substrates, respectively.

The set of equations (1-12) was transformed to a dimensionless form and solved numerically in Matlab (Mathworks, Inc., Natick, MA) by using a finite-difference method. The source code for the model equations (equations 1-12) alone with a graphical interface written in Matlab can be accessed at <http://www.bri.nrc.ca/envbioeng/PCPmodel.html>.

In the simulations, bulk substrate concentrations were chosen with respect to experimental data obtained during reactor operation. The following values were used (in mg l^{-1}) $s_1=5$; $s_2=200$; $s_3=30$. Bulk concentrations of bacterial species were (in g of VSS l^{-1}) $x_1=1$, $x_2=5$, $x_3=5$. Maximal density of biomass in the biofilm was set to 80 g VSS l^{-1} . No biofilm growth was allowed if total density of all bacterial species exceeded this value. Also, a constant granule radius of 1.5 mm, which corresponded to an average radius of biomass granules by the end of the reactor experiment, was assumed. Other model parameters are listed in Table 2.2.

Table 2.2. Model parameters.

Parameter	Value	Dimension
D_{s1}, D_{s2}, D_{s3}	$5 \cdot 10^{-4}$	$\text{dm}^2 \text{ d}^{-1}$
D_{x1}	$1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$	$\text{dm}^2 \text{ d}^{-1}$
D_{x2}, D_{x3}	$1 \cdot 10^{-7}$	$\text{dm}^2 \text{ d}^{-1}$
$q_{\max 1}$	400	mg g^{-1} of VSS $^{-1}$
$q_{\max 2}$	1500	mg g^{-1} of VSS $^{-1}$
$q_{\max 3}$	250	mg g^{-1} of VSS $^{-1}$
$q_{\max 4}$	400	mg g^{-1} of VSS $^{-1}$
$q_{\max 5}$	200	mg g^{-1} of VSS $^{-1}$
$\mu_{\max 1}$	0.3-2.2	day^{-1}
$\mu_{\max 2}$	1.0	day^{-1}
$\mu_{\max 3}$	0.6	day^{-1}
k_{s1}	0.2	mg l^{-1}
k_{s2}	25	mg l^{-1}
k_{s3}	50	mg l^{-1}
k_I	10	mg l^{-1}
x_{\max}	80	g l^{-1}

2.3.5 Results

2.3.5.1 FISH

The anaerobic granules analyzed by FISH originated from a PCP-treating UASB reactor. As described in the introduction, successful augmentation of this reactor was demonstrated by an increase in the strain PCP-1 population from 10^6 to 10^{10} cell g_{VSS}⁻¹ within a period of 70 days (Tartakovsky *et al.*, 1999). Samples were taken from the lowest port of the UASB reactor corresponding to the lower portion of the sludge bed where the PCP concentration would be highest. Samples were withdrawn after 24 h, 1, 2, 3, 4, 5, and 9 weeks of reactor operation. Negative controls consisted of Champlain sludge granules not exposed to pentachlorophenol and strain PCP-1 and of granules taken from a lab-scale UASB reactor never exposed to PCP and not inoculated with strain PCP-1.

Distribution of *Eubacteria* and *Archaea* in the granules was studied using the Cy3-EUB338 and Cy3-ARCH915 probes, respectively. Analysis of transects across the granule centers demonstrated a homogeneous distribution of *Eubacteria* and *Archaea* in the anaerobic granules used to inoculate the reactor. In the 24h samples, a homogeneous distribution of *Archaea* was observed, but a very thin (< 10 μm -thick) and non-continuous outer layer of *Eubacteria* was noted (results not shown). Growth of the outer eubacterial layer was visible in samples taken at week 1, 2 and 3, and by the fourth week of reactor operation a distinct outer layer of *Eubacteria* was formed (Figure 2.1B). This layer had a thickness of 50-100 μm and was observed in all subsequent samples. The eubacterial layer was followed by a region colonized by *Archaea* (Figure 2.1A) with some eubacterial colonies (Figure 2.1B). The hybridization experiments were carried out in triplicates yielding similar distribution of species.

Distribution of strain PCP-1 cells was studied using three species-specific probes (Table 2.1). In the 24-hour granules and in samples taken 1 and 2 weeks after reactor startup, no or low non specific signal was observed following FISH with all three species-specific fluorescent probes (results not shown). In samples taken at weeks 3 and 4, strain PCP-1 microcolonies were visible at the surface of the granules (Figure 2.1 C, D). In the 5-week granules (Figure 2.1E), a large number of microcolonies were found in the outer

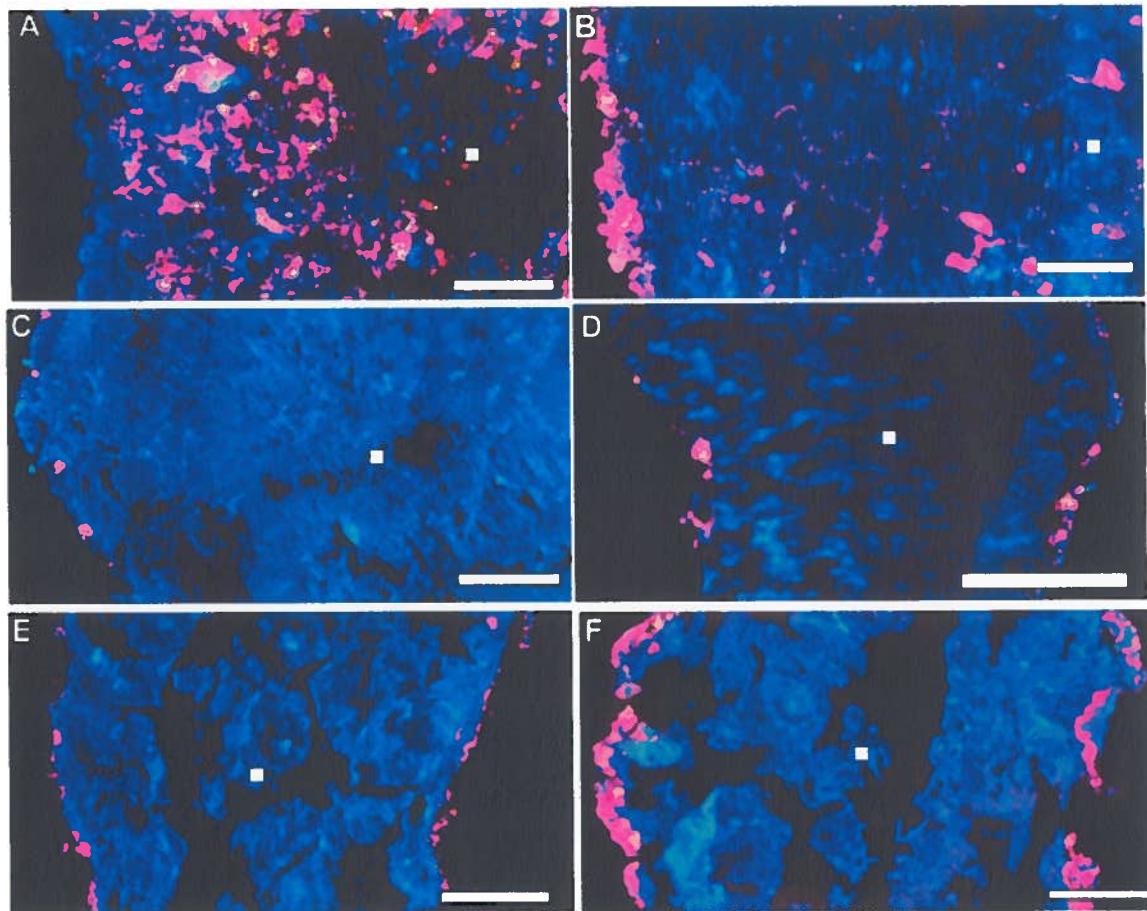


Fig. 2.1. Images of anaerobic granules taken from a UASB reactor augmented with *D. frappieri* PCP-1 and hybridized with fluorescent probes coupled to Cy3 (red) or Cy5 (red) and counterstained with DAPI (blue). Shown are sections of granules hybridized with probe specific to *Archaea*, after 4 weeks of reactor operation (A); probe specific to *Eubacteria*, after 4 weeks of reactor operation (B); and species-specific probe S-S-D.frap-327(*D. frappieri*)-a-A-19 (labelled with Cy3), 3, 4, 5 and 9 weeks of reactor operation, respectively (C, D, E, F). Bars correspond to 200 μm . Pink coloration results from the combination of red and blue when both signals are superimposed within the 7 μm thick cross-section of the granule. The white square on each panel indicates the granule center.

layer. Finally, in the 9-week granules strain PCP-1 microcolonies densely colonized the outer layer, which attained a thickness of 30-60 μm (Figure 2.1F).

Throughout the experiment, the validity of hybridization results was confirmed using both negative controls and hybridization with two species-specific probes (double hybridization). Negative controls (sludge granules without strain PCP-1 added and not exposed to PCP) showed some random non-specific hybridization signals. The intensity of non-specific signals with all three probes was low. These signals were not caused by *Desulfitobacterium* indigenous to the initial granular sludge, since PCR carried out with total DNA extracted from both negative control samples and primers specific to the *Desulfitobacterium* genus (Tartakovsky *et al.*, 1999; Lanthier *et al.*, 2001) showed no positive signal (results not shown).

Statistical analysis of fluorescent areas provided one-dimensional representation of signal distribution on the images, which confirmed visual observations. After one week of reactor operation only a weak fluorescent background was observed in granule samples (Figure 2.2A), but at week 5, regions at the edges of the granules were more fluorescent than the background (Figure 2.2B). By the end of the experiment (week 9), up to 35 % of the outer layer of the granule hybridized with PCP-1-specific probes (Figure 2.2C), while the hybridized area was below 2 % in the biofilm interior.

Fluorescent signals on samples obtained at weeks 3 through 9 with double hybridization (S-S-D.frap-327(*D. frappieri*)-a-A-19 and S-S-D.frap-576(*D. frappieri*)-a-A-19, or S-S-D.frap-86(*D. frappieri*)-a-A-20 and S-S-D.frap-576(*D. frappieri*)-a-A-19) confirmed that the fluorescent outer layer consisted of strain PCP-1 cells (Figure 2.3), as both combinations gave the same hybridization pattern in triplicate experiments. Simultaneously, a double hybridization using negative control samples showed no overlapping of the non-specific signals.

2.3.5.2 Modeling of biofilm colonization by *D. frappieri* PCP-1

A biofilm model outlined in the Materials and Methods section was used to simulate population dynamics and distribution of bacterial species in the biofilm. Based on the experimental results, the simulation was started with a homogeneous initial distribution of acidogenic and methanogenic bacteria in the granular biofilm. Reactor

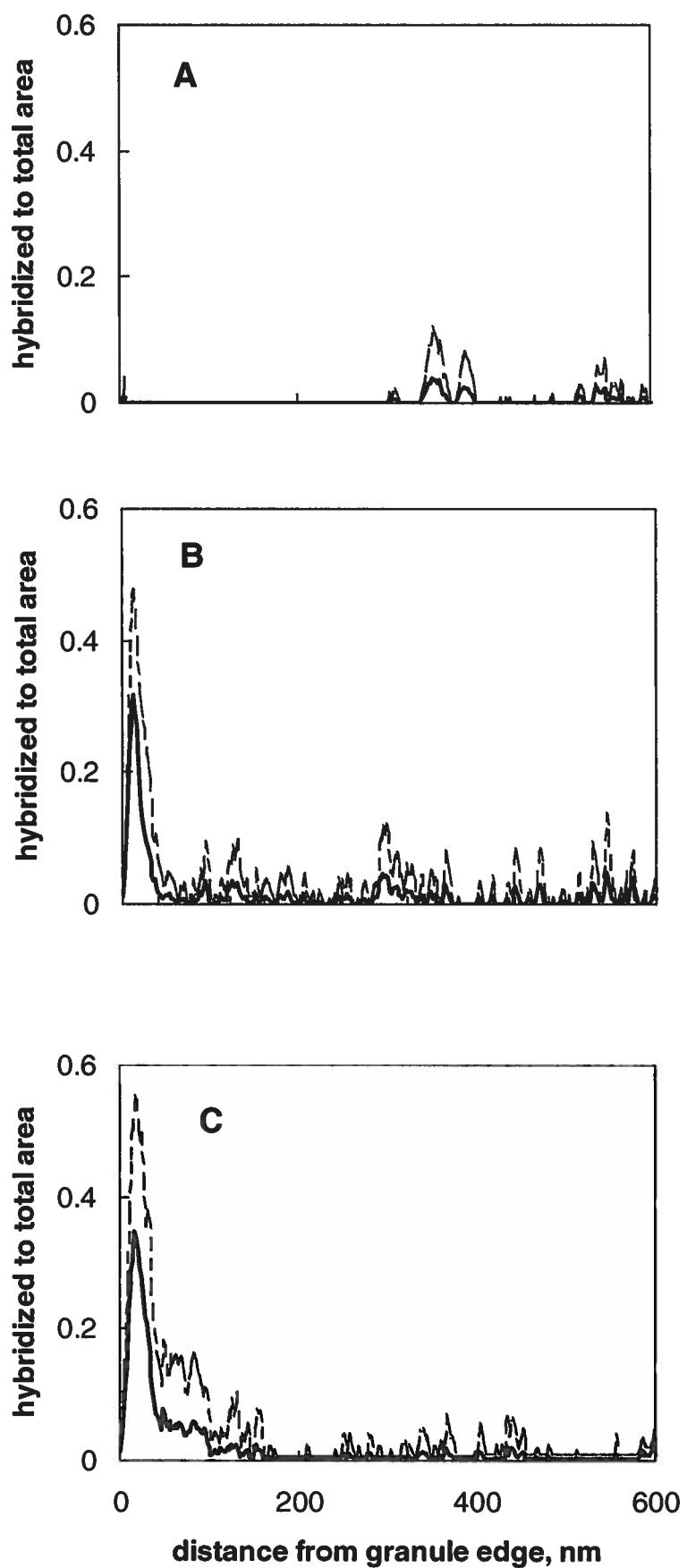


Fig. 2.2. Profiles of specific areas hybridized with S-S-D.frap-327(*D. frappieri*)-a-A-19 probe after 1 (A), 5 (B), and 9 (C) weeks of reactor operation. Broken lines show standard deviation of the area.

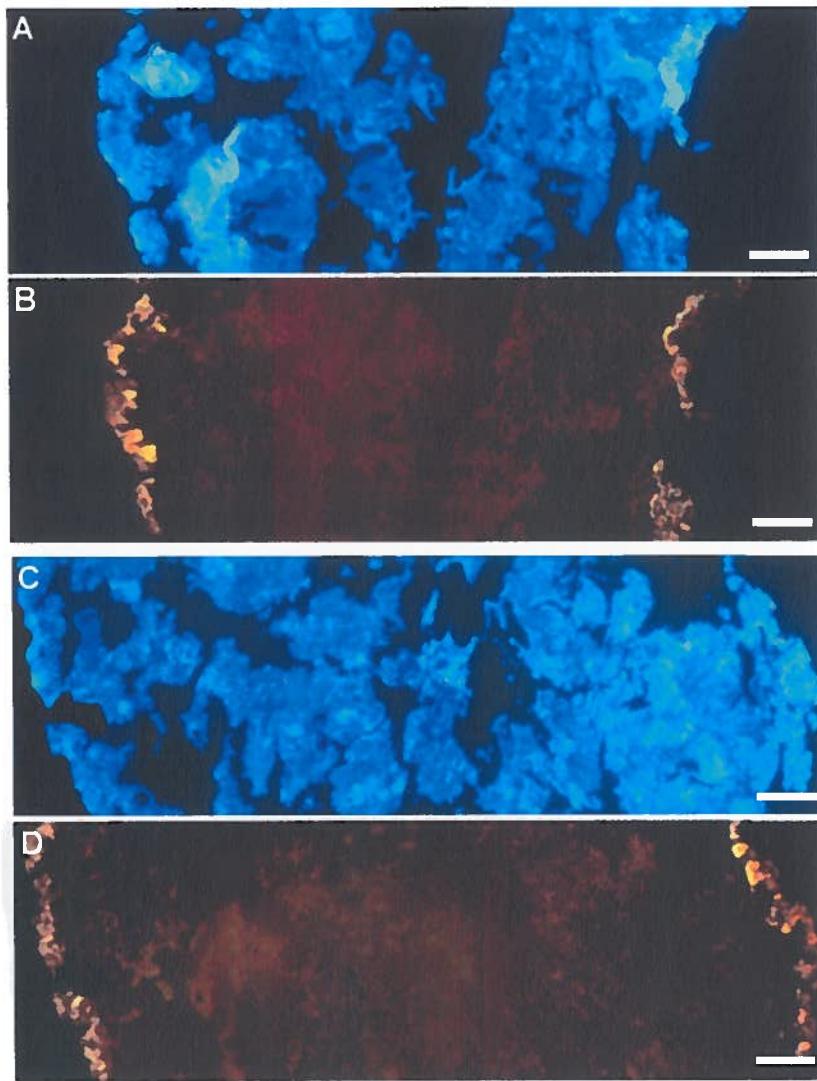


Fig. 2.3. Images of anaerobic granules taken from a UASB reactor augmented with *D. frappieri* PCP-1, after 9 weeks of operation. Shown are granule cross sections counterstained with DAPI (blue) (A and C) and hybridized either with S-S-D.frap-86(*D. frappieri*)-a-A-20 (Cy3) and S-S-D.frap-576(*D. frappieri*)-a-A-19 (Cy5) (B) or S-S-D.frap-327(*D. frappieri*)-a-A-19 (Cy3) and S-S-D.frap-576(*D. frappieri*)-a-A-19 (D). Overlapping fluorescent signal from both probes was converted to yellow.

inoculation with strain PCP-1 was simulated by maintaining a constant concentration of strain PCP-1 in the bulk liquid for a period of 3 days while setting the concentration of strain PCP-1 in the biofilm to zero. Then, the concentration of strain PCP-1 in the bulk was set to a near zero value to simulate a continuous mode of reactor operation, which led to a washout of free cells from the bulk liquid.

Biofilm colonization by strain PCP-1 was simulated for a period of 70 days. By the end of the integration period, the predicted distribution of bacterial trophic groups resembled the granule structure demonstrated by FISH. Acidogenic bacteria colonized the outer layer, while the maximal density of methanogenic bacteria was predicted in the interior region of the biofilm (Figure 2.4A). The distribution of acidogenic bacteria and methanogens mirrored that of corresponding substrates, sucrose and fermentation products (Figure 2.4B). Also, at a granule diameter of 3 mm the existence of a carbon source-limited granule core was predicted (Figure 2.4B).

It should be kept in mind that the deterministic one-dimensional biofilm model presented in this work does not distinguish between uniform cell growth and growth in the form of scattered microcolonies, as in the observations presented above for samples taken at weeks 3, 4, and 5. Consequently, the model prediction while appearing as a continuous function of the biofilm distance, can apply for both a uniform cell distribution as well as a multiplicity of microcolonies.

Sensitivity analysis of strain PCP-1 distribution to variations in the model parameters showed that the specific growth rate of strain PCP-1 and bacterial diffusive transport governed the distribution. A high specific growth rate combined with a low value of bacterial diffusion kept the bacterial growth predominantly at the surface (Figure 2.5 line A). Understandably, at a given specific growth rate, setting the model with a larger value for bacterial diffusion (e.g. $10^{-6} \text{ dm}^2 \text{ d}^{-1}$, Fig. 2.5 line B) was required to obtain a higher cell density in the biofilm core. A low value of specific growth rate (0.3 d^{-1}) also led to an almost homogeneous distribution (Figure 2.5 line C). A distribution similar to that observed experimentally in Figs. 2.2B and 2.2C was obtained by using a value of 2.2 d^{-1} for the specific growth rate and a bacterial diffusion of $10^{-7} \text{ dm}^2 \text{ d}^{-1}$, i.e. high growth rate and low bacterial transport. This specific growth rate was similar to that

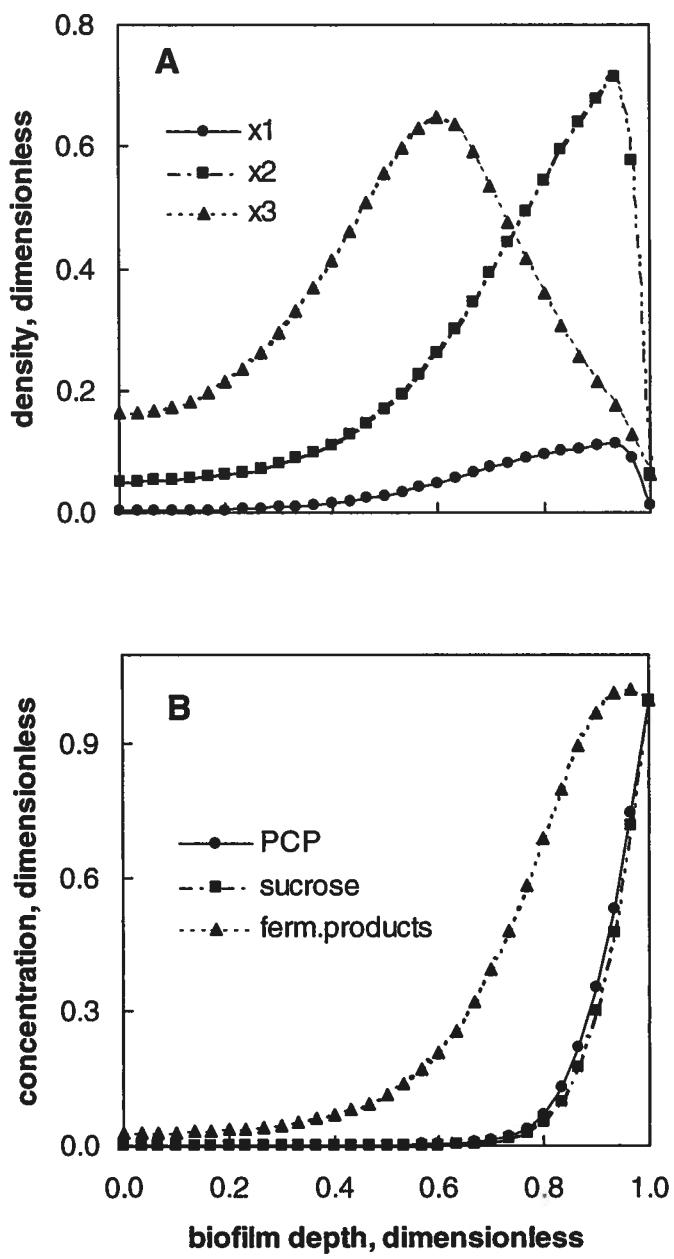


Fig. 2.4. Distribution of strain PCP-1 (x_1), acidogenic (x_2), and methanogenic (x_3) bacteria (A) and of substrates and intermediates (B) predicted by the biofilm model. Bacterial and substrate concentrations were normalized to concentrations in bulk liquid. Simulation parameters: integration time, 70 days, granule diameter, 3 mm. Other parameters are given in Table 2. Zero on the x-axis corresponds to the granule center and one corresponds to the granule surface.

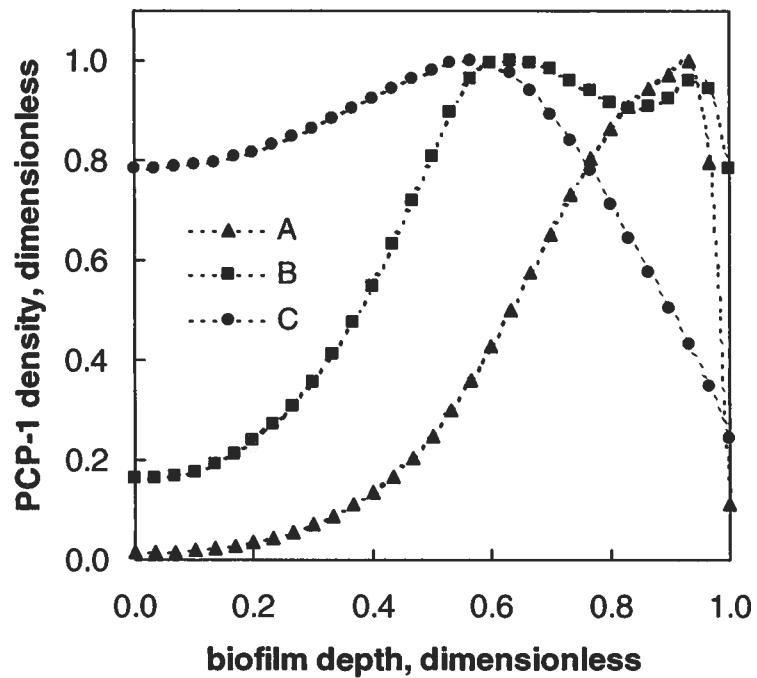


Fig. 2.5. The effect of specific growth rate and bacterial diffusion on the distribution of strain PCP-1 in the biofilm. (A) Fast growth, slow transport. Parameters: $\mu_{\max 1}=2.2 \text{ d}^{-1}$, $D_{x1}=10^{-7} \text{ dm}^2 \text{ d}^{-1}$, $x_{\max 1}=0.11 \text{ g/L}$. (B) Fast transport and growth. Parameters: $\mu_{\max 1}=2.2 \text{ d}^{-1}$, $D_{x1}=10^{-6} \text{ dm}^2 \text{ d}^{-1}$, $x_{\max 1}=0.05 \text{ g/L}$. (C) Slow transport and growth. $\mu_{\max 1}=0.3 \text{ d}^{-1}$, $D_{x1}=10^{-7} \text{ dm}^2 \text{ d}^{-1}$, $x_{\max 1}=0.02 \text{ g/L}$. In all equations, $\mu_{\max 1}$ is the maximal specific growth rate, D_{x1} is the effective bacterial diffusivity, and $x_{\max 1}$ is the maximal density of strain PCP-1. Zero on the x axis corresponds to the granule center.

cited in the literature for a pure culture of strain PCP-1 grown on a rich medium (Bouchard *et al.*, 1996).

2.3.6 Discussion

Hybridization results of the present study demonstrated that by the fourth week of reactor operation bacterial distribution had become stratified with *Eubacteria* dominating mostly in the peripheral portion of the granule, and *Archaea*, in the middle and inner parts of the granule (Figure 2.1A, B). The EU338 probe detects 97 % of all *Eubacteria*. Even though it fails to detect some groups of bacteria such as *Planctomycetales* and *Verrucomicrobia* (Daims *et al.*, 1999), which could be present in the granules, the overall distribution of *Eubacteria* was correctly represented.

The outermost *Eubacteria* most likely corresponded to fermentative bacteria which transform sucrose and pyruvate to acetate and/or other volatile fatty acids (VFAs), as well as hydrogen and CO₂. *Eubacteria* colonies observed in the inner region of the granule (Figure 2.1B) can be attributed to acetogenic bacteria. Such a layered distribution of *Eubacteria* and *Archaea* is well established for anaerobic granules fed with carbohydrates (Guiot *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 1994; Quarmby et Forster, 1995; Harmsen *et al.*, 1996b; Sekiguchi *et al.*, 1999) as the initial step of carbohydrate degradation is notably faster than subsequent steps. In contrast, at the time of inoculation both *Eubacteria* and *Archaea* were homogeneously distributed throughout the granules (results not shown). This random distribution was similar to that published previously for granules of the same origin (Rocheleau *et al.*, 1999) i.e. an industrial reactor treating protein-rich effluents. When proteolysis and acetogenesis from amino acids are the limiting steps in the overall degradation process, a uniform microstructure develops in granules with a random distribution of *Methanosaeta* populations (Grotenhuis *et al.*, 1991; Fang *et al.*, 1994, 1995). In comparison, the results shown in Figure 2.1A and B reflect the shift in the carbon source that the granules underwent from the industrial reactor to the lab-scale operation. This is a clear example of how the architecture of the granule is changed in response to a change in the carbon source composition.

As shown in our previous study (Tartakovsky *et al.*, 1999), proliferation of strain PCP-1 allowed for an increase in the volumetric PCP load from 5 to 80 mg l_R⁻¹ d⁻¹.

Throughout the experiment, a constant methane yield was observed suggesting that the dechlorination activity of strain PCP-1 protected other members of the anaerobic consortium, in particular methanogens, from PCP toxicity. Although the competitive-PCR-based enumeration did not provide information on the distribution of strain PCP-1 in the biofilm, it was postulated that strain PCP-1 essentially colonized the outer granule layer. This was inferred from the fact that such a distribution was a requisite for fast consumption of PCP combined with high methanogenic activity. The methanogens were expected to occupy the granule core, which was shielded from the PCP (Tartakovsky *et al.*, 1999). The results of FISH presented above proved this assumption was correct. Three weeks after reactor augmentation, strain PCP-1 microcolonies were detected in the outer layer of the granules (Figure 2.1C). The area of cells that hybridized with the PCP-1 specific probes progressively increased, and by the end of the experiment a dense outer layer of strain PCP-1 was observed (Figure 2.1F). It should be noted that since the FISH technique only detects cells with a high ribosomal content, it is theoretically possible to have some PCP-1 cells with a low metabolic state inside the granule that would not be detected.

The observations of a dense outer layer of strain PCP-1 are not entirely in agreement with previously published results, which showed that dehalogenating strains in anaerobic granules were distributed in both the exterior and interior part of the biofilm. By immunofluorescence assay, Ahring *et al.* (1992) demonstrated that *Desulfomonile tiedjei* formed microcolonies at the subsurface and surface of granules of a 3-chlorobenzoate (CB)-degrading UASB bioreactor. Also, inoculation of *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2 in a PCP-degrading UASB reactor containing sterilized granules led to the generation of a net structure by this strain (Christiansen et Ahring, 1996b). Finally, Horber *et al.* (1998) showed that *Dehalospirillum multivorans* built a net-like structure at the surface of PCE-fed live granules, but formed microcolonies principally in the center of autoclaved granules.

In an attempt to clarify these differences in the distribution of newly introduced strains in a biofilm (Table 2.3), the granule colonization by strain PCP-1 was simulated using a dynamic multispecies model, which accounted not only for substrate diffusion, but also for bacterial cell transport. Cell transport would have to be accounted for, if

Table 2.3. Comparison of UASB granules bioaugmented with dehalogenating anaerobic strains.

Added strain	Pure strain characteristics ^b				Initial granules	Distribution of added strain in granules	Chloroorganics used	Reference
	Size (μm^2) ^a	Motility	$\mu_{\text{max}} (\text{d}^{-1})$	Temp (°C)				
<i>Desulfobacterium frappieri</i> PCP-1	1.5-3	-	5.5	29	Live	Outermost layer	PCP	(Bouchard <i>et al.</i> , 1996), this study
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	4-10	-	0.1	37	Live	Inner and surface microcolonies	CB	(De Weerd <i>et al.</i> , 1990; Ahring <i>et al.</i> , 1992)
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	0.8-2.5	+	6.6	30	Live	Surface microcolonies	PCE	(Schloz-Muramatsu <i>et al.</i> , 1995; Horber <i>et al.</i> , 1998)
<i>Desulfobacterium hafniense</i>	2-4	+	0.3	30	Auto-claved	Uniform distribution	PCP	(Christiansen <i>et al.</i> , 1996a; Ahring, 1996b)

^a Cross-sectional surface calculated from the dimensions given in corresponding reference.

^b Growth substrate for all strains was pyruvate.

newly added cells were found in the biofilm interior in a relatively short time. The anaerobic granule has a porous structure, with numerous channels and wells (MacLeod *et al.*, 1990) that can easily serve as entry and transport routes for the cells. Cell transport can be mediated by bacterial motility, convection and/or diffusion. Strain PCP-1 is non-motile (Bouchard *et al.*, 1996). Convection is unlikely within a solid matrix, although one may imagine the gas microbubble release to displace the liquid at countercurrent, and thus to cause local convective motion in the pits and channels. Finally diffusive transport probably remains the most prominent mechanism by which the cell can enter and travel across the inner granule space. In diffusive transport, bacteria exhibit a Brownian motion, at an average speed of $40 \mu\text{m h}^{-1}$, which is responsible for crossing any quiescent liquid layer (van Loosdrecht *et al.*, 1990). Thus, bacterial diffusion was accounted for in the model. When the model is set with a large value for the specific growth rate and a low value for the bacterial diffusive transport term for strain PCP-1, computer simulations (Figure 2.5A) were in agreement with tendencies displayed by FISH results. Most of the strain PCP-1 growth was predicted to occur in the outer section of the biofilm. When the model is set with either a large value for both the specific growth rate and the bacterial diffusive transport term or a much lower value for the specific growth rate and low bacterial diffusive transport term, the distribution is more uniform (Figure 2.5, lines B and C). The latter set might explain the deep penetration of *Desulfomonile tiedjei*. Like *D. frappieri*, this strain is large and non-motile but in contrast it has a low growth rate (Table 2.3). The deeper penetration and more uniform distribution of *Dehalospirillum multivorans* and *D. hafniense* in the granules most likely results from the fact that the granules were autoclaved. This means that there was no competition for space and substrate with other bacteria, which would promote a more uniform growth. The motility of both *D. hafniense* and *Dehalospirillum multivorans* and the smaller size of the latter are other factors that contribute to a deeper penetration.

The model also predicted the proliferation of methanogens (*Archaea*) in the interior section of the biofilm, and acidogenic bacteria (*Eubacteria*) together with most of the strain PCP-1 to grow in the outer section of the biofilm. This is explained by the fact that the outer region contained the highest concentration of sucrose (s_2 , Figure 2.4B), a primary substrate for fermenters, and of pyruvate (s_3 , Figure 2.4B), a co-substrate

required for dehalogenating PCP to monochlorophenol. Presence of strain PCP-1 in the outer layer of the granules resulted in a fast decrease of PCP concentration with the depth of biofilm. Thus, PCP toxicity was brought below a threshold value which would affect metabolism of other members of the consortium, in particular methanogens, which are present in the granule core (Figure 2.1A).

In conclusion, FISH of anaerobic granules augmented with *D. frappieri* PCP-1 revealed a predominant growth of this strain at the periphery of the biofilm in the form of microcolonies. These microcolonies appeared to proliferate over time to form a dense outer layer of strain PCP-1. Mathematical simulation of the colonization process using a dynamic multispecies biofilm model agreed with the experimentally observed granule structure, providing the model is set with a high value for the specific growth rate and a low value for the bacterial diffusive transport term.

The present study has broad implications for decontamination of chemical-polluted waters as it confirms the possibility to design granules for specific bioremediation needs. It shows that the *de novo* biodegradation abilities can be incorporated in the granule, since the added strain PCP-1 cells are intimately associated with the biofilm structure. The anaerobic granule seems to be an adequate matrix for efficient attachment of exogenous microorganisms.

Moreover, sensitivity analysis of the model parameters suggested that an inward propagation of strain PCP-1 can be expected at lower specific growth rates and/or higher bacterial transport. A higher bacterial transport could be achieved during initial colonization of solid matrices, such as sterilized granules or inert porous supports. Consequently, the added cells colonizing a deeper part of the biofilm are expected to be shielded from any major attrition. This might be of particular concern if such reactors are subjected to various shearing factors, such as the relatively high liquid superficial velocity and possibly high production and release of gas bubbles. This may guarantee that such a reactor could operate at a high dilution rate, and thus low hydraulic residence time, which is instrumental in biosystems that have to be used at large scale in an economical manner. On the other hand, the association of new specific strains with live anaerobic granules offers a relatively easy way for engineering stable multispecies consortia that are capable of addressing target compounds. Multiple functions (e.g. co-substrate fermentation,

intermediates mineralization) and mutualistic ties are essential for completeness of degradation. Those assets are also instrumental for cost-effective specialized biosystems on a large scale.

2.3.7 Acknowledgement

The authors greatly appreciate the expert technical assistance of M.-J. Lévesque. This study was partially funded (ML, RV) by Natural Science and Engineering Research Council (NSERC No. OGP0155558) and partially (BT, GDL, SRG) by National Research Council of Canada, NRC no 44648.

3.1 Mise en contexte de l'article 2

Suite aux travaux de détection de *D. frappieri* PCP-1 dans les boues granulaires, nous avons voulu déterminer la position de cette souche dans un biofilm sur une surface. Comme présenté dans la revue de littérature, les biofilms sur surfaces ont une structure très différente des boues granulaires. De plus, très peu d'articles dans la littérature font mention d'un examen poussé de la structure des biofilms anaérobies sur surfaces fixes. Encore moins d'articles vont présenter la visualisation de souches spécifiques dans de tels systèmes et aucun article publié à ce jour ne mentionne la visualisation directe d'une souche ayant des capacités de dégradation dans un biofilm sur surface fixe. Quatre réacteurs anaérobies à FF ont donc été conçu afin d'étudier la disposition de la souche PCP-1 dans un biofilm sur surface fixe sous différentes conditions. Deux réacteurs ont donc été exposés à une dose croissante de PCP, mais un seul a été inoculé avec la souche PCP-1. Un réacteur contrôle a été inoculé avec la souche PCP-1 et n'a pas été exposé au PCP. Un dernier réacteur a été inoculé avec la souche PCP-1 et exposé à une dose constante de nitrate afin de déterminer si l'ajout de cette substance allait affecter la disposition de la souche PCP-1 dans le biofilm.

Pour plus de simplicité, les résultats obtenus au cours de cette partie de mon travail de recherche ont été divisés en deux articles distincts. Les résultats du suivi des quatre réacteurs à FF sont présenté dans l'article 2, alors que les résultats des travaux sur la disposition de la souche PCP-1 dans les différents biofilms sont présentés dans l'article 3.

3.2 Contribution de l'étudiant à l'article 2

Les travaux présentés dans cet article ont tous été effectués par l'étudiant sous la supervision du Dr Villemur. Le Dr Juteau a grandement contribué à la conception des réacteurs utilisés au cours de ces expériences. Les précieux conseils des Drs Juteau et Beaudet sur le maintien et le suivi de réacteurs anaérobies ont également été importants au cours de cette facette de mon projet de recherche. Le Dr Lépine a aidé au développement de la technique d'analyse des VFA présentée dans cet article et a gracieusement fourni l'accès à ses appareils d'analyses chimiques.

3.3 Article 2: Anaerobic fixed-film bioreactors supplemented with pentachlorophenol or nitrate I: methanogenesis, denitrification and biodegradation activities

M. Lanthier¹, P. Juteau¹, F. Lépine¹, R. Beaudet¹ and R. Villemur^{1*}

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Ville de Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Short title: Anaerobic FF bioreactors fed with PCP or nitrate

Key words: *Desulfobacterium frappieri*, pentachlorophenol, biofilm, anaerobic fixed-film bioreactor, DGGE

* Corresponding author. Mailing address: INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Ville de Laval, Québec, Canada H7V 1B7. Phone: (450) 687-5010. Fax (450) 686-5501. E-mail: richard.villemur@inrs-iaf.quebec.ca

3.3.1 Résumé

Quatre réacteurs anaérobies à film-fixe (FF) ont été étudiés. Le réacteur Pf a été supplémenté avec du pentachlorophénol (PCP) et a été inoculé avec la souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, une bactérie anaérobie dégradant le PCP. Le réacteur P0 a été supplémenté avec du PCP mais n'a pas été inoculé avec la souche PCP-1. Le réacteur Of n'a pas été supplémenté avec du PCP mais a été inoculé avec la souche PCP-1. Enfin, le réacteur Nf a été supplémenté avec du nitrate et a été inoculé avec la souche PCP-1. La charge maximale en PCP dégradée par les réacteurs supplémentés avec du PCP était de $312 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R \text{ j}^{-1}$. Aucune différence significative n'a été observée entre les capacités de dégradation des deux réacteurs supplémentés avec du PCP. Toutefois, la souche PCP-1 a été détectée par PCR dans ces deux réacteurs. Celle-ci était probablement présente en faible quantité dans les boues granulaires ayant servi à l'inoculation des réacteurs. L'arrêt de l'activité dans les deux réacteurs supplémentés avec du PCP a été occasionné par deux problèmes fréquemment rencontrés lors de l'opération de réacteurs anaérobies, soit l'entrée d'oxygène et l'exposition à de nouveaux produits toxiques. Le réacteur supplémenté avec du nitrate possédait une activité méthanolique et pouvait également transformer le nitrate ($476 \text{ mg}_{\text{NO}_3} \text{ l}_R \text{ j}^{-1}$). Des analyses par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant des gènes codant pour l'ARNr 16S provenant d'échantillons de biofilm et de la biomasse en suspension de tous les réacteurs a permis de révéler d'importantes modifications au sein des profils des *Eubacteria* et des *Archaea* comparativement à la boue ayant servi à l'inoculation de ceux-ci et entre les différents bioréacteurs. La seule exception a été les profils de diversité des *Eubacteria* et *Archaea* des deux réacteurs supplémentés avec du PCP qui étaient très similaires. Les résultats de cette étude pourraient avoir des implications importantes pour la décontamination des environnements pollués par le PCP et pour l'amélioration des traitements anaérobies.

3.3.2 Abstract

Four anaerobic fixed-film (FF) bioreactors were studied. The Pf reactor was fed with an increasing pentachlorophenol (PCP) load and inoculated with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, a PCP-degrading anaerobic bacterium. The P0 reactor was fed with PCP but was not inoculated with the PCP-1 strain. The Of reactor was not fed with PCP but was inoculated with the PCP-1 strain. The Nf reactor was fed with nitrate and inoculated with the PCP-1 strain. The highest PCP load degraded was $312 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R \text{ d}^{-1}$. No significant difference was observed between the PCP degradation performances of the Pf and P0 bioreactors. However, the PCP-1 strain was detected by PCR in both bioreactors. This strain was probably present at low levels in the granular sludge used for inoculation of the FF bioreactors. Upset of both reactors fed with PCP was caused by two problems that occur frequently when operating anaerobic reactors: oxygen entry and exposure to new toxic compounds. The nitrate-fed anaerobic FF bioreactor had methanogenic activity and also completely transformed nitrate ($476 \text{ mg}_{\text{NO}_3} \text{ l}_R \text{ d}^{-1}$). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA gene sequences from biofilm and liquid phase samples from all reactors revealed significant modifications in the population profiles of *Eubacteria* and *Archaea* comparatively to the original granular sludge, and between the different bioreactors. The only exception was the *Eubacteria* and *Archaea* profiles from both reactors fed with PCP' which had similar profiles. Results from this study might have implications for the decontamination of PCP-contaminated environments and improvement of anaerobic biodegradation processes.

3.3.3 Introduction

Pentachlorophenol (PCP) is a highly toxic compound that has been widely used as a wood-preservation agent and a biocide since the 1930s and has also been found in industrial effluents of the paper bleaching industry. This wide usage has led to the contamination of soils, sediments and groundwater (Rao, 1978; Jensen, 1996). PCP present in groundwater or industrial effluents (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1983; Hendriksen et Ahring, 1993; Duff *et al.*, 1995), or PCP extracted from contaminated soil, sediments or wood chips (Beaudet *et al.*, 1997; Koran *et al.*, 2001) can be degraded with anaerobic bioreactors.

Anaerobic bioreactors are commonly used for the biodegradation of both industrial and municipal wastewater with a high carbon content, but can be adapted for the biodegradation of xenobiotic compounds. Anaerobic bioreactors have many advantages when compared to their aerobic counterparts, such as low operation costs because of the lack of aeration and methane recovery. Anaerobic bioreactors can be grouped into two categories: biofilm reactors and suspended growth bioreactors (Skiadas *et al.*, 2003). Biofilm reactors have many advantages over the suspended growth systems: high biomass content, operation at low hydraulic retention times without causing the wash out of the biomass, and the absence of mechanical mixing, which reduces the operation costs. Compared to other anaerobic biofilm-based bioreactors such as expanded and fluidized-bed reactors, the advantages of anaerobic fixed-film (FF) reactors reside in their shorter start-up period, no need for bed-expansion or fluidizidation and no risk of accidental wash-out of the biomass (Skiadas *et al.*, 2003).

Anaerobic FF bioreactors have been used for the degradation of xenobiotic compounds (Skiadas *et al.*, 2003), like tetrachloroethylene (PCE) (Vogel and McCarty, 1985; Fathepure and Tiedje, 1994; Nofsker and Watwood, 1997), 5-amino-2,4,6-triiodoisopthalic acid (ATIA) (Lecouturier *et al.*, 2003), chloroform, chlorocatechols, chloroguaiacols, chloroveratroles, chlorinated resin acids (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1983), 1-naphthol, 2-nitrophenol (El Fantroussi *et al.*, 1998), phenol (Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen and Ahring, 1993), chlorophenols (CPs) (Krumme and Boyd, 1988; El Fantroussi *et al.*, 1998), and PCP (Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen and Ahring, 1993;

Juteau *et al.*, 1995b; Beaudet *et al.*, 1997). However, few studies have been performed on the dynamics of populations present in anaerobic FF bioreactors.

Desulfitobacterium frappieri PCP-1 is an anaerobic bacterium possessing the capacity to dehalogenate PCP up to 3-monochlorophenol (3-MCP) and use different electron acceptors, including nitrate (Bouchard *et al.*, 1996). The PCP-1 strain was used to inoculate a UASB bioreactor, which permitted a successful increase in the PCP load rate from 5 to 80 mg l_R⁻¹ d⁻¹ with a 99 % PCP degradation by the system (Tartakovsky *et al.*, 1999). The population density of the PCP-1 strain was estimated at 10¹⁰ per granule, and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis showed that the PCP-1 strain cells colonize the outer section of granular sludge (Lanthier *et al.*, 2002).

The aim of our research reported in this paper was to study FF bioreactors operated under methanogenic conditions and denitrification conditions in THE presence of the PCP-1 strain. The effect of PCP supplementation was also studied under methanogenic conditions. This study combines analytical and biodegradation data and microbial population profiles.

3.3.4 Materials and methods

3.3.4.1 Microorganisms.

D. frappieri PCP-1 (ATCC 700357) was grown under anaerobic conditions at 30°C in a mineral salts medium supplemented with pyruvate (55 mM; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) and yeast extract (0.1 %; Gibco Laboratories, Madison, WI), as previously described by Bouchard *et al.* (1996).

D. frappieri PCP-1 was grown under denitrification conditions with the same liquid medium supplemented with 10 mM nitrate (EM Science, Darmstadt, Germany) but without NH₄Cl. Because it reduces NO₃ and NO₂ abiotically, Na₂S was replaced in the medium by 2 mM L-cysteine (Sigma-Aldrich) and yeast extract (Gibco Laboratories) was lowered to 0.05 %.

Anaerobic granular sludge was sampled from an industrial reactor treating wastewater from the apple industry (Rougemont, QC, Canada).

3.3.4.2 Anaerobic FF bioreactors.

All bioreactors were manufactured by Lasalle Scientifique, Inc. (Montreal, QC, Canada). They had a total volume of 505 ml and an effective volume of 375 ml ($H = 25$ cm, O.D. = 7 cm). To minimize adsorption of PCP and its metabolites, the reactor was made of glass, stainless steel needles (diameter 3.5 mm), and Masterflex tubing (nutrients entry 6485-13 and 95-709-18, 6485-25 for effluent waste, other 6485-16, all from Pharmed Instrument Company, Chicago, IL). Silicone tubing (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) was used for NaOH entry. A plastic stopper (GL-45 threads) with a stainless steel joint was present at the bottom and top of all reactors. All reactors had three sampling ports (24 mm) alongside that were plugged with butyl rubber stoppers and pierced with needles for liquid sampling. Another sampling port was present in the recirculation loop. The cell for the pH electrode was also made of glass and sealed with a rubber stopper. All reactors were filled with approximately 275 g of raschig rings (8.0 x 8.0 mm; Ace Glass Inc., Vineland, NJ, USA) and small pieces of glass slides (0.5-1.0 x 1.0 cm). See Figure 3.1 for a schematic overview of the reactors under study.

Reactors were operated at 35°C, an optimal temperature for the growth of bacteria in mesophilic reactors (Speece, 1996). The retention time was 28-35 h and reactors were fed at a rate of 320 ml d^{-1} . A pH controller (automatic pH controller PH-40, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ) coupled to an Accumet electrode (model 55502-02, Cole-Parmer Instrument Company Co.) maintained the pH at 7.3 ± 0.1 with a 5.0 g l^{-1} NaOH (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) solution with a Peristaltic pump P-1 (Amersham). Recirculation in the reactor systems provided a linear upflow liquid velocity of 0.79 m d^{-1} with a Masterflex pump (model 7521-50, Cole-Parmer Instrument Company Co.). All reactors were fed with a 2.5 l nutrient solution containing (in g l^{-1}): sucrose, 1.99; *n*-butyrate, 0.63; yeast extract, 0.05 (Gibco Laboratories); ethanol (95 %), 0.46; KH_2PO_4 , 0.04; K_2HPO_4 , 0.05; $NaHCO_3$, 0.88; $KHCO_3$, 1.24; resazurin 0.001 (BDH Chemicals Ltd., Poole, England). A trace mineral solution was also added to the nutrient solution. The final concentration of each mineral was as follows (in mg l^{-1}): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.71; H_3BO_3 , 0.42; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.47; $CuSO_4$, 0.49; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 4.55; $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.82; $NiSO_4 \cdot 6H_2O$, 0.84; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 1.47; $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, 0.18; Na_2EDTA , 5.26; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 9.00; Na_2SeO_4 , 0.14; Na_2WO_4 , 0.07

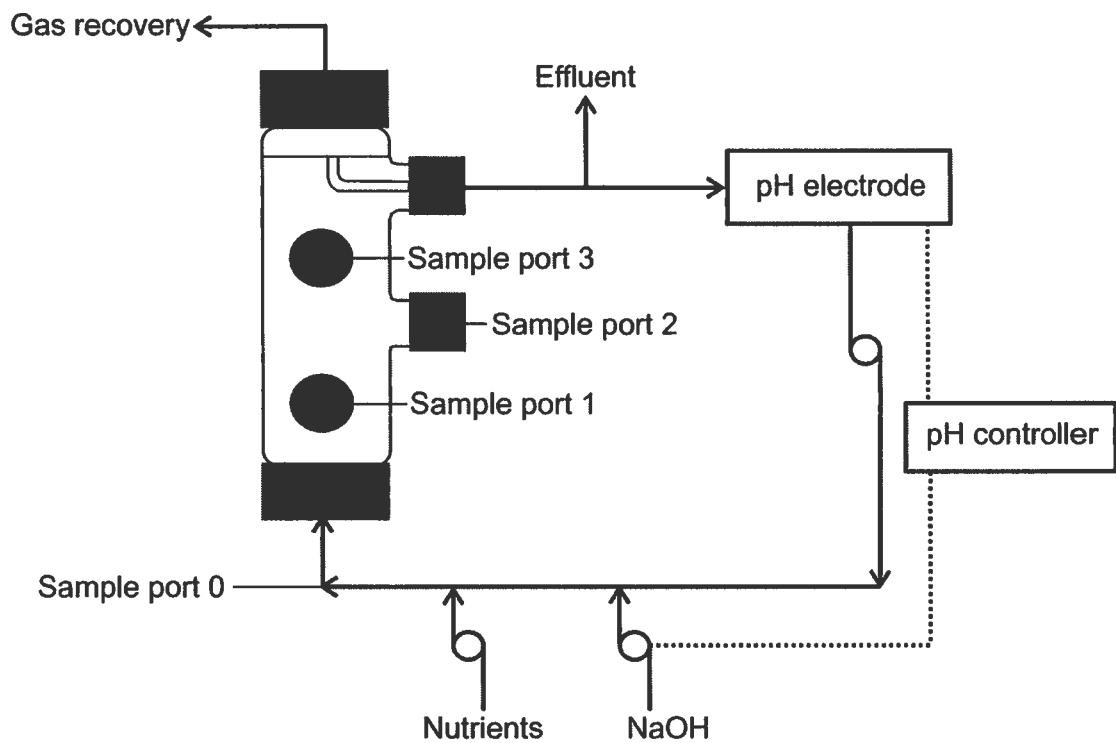


Fig. 3.1. Schematic overview of the fixed-film bioreactors.

(Tartakovsky *et al.*, 1999; Lanthier *et al.*, 2002). NH_4HCO_3 (0.45 g l⁻¹) was also present in the nutrient solution of all reactors, except the reactor fed with nitrate, in which NH_4HCO_3 was replaced with NH_4Cl (0.30 g l⁻¹). Total chemical oxygen demand (COD) present in nutrient solution averaged 3500 mg l⁻¹.

Nutrient solutions were not sterilized before use, except for the reactor fed with nitrate, for which the nutrient solution was autoclaved for 1 hour. Before use, all nutrient solutions were sparged for 10 minutes with a gas mixture containing H₂-CO₂-N₂ (10:10:80) (Praxair, Mississauga, ON) and then butyrate, ethanol, and PCP (99 % or 90 %, both from Aldrich Chemicals Company, Inc., Milwaukee, WI) or KNO₃ were added. A Masterflex pump (model 7520-35, Cole-Parmer Instrument Company Co.) was used for nutrient entry into the bioreactors. Growth of microorganisms in the nutrient solution was prevented by keeping the nutrient solutions at 4°C in a nearby refrigerator while feeding the reactors. See Table 3.1 for details about reactor inoculation and feeding. Briefly, granules were homogenized mechanically and the mixture was diluted 1:4 with anaerobic phosphate buffered saline (PBS) (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.2), and a volume of 30 ml was inoculated in each reactor. A volume of 10 ml of exponential growth culture of the PCP-1 strain was inoculated in three of the four bioreactors. Feeding was started after reactors were left 3 days on recirculation mode after being inoculated. This step was necessary to facilitate bacterial attachment to the surface of the glass rings.

3.3.4.3 Reactor monitoring.

Gas production was monitored daily by the water displacement method (Fang *et al.*, 2002) with an inverted cylinder in a plastic beaker filled with water. Gas composition (CH₄, CO₂, O₂, H₂, N₂) was determined by gas chromatography (Sigma 2000; Perkin-Elmer, Norwalk, CT) equipped with thermal conductivity detectors GC-TCDs), as described in Shen and Guiot (Shen *et al.*, 1996). Two columns were used in tandem. The first column (61 cm X 3.2 cm) contained 60/80 Chromosorb 102 and the second column (1.83 m X 3.2 mm i.d.) was filled with 60/80 molecular sieve 5A (Supelco, Sigma-Aldrich). The injector and detector were both kept at 125°C. The carrier gas was argon. The analysis program was composed of a first phase in which

Table 3.1. Start-up and operation conditions of anaerobic FF bioreactors.

Bioreactor	Inoculum	Influent	COD degradation (%)	Total days in function	Upset at day	Reason for upset
Broken granular sludge (mgvss)	Strain PCP-1 (mgvss)	PCP load (mg l _R ⁻¹ d ⁻¹)	NO ₃ load (mg l _R ⁻¹ d ⁻¹)			
Pf	406	32	Gradual increase from 1.3 to 157 (after 130 d)	-	69.6	200
P0	525	-	Gradual increase from 1.3 to 312 (after 230 d)	-	62.1	272
Of	242	36	-	-	68.5	205
Nf	183	39	-	10 mM (476 mg l _R ⁻¹ d ⁻¹)	196	33 NaOH entry

the column was held at 50°C for 2.5 min, a second phase in which the column was heated to 100°C at a rate of 13°C min⁻¹ and a third phase in which the 100°C temperature was held for 2 min.

Liquid samples were taken weekly from the bioreactors (in the nutrient solution, from sampling port 0 and from the effluent) for volatile fatty acid (VFA), NO_x and CPs analyses. Supernatant from these samples was analyzed following a 2 min centrifugation at 6000 x g. Sampling of glass rings coated with biofilm was done in an anaerobic chamber (Bactron II from Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius, OR). Biofilm samples were taken from sampling ports 1-3 with ethanol-sterilized pliers.

Three different VFA were monitored: acetate, propionate and *n*-butyrate. Samples were prepared by mixing 300 µl of centrifuged liquid bioreactor sample with 100 µl of heptanoic acid (153 mg l⁻¹, final concentration) used as an internal standard and 200 µl of 3 % formic acid (final concentration 1 %) to increase VFA volatilization. A volume of 1 µl was manually injected into a gas chromatograph system coupled to a flame ionization device (GC-FID; Hewlett-Packard 6890 Series GC System, Agilent Technologies, Montreal, QC) equipped with a SPB-1000 column for VFA analysis (0.25 µm thickness, 15459-01A from Supelco, Bellefonte, PA). The sample was injected in splitless mode with He (Praxair) as the carrier gas (4.0 ml min⁻¹). The program was run at 120°C for 4 min, then at 135°C, 150°C, 165°C and 180°C for 1 min each with a ramp of 15°C min⁻¹ between each temperature. The FID detector was heated at 220°C with a H₂ flow of 40.0 ml min⁻¹, an air flow of 450 ml min⁻¹ and a N₂ flow of 35 ml min⁻¹ (Praxair) (Dicorgia et Samperi, 1974; Supelco Inc., 1975, 1995). The software used was Hewlett Packard Chemstation (version Rev. A.06.03[509]). A sample composed of 3 % formic acid was analyzed between each sample to prevent carry over. A standard sample composed of 500 ppm of acetate, propionate, *n*-butyrate and 153 ppm of heptanoic acid was analyzed before each series of samples to confirm retention time of VFAs.

CP analysis was performed on 1 ml bioreactor samples to which a volume of 0.5 ml of acetonitrile containing 0.1 % acetic acid was added. Samples were then centrifuged for 5 min. at 16 000 x g. After this step, 1 ml samples were taken and CP degradation was monitored by high pressure liquid chromatography (HPLC) (Waters 600 system coupled to a model 486 spectrophotometer and a model 717 plus automatic injector,

Mississauga, ON) using a reverse-phase NovaPak C₁₈ column (3.9 x 150 mm). The software used for data analysis was Millenium³² v.3.05.01. Two mobile phases were used for CP analysis: the A phase was composed of deionized water (99.9 %) and acetic acid (0.1 %) and the B phase was composed of acetonitrile (99.9 %) and acetic acid (0.1 %). The column was equilibrated for at least 5 min before analysis with a ratio of 70 % A phase and 30 % B phase at 2 ml min⁻¹. After the injection of a sample, an acetonitrile gradient was applied to the column for 4 min, bringing the acetonitrile concentration up to 55 % and the water concentration down to 45 %. These conditions were kept stable for 6 min. In the last 3 min, the original ratio of A and B was returned to the initial conditions following a concave gradient. The different CP were quantified by their absorbance at 220 nm and compared with standard curves (Juteau *et al.*, 1995a; Juteau *et al.*, 1995b).

NO_x were analyzed by a colorimetric method adapted from Clesceri *et al.* (1998). For NO₂ detection, 500 µl of diluted (1/100) bioreactor samples were mixed with ZnSO₄·7H₂O and NaOH (final respective concentrations: 0.055 mg ml⁻¹ and 0.075 N). Following this step, a coloring solution containing sulfanilamide (Fisher Scientific), N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED; J.T. Baker, Philipsburg, NJ) and phosphoric acid 85 % was added (final respective concentrations of 2.5 mg ml⁻¹, 0.2 mg ml⁻¹ and 4.25 %), for a final reaction volume of 2.0 ml. Samples were then incubated at room temperature for 10 min. For NO₃ detection, the same protocol was used, except that water was replaced by 0.5 ml of hydrazine sulfate (final concentration 2.6 mg ml⁻¹; Sigma-Aldrich). Tubes were then incubated at 55°C for 20 min, and the coloring solution was added after the tubes were cooled for 10 min. at room temperature. The optical density (OD) of the solutions was measured at 548 nm with a spectrophotometer (Pye Unicam, model SP6-550 UV/VIS) and quantification was done by comparison with a standard curve.

Presence of organic matter in the influent, reactor and effluent was monitored by COD, as described in Clesceri *et al.* (1998). All samples were tested in duplicates. A volume of 200 µl of homogenized liquid sample was mixed with 5 ml of digestion reagent and 2 ml of sulfuric acid reagent and incubated at 150°C for 2 h. After this, OD was taken at 620 nm with a spectrophotometer (Pye Unicam SP6-550). The digestion reagent was prepared by mixing 10.216 g of previously dried K₂Cr₂O₇, 167 ml

concentrated H₂SO₄ and 33.3 g HgSO₄ in 1 l of distilled water. The sulfuric acid reagent was prepared by mixing 5.5 g Ag₂SO₄ in 1 kg of H₂SO₄ and letting it stand for 1-2 days.

3.3.4.4 Detection of *Desulfitobacterium* bacteria in anaerobic granular sludge.

Anaerobic enrichment of the indigenous flora of Rougemont sludge was done accordingly to Lanthier *et al.* (2001). Granular sludge was first broken mechanically with an industrial blender and was diluted 1:4 in anaerobic sterile mineral salt medium (Boyd *et al.*, 1983). A volume of 2.8 ml of diluted sludge was used to inoculate each 35 ml of liquid medium. Two series of enrichments were done with no CP and with 1.5 ppm of 2,4,6-TCP (Sigma-Aldrich). Non-inoculated controls were also done, as well as negative extraction controls. Media were incubated at 30°C for 14 days. Before DNA extraction, medium from each enrichment bottle was centrifuged 10 min at 15 000 x g and DNA was extracted from the pellet. DNA extraction and PCR amplification with *Desulfitobacterium* and *D. frappieri* specific primers (De1 and De2 and PCP1G/PCP4D, see Table 3.2) were done as described below.

3.3.4.5 DNA extraction, PCR and DGGE profiling.

DNA extraction was done with 1 ml of liquid phase sample or 2 raschig rings for the biofilm samples. Glass beads (300 mg; 0.4 - 0.5 mm diameter) and a volume of 1 ml of extraction buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, polyvinylpolypyrrolidone [PVPP] 1 %) were added to each sample. Samples were then homogenized in a bead beater (Fast Prep FP120, Bio101 Thermosavant, Qbiogene, Carlsbad, CA) twice for 20 seconds at speed 4, and centrifuged at 16 000 x g for 15 min. DNA in the supernatant was purified by adding 0.5 ml of phenol/chloroform/isoamylic alcohol (50:49:1), mixed by inversion and centrifuged for 10 min. at 16 000 x g. A volume of 1 ml of chloroform/isoamylic alcohol (49:1) was then added to the first supernatant and samples were mixed by inversion followed by a 5 min. centrifugation at 16 000 x g. Phenol used in these manipulations was equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). Two volumes of ethanol 95 % were then added to each sample. Samples were then incubated

Table 3.2. Sequence of PCR primers used. An * indicates the presence of a GC clamp on the primer.

Usual probe name	Target organisms	Sequence (5'-3')	Position (16S rRNA gene)	References
pA	<i>Eubacteria</i>	AGAGTTGTATCCCTGGCTCAG	8-27	(Bruce <i>et al.</i> , 1992)
pH	<i>Eubacteria</i>	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1541-1522	(Bruce <i>et al.</i> , 1992)
PCP1G	<i>D. frappieri</i> PCP-1	CGAACCGTCCAGTGTCTA	56-73	(Lévesque <i>et al.</i> , 1997)
PCP4D	<i>D. frappieri</i> PCP-1	AGGTACCGTCATGTAAGTAC	580-599	(Lévesque <i>et al.</i> , 1997)
De1	<i>Desulfobacterium</i> genus	GCTATCGTTA(G)TG(A)GATGGAT	327-347	(Lanthier <i>et al.</i> , 2001)
De2	<i>Desulfobacterium</i> genus	TTCAGACCACACTTTGGATCC	710-732	(Lanthier <i>et al.</i> , 2001)
PRBA341F*	<i>Eubacteria</i>	CCTACGGGAGGCAGCAG	341-357	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
ARC344f*	<i>Archaea</i>	ACGGGGAGCAGCAGGGCGGA	344-363	(Raskin <i>et al.</i> , 1994)
PRUN518r	Universal	ATTACCGGGCTGCTGG	518-534	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
ARC915r	<i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	915-934	(Raskin <i>et al.</i> , 1994)
* GC clamp	-	CGCCCGCCGGCGGGGGGG - GGGGCACGGGGG	-	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)

at -70°C for 20 min. and centrifuged 15 min at 16 000 x g. The DNA pellet was then dissolved in 50 µl of deionized water and kept at 4°C until used.

PCR mixes contained 10 mM Tris-HCl buffer pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 µM dNTPs, 2.5 U *Taq* polymerase (all from Amersham), 10 pmol of each primer (Table 3.2), 0.5 µg µl⁻¹ of bovine serum albumin (BSA) and approximatively 10 ng of DNA for a total volume of 50 µl. Amplifications were done with a model 480 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). DNA samples were added during a 5 min phase at 80°C. This phase was followed by 5 min at 94°C and another phase at 55°C for 5 min. After these steps, PCR solutions were amplified for 30-35 cycles (2 min step at 72°C followed by a 40 second step at 94°C and a 1 min exposition at 55°C). These cycles were followed by a final extension step at 72°C for 10 min.

For PCR using primers De1 and De2, the primer annealing temperature was 50°C instead of 55°C (Lanthier *et al.*, 2001). DNA samples for DGGE profiling of *Eubacteria* were amplified with primers PRBA341f and PRUN518r. DNA samples for DGGE profiling of *Archaea* were first amplified with primers ARC344f and ARC915r (with a annealing temperature of 50°C), but a nested PCR with primers ARC344f and PRUN518r was necessary to obtain a detectable amount of PCR amplicon. Thus, PCR products from the first PCR were precipitated with 95 % ethanol for 20 min at -20°C. Samples were then centrifuged at 16 000 x g for 10 min. and the pellet was resuspended in 50 µl of deionized water. A volume of 1-2 µl of this DNA was then amplified by PCR with the ARC344f and PRUN518r and an annealing temperature of 55°C.

DGGE profiling was performed using a D-code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Mississauga, ON). The 1.5 mm thick gels consisted of 8 % (w/v) polyacrylamide (37.5:1 acrylamide:bisacrylamide; both from Bio-Rad) and were submerged in 1X TAE buffer (Tris-HCl 40 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0). The linear gradient used ranged from 20 to 70 % (100 % denaturant agent was defined as 7 M urea and 40 % deionized formamide). Approximately the same quantity of DNA (300-600 ng) was loaded on the gel for each sample. 16S rDNA amplified sequences of DNA extracted from Rougemont sludge was used as a marker on each gel. Migration was performed for 16 hours at 100 V and 60°C. Following migration, gels were stained with ethidium

bromide (Sigma-Aldrich), destained with water and visualized with a Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad) under UV illumination.

DNA extraction of bands from DGGE gels was done as follows. First, bands were cut under UV light with an ethanol-sterilized cutter. Sections of polyacrylamide gel were then incubated for 2 hours in 500 µl elution buffer (0.5 M ammonium acetate, 10 mM magnesium diacetate, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 % SDS). The samples were centrifuged 1 min. at 16 000 *g* and the supernatant was transferred to a new tube. The pellet was then washed with 250 µl of elution buffer and centrifuged again. The two supernatants were pooled and DNA was precipitated by adding 2 volumes of 100 % ethanol at -70°C for 1 h, and then by centrifuging 15 min. at 16 000 *x g*. The pellet was dissolved in 100 µl of deionized water. DNA was precipitated again with 10 µl of 3 M sodium acetate and 2 volumes of 100 % ethanol at -70°C for 20 min. This step was followed by a 15 min centrifugation at 16 000 *x g*. DNA was dissolved in 10 µl deionized water. Extracted DNA was then amplified by PCR with primers PRBA341f/PCP4D, as described above. A volume of 5 µl of amplified DNA was digested overnight with *Kpn*I at 37°C (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.5 U *Kpn*I, total volume 20 µl; Amersham BioSciences) and electrophoresed on a 2.5 % agarose gel.

3.3.5 Results

3.3.5.1 Reactor monitoring.

The four anaerobic FF reactors were exposed to different growth conditions (Table 3.1): the first one was fed with PCP and inoculated with the PCP-1 strain (referred as the Pf reactor); the second was fed with PCP without the PCP-1 strain (referred as the P0 reactor); the third one was not fed with PCP but inoculated with the PCP-1 strain (referred as the Of); and finally the fourth reactor was fed with nitrate and inoculated with the PCP-1 strain (referred as the Nf reactor). The first three reactors were maintained under methanogenic conditions. Gas production, VFA degradation and COD were used as indicators of methanogenic activity (Pind *et al.*, 2003b). Acetate, propionate and *n*-butyrate were chosen to monitor bioreactor activity, since these VFAs are important intermediates in anaerobic processes (Pind *et al.*, 2003a; Pind *et al.*, 2003b). CPs and

NO_x were monitored to confirm PCP degradation and nitrate transformation activity, respectively.

The Pf reactor was exposed to an increasing PCP load throughout the experiment. An initial low PCP load and a slow PCP load increase were chosen to avoid mass toxicity and allow for bacterial adaptation. Since it has already been demonstrated that methanogenesis is inhibited at PCP concentrations higher than 1 mg l^{-1} (Wu *et al.*, 1993), the original PCP concentration in the nutrient medium was kept at 0.5 mg l^{-1} . This bioreactor reached an average gas production of 9.6 ml h^{-1} after 5 days following start-up (Figure 3.2A). VFA analyses on the effluent showed that butyrate was degraded instantly and no propionate accumulated in the system. However, acetate gradually increased after start-up and then stabilized at less than 100 ppm after 70 days of operation (Figure 3.3A). Reactor upset at day 130 was caused by oxygen entry in the system. This oxygen entry decreased gas production to an average of 0.9 ml h^{-1} (Figure 3.2A) and led to the accumulation of butyrate and acetate in the effluent (Figure 3.3A). While gas production never recovered, even following a decrease in the PCP load from $157 \text{ mg l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ to $14 \text{ mg l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ and a return to anaerobic conditions, acetate and butyrate started to decrease while propionate started to accumulate after day 139.

The P0 reactor was exposed to the same increasing PCP load throughout the experiment as the first reactor. Average gas production in this bioreactor (9.7 ml h^{-1}) reached a level similar to the first reactor in 3 days following start-up and was mostly stable throughout the experiment (Figure 3.2B). VFA analysis of the effluent of this reactor revealed that butyrate was degraded in the first 13 days of operation instead of instantly as in the first reactor. Also, acetate accumulated and then decreased in a manner similar to what was observed in the first reactor, becoming stable at less than 100 ppm after 90 days. Propionate rapidly decreased after start-up and reached trace level after 20 days of operation (Figure. 3.3B). Replacement of the PCP (99 % purity) normally used for the preparation of the nutrient solution by technical grade PCP (90 % purity) after 243 days of operation resulted in reactor upset. Addition of 90 % pure technical grade PCP to the nutrient solution decreased the gas production to an average 1.7 ml h^{-1} and led to the accumulation of acetate and butyrate, but not propionate (Figure 3.2B, 3.3B). Return to the 99 % pure PCP used before reactor upset and decrease of the PCP load to 36 mg l_R^{-1}

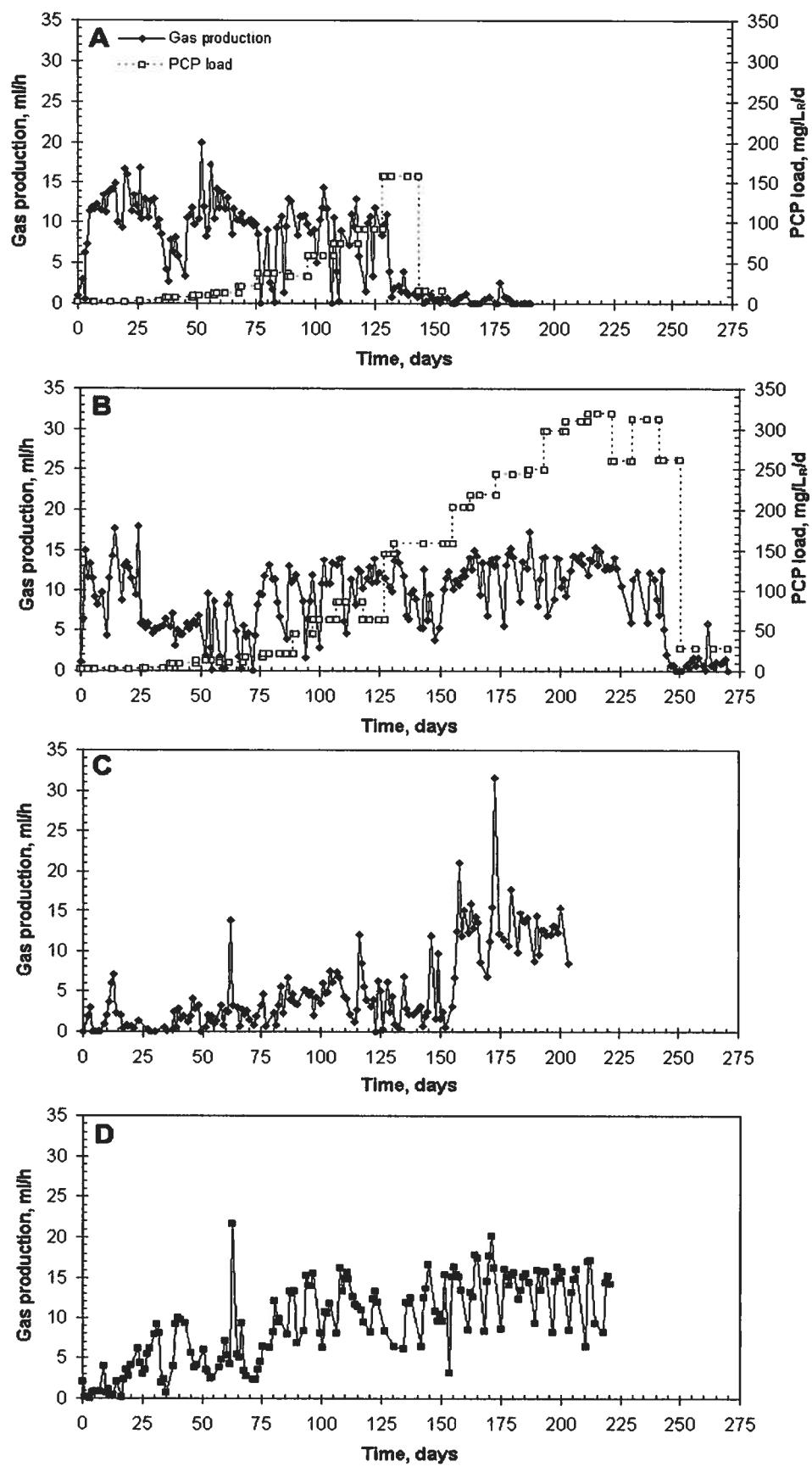


Fig. 3.2. Gas production by the anaerobic FF bioreactors. A: Pf reactor, B: P0 reactor, C: Of reactor, D: Nf reactor.

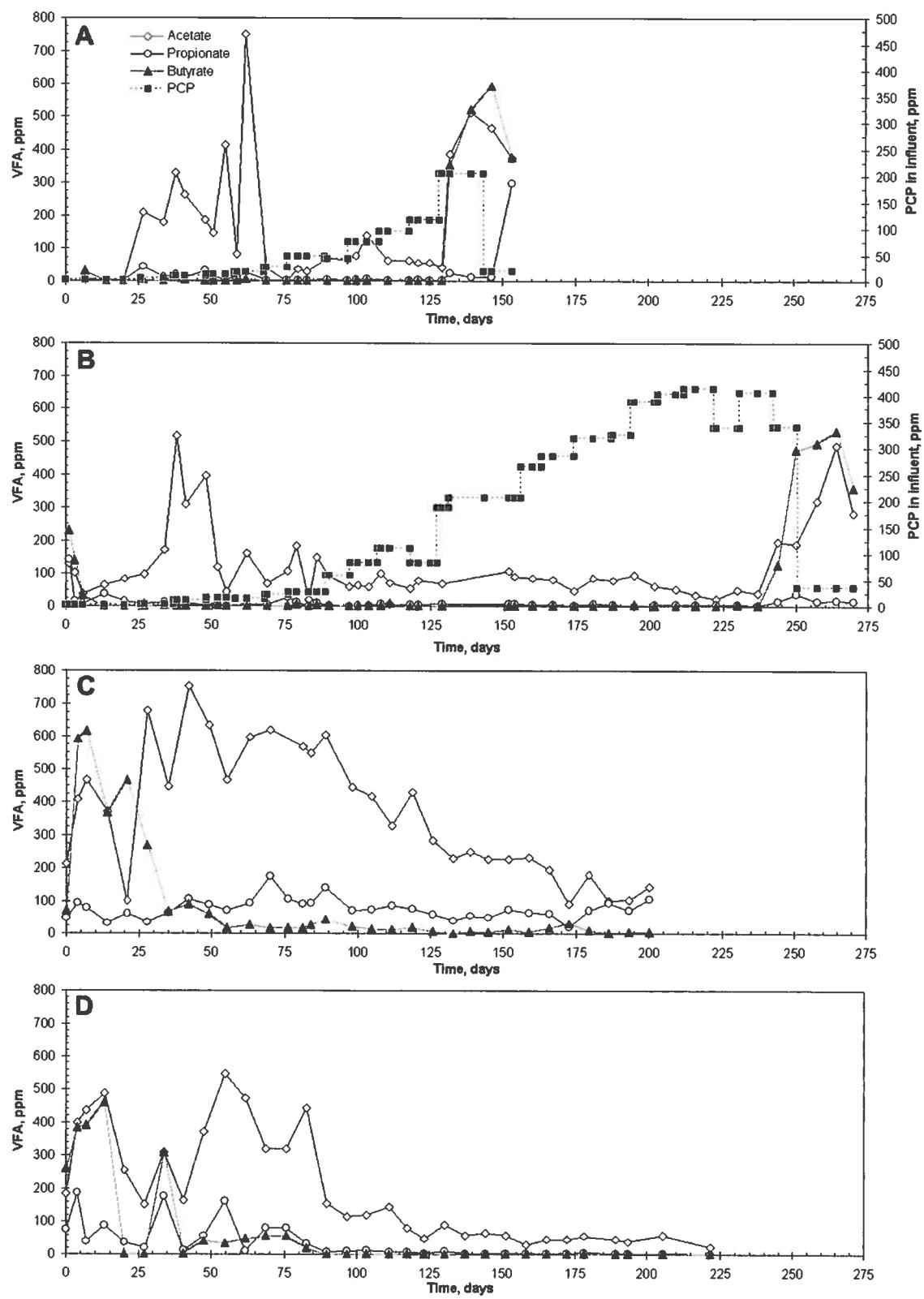


Fig. 3.3. VFA degradation in the anaerobic FF bioreactors. A: Pf reactor, B: P0 reactor, C: Of reactor, D: Nf reactor

d^{-1} did not return gas production to normal for this reactor, but acetate and propionate started to decrease.

The Of reactor was started 8 months later than the two first reactors. However, the sludge used for inoculation was kept for 8 months before utilization. The gas production in this reactor was inferior to the first two reactors before day 158, with an average gas production of 3.0 ml h^{-1} from start-up to day 158. The gas production reached a level similar to the first two reactors (13.3 ml h^{-1}) only after more than 158 days of operation (Figure 3.2C). Analysis of the gas composition at day 202 revealed the presence of 7.1 % of $\text{N}_2 + \text{O}_2$, 69.3 % of CH_4 and 2.6 % of H_2 ($n=2$). VFA analysis on samples taken from the effluent of this reactor revealed that the time needed for complete disappearance of butyrate was much slower, needing 55 days to reach a level similar to both reactors fed with PCP. The initial increase in acetate observed in the first two reactors was also present, but the decrease in acetate concentration was much slower, starting to decrease only after 159 days of operation. Concentrations near 100 ppm of propionate were also detected throughout the experiment, a much higher concentration than in the first two reactors (Figure 3.3C).

The Nf reactor was inoculated with fresh anaerobic granular sludge showed a more gradual increase in gas production, with an average of 7.8 ml h^{-1} and stabilization after 80 days of operation (Figure 3.2D). Analysis of the gas composition at day 110 revealed 21.9 % of $\text{N}_2 + \text{O}_2$, 53.9 % of CH_4 and no H_2 ($n=3$). These results are different from the third reactor: $\text{N}_2 + \text{O}_2$ was higher by 14.8 % and CH_4 was lower by 15.4 %. VFA analysis revealed that the initial increase in acetate is also observed in this reactor. Acetate then decreased after 14 days of operation, but started to accumulate again after an accidental 10 M NaOH entry at day 33. Acetate started to decrease again after 55 days. Propionate was detected in low amounts (generally less than 100 ppm) after start-up, but was reduced to trace amounts after day 90. The butyrate concentration increased initially, but decreased to less than 100 ppm (generally) after 20 days of operation and was not detectable after 90 days (Figure 3.3D). Gas production decreased after NaOH entry in this bioreactor after 33 days of operation. This NaOH entry increased the pH to 10. Return to normal pH was accomplished in less than 30 min. The reactor returned to its original gas production in less than 5 days (Figure 3.2D). Accumulation of the three VFA

analyzed was observed after NaOH entry in the bioreactor fed with nitrate (Figure 3.3D), but the reactor returned to normal VFA degradation in less than 7 days, except for acetate which lagged up to day 120.

To determine the organic matter degradation capacity of the four reactors, COD was determined in the influents and compared with the effluents to obtain a degradation percentage for entering organic matter. All bioreactors degraded the entering organic matter rapidly and efficiently, with average degradation efficiencies between 62.1 and 69.6 % (Table 3.1).

3.3.5.2 PCP biodegradation capacities

The PCP-fed reactors (Pf and P0) were degrading a similar PCP load after 129 days of operation ($157 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ for Pf compared to $145 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ for P0). However, since the P0 reactor was operated for a longer period of time, it reached a PCP-degrading rate of $312 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Figure 3.4). PCP was degraded up to 99 % in both reactors and no other CP intermediates were detected (or were detected as traces), except for 3-CP. This compound was partly degraded in both bioreactors, with degradation capacities of approximately 60 % for both reactors before reactor upset. Accumulation of 3-CP in the effluent increased consistently with the PCP load in the influent of both reactors. Following reactor upsets, PCP accumulated and 3-CP disappeared from the effluent of both reactors. No other CPs were detected following reactor upset. Return to initial conditions and lowering the PCP load did not allow return of the PCP-degradation capacity in both reactors.

3.3.5.3 Denitrification activity

Before the nitrate-fed FF bioreactor was started, the capacity of the PCP-1 strain to use nitrate as an electron acceptor in pure culture was verified. Even if Bouchard *et al.* (1996) showed that the PCP-1 strain could use nitrate as an electron acceptor, it was necessary to verify if this strain could also use nitrite resulting from the transformation of nitrate. Thus, the PCP-1 strain was inoculated in a mineral salts medium containing 10 mM nitrate. The yeast extract content of this medium was lowered to 0.5 % and the reducing agent Na₂S was replaced with L-cysteine to limit abiotic reduction of NO_x.

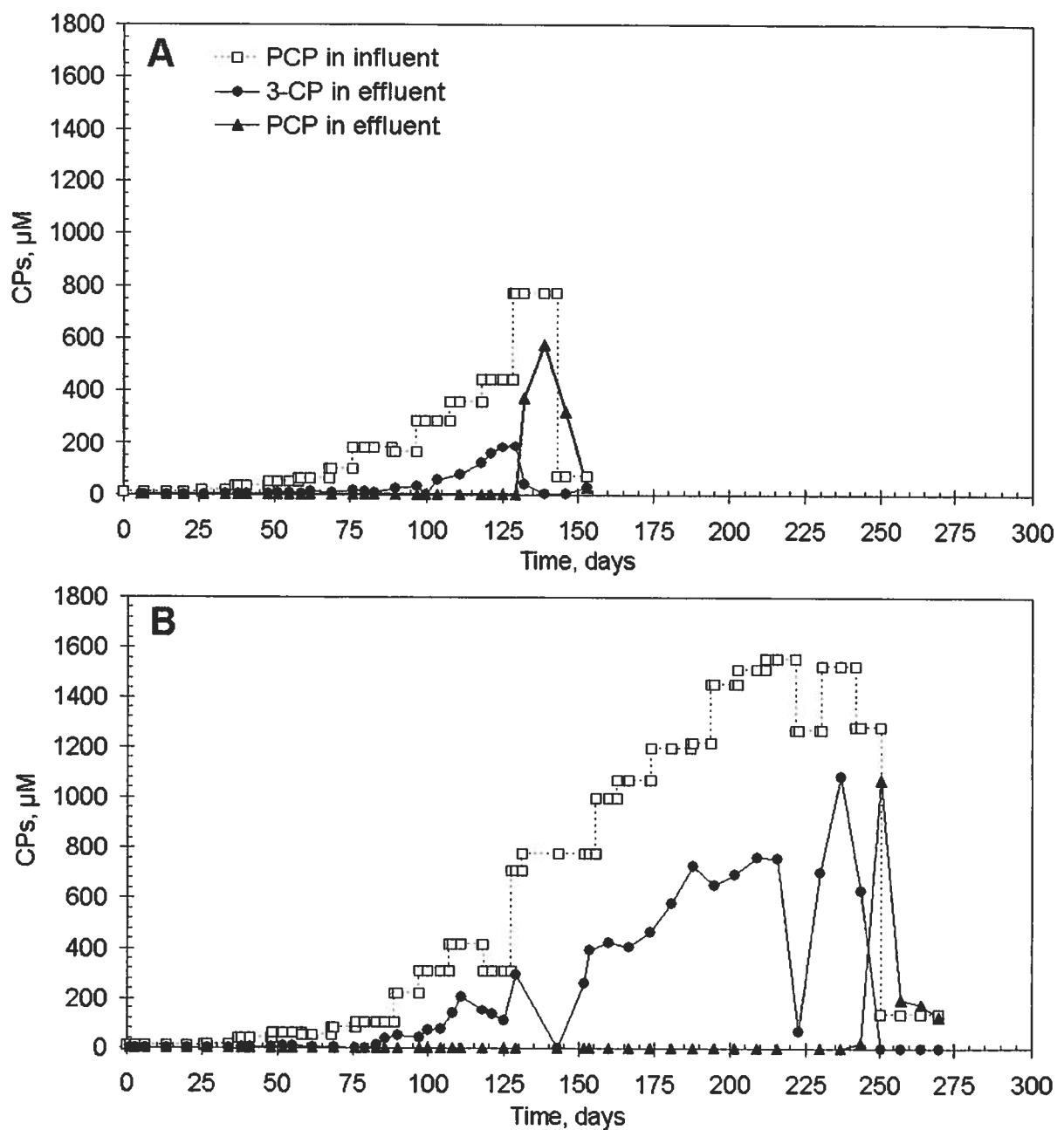


Fig. 3.4. Biodegradation of CPs in the anaerobic FF bioreactors. A: Pf reactor, B: P0 reactor

molecules. No NH₄Cl was added to the medium, so the only available source of nitrogen for the PCP-1 strain was nitrate (and to a lesser extent, yeast extract). Results showed that the concentration of nitrate decreased with bacterial growth and was transformed into nitrite. Nitrite decreased approximately 48 hours after the PCP-1 strain reached the stationary phase, thus suggesting that this molecule can be used as an electron acceptor by the PCP-1 strain (Figure 3.5). The Nf reactor was fed with 10 mM nitrate (theoretical NO₃ load of 476 mgNO₃ L_R⁻¹ d⁻¹). NO_x analyses of the effluent from this reactor throughout operation showed that no nitrate or nitrite were present (or sometime present as traces).

3.3.5.4 PCR monitoring of *D. frappieri* PCP-1 in bioreactors.

The presence of *D. frappieri* PCP-1 in all bioreactors was monitored by PCR. Total DNA of biofilm and liquid phase samples was extracted and DNA was amplified with a pair of specific primers (PCP1G/PCP4D) targeting the 16S rRNA gene of the PCP-1 strain. Positive controls were also performed for each sample with a pair of specific primers targeting the *Eubacteria* 16S rRNA gene (pA/pH) (Table 3.2), and showed that extracted DNA from all samples was amplifiable. PCR analyses with the set of primers specific for the PCP-1 strain showed that for the 3 bioreactors inoculated with this strain (Pf, Of and Nf), the expected 543 base pair (bp) amplicon was obtained with liquid phase samples taken during the recirculation process before reactor start-up. In the first 13 days of operation, the PCP-1 strain was detected in the biofilm of these reactors, and in the liquid phase of the Of reactor but not in the liquid phase of the Pf and Nf reactor. After 14 days of operation, PCR analysis showed that the PCP-1 strain was present in both the liquid phase and biofilm of the three inoculated bioreactors. Surprisingly, the PCP-1 strain was also detected by PCR in both the biofilm and liquid phase of the non-inoculated (P0) reactor after 14 days of operation (Table 3.3).

To verify the hypothesis that the PCR signal for the PCP-1 strain from the non-inoculated reactor was caused by an indigenous strain present in the original Rougemont sludge, DNA was extracted and PCR with the PCP-1 strain specific primers was performed. This experiment did not reveal the presence of the PCP-1 strain in Rougemont sludge. A second PCR with the same primers and a volume of 2 µl from the

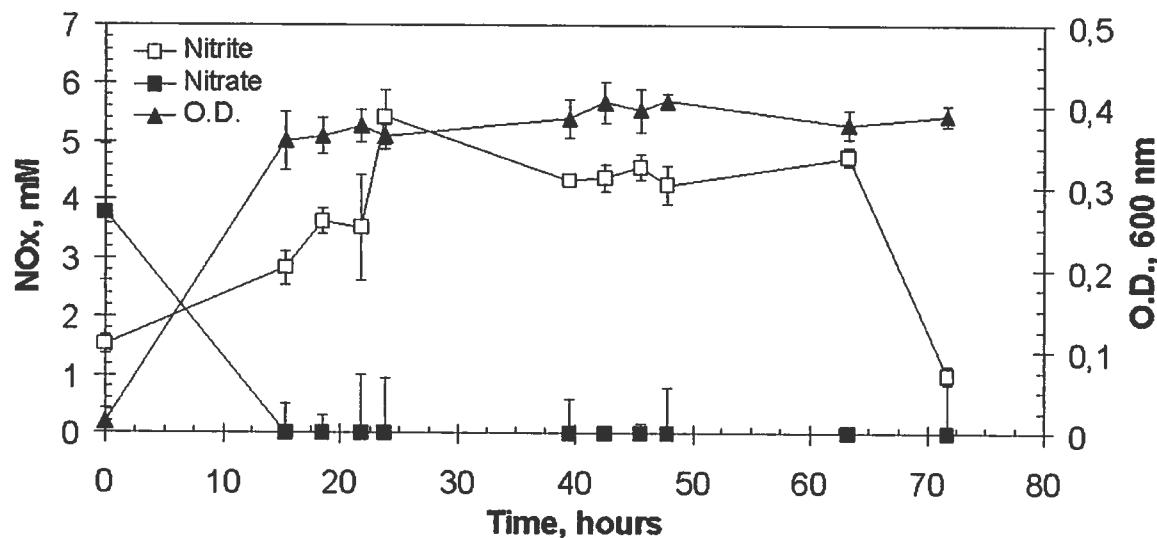


Fig. 3.5. Transformation of nitrate in nitrite by a pure culture of *D. frappieri* PCP-1. The PCP-1 strain was cultured at 30°C in minimal salts medium containing no NH₄Cl and supplemented with 10 mM nitrate and 0.5 % of yeast extract. Data are means of duplicate determinations.

Table 3.3. PCR detection of *D. frappieri* PCP-1 in the anaerobic FF bioreactors.

Reactor	Recirculation		Days 0-13		14 days and over		Reactor upset	
	L	B	L	B	L	B	L	B
Pf	+	-	+	+	+	+	-	+
P0	-	-	-	+	+	+	+	+
Of	+	+	+	+	+	+	NA	NA
Nf	+	-	-	+	+	+	NA	NA

L, liquid phase of bioreactor; B, biofilm on raschig rings; NA, not applicable

previous PCR did not reveal the presence of *D. frappieri* PCP-1 either. The Rougemont sludge was then cultured under conditions that would favour the enrichment of *Desulfobacterium* in the presence or absence of 2,4,6-TCP. After 13 days of incubation at 30°C, total DNA was extracted and a PCR was performed. A weak positive signal was obtained in the enrichment culture containing no 2,4,6-TCP, but not in the other cultures (results not shown). These results suggest the presence of low levels of *D. frappieri* in the original Rougemont granular sludge.

3.3.5.5 Archaea and Eubacteria population profiles.

Monitoring of the microorganism populations present in the bioreactors was necessary to gain information about the population dynamics in these systems. To achieve this, we used PCR-DGGE to generate a representation of the most abundant *Eubacteria* and *Archaea* present in the reactors. DNA was extracted from samples taken from the liquid phase and biofilm of all bioreactors, from the original Rougemont sludge, and from a pure culture of the PCP-1 strain. 16S rRNA genes of *Eubacteria* or *Archaea* were then PCR amplified, and the amplicons were electrophoresed on a denaturing gradient gel (DGGE). DGGE migration profile of the original Rougemont sludge showed the presence of at least 13 *Eubacteria* DNA fragments and 12 *Archaea* DNA fragments. The DGGE migration profile of the PCP-1 strain showed the presence of three bands (Figure 3.6).

3.3.5.5.1 Eubacteria population profiles.

DGGE monitoring showed that the *Eubacteria* populations were mostly stable after 14 days of operation in both the liquid phase and biofilm of all bioreactors (the profile of the Pf reactor is illustrated as an example in Figure 3.7).

The DGGE migration profile of the 4 reactors after 56 days of operation (Figure 3.6A) showed important modifications of the *Eubacteria* population in all reactors compared to the original Rougemont sludge. The original Rougemont sludge had 13 visible bands in its DGGE profile for *Eubacteria*, but this number increased to 16-21 bands in the Pf and P0 reactors (in both biofilm and liquid phase) after stabilization of the

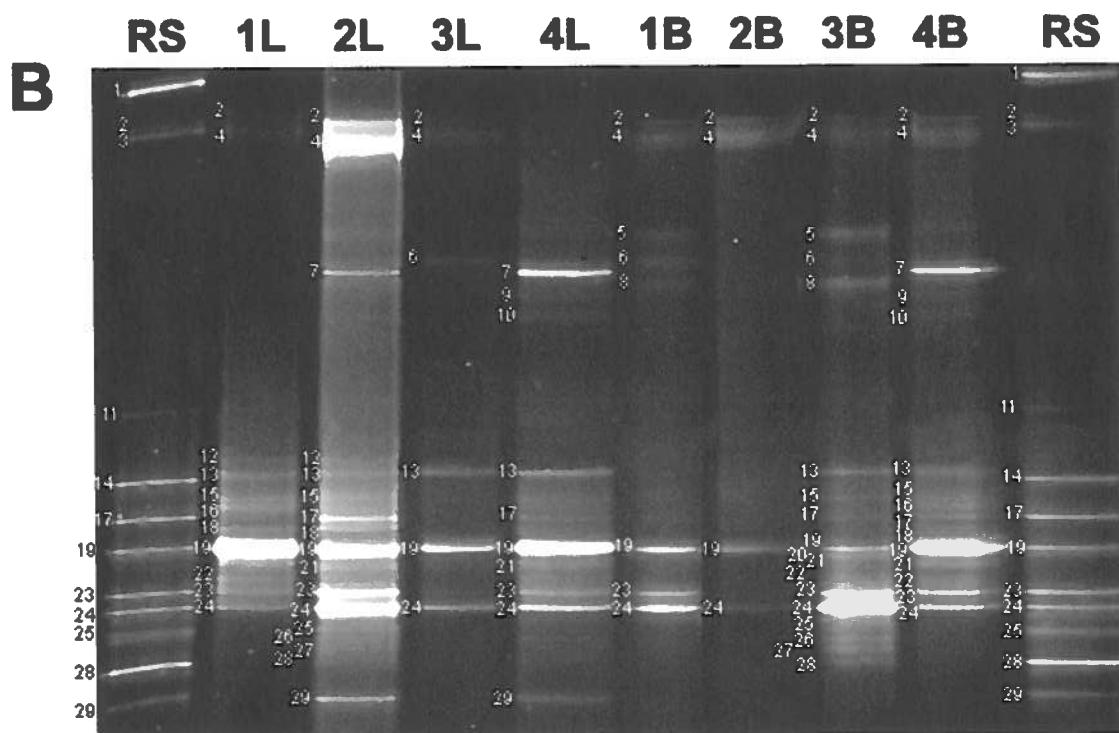
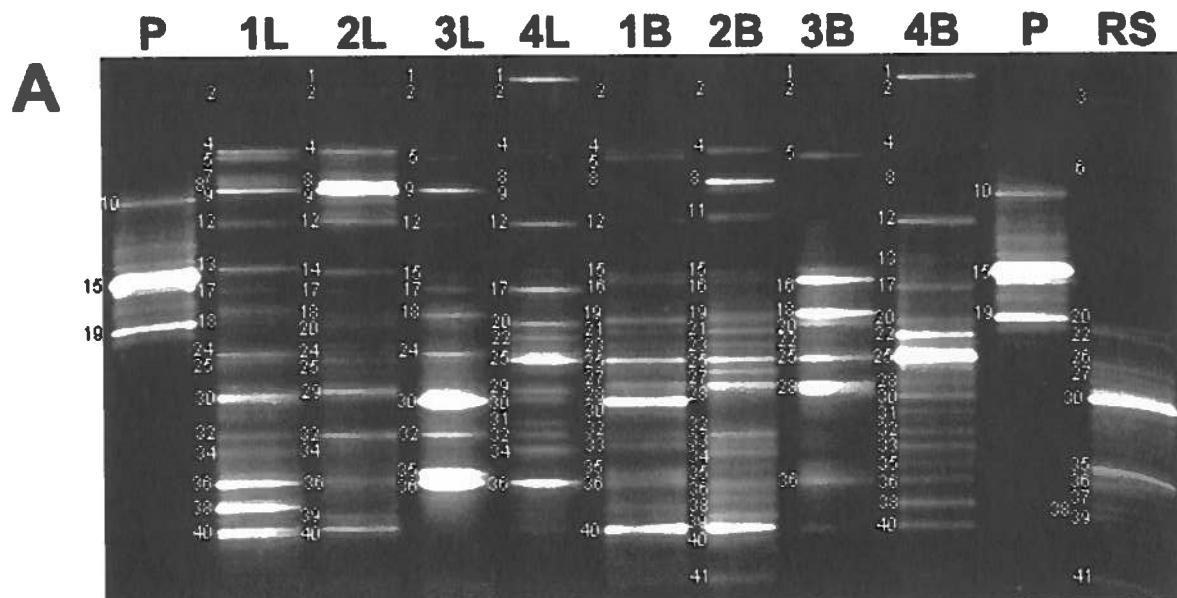


Fig. 3.6. PCR-DGGE migration profiles of the anaerobic FF bioreactors after 56 days of operation. A: *Eubacteria* populations; B: *Archaea* populations. Lanes identified by a L are samples taken from the liquid phase. Lanes identified by a B are samples taken from the biofilm. Lane 1: Pf reactor, lane 2: P0 reactor, lane 3: Of reactor, lane 4: Nf reactor, RS: Rougemont sludge, P: the PCP-1 strain. Each DNA fragment was numbered; comigrating fragments have the same number.

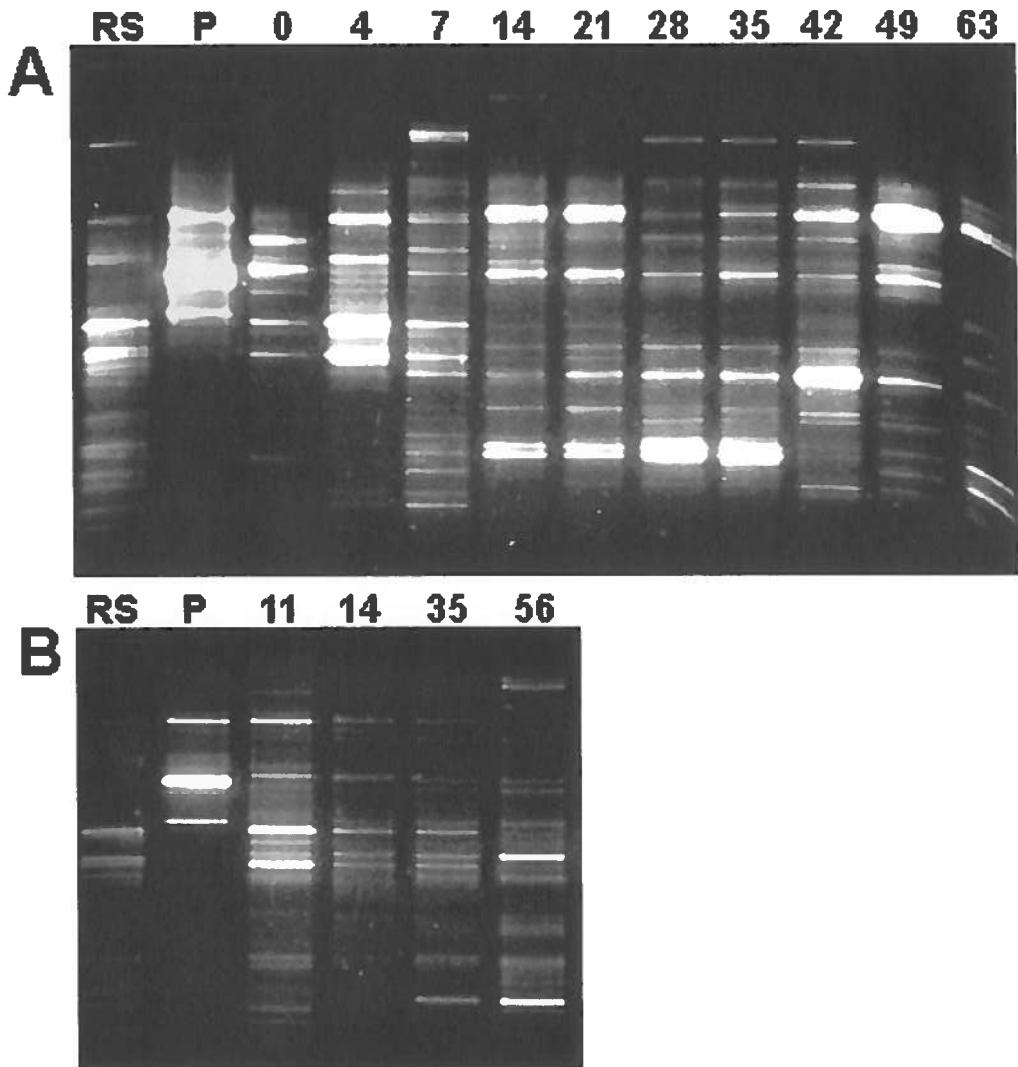


Fig. 3.7. *Eubacteria* PCR-DGGE migration profiles of the Pf reactors during the first two months of operation. A: liquid phase, B: biofilm, RS: Rougemont sludge, P: the PCP-1 strain.

populations (Table 3.4). In the Nf reactor, the number of bands was stable at 13 in the liquid phase and decreased to 10 in the biofilm.

The important modification in the *Eubacteria* populations in all bioreactors compared to the original Rougemont sludge is also reflected when the number of bands remaining from the original sludge is calculated (Table 3.5). The number of bands from the original Rougemont sludge that are still present in the biofilm or liquid phase of all reactors is generally low, ranging from 3 to 6 bands (or 10-23 % of the total number of different bands in both samples).

Comparison of the migration profile between each reactor from either the biofilm or the liquid phase samples showed that the percentages of comigrating bands vary between 19 to 67 % (Table 3.5). The most similar profiles are from the P0 and Pf reactors that have the highest percentage of comigrating bands either with the biofilm sample (67 %) or the liquid phase sample (57 %). On the other hand, the most divergent profiles are from the P0 and the Of reactor for biofilm samples (19 %), and the Of and the Nf reactors in the liquid phase sample (38 %). If we compare the migration profile between the liquid phase and the biofilm samples in each reactor, the Nf reactor is the only one that has more than 50 % of comigrating bands.

DNA fragments possibly corresponding to the PCP-1 strain were detected in the three strain PCP-1 inoculated reactors (fragment #19 from the Pf reactor; fragments #16 and 20 from the Of reactor; Figure 3.6A and Table 3.5). These fragments were cut from the DGGE gel, and DNA was extracted and reamplified. Following this step, reamplified DNA was digested with the *Kpn*I restriction enzyme. This enzyme cuts at a very specific site in this part of the 16S rDNA sequence of *D. frappieri* PCP-1 and thus should give two fragments (189 pb and 46 pb). Only fragment #16 from the biofilm of the Of reactor generated the expected restriction fragments.

3.3.5.2 *Archaea* population profiles.

Regular monitoring of the *Archaea* populations present in the four bioreactors showed that these populations were mostly stable after 14 days of operation in both the liquid phase and biofilm, except for the Nf reactor. *Archaea* populations were stable after 21 and 35 days in the liquid phase and biofilm, respectively (see Figure 3.6B for the

Table 3.4. Number of bands detected after DGGE profiling of samples taken from the bioreactors after 56 days of operation and from samples that were used as inocula for these reactors.

Sample	<i>Eubacteria</i>		<i>Archaea</i>	
	Liquid phase	Biofilm	Liquid phase	Biofilm
Pf	18	19	11	8
P0	18	21	17	4
Of	13	10	6	18
Nf	16	19	10	15
Rougemont sludge	N.A.	13	N.A.	12
<i>D. frappieri</i> PCP-1 in pure culture	3	N.A.	N.A.	N.A.
N.A., not applicable				

Table 3.5. Number of comigrating *Eubacteria* DGGE DNA fragments between the four FF bioreactors after 56 days of operation.

Reac- tor	Phase	Reactor						Sample		
		Pf		P0		Of		Nf	PCP-1	RS
		L	B	L	B	L	B	L	B	L
Pf	L	10/27 (37%)	13/23 (57%)		10/21 (48%)		11/23 (47%)		0	3/28 (10%)
	B			16/24 (67%)		6/23 (26%)		12/26 (46%)	2/20 (10%)	4/28 (14%)
P0	L			9/30 (30%)	9/22 (41%)		12/22 (55%)		0	3/28 (11%)
	B					5/26 (19%)		11/29 (38%)	2/22 (9%)	5/29 (17%)
Of	L					5/18 (28%)	8/21 (38%)		1/15 (7%)	3/23 (13%)
	B							7/22 (32%)	0	3/20 (15%)
Nf	L							13/22 (59%)	0	4/25 (16%)
	B								0	6/26 (23%)

The ratio represents the number of comigrating DGGE DNA fragments to the summation of DGGE DNA fragments in the two compared samples. B: Biofilm sample; L: Liquid sample; RB: Rougemont sludge.

DGGE profiles after 56 days of operation and Figure 3.8 for a more detailed profile). As for the *Eubacteria* DGGE profiles, the *Archaea* migration profiles of samples taken from the 4 bioreactors after 56 days of operation showed important modifications in the population as compared to the original Rougemont sludge. Generally, the number of bands corresponding to *Archaea* microorganisms decreased in both the biofilm and the liquid phase of all reactors as compared to the original Rougemont sludge. Specifically, the original Rougemont sludge had 12 bands in its *Archaea* population profile, while the number of bands present in the *Archaea* population profile of the liquid phase and biofilm of all reactors ranged between 4 and 11, except for the liquid phase of the P0 reactor and the biofilm from the reactor Of and Nf. In these samples, an increase in the number of bands occurred, ranging to a total number of bands between 15-18 (Figure 3.6B., Table 3.4). However, for the liquid phase of the P0 reactor, the higher number of bands is probably caused partly by a higher amount of DNA in this lane. These important modifications in the population profiles of the *Archaea* can also be seen when the number of original bands from the Rougemont sludge is calculated for each sample (Table 3.6). As seen for the *Eubacteria*, only a few bands (11 % to 35 % of comigrating bands) remaining from the Rougemont sludge are seen in the biofilm and liquid phase of all reactors.

The *Archaea* population profiles were compared between the biofilm and liquid phase in each reactor (Table 3.6). In the Pf, P0 and Of reactors, 4 to 5 bands were common between the biofilm and liquid phase samples (corresponding to 18-36 % of comigrating bands). As for the *Eubacteria* profiles, the Nf reactor had the most similarity between its liquid phase and biofilm sample (56 % of comigrating bands).

The *Archaea* population profiles were also compared between each different reactor (Table 3.6). The most similar profiles never exceeded 60 % similarity. For instance, the biofilm of the P0 and Of reactors have 53 % of comigrating bands. Two bands from the RS samples, #19 and #24, however were found in all reactors in both the biofilm and the liquid.

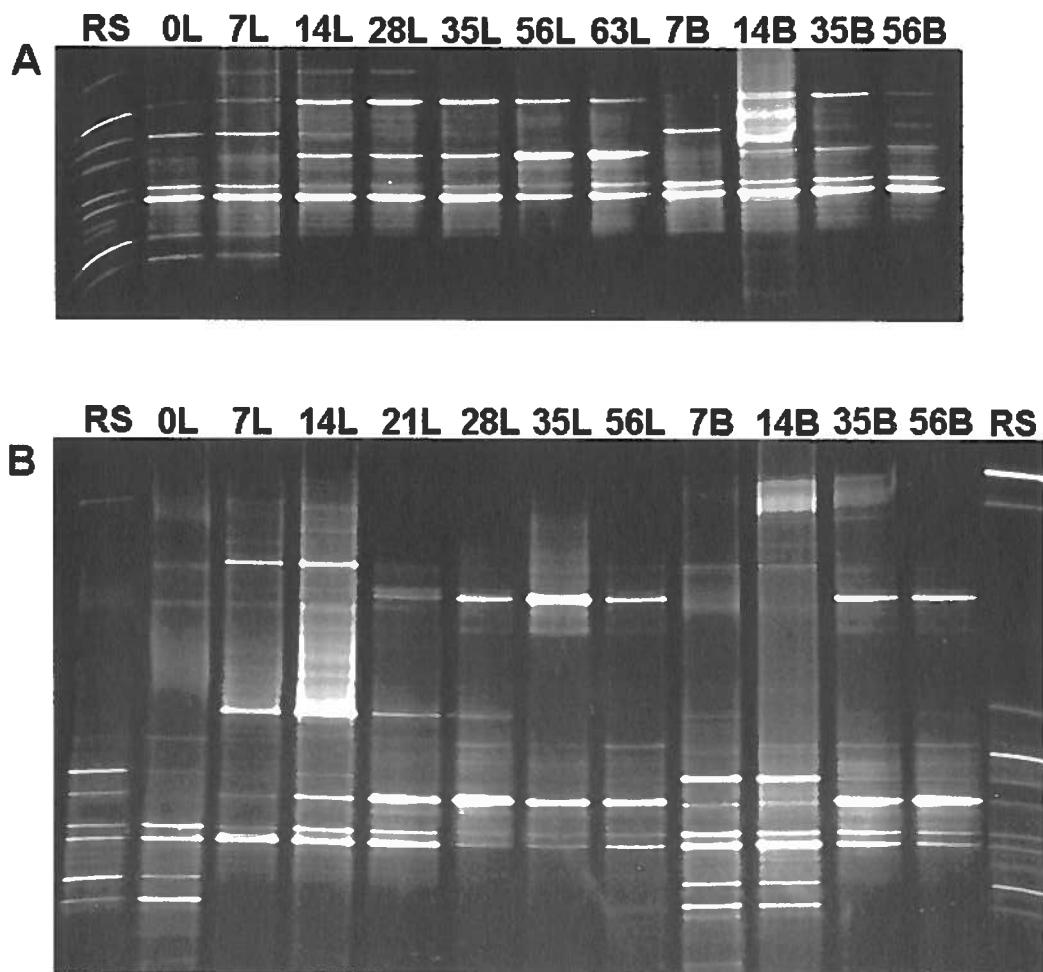


Fig. 3.8. *Archaea* PCR-DGGE migration profiles of FF reactors during the first two months of operation. A: Of reactor, B: Nf reactor. Lanes identified by a L are samples taken from the liquid phase. Lanes identified by a B are samples taken from the biofilm. Numbers are days. RS: Rougemont sludge.

Table 3.6. Number of comigrating *Archaea* DGGE DNA fragments between the four FF bioreactors after 56 days of operation

Reac-	Phase	Reactor						Sample		
		Pf		P0		Of		Nf		BR
		L	B	L	B	L	B	L	B	B
Pf	L	5/14 (36%)	9/19 (47%)		5/24 (21%)		4/17 (24%)		4/19 (22%)	
	B			4/18 (22%)		8/15 (53%)		5/18 (28%)		4/16 (25%)
P0	L		4/13 (31%)	5/30 (17%)		8/19 (42%)		8/21 (38%)		
	B				4/15 (27%)		4/15 (27%)		3/13 (23%)	
Of	L			5/28 (18%)	3/25 (12%)			3/27 (11%)		
	B					10/20 (50%)		7/20 (35%)		
Nf	L					9/16 (56%)		5/15 (33%)		
	B						5/22 (23%)			

See table 3.5 for descriptions

3.3.6 Discussion

3.3.6.1 Reactor monitoring

The stabilization of gas production by the Pf, P0 and Nf reactors occurred after 3-5 days of operation, which is consistent with the fresh sludge (conserved for 1-2 months at 4°C) used as inoculum. However, stabilization of the gas production for the Of reactor occurred only after 158 days. This is probably caused by the age of the inoculum, since this reactor was inoculated with granular sludge conserved for approximately 8 months at 4°C. Thus, this longer conservation period could have inhibited the microorganisms in the sludge because of starvation, loss of viability of certain species over time or elimination of some non-sporulating bacteria.

The lowered gas production of Pf and P0 reactors (9.6–9.7 ml h⁻¹) compared to the Of reactor (13.3 ml h⁻¹) can be attributed to the presence of PCP or other CP intermediates. Ahring (2003) reported that adaptation of an anaerobic consortium to toxic compound can reduce gas production. Methanogenesis is known to be inhibited in presence of low levels of PCP (0.1 – 3.0 mg l⁻¹) for non-acclimatized sludge, while acclimatized sludge is only slightly inhibited (2.5 mg l⁻¹) (Guthrie *et al.*, 1984; Wu *et al.*, 1993; Duff *et al.*, 1995; Stuart and Woods, 1998).

The drop in gas production following oxygen entry in the Pf reactor shows that the anaerobic bacteria in the system were affected by oxygen. The toxicity of oxygen for anaerobic microorganisms (Morris, 1994) is caused by the reaction of oxygen with flavine enzymes, quinones and iron-sulfur proteins present in these microorganisms and which react spontaneously with oxygen. This reaction yields hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals. These highly reactive products cannot be eliminated by the anaerobes, since most of them do not possess superoxide dismutases (Stams *et al.*, 2003). The absence of recovery in gas production in this reactor can be explained by the fact that anaerobic bacteria are slow growers (Morris, 1994), and that return to normal gas production by these bacteria can take some time following perturbation of the system.

A drop in gas production was also observed in the P0 reactor following the addition of technical grade PCP (90 % pure) instead of the 99 % purity normally used. This drop in gas production is probably caused by the presence of a much higher quantity of toxic impurities in the technical grade PCP than in the high purity PCP. Possible

contaminants of technical grade PCP are tetrachlorophenols (TeCPs; 4-12 %), chlorinated phenoxyphenols (1-5 %), and traces of chlorodioxins, chlorofurans, chlorinated diphenyl ethers, dibenzofurans and dihydroxybiphenyls (Cirelli, 1978; Nilsson *et al.*, 1978). While TeCPs should not be a problem for the consortium since it already degrades PCP and its degradation intermediates, the other impurities could have a much greater impact on the consortium because of their high toxicity, even if present as traces. Among these possible contaminants, dioxins and furans are the most toxic molecules, and it has been shown recently that these compounds are toxic for bacteria (Min *et al.*, 2003a; Min *et al.*, 2003b). These compounds could have affected the methanogenic bacteria, which are quite sensitive to toxic molecules (Angelidaki *et al.*, 2003). These results further emphasize the importance of gradual sludge acclimatization for enhanced reactor performances when new compounds are present in the influent.

Stabilization of gas production in the Nf reactor was slow (stable after 80 days of operation) compared to PCP-fed reactors, but faster than the Of reactor. Also, the average gas production by the Nf reactor was the lowest (7.8 ml h^{-1}) compared to the other reactors. While delays in the stabilisation of gas production in this reactor can be attributed to the time needed for the microorganisms to adapt to the presence of nitrate, the effect of the accidental NaOH entry at day 33 cannot be neglected, since it increased the pH in the reactor temporarily to 10. Anaerobic bacteria present in digestion processes can grow at a pH range varying between 6.0 and 8.5, with a pH optimum around 7 for acetogenic bacteria and methanogenic *Archaea* and around 6 for acidogenic bacteria (Angelidaki *et al.*, 2003).

Detection of a high percentage of methane (69 %) in the gas produced by the Of reactor confirmed the methanogenic activity in this reactor. This percentage is near the 75 % methane detected in the gas produced by a methanogenic UASB reactor (Duff *et al.*, 1995). Also, low levels of H₂ are eliminated by H₂-consuming methanogens. The low H₂ concentration detected in this reactor is essential for efficient VFA degradation, because synthrophic VFA degraders are inhibited by the presence of H₂ (Ahring, 2003). It can thus be deduced that the PCP-fed reactors were also producing methane since they were operated in the same way as the control reactor and inoculated with the same sludge. A lower percentage of methane (54 %) and a higher percentage of nitrate and oxygen (22 %

instead of 7 % in the Of reactor) were detected in the Nf reactor compared to the Of reactor. This suggests a lower methanogenic activity in the Nf bioreactor and also the presence of denitrification activity, thus showing that this reactor possesses both abilities. The fermentative bacteria are probably responsible for the transformation of nitrate into nitrite instead of ammonia (Stams *et al.*, 2003). These results also suggest that the transformation of nitrite is completed to N₂. Furthermore, ammonia is known to be toxic to methanogens (Angelidaki *et al.*, 2003), but the presence of methane in this reactor shows that these microorganisms are active, enhancing the denitrification hypothesis. Mosquera-Corral *et al.* (2001) also studied a reactor combining denitrification and methanogenesis, and also detected the formation of nitrogen by the bioreactor.

As determined by Akunna and Moletta (Akunna et Moletta, 1992) a COD/N-NO_x ratio over 53 resulted in methane production without denitrification (ammonification was the main NO_x reduction pathway). Furthermore, a COD/N-NO_x ratio varying between 8.86 and 53 resulted in both denitrification and methane production, and finally a COD/N-NO_x ratio below 8.86 resulted in only denitrification. Thus, the ratio of 5.65 (3500 mg_{COD} l⁻¹/620 mg_{N-NO_x} l⁻¹) used in the Nf reactor should have resulted in a solely denitrifying reactor without methanogenic activity. However, conditions used by Akunna and Moletta (1992) were different than this study, since they used completely-stirred anaerobic digesters fed with only glucose as the carbon source, which are different from our FF reactor fed with a complex medium. Mosquera-Corral *et al.* (2001) also studied the simultaneous methanogenesis and denitrification in a hybrid upflow sludge-bed filter and showed that denitrifying microorganisms were present in the sludge used as inoculum. They used a C:N ratio in the influent varying between 2 and 3 (2.86 COD:N). However, the COD:N ratio used in this study was below 8.86 and should have resulted mainly in denitrification as compared to the model of Akunna and Moletta (1992), instead of combined methanogenesis and denitrification. Thus, results from Mosquera-Corral *et al.* (2001) corroborate the combined methanogenesis and denitrification in the Nf reactor, even if the COD:N ratio was below 8.86.

VFA analysis in the effluent of all reactors helps to better understand the activity of VFA producers and consumers (Ahring *et al.*, 1995). Accumulation of acetate after start-up for PCP-fed reactors can be explained by the inhibition of aceticlastic

methanogens (Angelidaki *et al.*, 2003), which are responsible for the transformation of acetate into CH₄ and CO₂. Also, only trace-levels of butyrate and propionate were found in the effluents of PCP-fed reactors, thus demonstrating that acetogenic bacteria were not affected by the toxicity in the reactor and were readily transforming these VFAs. These results are relatively different from those obtained by Wu *et al.* (1993), who found that all three VFA-degrading populations were affected by the PCP toxicity. More specifically, propionate-degraders were the most sensitive to the presence of PCP, followed by acetate-utilizing methanogens and then butyrate degraders. The differences between our results and the results of Wu *et al.* (1993) can be attributed to the different inoculum. Also, perhaps the structure of the surface biofilm helped the anaerobic bacteria in our reactor to more efficiently resist to the toxic effect of PCP (and its intermediates) and from the granular sludge. Biofilm structure on a surface is different than the structure of anaerobic granular sludge, and it is well documented that this type of biofilm is particularly resistant to toxic compounds (Costerton *et al.*, 1999).

Contrarily to the PCP-fed reactors, acetate and butyrate accumulated in the O_f reactor. This can possibly be attributed to the older inoculum. A possible scenario is that H₂-producing acetogenic bacteria lagged at start-up. Microorganisms present in this reactor recovered from the conservation at 4°C, but rather slowly. Accumulation of acetate and butyrate in the Nf reactor decreased rapidly, showing a fast adaptation to the presence of nitrate. Unfortunately, upset of this reactor at day 33 by NaOH entry caused the accumulation of acetate again, while butyrate and propionate returned to normal quite fast. This shows that acetoclastic methanogens are very sensitive to pH changes in the system.

Following upset of PCP-fed reactors, VFA accumulated in both systems. The accumulation of acetate and butyrate both Pf and P0 reactors show inhibition of the acetoclastic methanogens and partial inhibition of acetogenic bacteria. Acetogenic bacteria were only partly inhibited, since this population is also responsible for the degradation of propionate, which was not detected in the effluent. Reactor recovery is visible with the reduction of both acetate and butyrate in both systems, but the accumulation of propionate in the recovery process of the Pf reactor shows that acetogenic bacteria were still unstable.

Organic matter degradation was similar in all reactors (Table 3.1). This demonstrates the activity of fermentative bacteria responsible for the degradation of polymers. The presence of PCP or nitrate or NaOH entry did not significantly affect the degradation of organic matter. Degradation of organic matter in our FF reactors was slightly lower than what is found in the literature for organic industrial waste and source-sorted household waste. In these wastes, approximately 80 % of the organic matter is transformed into biogas (Ahring, 2003). More specifically, Picanço *et al.* (2001) and Michaud *et al.* (2002) obtained COD removal of 68 % and 75 - 80 %, respectively, both with methanogenic FF bioreactors. Around 80 % COD removal was obtained in a bioreactor fed with $220 \text{ mgNO}_3^{-1} \text{ l}_R \text{ d}^{-1}$ in which methanogenesis and denitrification occurred (Mosquera-Corral *et al.*, 2001). The lower carbon removal in our reactors can be explained by the toxicity of PCP or the conservation of inoculum. A higher COD result would have been interesting for the Nf reactor, since Akunna *et al.* (1994a) explained that the combination of both nitrogen and carbon removal could be advantageous since it can result in higher COD reduction. This higher COD reduction is theoretically possible since both methanogenesis and denitrification reactions use some organic matter. However, Akunna and Moletta (1992) explained that a similar COD removal, when compared to a methanogenic reactor, resulted from a lower COD removal by methanogenesis in the presence of nitrate, which is compensated by the COD removal by denitrification.

3.3.6.2 PCP biodegradation capacities

The PCP-fed reactors were gradually exposed to an increasing PCP load to allow adaptation of the anaerobic consortium. Tartakovsky *et al.* (1999; 2001) demonstrated with a UASB bioreactor that if the PCP concentration is increased too rapidly, this could cause the accumulation of more toxic intermediates (i.e. TCPs) and eventually cause reactor failure. The PCP-1 strain in pure culture is also sensitive to PCP at concentrations higher than 10 mg l^{-1} . Above this concentration, the PCP-1 strain cannot dehalogenate PCP (Bouchard, 1995). These data further enhance the importance of gradual exposure to PCP.

Both reactors fed with PCP acquired the capacity to degrade this compound (see section 3.3.6.4). The best degradation rate in the Pf reactor was $157 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ after 129 days. The P0 reactor was operated for a longer period of time, and reached a degradation rate of $312 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$. However, both reactors could degrade a similar PCP load after 129 days of operation. The degradation performance of both reactors could probably have been even higher if they had not been upset. What would have upset eventually is the accumulation of 3-CP in the system, which was not degraded rapidly enough. However, modifications in the operation conditions of the reactors could have resolved this problem.

The 3-MCP degradation in both PCP-fed reactors is probably done by indigenous microorganisms, since the PCP-1 strain does not dehalogenate MCPs. Degradation of PCP in the P0 reactor also suggests the presence of indigenous PCP-degrading bacteria in the Rougemont sludge. Lanthier *et al.* (2000) found that adaptation in a rotating sludge bioreactor for PCP degradation demonstrate similar performances whether they were inoculated or not with *D. frappieri* PCP-1. Also, Tartakovsky *et al.* (1999; 2001) found few differences in the PCP-degradation capacities between UASB reactors inoculated or not with the PCP-1 strain. This hypothesis is further supported by the work of Lanthier *et al.* (2001), which demonstrated by PCR that *D. frappieri* and the genus *Desulfitobacterium* were widely distributed in different soils and sediments from the Province of Quebec.

The PCP load, the PCP degradation (99 % in both PCP-fed reactors), and the 3-CP degradation (58-99 % in the Pf reactor and 40-99 % in the P0 reactor) reached in our study compare favourably to other studies. For example, Hendriksen *et al.* (1991) and Hendriksen et Ahring (1993) studied the degradation of PCP in a FF bioreactor and obtained 98 % PCP removal with a loading rate of $1.5 \text{ mg l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$. They quantified the intermediate CPs as a sum of lesser chlorinated CPs, and obtained 20-40 % of fully dechlorinated PCP, with mostly 3,4,5-TCP as a major intermediate. Juteau *et al.* (1995b) obtained 99 % PCP removal with a PCP load of $15.9 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ with their FF bioreactor. They observed mostly 3,4-DCP and 3-CP as major intermediates and no significant 3-CP degradation. Beaudet *et al.* (1997) obtained the complete dechlorination of PCP extracted from contaminated wood chips with a loading rate of up to $18.0 \text{ mg}_{\text{PCP}}$

$\text{l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ in an anaerobic FF bioreactor. Our PCP-fed reactors showed a superior PCP load, at least 8 times higher for the Pf reactor and 18 times higher for the P0 reactor, compared to the best FF reactor performance reported by Beaudet *et al.* (1997). The major CP intermediate detected in the effluent of our reactors was 3-CP. However, more than 85 % of this intermediate was degraded in both reactors at PCP loads up to $22.5 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$. This percentage is superior to the pre-cited studies, except for the complete PCP degradation reported by Beaudet *et al.* (1997) at a similar PCP load. This difference in the degradation efficiency of 3-CP could be attributed to the source of the inoculum, an inoculum from a PCP-degrading anaerobic continuous flow sludge reactor in the case of Beaudet *et al.* (1997).

PCP degradation in an anaerobic bioreactors has been more intensely studied with UASB bioreactors. These studies have shown that UASB reactors could degrade higher PCP loads than FF bioreactors. Woods *et al.* (1989) tested the degradation of a mixture of CPs containing a PCP load up to $0.93 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$, with 94.9 % of PCP removal efficiency. Duff *et al.* (1995) also studied the degradation of diluted PCP wastewaters with a UASB reactor. Microorganisms in the reactor were exposed to a PCP load of up to $1 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ and decreasing 3-CP concentrations were detected in the effluent. Hendriksen and Ahring (1993) also studied the degradation of PCP in a glucose-fed anaerobic UASB bioreactor and obtained up to 95 % PCP removal, with 20 % of total dechlorination with a PCP load of $1.4 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$. Hendriksen *et al.* (1992) fed a UASB reactor with a PCP load of $2.25 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ and obtained mainly DCPs as major intermediates (less than 20 % of total PCP). Wu *et al.* (1993) also studied the degradation of PCP in a UASB reactor and reported the highest PCP load to be degraded by an anaerobic bioreactor. The maximum PCP load tested was $88-97 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$, with a PCP removal of more than 99 % and no CP intermediates were detected during operation. Thus, our PCP-fed reactors have achieved removal of a higher PCP load than the best performance obtained with a UASB reactor reported by Wu *et al.* (1993). The Pf reactor had a 1.6 fold higher PCP load and the P0 reactor attained a 3.2 fold higher PCP load. However, in contrast to Wu *et al.* (1993), the main intermediate in the effluent of our reactors fed with PCP was 3-CP. As mentioned before, this difference can be attributed to the source of the inoculum. The granular sludge used by Wu *et al.* (1993), was

enriched in the presence of a mixture of VFAs, but the UASB reactor was also inoculated with contaminated soils enriched anaerobically in the presence of PCP. This further enhances the need to use, at least partially, an inoculum with a contamination history.

Our results with the PCP-fed bioreactors also compare advantageously with other publications that used UASB bioreactors inoculated with *D. hafniense* or *D. frappieri*. Work by Christensen and Ahring (Christiansen et Ahring, 1996b) showed that inoculation of *D. hafniense* DCB-2 in a UASB bioreactor with sterilized granular sludge resulted in 99 % transformation of PCP in 3,4,5-TCP when fed a PCP load up to $42 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$. Tartakovsky *et al.* (1999) also tested the PCP degradation capacity of a UASB bioreactor inoculated with *D. frappieri* PCP-1. Their reactor was exposed to increasing amounts of PCP, up to a PCP load of $62 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$. They obtained more than 95 % PCP degradation, with less than 5 % residual 3-CP.

Aerobic systems are also very efficient for the degradation of PCP. For example, Stinson *et al.* (1991) were able to degrade PCP loads of up to $360 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ in an aerobic FF bioreactor, which is comparable to what was obtained with the P0 reactor. Jarvinen *et al.* (1994) obtained 99.9 % PCP degradation with a PCP load of $740 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ with an aerobic fluidized bed reactor. Even if aerobic treatments are able to degrade higher PCP loads, the PCP loads reached by our anaerobic reactors are sufficient to degrade PCP concentrations of 25 - 150 mg l⁻¹ which are commonly found in wastewater (Edgehill et Finn, 1983).

Oxygen entry (Pf reactor) and addition of technical grade PCP to the influent (P0 reactor) resulted in accumulation of PCP and disappearance of 3-CP in both effluents. Degradation activity in both reactors never recovered, even after the return of anaerobic conditions, reduction of the entering PCP load and usage of a high purity PCP. The PCP-1 strain can resist oxygen exposure and high PCP load exposure by forming spores. However, the PCP-1 strain requires other members of the anaerobic consortium for its survival in the biofilm. Since the PCP-1 strain needs pyruvate for its growth and no pyruvate was provided in the system, the PCP-1 strain has to get pyruvate through synthrophic associations. However, these synthrophic strains were probably affected by the oxygen entry or the toxicity of PCP contaminants in the system. Upset of both PCP-fed reactors demonstrates the fragility of the microbial community, the importance of

acclimatization of microorganisms to new substrates and usage of an air-tight bioreactor system. However, even with these weaknesses, anaerobic bioreactors should still be considered for higher scale treatments of chlorinated solvents like PCP because they can still be less expensive than aerobic treatments.

3.3.6.3 Denitrification activity

Bouchard *et al.* (1996) demonstrated the use of nitrate as an electron acceptor for the PCP-1 strain in pure culture. Nitrite can also be used by this strain as an electron acceptor at the end of the log phase. This result was confirmed by three independent series of duplicate cultures (results not shown). This use of nitrite is probably a last resort process, i.e. when electron acceptors are becoming rare in the medium.

The use of nitrite as an electron acceptor has been tested without success for *D. dehalogenans* JW/IU-DC1 (Utkin *et al.*, 1994), *D. frappieri* TCE1 (Gerritse *et al.*, 1999), *D. hafniense* DCB2 (Niggemyer *et al.*, 2001), *D. hafniense* GBFH (Niggemyer *et al.*, 2001), *D. metallireducens* 853-15A (Finneran *et al.*, 2002), and *Desulfitobacterium* Y51 (Suyama *et al.*, 2001) (but poor growth was observed with this strain). Nitrite reduction by *D. frappieri* PCP-1 was reported to be negative by Niggemyer (2001). However, the standard method to confirm use of an electron acceptor by an isolated strain is growth in the presence of this acceptor for three successive transfers (Shelobolina *et al.*, 2003). While these results suggest that the PCP-1 strain could use nitrite as an electron acceptor, other experiments are required to confirm these data.

Industrial wastewater containing high amounts of organic matter is usually treated with anaerobic bioreactors, which transforms organic matter into methane, ammonia, carbon dioxide and hydrogen sulphide. This anaerobic treatment is followed by a treatment composed of an aerobic nitrifying stage for the oxidation of residual organic matter and ammonia to carbon dioxide, water and nitrate. Denitrification, the last step of the treatment, is anoxic and completely removes the carbon and nitrogen (Akunna et Moletta, 1992; Quevedo *et al.*, 1996). Nitrate under anaerobic conditions is reduced by a dissimilatory process in which nitrate is used as a terminal electron acceptor. Two types of reaction are possible. The first one is the denitrification step in which nitrite is produced by the reduction of nitrate. Nitrite is then reduced to nitrogen or nitrous oxide.

The second one is the ammonification step, in which nitrate is reduced to nitrite and then ammonia (Akunna et Moletta, 1992; Quevedo *et al.*, 1996). Akkuna *et al.* (1994b) suggested that both the methanogenic and denitrification steps could be done in the same reactor, thus simplifying the process. This suggestion is supported by data from Akkuna et Moletta (1992) and Quevedo *et al.* (1996), who showed that methanogenic sludge has denitrifying activity and also by Jorgensen and Tiedje (1993) who demonstrated that nitrifying microorganisms were present in nitrate-free environments like anaerobic sediments and digested sludge. However, little information has been published describing the addition of nitrate to methanogenic consortia (Quevedo *et al.*, 1996).

The denitrification performance of the Nf reactor ($476 \text{ mgNO}_3^{-1} \text{ l}_R \text{ d}^{-1}$) is comparable to other works published such as Mosquera-Corral *et al.* (2001) (hybrid up flow sludge bed-filter, $220 \text{ mgNO}_3^{-1} \text{ l}_R \text{ d}^{-1}$ with 100 % N-NOx removal), Hanaki and Polprasert (1989) (upflow anaerobic filter, $880 \text{ mgNO}_3^{-1} \text{ l}_R \text{ d}^{-1}$ with a 99.8 % N-NOx removal) and Akunna and Moletta (1992) (continuous-flow stirred anaerobic digester, $60 \text{ mgNO}_3^{-1} \text{ l}_R \text{ d}^{-1}$ with 64 % N-NOx removal).

3.3.6.4 PCR monitoring of *D. frappieri* PCP-1 in bioreactors

The strain PCP-1 was detected in the liquid phase of the Pf, Of and Nf reactors. The detection of this strain in recirculation was expected since reactors were put in the recirculation mode. The PCP-1 strain was also detected in the first 14 days of operation in the biofilm and liquid phase of these reactors, but infrequently. One hypothesis explaining this is the partial washout and dilution of the strain in the liquid phase. In fact, if the growth rate of the microorganisms is faster than the hydraulic retention time (HRT) of the reactor, the microorganism is growing faster than it is washed out of the system and thus can maintain itself in the reactor without being attached in the biofilm (Ahring *et al.*, 1992). However, since the generation time of the PCP-1 strain (approximately 3 h (Bouchard *et al.*, 1996)), is lower than the retention time of the reactor (28h), washout from the reactor should not occur. Also, the detection limit of the PCR technique (theoretically, about 10 target genes per reaction (Steffan et Atlas, 1991)) may also explain lack of detection following the dilution or washout of the PCP-1 strain in the

reactor. The size of the inoculum did not seem to have a clear impact on the detection of this strain before 14 days of operation.

After 14 days of operation, the PCP-1 strain was detected in a more regular manner in both the biofilm and the liquid phase in the PCP-1 inoculated bioreactors. This shows that the PCP-1 strain had colonized the biofilm and was also present in the liquid phase. These results show that the PCP-1 strain can survive and compete in a mixed microorganism population both in the presence or absence of PCP. This ability of *D. frappieri* PCP-1 to compete well in mixed microbial populations has already been described in soil (Lévesque *et al.*, 1997; Beaudet *et al.*, 1998; Lanthier *et al.*, 2000) and UASB reactors (Tartakovsky *et al.*, 1999).

The PCP-1 strain was also detected in the P0 reactor. While we first hypothesized that the presence of the PCP-1 strain in this reactor was caused by a contamination occurring in the non-sterile anaerobic chamber during the sampling of the biofilm, we wanted to verify if indigenous strain PCP-1 cells were present in the original methanogenic sludge used as inoculum for these reactors. Absence of detection of this strain following PCR or nested PCR with DNA extracted from the methanogenic sludge suggested that this strain, if present, was below the detection limit of these techniques. However, a weak PCR signal for *D. frappieri* was obtained following an enrichment of the methanogenic sludge used as inoculum. This suggests that *D. frappieri* was present in the indigenous flora of the sludge used as inoculum for the reactors. This is not surprising, since *Desulfobacterium* species are present in a great variety of contaminated and non-contaminated environments (Lanthier *et al.*, 2001). This presence also explains why the non-inoculated reactor performed in a similar way as the inoculated reactor for the degradation of PCP. These results show that bioaugmentation might be necessary only when the indigenous degradation activity is not present or if the indigenous flora is not performing well. Thus, verification of the degradation capacities of the indigenous flora might save operation costs, because there will be no need for bioaugmentation if the needed degradation activity is already present.

3.3.6.5 Archaea and *Eubacteria* population profiles

3.3.6.5.1 *Eubacteria* population profiles

The *Eubacteria* population was stable after 14 days of operation in both the liquid phase and biofilm of all four reactors. This is similar to the results of Tartakovsky *et al.* (1999), who reported stabilization in the *Eubacteria* population after 17 days of operation in a UASB reactor fed with an increasing amount of PCP. These authors also did not notice any modification in the *Eubacteria* population after 17 days of operation. Stabilization of the *Eubacteria* population was also observed by DGGE in two anaerobic acidogenic bioreactors after 13 days of operation (Liu *et al.*, 2002).

Important modifications between the *Eubacteria* population profiles of all reactors compared to the original Rougemont sludge used as inoculum were observed after 56 days of operation. The total number of DGGE bands was higher in the biofilm and liquid phase than in the granular sludge in three out of four FF reactors (the exception was the Of reactor) and by the number of bands remaining from the Rougemont sludge that was low for all FF reactors. These differences can be attributed to the reactor type and to the media. First, the reactor from which the Rougemont sludge was collected was a UASB reactor. Second, the medium that was used to run the FF bioreactors was quite different from the wastewater from an apple industry that was originally fed to the Rougemont sludge. The growth conditions in the FF bioreactors were probably favourable to more *Eubacteria* than in the Rougemont reactor. The smaller number of bands from samples taken from the liquid phase and biofilm of the Of reactor compared to the Rougemont sludge can be explained by the age of the inoculum. The lower diversity present in the Nf reactor compared to the PCP-fed reactors can possibly be attributed to the nitrate and its toxic intermediates (Stams *et al.*, 2003).

The *Eubacteria* populations present in the biofilm and the liquid phase of the same reactor are slightly different. There are two explanations for these results: to be detected in the liquid phase, microorganisms need to have a growth rate faster than HRT (Ahring *et al.*, 1992) and the differences in the DGGE profiles of biofilm and liquid phase in the same reactor could also reside in the detection limit of the DGGE technique. As determined by Muyzer *et al.* (1993), the DGGE technique can detect populations as low as 1 % of the total microorganisms.

Results obtained following comparison of *Eubacteria* populations present in the bioreactors confirmed that the DGGE technique is adequate for this purpose. The results showed that the highest similarity was found between the populations present in the two PCP-fed reactors in both the biofilm and liquid phase. This is not surprising, since both reactors were operated under the same conditions and the PCP-1 strain was detected in both reactors. The population profile for *Eubacteria* found in both PCP-fed reactors was different than the population found in the Of reactor. Since PCP is a very toxic compound and was added in increasing load in the reactors, it selected different populations than in the Of reactor. The Nf reactor had the most different *Eubacteria* population pattern when compared to the Of reactor. The presence of nitrate may have caused more differences in the *Eubacteria* population than the addition of PCP. This is not surprising, since adding nitrate to a methanogenic consortium should select for denitrifying bacteria. When compared to the Pf and P0 reactors, the population profile of the Nf reactor was more similar to the PCP-fed reactor than to the Of reactor. Thus, these results suggest that some *Eubacteria* that tolerate PCP also tolerate the presence of nitrate.

To obtain more information about the different populations present in the liquid phase and biofilm of the four FF bioreactor, DNA from the different bands present on the DGGE gels should be extracted and sequenced. However, since the length of the amplicon is about 190-193 bp, only partial characterization of the different microorganisms is possible. For the PCP-fed reactors (and probably for the Of reactor), we hypothesize that the *Eubacteria* population will be similar to what has been found by the partial characterization of a PCP-fed UASB reactor done by Tartakovsky *et al.* (2001). These researchers found that the population profile for *Eubacteria* was similar to a control reactor not fed with PCP, with the exception of a few minor bands. The sequencing of some bands allowed the identification of bacterial genera, including *Clostridium*, *Synthrophomonas*, *Synthrophobacter*, *Synthrophus*, *Bacteroides*, *Geobacter*, *Planococcus* and *Bacillus*. Other non-dehalogenating microorganisms have been identified by different molecular techniques in anaerobic enrichment degrading different compounds. Richardson *et al.* (2002) found that their TCE-degrading consortium contained some *Desulfovibrio* species and members of the Clostridiaceae. Von Wintzingerode *et al.* (1999) found that the sequences retrieved from a clone *Eubacteria*

clone library created to evaluate the diversity of a trichlorobenzene-degrading consortium from a fluidized-bed reactor were diverse. Members of the green non-sulfur phylum, *Proteobacteria*, candidate phylum OP10, spirochetes, *Holophaga/Acidobacterium* phylum and the low G+C Gram positive phylum were detected. For their part, Lecouturier *et al.* (2003) found only one type of clone not related to *Desulfitobacterium* in their ATIA-degrading consortium. This clone was affiliated to the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group. Finally, Breitenstein *et al.* (2001) identified sequences similar to four *Clostridium* species from 16S rRNA clones isolated from an anaerobic consortium degradation of 2,4,6-TCP.

Three major bands were detected for the PCP-1 strain in pure culture on DGGE analysis. Theoretically, a pure culture should generate only one band. However, the PCP-1 strain has three copies of the 16S rRNA gene (Lévesque *et al.*, 1997), but only one of these copies has been sequenced. Microheterogeneity between the three sequences of the 16S rRNA gene of the PCP-1 strain could explain the presence of three bands on the gel for this strain in pure culture (Kisand, 2003). Also, the presence of multiple melting domains on the 16S rRNA gene would result in the presence of fuzzy bands and not multiple crisp bands as observed for the PCP-1 strain, thus this phenomenon is probably not responsible for these multiple bands (Kisand, 2003). The number of ribosomal operons is widely believed to be associated with the growth rate of microorganisms, but is not limited to that role, and is also tough to be an adaptative mechanism. In fact, it has been observed that species living in a stable environment (like *Archaea* and symbiotic or parasitic species) always have a low number of ribosomal operons (Tourova, 2003).

However, the PCP-1 strain was not detected very efficiently in the bioreactor by the DGGE technique: only the band present in the biofilm from the Of reactor (Figure 3.6A, lane 3B, band 16) was confirmed to be from the PCP-1 strain. In this case, this band did not correspond to one of the three major bands detected in the profile of the pure culture of the PCP-1 strain. These results suggest that DGGE is not an adequate method to detect a specific strain in a mixed culture. Bias can occur at the extraction step, but our DNA extraction technique is adequate for the extraction of DNA from pure cultures of the PCP-1 strain. However, the PCR is an important source of errors, with possible problems like preferential amplification, copy number, formation of chimeric molecules and

heteroduplexes affecting the final band pattern on DGGE (Muyzer et Smalla, 1998). Single bands can also be composed of DNA amplified from different species (Sekiguchi *et al.*, 2001). The DGGE technique is also prone to variation in band patterns between gels, even with the same sample (Muyzer et Smalla, 1998). Also, the detection of the PCP-1 strain by PCR with specific primers (not Eubacterial primers as used with DGGE) occurred regularly, thus demonstrating the presence of this strain in these reactors. This difference can be attributed to the detection limit of both techniques. Specific primers directly target the PCP-1 strain specific 16S sequences, whereas the Eubacterial primers target all the 16S sequences present in the DNA mixture, which leads to the detection of only dominant populations of microorganisms (Muyzer *et al.*, 1993). Finally, sequencing of the cut and extracted bands in the gel is the best way to determine the nature of the microorganisms present in the community (Muyzer, 1999), rather than enzymatic digestion.

This low frequency of dehalogenating bacteria in anaerobic biodegradation systems is corroborated by many studies. For example, Tartakovsky *et al.* (2001) did not find dehalogenating bacteria in their DGGE profile of *Eubacteria* from a UASB reactor fed with PCP. However, these researchers correlated the presence of sequences belonging to *Clostridium* and *Synthrophomonas*, or *Synthrophobacter* to the presence of TCP dechlorination, and *Synthrophomonas* and *Synthrophus* with the presence of lesser chlorinated CPs. The authors tentatively attributed the dechlorination activity to the *Clostridium* genus, since synthrophic bacteria are not known to possess dehalogenation activity, but are known to be associated with aryl-dehalogenating microorganisms like *Desulfomonile tiedje*.

Nor did any of the clones sequenced after DNA extraction of a 2-bromophenol dehalogenating consortium revealed the presence of members of the *Desulfitobacterium* or *Desulfomonile* (Knight *et al.*, 1999). von Wintzingerode *et al.* (1999) found one clone family out of 51 that were closely related to the genus *Dehalobacter*. These sequences were isolated from a trichlorobenzene degrading consortium. Breitenstein *et al.* (2001) also found by dot blot analysis that the dehalogenating bacterium *Desulfitobacterium frappieri* TCP-A was present at low levels in a TCP-degrading consortium. The only exceptions are the work of Lecouturier *et al.* (2003), which found that 83 % of the 16S

rRNA gene clones isolated from an ATIA-degrading consortium in a FF bioreactor belonged to the genus *Desulfitobacterium* and the work of Richardson *et al.* (2002), which found that an anaerobic microbial consortium degrading TCE was dominated by *Dehalococcoides* species.

3.3.6.5.2 *Archaea* population profile

Contrary to the *Eubacteria* population profiles, low similarity was generally found when the *Archaea* profiles of the biofilm and liquid phase of the same reactor were compared. Low similarity was also found when the liquid phase and biofilm profiles from the different bioreactors were compared. While this suggests that the *Archaea* populations are very different in all reactors, even in the biofilm and liquid phase of the same reactors, other explanations can be put forward. For instance, the DNA from the *Archaea* populations was difficult to amplify by PCR and needed a second PCR to obtain a substantial amount of amplicon. Thus, some preferential amplification can occur and modify the population profiles on a DGGE gel. Also, since the *Archaea* have more diverse sequences in their 16S rRNA gene, no set of PCR primers can amplify all the *Archaea*, thus showing only a portion of the total diversity. The primers used in this study (ARC344 and ARC915) are targeting three groups of *Archaea*: the *Methanobacteriales*, the *Methanococcales* and the *Methanomicrobiales*, but the *Methanosarcinales* and the *Methanopyrales* are left out (Raskin *et al.*, 1994; Lange et Ahring, 2001). Few papers report the population analysis of *Archaea* in anaerobic dehalogenating consortia, mostly because of the presence of only a weak PCR signal when the 16S rRNA gene is amplified or because of a low *Archaea* diversity (von Wintzingerode *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 2002).

The *Archaea* population stabilized after 14 days of operation in both the biofilm and liquid phase of all reactors, except for the Nf reactor. Following *Archaea* population analysis, Liu *et al.* (2002) also observed by DGGE analysis the stabilization of the *Archaea* population in the first 13 days of reactor operation in two anaerobic acidogenic bioreactors. The *Archaea* population profiles of our 4 reactors also showed important modifications compared to the original Rougemont sludge after 56 days of reactor operation. The number of DGGE bands decreased in most of the reactors, and the

number of original bands from the Rougemont sludge was low in all reactors. Multiple hypotheses can explain the modifications between the *Archaea* populations in the biofilm and liquid phase of the reactors and the Rougemont sludge, like selection for growth on a surface instead of a granule, sensibility to the transformation products of nitrate (like nitrite and nitrous oxide) (Quevedo *et al.*, 1996), and technical problems related to the double PCR amplification.

It is difficult to hypothesize about the identity of the different *Archaea* populations present in our FF bioreactors. Few studies have shown the presence of *Archaea* in anaerobic consortia degrading chlorinated compounds. Richardson *et al.* (2002) found only one species of *Archaea* (*Methanobacterium congolense*) in their TCE-degrading consortium. Von Wintzingerode *et al.* (1999) also found a low diversity of *Archaea* in a trichlorobenzene-degrading consortium, with *Methanosaeta concilii* representing to 89 % of all the *Archaea* clones. Only Raskin *et al.* (1995; 1996) intensively studied the presence of methanogenic groups in methanogenic reactors. These researchers studied by slot-blot hybridization the *Archaea* populations. Using molecular probes targeting different methanogen populations, these authors found that 25 % of the total 16S rRNA corresponded to methanogens. *Methanobacteriales* were the most abundant group (12,7 % of the total 16S rRNA), followed by *Methanosarcinales*, *Methanococcales* and *Methanomicrobiales* (4-5 % each).

To our knowledge, no papers have investigated the *Eubacteria* or *Archaea* diversity present in methanogenic reactors degrading nitrate. However, Stams *et al.* (2003) explained that the denitrification and methanogenesis processes are carried out by different microbial populations: the denitrifying bacteria being mostly facultatively anaerobic bacteria while the methanogenic process is done by methanogens. Thus, the denitrifying bacteria should only be present in the reactor if nitrate is present, suggesting that some of the different bands present in the *Eubacteria* diversity profile in this study could belong to these microorganisms. Also, some fermentative bacteria are expected to be present in the *Eubacteria* profile to this reactor, since this group is responsible for the transformation of oxidized nitrogen species into either nitrite or ammonia. Some microorganisms were isolated from an anaerobic continuous flow reactor fed with nitrate by Akunna and Moletta (Akunna et Moletta, 1992). They isolated some true denitrifiers

(*Pseudomonas fluorescens*, *P. medocina*, *Alcaligenes denitrifians*), and some microorganisms with denitrification and ammonification activity (*Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*). It is possible that these types of microorganisms are also present in our Nf reactor. It is difficult to hypothesize about the different *Archaea* species present in this reactor, and sequencing of some of the bands in the DGGE profile of the *Archaea* will answer these questions.

3.3.7 Conclusion

This study showed that our anaerobic FF bioreactors were able to degrade a PCP load much higher than the PCP load degraded by other FF bioreactors reported in the literature. Our results also suggest that denitrification and methanogenesis can occur in the same reactor. We were able to determine the evolution of *Eubacteria* and *Archaea* by DGGE, and found important differences in these populations between the original granular sludge and the established biofilm in the reactors. The next step is to determine how these microorganisms, and particularly the PCP-1, strain are arranged in the biofilm. This will be described in the next paper.

3.3.8 Acknowledgements

The authors of this papers would like to thank the Fonds pour la Formation de Chercheurs et Aide à la Recherche and the Fondation Armand-Frappier for financial support. Also, we would like to thank Dr. Serge Guiot, Dr. Boris Tartakovsky, Jean-Claude Frigon, Marie-Josée Levesque, Alain Corriveau and Stephane Deschamps from the Biotechnology Research Institute of Montreal for their help with the VFA analysis and providing the anaerobic granular sludge. Finally, we would like to thanks Sylvain Milot for his help and assistance for all chemical analyses.

4.1 Mise en contexte de l'article 3

La suite logique des travaux entrepris dans l'article précédent était de visualiser la structure des biofilms présents dans les quatre réacteurs à l'étude. Ces travaux sont très originaux, car la structure des biofilms anaérobies, ainsi que la disposition spatiale de micro-organismes anaérobies dans des biofilms est une facette très peu abordée dans la littérature. Nous avons donc examiné les biofilms provenant des quatre réacteurs anaérobies à l'aide de la technique de FISH couplée à la microscopie confocale à balayage laser. Des sondes spécifiques aux *Eubacteria*, aux *Archaea* et à *D. frappieri* nous ont permis d'évaluer la disposition spatiale de ces micro-organismes directement dans le biofilm.

Également, très peu de travaux portant sur l'étude des biofilms effectuent la quantification des données recueillies par imagerie numérique. Nous avons donc testé la technique de quantification par imagerie numérique proposée par Manz *et al.* (1999) afin de déterminer le ratio des différents micro-organismes ciblés par FISH comparativement au total de micro-organismes présents dans les biofilms.

4.2 Contribution de l'étudiant à l'article 3

Tous les travaux présentés dans cet article ont été effectués par l'étudiant sous la supervision du Dr Villemur. Les autres auteurs ont également contribué à la réalisation de ces travaux par l'entremise de suggestions et de discussions.

4.3 Article 3: Anaerobic fixed-film bioreactors fed with pentachlorophenol or nitrate

II: spatial arrangement of bacterial communities in biofilms

M. Lanthier¹, P. Juteau¹, F. Lépine¹, R. Beaudet¹ and R. Villemur^{1*}

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Ville de Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Short title: Anaerobic FF bioreactors fed with PCP or nitrate

Key words: *Desulfitobacterium frappieri*, pentachlorophenol, FISH, biofilm, anaerobic fixed-film bioreactor

* Corresponding author. Mailing address: INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Ville de Laval, Québec, Canada H7V 1B7. Phone: (450) 687-5010. Fax (450) 686-5501. E-mail: richard.villemur@inrs-iaf.quebec.ca

4.3.1 Résumé

La structure et la composition du biofilm présent dans quatre différents réacteurs anaérobies à film-fixe (FF) ont été investigués. Le réacteur Pf a été supplémenté avec une charge croissante en pentachlorophénol (PCP) et inoculé avec *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, une bactérie anaérobie dégradant le PCP. Le réacteur P0 a été supplémenté avec du PCP mais n'a pas été inoculé avec la souche PCP-1. Le réacteur O_f n'a pas été supplémenté avec du PCP mais a été inoculé avec la souche PCP-1. Le réacteur Nf a été supplémenté avec du nitrate et a été inoculé avec la souche PCP-1. La technique d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) a été utilisée afin de visualiser directement les cellules de *D. frappieri* PCP-1, ainsi que les *Eubacteria* et les *Archaea* dans ces biofilms et l'imagerie numérique a été utilisée afin de quantifier ces populations en relation avec la surface totale du biofilm. L'observation du biofilm avec la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) a révélé que les cellules de *D. frappieri* PCP-1 étaient présentes de manière dispersée dans le biofilm des réacteurs supplémentés avec du PCP et étaient relativement abondantes (17-19 %) après 257 jours d'opération des réacteurs. Lorsque du nitrate était présent dans l'influent ou lorsque le PCP était absent dans l'influent, les cellules de *D. frappieri* PCP-1 étaient présentes en faible quantité (<1 %) dans le biofilm. Ceci suggère que les cellules de *D. frappieri* PCP-1 prolifèrent dans le biofilm seulement si cette association est avantageuse pour la communauté. L'utilisation de la technique de FISH avec des sondes spécifiques aux *Archaea* ou aux *Eubacteria* a révélé qu'en présence de PCP ou de nitrate, le biofilm était composé en majeure partie d'*Eubacteria*. Lorsque le PCP ou le nitrate n'étaient pas présents dans l'influent, ces deux populations comptaient environ la moitié de la surface du biofilm. Ces résultats démontrent que la présence de ces produits dans l'influent a des effets importants sur les proportions relatives de ces deux populations. Les résultats de cette étude pourraient avoir des implications importantes pour la décontamination des environnements pollués par le PCP et pour l'amélioration des systèmes de biodégradation anaérobies.

4.3.2 Abstract

The structure and composition of the biofilm present in four different anaerobic fixed-film (FF) reactors was investigated. The Pf reactor was fed with an increasing pentachlorophenol (PCP) load and inoculated with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, a PCP-degrading anaerobic bacterium. The P0 reactor was fed with PCP but not inoculated with the PCP-1 strain. The Of reactor was not fed with PCP but was inoculated with the PCP-1 strain. The Nf reactor was fed with nitrate and inoculated with the PCP-1 strain. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was used to visualise *D. frappieri* PCP-1, *Eubacteria* and *Archaea* cells directly in these biofilms and image analysis was used to quantify these populations in relation to the total surface of the biofilm. Observation of biofilms with confocal scanning laser microscopy (CLSM) revealed that the PCP-1 strain cells appeared as scattered cells in the biofilms from the PCP-fed reactors and were relatively abundant (17-19 %) in these biofilms after 257 days of reactor operation. When nitrate was added or when PCP was not present in the influent, the PCP-1 strain cells were present in low numbers (<1 %) in the biofilm. This suggests that the PCP-1 strain cells proliferate in the biofilm only if they bring an advantage to the community. FISH with probes specific to the *Archaea* or *Eubacteria* revealed that in the presence of PCP or nitrate, the biofilm is mostly composed of *Eubacteria*. When no PCP or nitrate was added to the influent, these two populations composed about half of the total surface in the biofilm, thus showing that the presence of these compounds in the influent had significant effects on the relative proportion of these populations. Results from this study might have implications for the decontamination of PCP-contaminated environments and enhancement of anaerobic biodegradation processes.

4.3.3 Introduction

Wide usage of pentachlorophenol (PCP), mostly as a wood-preserving agent, has led to the contamination of the environment. PCP and other chlorophenols (CPs) are very toxic molecules and are common environmental pollutants. Anaerobic bioreactors can be used to decontaminate PCP-contaminated waste or underground waters. Coupling of anaerobic bioreactors with the previous chemical extraction of PCP can also be used to decontaminate soils or sediments (Rao, 1978; Jensen, 1996; Khodadoust *et al.*, 1999). Anaerobic bioreactors are well suited for the degradation of PCP because anaerobic microflora degrade highly halogenated compounds easier than aerobic bacteria (Wang *et al.*, 1995). The mechanism by which this degradation occurs under anaerobic conditions is termed “reductive dehalogenation”. In this process, a halogen atom is replaced by a hydrogen atom (Mohn et Tiedje, 1992; Hagglom *et al.*, 2000). Elimination of chlorine atoms from halogenated molecules reduces their toxicity.

One major advantage of anaerobic biofilm systems is their ability to resist higher concentrations of toxic compounds compared to suspended growth systems. This ability could be due to the protective effect of biofilms. The gradient of toxic compounds in the biofilm creates some niches where microorganisms are exposed to lower concentrations of toxic compounds (Ahring, 2003). Two major types of strictly anaerobic biofilm-based bioreactors have been tested for the degradation of PCP and other CPs: upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactors (Woods *et al.*, 1989; Hendriksen *et al.*, 1992; Hendriksen et Ahring, 1993; Christiansen et Ahring, 1996b; Tartakovsky *et al.*, 1999; Tartakovsky *et al.*, 2001), and fixed-film (FF) bioreactors (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1983; Krumme et Boyd, 1988; Hendriksen *et al.*, 1991; Hendriksen et Ahring, 1993; Juteau *et al.*, 1995a; Juteau *et al.*, 1995b; Beaudet *et al.*, 1997; El Fantroussi *et al.*, 1998). The advantage of FF bioreactors are their shorter start-up period, no need of requirements for bed-expansion or fluidizidation and no risk of accidental wash-out of the biomass (Skidas *et al.*, 2003). Since the biomass present in anaerobic bioreactors can be slow to adapt to new compounds, bioaugmentation of these bioreactors with pure bacterial strains possessing specific degradation capacities could improve their degradation efficiency and accelerate the adaptation time of the consortium for the degradation of the new xenobiotic compounds (Tartakovsky *et al.*, 1999).

Biofilms are matrix-enclosed bacterial populations adherent to each other and/or to surfaces or interfaces (Costerton *et al.*, 1995). These bacterial populations are organized in a structured manner. On surfaces, biofilms typically form three-dimensional mushroom-like structures separated by channels (Costerton *et al.*, 1995; Stoodley *et al.*, 2002). However, compared to their aerobic counterparts, few publications dealing with anaerobic biofilm structure have been published.

Juteau *et al.* (1995b) examined by scanning electron microscopy (SEM) the biofilm present in anaerobic PCP-degrading bioreactors. They showed that the biofilm was composed of a great morphological diversity. Coccii or small rods, rods, filamentous microorganisms and large rods similar to *Methanosaeta* were observed at the surface of the biofilm, while different types of rods and microorganisms similar to *Methanosaeta* were observed at the base of the biofilm. However, one major drawback of SEM is that the examination of the sample is limited by the morphology of the microorganisms. This can be overcome by the use of fluorescent *in situ* hybridization (FISH). FISH allows the detection of specific microorganisms or populations in a biofilm by the hybridization of specific fluorescent oligonucleotide probes targeting the 16S rRNA sequences (Amann *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1998). FISH can be combined with confocal scanning laser microscopy (CLSM), allowing acquisition of clear images by removing out-of-focus information. These images can be combined to create a three-dimensional reconstruction of the observed biofilm and can also be quantified with image analysis software (Lawrence *et al.*, 1991; Lawrence *et al.*, 1998b; Wagner *et al.*, 1998; Lawrence et Neu, 1999).

FISH on biofilms sampled from anaerobic FF bioreactors has been performed mostly for the detection of sulfate-reducing bacteria (SRB) (Amann *et al.*, 1992a; Poulsen *et al.*, 1993; Raskin *et al.*, 1995) and methanogens (Raskin *et al.*, 1994). Amann *et al.* (1992a) showed that the *Desulfovibrio vulgaris*-like population observed in a biofilm had a patchy distribution, while the *Desulfuromonas*-like population was more uniformly distributed. Raskin *et al.* (1995) visualized strain PT2 (a relative of *Desulfovibrio vulgaris*) in a biofilm while Poulsen *et al.* (1993) estimated the growth rate of strain PT2 directly in the biofilm. Also, Raskin *et al.* (1995) visualized an increase of SRB in a biofilm following addition of sulfate to a methanogenic FF bioreactor, and a decrease of

SRB following cessation of addition of sulfate in a sulfate-fed bioreactor. However, all of these studies examined biofilms with epifluorescence microscopy, which misses the three-dimensional aspect of biofilms which can be observed with CLSM.

Localisation of degradative strains in anaerobic biofilms has already been performed with success for UASB bioreactors. For example, *Desulfomonile tiedje* cells inoculated in a reactor fed with 3-chlorobenzoate (3-CB) colonized the granules as inner and surface microcolonies (Ahring *et al.*, 1992). Also, *Dehalospirillum multivorans* (now *Sulfurospirillum* (Luitjen *et al.*, 2003)) cells inoculated in a reactor fed with tetrachloroethylene (PCE) colonized granules as surface microcolonies (Horber *et al.*, 1998). In the case of *D. hafniense*, this bacterium showed a uniform distribution in autoclaved granules contained in a bioreactor fed with PCP (Christiansen et Ahring, 1996b). Bauer-Kreisel *et al.* (1996) detected cells of *Dehalospirillum multivorans* by enzyme-linked immunosorbent assay in detached biofilms from an anaerobic fluidized bed reactor, and no follow-up of the degradation in the bioreactor was done (the bioreactor ran for only 12 hours). To our knowledge, no study has been published thus far on the distribution of anaerobic bacterial species with degradation abilities in anaerobic FF bioreactors and few studies have been published on the distribution of *Eubacteria* and *Archaea* in anaerobic FF bioreactors.

In this study, we examined the spatial arrangement of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 in methanogenic biofilms of anaerobic FF bioreactors in the presence or absence of PCP. We also studied this biofilm when the reactor was fed with nitrate. *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 was isolated from a methanogenic bioreactor and is the only isolated anaerobic microorganism able to dehalogenate PCP to 3-chlorophenol (3-CP) (Bouchard *et al.*, 1996). With a wide dehalogenation range (Dennie *et al.*, 1998) and the ability to use different electron acceptors, including nitrate (Bouchard *et al.*, 1996), this strain is an ideal candidate for bioaugmentation in anaerobic bioreactors. Tartakovsky *et al.* (1999) inoculated *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 in a UASB bioreactor, which resulted in a successful increase in the PCP load from 5 to 80 mg l_R⁻¹ d⁻¹ with 99 % PCP degradation by the system. Lanthier *et al.* (2002) showed that *D. frappieri* PCP-1 cells inoculated in this UASB bioreactor were colonizing the outer section of granular sludge, forming a dense outer layer after 9 weeks of reactor operation.

In this study, the spatial arrangement of *Eubacteria*, *Archaea* and *D. frappieri* PCP-1 in different anaerobic biofilms was examined with the combination of FISH and confocal scanning laser microscopy. These microbial populations were also quantified with image analysis software.

4.3.4 Materials and methods

4.3.4.1 Microorganisms, reactor design and monitoring

All details about these features are presented in the first part of this paper (second paper in this thesis, section 3.3).

4.3.4.2 FISH on pure culture samples

Details about fluorescent probe design are described in Lanthier *et al.* (2002) (first paper of the thesis, section 2.3.4.2). The different fluorescent probes and helper probes used in this study are presented in Table 4.1. Fluorescent probe PCP-1-3 and helper probes h1, h2, h5 and h6 were designed identically to the other oligonucleotides as described in Lanthier *et al.* (2002) (section 2.3.4.2).

Pure cultures of *D. frappieri* PCP-1 were grown as described previously (Bouchard *et al.*, 1996). Samples were taken in the log phase and were rinsed two times in the same volume of ice-cold filtered phosphate buffered saline (PBS) (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄·H₂O). The PCP-1 strain was then diluted 1/10 and a volume of 20 µl was heat-fixed on a glass slide. Samples were then fixed for 15 min. in paraformaldehyde 4 % (Fisher Scientific, Hampton, NH)-PBS, pH 7.2, and then rinsed with PBS. Slides were then kept at 4°C until hybridized. Before hybridization, samples were permeabilised in a graded series of ethanol solutions of 50 %, 80 % and 95 % for 5 min. each (Rocheleau *et al.*, 1999). The hybridization conditions for each probe were tested by varying the concentration of deionized formamide in the hybridization buffer. Then, 200 µl of hybridization solution containing 10-60 % deionized formamide (Fisher Scientific), 0.9 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, 0.01 % sodium dodecyl sulfate, 2,5 ng µl⁻¹ of fluorescent probe or helper oligonucleotide (final pH 7.2) was added to the fixed samples. Fluorescent probes were synthesized by Biosource international (Cy3 and Cy5

Table 4.1. Characteristics of the oligonucleotide probes.

Usual name	probe <i>et al.</i> , 2003)	ProbeBase name (Loy molecule	Fluorescent molecule	Target organisms	Sequence (5'-3')	Position	Ref.
ARC915	S-D-Arch-0915-a-A-20	Cy3	Archaea	GTGCTCCCCGCCAATTCCCT	934 - 915	(Stahl <i>et al.</i> , 1988)	
EUB338	S-D-Bact-0338-a-A-18	Cy3 / Cy5	Most <i>Eubacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	355 - 338	(Amann <i>et al.</i> , 1990a)	
EUB338 II	S-*-BactP-0338-a-A-18	Cy5	Planctomycetales	GCAGCCACCCGTAGGTGT	355 - 338	(Daims <i>et al.</i> , 1999)	
EUB338 III	S-*-BactV-0338-a-A-18	Cy5	Verrucomicrobiales	GCTGCCACCCGTAGGTGT	355 - 338	(Daims <i>et al.</i> , 1999)	
NONEUB338	-	Cy3	Negative control	ACTCCTACGGGAGGCAGC	-	(Wallner <i>et al.</i> , 1993)	
PCP-1-3	S-S-D.frapp-0272 (<i>D. Cy3 frappieri</i>)-a-A-18	<i>D. frappieri</i> PCP-1	GATGCCACCGATTAAAGCTC	290 - 272	This study		
PCP-1-4	S-S-D.frapp-0327 (<i>D. Cy3 frappieri</i>)-a-A-19	All strains of <i>D. frappieri</i> , <i>D. hafniense</i> , and <i>D. chlorospirans</i>	GCGGATCCATCTACTAACG	345 - 327	(Lanthier <i>et al.</i> , 2002)		
PCP-1-7	S-S-D.frapp-0086 (<i>D. Cy3 frappieri</i>)-a-A-20	All strains of <i>D. frappieri</i> except strain DP7	ATCCACTTATCTGCTCCTTA	105 - 86	(Lanthier <i>et al.</i> , 2002)		
PCP-1-8	S-S-D.frapp-0576 (<i>D. Cy5 frappieri</i>)-a-A-19	All strains of <i>D. frappieri</i> and <i>D. hafniense</i>	CCGTCAATGTAAGTACATTA	594 - 576	(Lanthier <i>et al.</i> , 2002)		
h1	S-S-D.frapp-0068 (<i>D. Cy3 frappieri</i>)-a-A-18	Helper for PCP-1-7	AACACTCGGTGTTAGACA	85 - 68	This study		
h2	S-S-D.frapp-0106 (<i>D. Cy5 frappieri</i>)-a-A-17	Helper for PCP-1-7	TTCGCGCTCTCGCTGTC	122 - 106	This study		

h3	S-S-D.frapp-0555 <i>(D. frappieri)</i> -a-A-21	(D. -	Helper for PCP-1-8	TTTACATACTTACCGTTCGTC	575 - 555	(Lanthier <i>et al.</i> , 2002)
h4	S-S-D.frapp-0595 <i>(D. frappieri)</i> -a-A-18	(D. -	Helper for PCP-1-8	GGGCTTCCTCCTCAGGTA	612 - 595	(Lanthier <i>et al.</i> , 2002)
h5	S-S-D.frapp-0533 <i>(D. frappieri)</i> -a-A-22	(D. -	Helper for PCP-1-8	CCTGAAGACAGTACTTTACAAC	554 - 533	This study
h6	S-S-D.frapp-0611 <i>(D. frappieri)</i> -a-A-22	(D. -	Helper for PCP-1-8	GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCCG	634 - 611	This study

Position is referred as the *E. coli* 16S rDNA sequence for the ARC and EUB oligonucleotides and to the PCP-1 strain 16S rDNA sequence for the other ones.

probes; Camarillo, CA). Autofluorescence controls were performed with hybridization buffer containing no fluorescent probe (Rocheleau *et al.*, 1999). Hybridizations were performed in an Omnislide *In Situ* Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) for 2 hours at 46°C. The humidity chamber was filled with towels soaked with 30 ml of hybridization buffer without fluorescent probe. After this step, slides were washed for 20 min. at 48°C in washing buffer (0.04 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, 0.01 % sodium dodecyl sulfate, 0.005 M EDTA; pH 7.2) (Jansenn, 1996). The slides were then rinsed with deionized water and counterstained in the dark with DAPI (10 µg ml⁻¹; Molecular Probes, Eugene, OR) for 10 min. and rinsed with deionized water. Antifade (ProLong Antifade Kit; Molecular Probes) and a glass coverslip were added to the slides. Slides were then left overnight in the dark at room temperature and then kept at 4°C until microscopic examination.

Slides were mounted and examined on a Nikon Eclipse E-800 epifluorescence microscope (Bio-Rad, Hampstead, UK) equipped with a Nikon 100X oil-immersion objective (numerical aperture (NA) of 1.3) and a Sensys 1401E, (ITO) digital camera from Photometrics (now Roper Scientific, Trenton, NJ). Number of *D. frappieri* PCP-1 hybridized cells and their intensity were quantified using MetaMorph Imaging System (version 4.5r0) (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). The threshold was individually set for each image to allow the quantification of a maximum of individual cells. At least 20 pictures from the same slide were taken and quantified, for total cell number varying generally between 200-2000.

4.3.4.3 FISH on biofilm samples

Biofilm grown on small squares of glass slides were washed for 2 minutes in ice-cold filtered PBS and fixed for 45 min in paraformaldehyde 4 %-PBS (pH 7.2). Biofilm samples were then washed again in PBS for 5 minutes and kept at 4°C until hybridized. For hybridization, biofilm samples were first dehydrated in a graded series of ethanol solutions of 50 %, 80 % and 95 % for 5 min each (Rocheleau *et al.*, 1999). To lower non-specific hybridization of the probes to proteins, biofilm samples were then soaked in 5 ml of acetylation solution containing 100 mM triethanolamine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) and 0.25 % acetic anhydride (Fisher Scientific), 0.09 % NaCl (pH 7.2) (Emson and

Gait, 1992). Then, each biofilm sample was laid on a glass slide and 200-500 μ l of hybridization solution (30 % deionized formamide, 0.9 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, 0.01 % sodium dodecyl sulfate, 2.5 ng μ l⁻¹ of fluorescent probe or helper oligonucleotide; final pH 7.2) was added, depending of the thickness and area of biofilm. Hybridization of biofilm samples with probe S-S-D.frapp-576 (*D. frappieri*)-a-A-19 (PCP-1-8) was done simultaneously with helper probes (Fuchs *et al.*, 2000) S-S-D.frapp-555 (*D. frappieri*)-a-A-21 (h3) and S-S-D.frapp-595 (*D. frappieri*)-a-A-18 (h4) (Lanthier *et al.*, 2002). Autofluorescence controls were performed with hybridization buffer containing no fluorescent probe (Rocheleau *et al.*, 1999). Hybridizations were performed as before (Lanthier *et al.*, 2002). After this step, slides were washed for 20 min. at 48°C in 10 ml of the washing buffer. The slides were then rinsed with deionized water and counterstained in the dark with 200 μ l of 1 μ M YOYO-1 (Molecular Probes) for 15 min. and rinsed with deionized water. Antifade (ProLong Antifade Kit; Molecular Probes) and a glass coverslip were added to the slides. Slides were then left overnight in the dark at room temperature and then kept at 4°C until microscopic examination.

Slides were mounted and examined on a Nikon Eclipse E800 Confocal Microscope (Bio-Rad) equipped with a Nikon 60X Plan Apo oil-immersion objective (numerical aperture (NA) of 1.4 and 2.6X zoom) and a Radiance 2000 digital camera (Bio-Rad). The confocal microscope was equipped with a krypton-argon dual laser (488 and 568 nm) and a diode laser (638 nm). A total of 20 microscope field pictures were taken with the 60 X objectives (1.9X zoom). These images (1280 x 1024 pixels, 12 bits images) corresponded to biofilm sections of 110 μ m x 88 μ m = 9680 μ m² (total area analyzed was equal to 193 600 μ m²) and had a pixel size of 0.39 μ m. Images were averaged using Kalman filtration with 8 running scans per image and were saved as TIFF files for analysis (Manz *et al.*, 1999). The acquisition software used was LaserSharp 2000 (version 4.3).

Cell areas of *Eubacteria*, *Archaea* and *D. frappieri* were quantified using the MetaMorph Imaging System (version 4.5r0) (Universal Imaging Corporation). The boundary of biofilm to be quantified was defined by thresholding the images and transforming them into binary images. Application of a single cycle of two different filters (dilatation and erosion) and followed by another filter to remove single pixels

helped to increase the signal-to-noise ratio. Processed images were then transformed into binary images and the biofilm area was quantified. Biofilm area hybridized with each fluorescent probe was then compared to the total biofilm area stained with YOYO-1 (Lawrence *et al.*, 1997; Lawrence *et al.*, 1998a; Lawrence et Neu, 1999; Manz *et al.*, 1999).

4.3.5 Results

4.3.5.1 Optimization conditions of FISH for *D. frappieri* PCP-1

Following design of the fluorescent probes, different fixation and permeabilisation protocols were tested with pure cultures of *D. frappieri* PCP-1. Concentrations of paraformaldehyde (3 and 4 %) as a fixative agent and different ethanol solutions were tested for permeabilisation. Both paraformaldehyde concentrations tested resulted in adequate fixation, with maintenance of the cell morphology. Permeabilisation of the cells was done successfully with a mixture of ethanol (50 %) and benzalkonium chloride (0.05 %) and also when the cells were exposed to grading concentrations of ethanol (50, 80 and 100 %). No additional enzymatic treatment was necessary to complete permeabilisation.

Hybridization efficiency was tested at 46°C by varying the stringency of the hybridization buffer of Rocheleau *et al.* (1999) with increasing concentrations of formamide (Figure 4.1). As expected, increasing the formamide concentration in the hybridization buffer led to a decreasing fluorescence signal following FISH with probes EUB338, PCP-1-3 and PCP-1-4. No fluorescence signal was detected with probes PCP-1-7 and PCP-1-8, independent of the formamide concentration used. Addition of helper oligonucleotides (Fuchs *et al.*, 2000) was necessary to obtain a stronger fluorescence signal with probes PCP-1-7 and PCP-1-8. Probe PCP-1-7 required the presence of the h2 helper oligonucleotide while a fluorescence signal for PCP-1-8 was obtained with different combinations of helper oligonucleotides. No or very low signal was observed when only helper probe h1 or both h1 and h2 were added in combination to PCP-1-7. A very low background fluorescence signal was observed for autofluorescence and also following hybridization with the negative control probe NON338.

Different washing temperatures (48°C, 52°C and 62°C) were tested with the washing buffer from Rocheleau *et al.* (1999). Only the wash at 48°C successfully

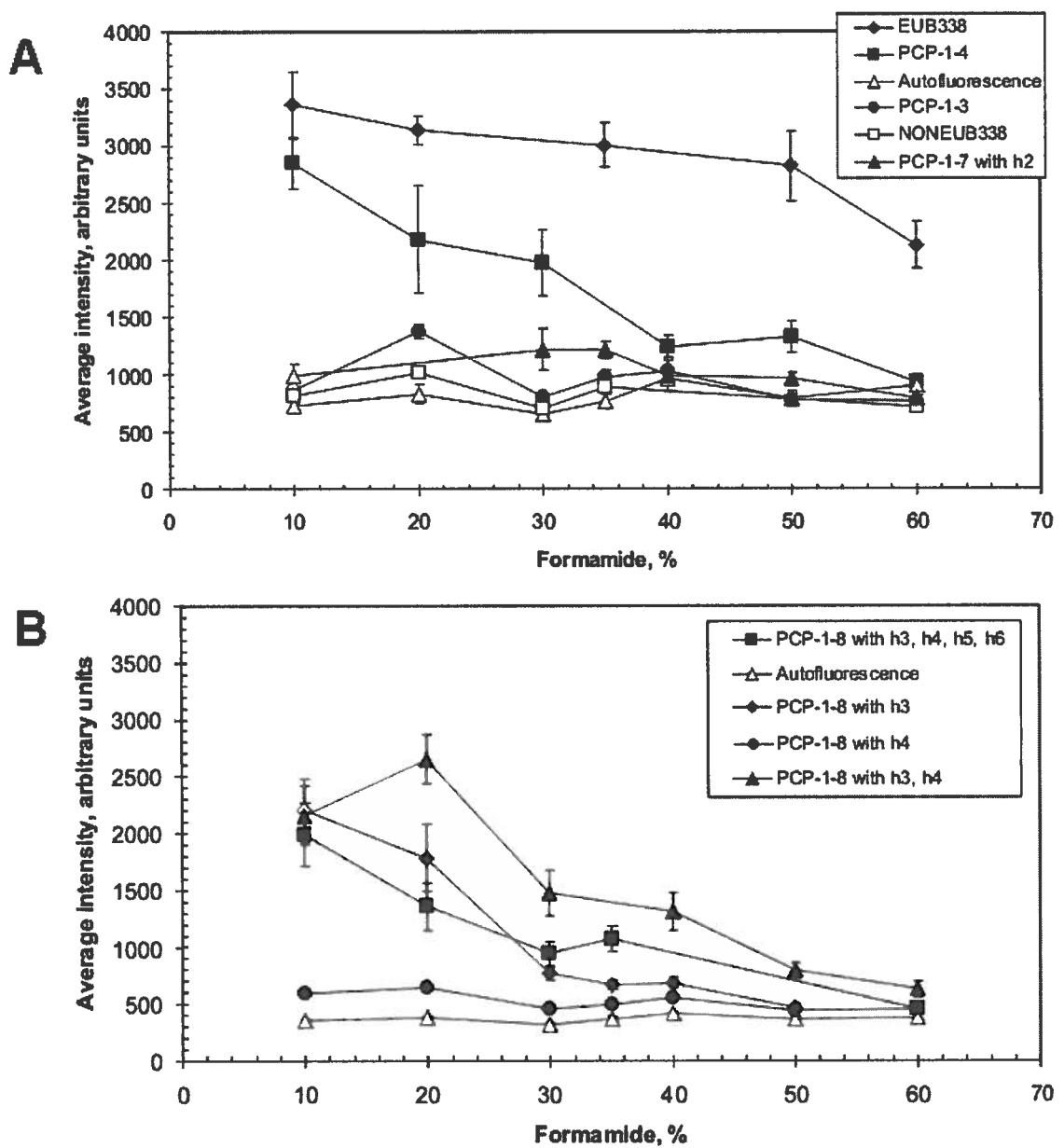


Fig. 4.1. Denaturation curves of fluorescent probes following FISH with pure cultures of *D. frappieri* PCP-1. Probes were coupled to A) CY3 and B) CY5. Fluorescence signal from the PCP-1 strain cells was quantified from at least 20 microscope fields (total number of cells between 200-2000).

eliminated excess probe from the samples while preserving the specific fluorescence signal. Higher washing temperatures significantly decreased or eliminated the fluorescence signal.

The hybridization protocol that gave the best fluorescence signal with pure cultures of the PCP-1 strain was composed of a fixation step in 4 % paraformaldehyde followed by a permeabilisation step with either incubations in 50 %, 80 % and 95 % ethanol or in 50 % ethanol with 0.05 % benzalkonium chloride, a hybridization step of 2 hours at 46°C with 30 % formamide and a washing step of 20 min. in washing buffer at 48°C (Figure 4.2). The specificity of the probes was confirmed with the detection by FISH of *D. frappieri* PCP-1 cells mixed with an undefined consortium taken from a methanogenic bioreactor. In this mixture, only cells morphologically similar to the PCP-1 strain hybridized to the fluorescent probes specific to this species, while a wide variety of morphologically different cells were hybridized with the *Archaea* and *Eubacteria* specific probes.

4.3.5.2 FISH on biofilm samples from the reactors

The protocol used for FISH on biofilm samples taken from the anaerobic FF bioreactors was based on the protocol developed for the anaerobic granular sludge as described in Lanthier *et al.* (2002) (section 2.3.4.3) combined with the optimal conditions determined in the previous section. The fixation step in 4 % paraformaldehyde preserved the complete biofilm very well while the permeabilisation step effectively permeabilised the majority of the cells present in the biofilm (Lanthier *et al.*, 2002). No additional enzymatic treatment was necessary to complete permeabilisation.

The hybridization conditions tested in granular sludge (Lanthier *et al.*, 2002) worked well with biofilm samples. However, the formamide concentration was slightly decreased (from 35 % to 30 %) to increase the fluorescence signal in the biofilm. As observed in granular sludge (Lanthier *et al.*, 2002), some non-specific hybridization of the fluorescent probes occurred in the biofilm samples, thus necessitating an acetylation step to decrease this non-specific signal (Emson and Gait, 1992). Also, as in the granular sludge studies, two washing steps at 48°C were necessary to remove excess probe. Autofluorescence of the different biofilm samples was very weak in the red and far red

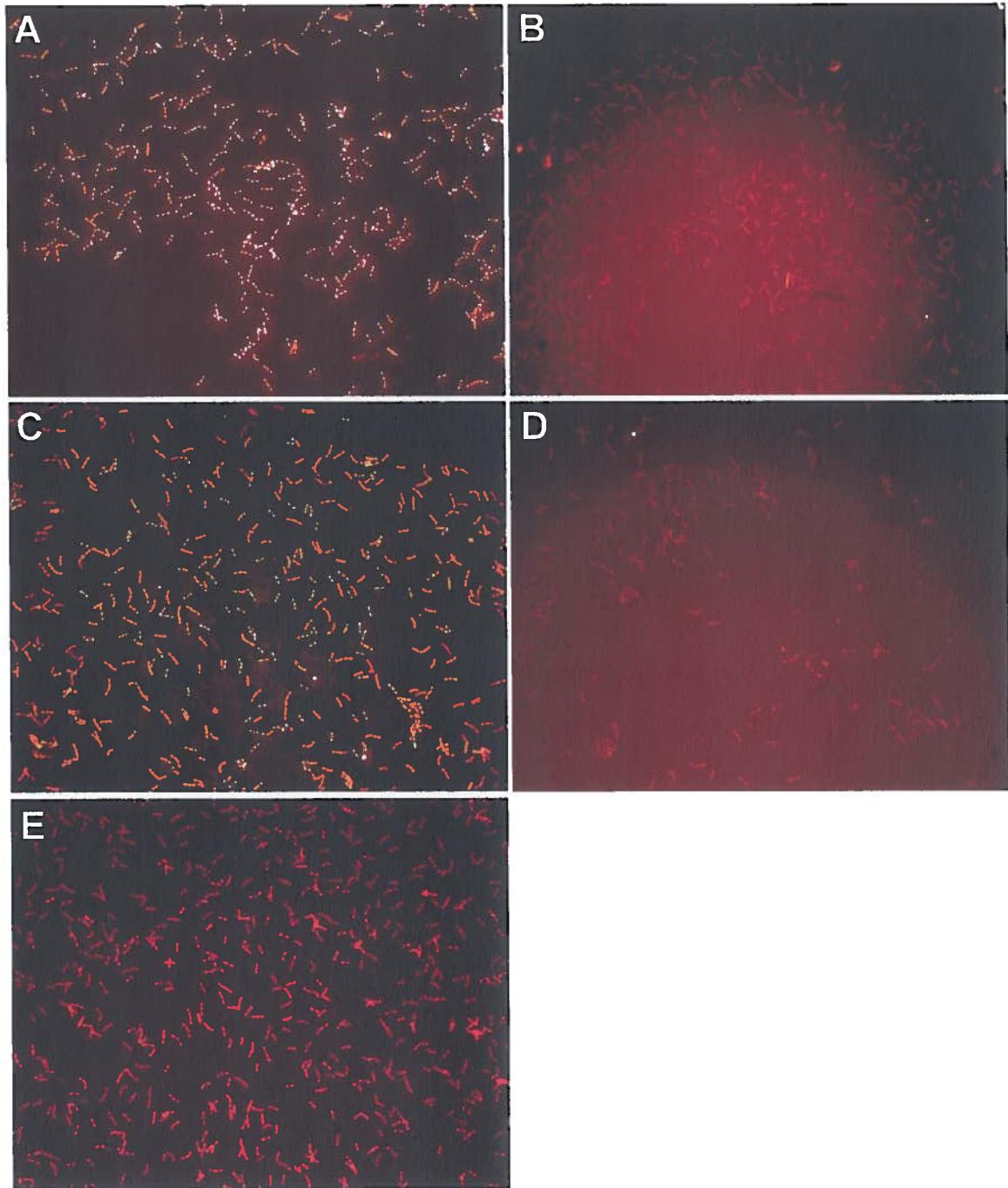


Fig. 4.2. Images of *D. frappieri* PCP-1 cells grown in pure culture. Different probes were used to target *D. frappieri* cells: EUB338 (A), PCP-1-3 (B), PCP-1-4 (C), PCP-1-7 (D) and PCP-1-8 (E). Probe PCP-1-7 was used together with the non-fluorescent helper probe h2, while probe PCP-1-8 was used together with the helper probes h3 and h4.

channels, and did not interfere with the fluorescence signal from the different probes tested.

All biofilm samples were examined by CLSM following hybridization. The biofilms on the glass squares were patchy, with some areas colonized by the biofilm and other areas without biofilm. Generally, the area colonized by the biofilm increased with the number of days present in the bioreactor. The biofilm in each bioreactor was irregular, and varied in thickness between 10 - 30 μm . No clear mushroom-like structures or channels were observed. Preliminary examination of biofilms from the Pf and P0 reactors revealed a similar biofilm structure and thickness, while hybridization with *Eubacteria*, and *Archaea* fluorescent probes revealed a similar population profile (results not shown). As both reactors contained the PCP-1 strain cells, although one was not inoculated with this strain, these reactors were assumed to be identical.

4.3.5.3 FISH of biofilm samples from the P0 reactor

FISH of biofilm samples taken from the P0 reactor were done with probes specific to *Eubacteria* (Figure 4.3A, B), *Archaea* (Figure 4.3C) and the PCP-1 strain (Figure 4.3D). *Eubacteria* were more abundant than the *Archaea* in this biofilm. Eubacterial morphology was diverse, with the presence of different types of cocci, coccobacilli and rods. *Archaea* were less diverse, with mostly *Methanosarcina*-like microorganisms present, but some rods were also observed. The PCP-1 strain cells were detected in high numbers in biofilm samples from this reactor. This bacterium was present as scattered cells in the biofilm. No microcolonies of the PCP-1 strain cells were observed. The hybridization signal of both probes (PCP-1-4 and PCP-1-8) targeting the PCP-1 strain cells in the biofilm but coupled to different fluorochromes gave an almost identical pattern, thus confirming the detection of this population in the biofilm. No hybridization was performed on biofilm samples from the Pf reactor because the number of slides needed to perfect the method was underestimated.

4.3.5.4 FISH of biofilm samples from the Of reactor

Biofilm samples taken from the Of reactor were also observed by CLSM following hybridization with fluorescent probes. Probes specific to *Eubacteria* (Figure 4.4A),

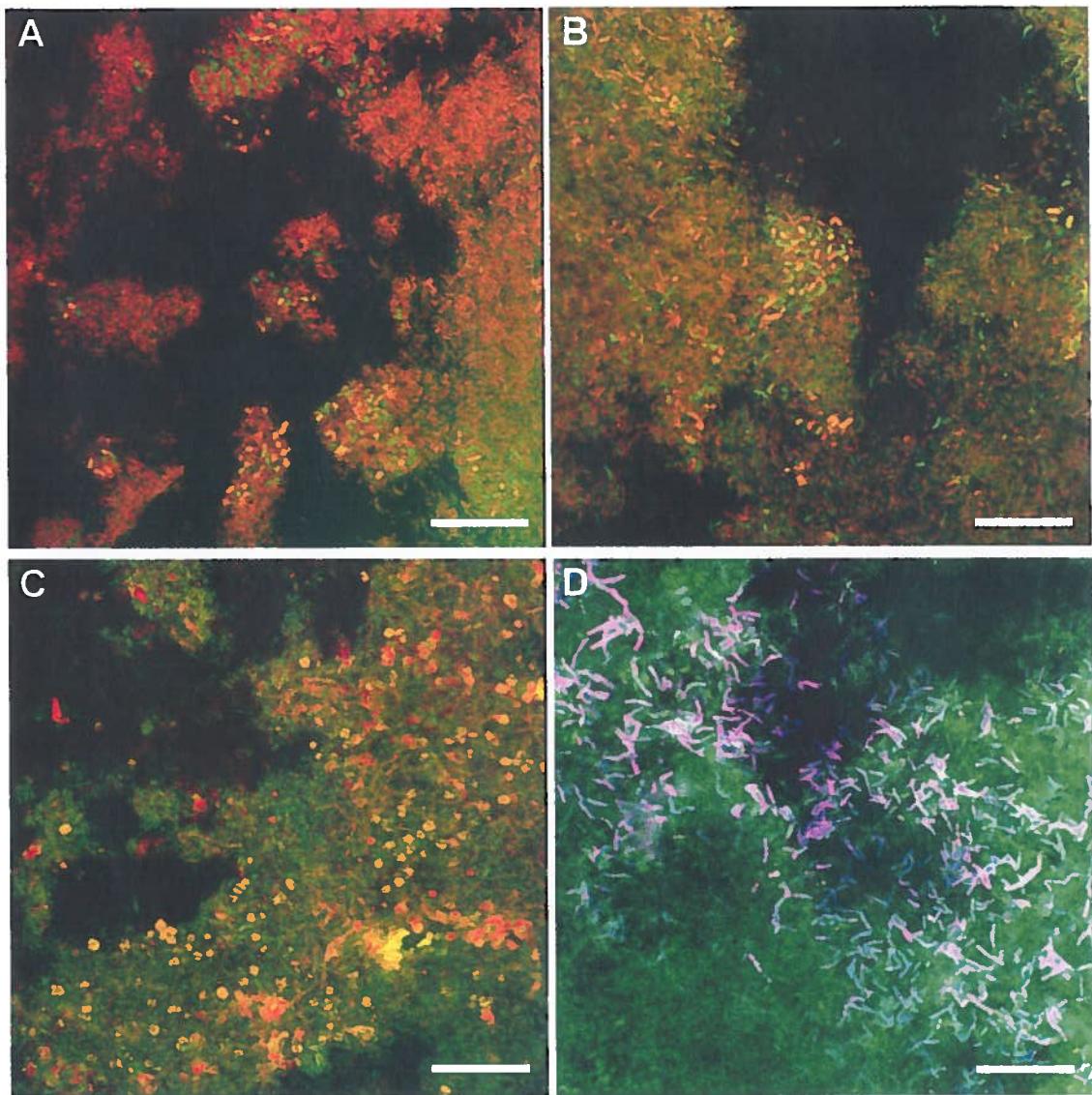


Fig. 4.3. CLSM cross-section images of the anaerobic biofilm present in the P0 reactor. The biofilm samples were hybridized with fluorescent probes coupled to Cy3 (red/yellow) or Cy5 (pink) and counterstained with YOYO-1 (green). A and B: *Eubacteria* (Cy3), after 56 days of operation; C: *Archaea* (Cy3), after 116 days of operation; D: *D. frappieri* (Cy3 and Cy5), after 257 days of operation. Bars correspond to 20 μ m. Pink coloration results from the superimposition of signals from Cy3, Cy5 and YOYO-1, while the yellow coloration results from the superimposition of Cy3 and YOYO-1.

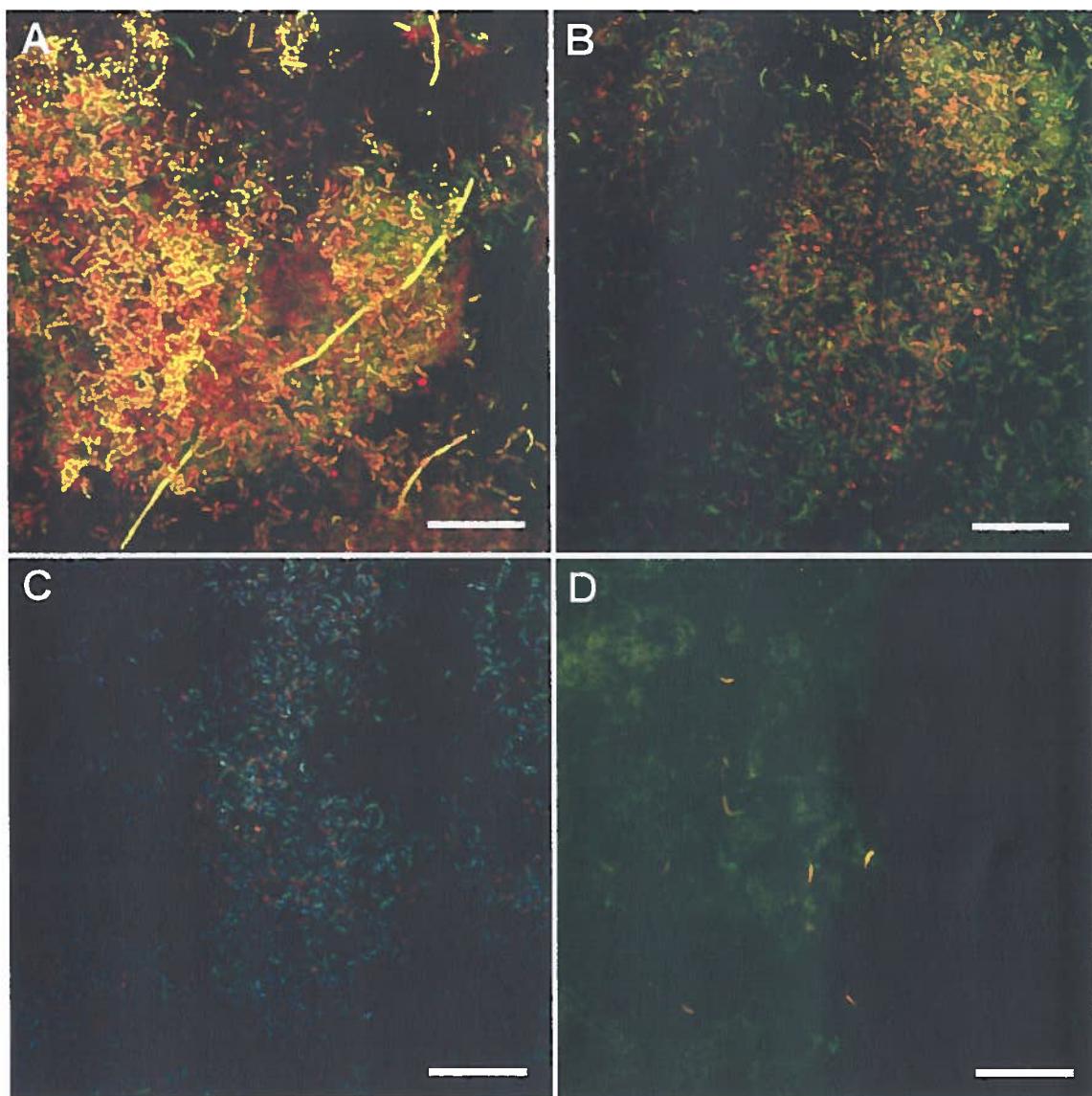


Fig. 4.4. CLSM cross-section images of the anaerobic biofilm present in the Of reactor. The biofilm samples were hybridized with fluorescent probes coupled to Cy3 (red) or Cy5 (blue) and counterstained with YOYO-1 (green). A: *Eubacteria* (Cy3), after 81 days of operation; B: *Archaea* (Cy3), after 81 days of operation; C: *Archaea* (Cy3) and *Eubacteria* (Cy5), after 81 days of operation; D: *D. frappieri* (Cy3), after 105 days of operation. Bars correspond to 20 μm . Blue and yellow colorations result from the superimposition of signals from Cy5 and YOYO-1, and Cy3 and YOYO-1, respectively.

Archaea (Figure 4.4B) and the PCP-1 strain (Figure 4.4D) were used. In contrast to the Pf and P0 reactors, the cell morphologies of *Eubacteria* and *Archaea* were more diverse in the biofilm samples. For *Eubacteria*, some long chains and clusters of cocci were observed, as well as long rod-shaped microorganisms and different types of rods and cocci or coccobacilli. For *Archaea*, *Methanosarcina*-like microorganisms were also present, as well as different types of rods. A double hybridization done with the *Eubacteria*-specific probe combined to Cy5 and the *Archaea*-specific probe combined to Cy3 was also done (Figure 4.4C) and showed that the number of *Eubacteria* and *Archaea* cells are more similar in this biofilm than in the reactors fed with PCP. Some rare and dispersed *D. frappieri* cells were found in the biofilm, as observed with PCP-1-4 and PCP-1-8 probes (Figure 4.4D).

4.3.5.5 FISH of biofilm samples from the Nf reactor

The biofilm sampled from the Nf reactor was also observed following hybridization with fluorescent probes. Long chains and clusters of cocci were also observed following hybridization with the probe specific to *Eubacteria*, as well as different types of rods, some of which were also present as chains. Coccobacilli and curved rods were also present (Figure 4.5A). Few cells hybridized with the *Archaea*-specific probes in these biofilm samples compared to the *Eubacteria*, with the fluorescence signal coming mostly from *Methanosarcina*-like microorganisms and rods (Figure 4.5B). The double hybridization done with probes ARC915 and EUB338 coupled to Cy3 and Cy5, respectively, also showed that this biofilm was dominated by *Eubacteria* (Figure 4.5C). As in the Of reactor, only rare and dispersed *D. frappieri* cells were observed in the biofilm (Figure 4.5D).

4.3.5.6 Quantification of the microbial population in biofilm

Populations of *Archaea*, *Eubacteria* and *D. frappieri* were quantified in the different biofilms. Quantification of biofilm was done only with the *Eubacteria*-specific probes coupled to Cy3, since the fluorescence signal was much more intense than the probes coupled to Cy5. In order to be quantified, at least 20 CLSM cross section images of the biofilm were taken. The quantification was done by computerized image analysis

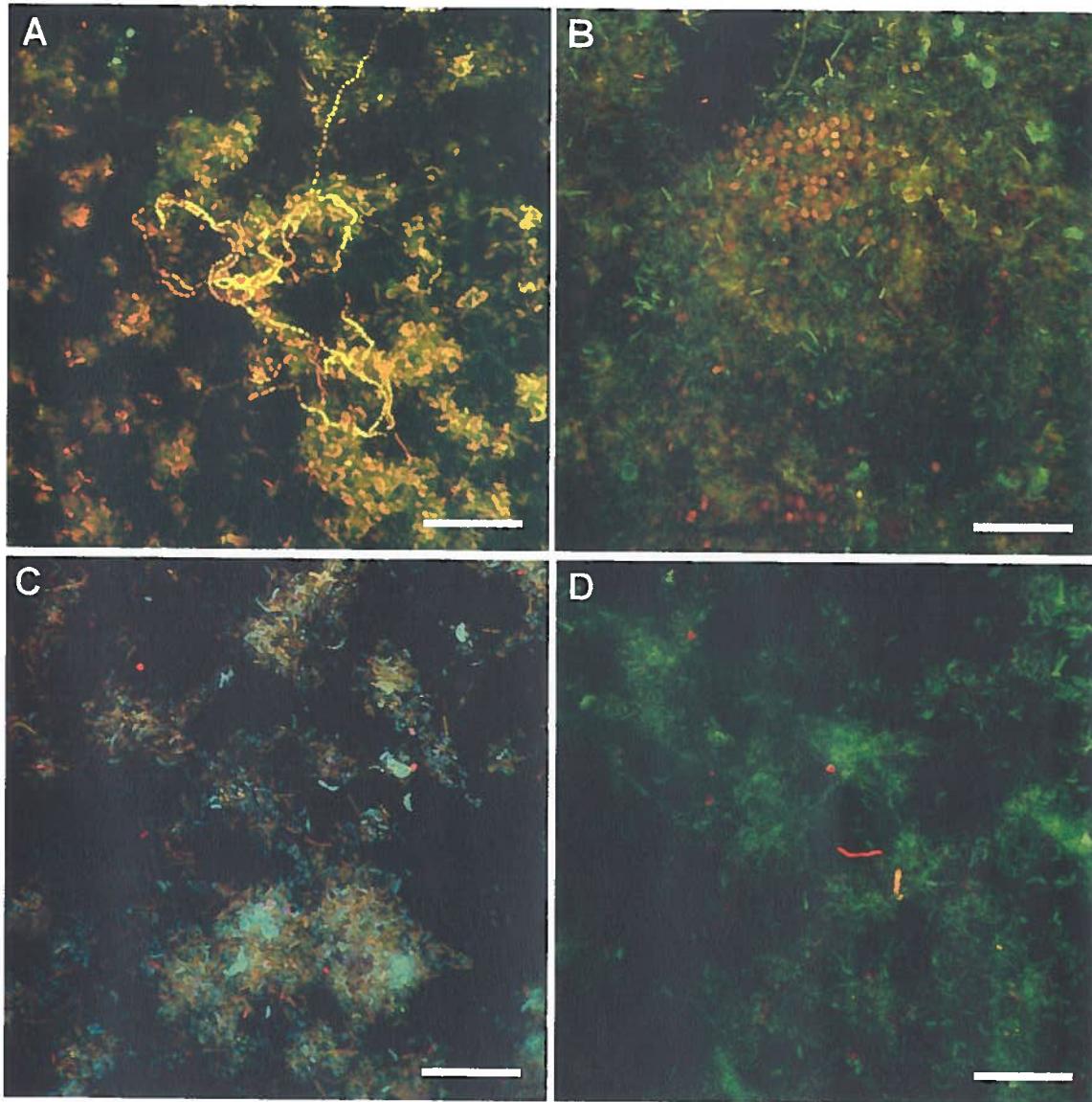


Fig. 4.5. CLSM cross-section images of the anaerobic biofilm present in the Nf reactor fed with nitrate and inoculated with *D. frappieri* PCP-1. The biofilm samples have been hybridized with fluorescent probes coupled to Cy3 (red) or Cy5 (blue) and counterstained with YOYO-1 (green). A: *Eubacteria* (Cy3), after 177 days of operation; B: *Archaea* (Cy3), after 177 days of operation; C: *Archaea* (Cy3) and *Eubacteria* (Cy5), after 213 days of operation; D: *D. frappieri* (Cy3), after 257 days of operation. Bars correspond to 20 μm . Blue and yellow coloration result from the superimposition of signals from Cy5 and YOYO-1, and Cy3 and YOYO-1, respectively.

comparison of the biofilm area hybridized with the specific probe compared to the total biofilm area dyed with the non-specific fluorescent dye YOYO-1. The results of these quantifications are presented in Table 4.2. This quantitative analysis allowed the confirmation of the predominance of *Eubacteria* in the biofilm from the P0 reactor and in the Nf reactor (70 % and 45 %, respectively) compared to the *Archaea* population (10 % and 11 %, respectively). This analysis also showed that the populations of *Archaea* and *Eubacteria* were present in a similar amount (44 % and 54 %, respectively) in the biofilm from the Of reactor. Total cell areas hybridized with the *Archaea* and *Eubacteria*-specific probes coupled to Cy3 totaled 80 %, 98 % and 56 % of the total biofilm area in the P0, Of, and Nf reactors, respectively.

Quantitative analysis also showed that the PCP-1 strain cells covered 17 – 19 % of the total surface of the biofilm in the P0 reactor. However, less than 1 % of the total biofilm area was colonized with the PCP-1 strain in the Of and Nf reactors.

4.3.6 Discussion

4.3.6.1 FISH of pure cultures of *D. frappieri* PCP-1

In this study, we first developed a FISH protocol for the detection of *D. frappieri* PCP-1 cells in pure culture. This protocol is similar to other protocols found in the literature (Amann *et al.*, 1990a; Amann *et al.*, 1990b; Manz *et al.*, 1992; Amann, 1995b; Stahl *et al.*, 1995). The first step was the paraformaldehyde fixation of the PCP-1 strain cells. The paraformaldehyde fixation step is generally used for fixation of Gram-negative bacteria, because in Gram-positive bacteria, paraformaldehyde can cross-link the cell wall and prevent or lower penetration of the fluorescent probes (Lipski *et al.*, 2001; Hofman-Bang *et al.*, 2003). However, many authors (Amann *et al.*, 1990b; Zarda *et al.*, 1991; Amann *et al.*, 1992b; Manz *et al.*, 1994) reported that a paraformaldehyde fixation step could also be used for Gram-positive bacteria. Reduction of the fixation time also lowered the cross-linking effect of this fixative agent (de los Reyes *et al.*, 1997), thus facilitating its use for fixation of Gram-positive bacteria. The second step in the FISH protocol was the permeabilisation of the cells by ethanol. This step is consistent with protocols used in the literature (Amann, 1995a).

Table 4.2. Proportion of *Eubacteria*, *Archaea* and *D. frappieri* in the bioreactor biofilm.

Reactor	Probe	Fluorochrome	Area (%) *	Standard deviation	n	Day sampled
P0	EUB338	Cy3	70	12	25	56
	ARC915	Cy3	10	8	20	116
	ARC915 +	Cy3	80	14		
	EUB338					
	PCP-1-4	Cy3	19	6	20	257
	PCP-1-8	Cy5	17	6	20	257
Of	EUB338	Cy3	54	17	21	81
	ARC915	Cy3	44	19	20	81
	ARC915 +	Cy3	98	25		81
	EUB338					
	PCP-1-4	Cy3	1	2	22	105
	PCP-1-8	Cy5	Weak signal			
Nf	EUB338	Cy3	45	21	20	177
	ARC915	Cy3	11	10	20	177
	ARC915 +	Cy3	56	23		
	EUB338					
	PCP-1-4	Cy3	1	1	20	213
	PCP-1-8	Cy5	Weak signal			

*Areas are defined as surface by specific signal compared to the total surface of biomass.

Total cell area was determined after staining with YOYO-1.

The third step of the FISH protocol was the hybridization of fluorescent probes. The 46°C hybridization temperature, the 2 h incubation time and the 30 % formamide concentration in the hybridization buffer chosen for our experiments were also similar to other protocols found in the literature. Moter and Gobel (2000) reported that the usual hybridization temperature varies between 37°C and 50°C and the hybridization time varies between 30 min and several hours, while Amann (1995b) suggested using a formamide concentration below 50 % in the hybridization buffer. The number of cells quantified to obtain the denaturation curves was between 200 and 2000 cells. This number is highly significant, since Hofman-Bang *et al.* (2003) suggested using the average hybridization intensity of 100 to 200 cells. High fluorescence signal obtained following hybridization with probes PCP-1-3, PCP-1-4 and EU338 shows that the hybridization protocol is working well and that cells are metabolically active. This signal is specific, since no autofluorescence was detected in non-hybridized cells and no signal was detected following hybridization with the non-specific probe NON338.

Absence of fluorescence signal with probes PCP-1-7 and PCP-1-8 independent of the formamide concentration used was noted following FISH with pure cultures of the PCP-1 strain. Since intense fluorescence signals were obtained with the other probes tested (PCP-1-3, PCP-1-4 and EU338), problems with the FISH protocol were not causing this absence of signal, nor was the low abundance of ribosomes in the cells, and no mismatches were found in the probe sequences (Amann, 1995a; Lipski *et al.*, 2001). Inaccessibility of probes to target rRNA has already been observed (Brosius *et al.*, 1981; Brimacombe *et al.*, 1988; Lipski *et al.*, 2001; Behrens *et al.*, 2003a; Hofman-Bang *et al.*, 2003). Even if some mathematical equations are accessible to calculate hybridization conditions, these parameters still need to be determined empirically because cross-linking following fixation of the ribosomal proteins with the target site and/or the three-dimensional conformation of the 16S rRNA can hinder hybridization of the probes (Moter *et al.*, 2000; Behrens *et al.*, 2003a; Hofman-Bang *et al.*, 2003). Behrens *et al.* (2003b) compared the accessibility of 176 fluorescent probes with the position of these probes on a three-dimensional model of the 30S ribosomal subunit of the ribosome of *E. coli*. They found little correlation between the accessibility of the probes and the proximity of the surface of the subunit. These authors attributed this result to the difference between the

native conformation of the ribosomal subunit studied in the model and the denaturation occurring in the fixation step or in presence of sodium dodecyl sulfate.

Fuchs *et al.* (1998) studied in a systematical manner the accessibility of 200 fluorescent probes on the 16S rRNA of *E. coli* cells and attributed the signal intensity to a brightness class between I (intense fluorescent signal) and VI (no signal). The authors found that the signal intensity can vary greatly with the position of the target and suspected that the three-dimensional structure of 16S rRNA was hindering the hybridization of some probes. The authors also suggested that this map can be used to choose regions for fluorescent probes targeting other eubacterial species, since the 16S rRNA is generally conserved through evolution. We thus compared the target regions of our probes for *D. frappieri* PCP-1 with this map. In our study, the brightest fluorescent probe was EUB338, and this probe was classified in class III by Fuchs *et al.* (1998). Comparison with probes PCP-1-3 and PCP-1-4 was difficult, since these probes were in regions covered by two probes from different brightness classes in the map: probe PCP-1-3 was in a region corresponding to classes IV and II, while probe PCP-1-4 was in a region corresponding to classes VI and IV. This comparison suggests that probe PCP-1-3 should be brighter than probe PCP-1-4, but the opposite was observed in our study. However, the absence of signal with probe PCP-1-8 was consistent with the accessibility map, since this probe corresponded to a class VI probe. The accessibility of probe PCP-1-7 could not be compared with the *E. coli* 16S rRNA map since this probe was targeting the insert region at the beginning of the 16S rRNA gene characteristic of genus *Desulfitobacterium*. Thus, while the 16S rRNA accessibility map of *E. coli* can give some hints about the accessibility of the fluorescent probe, it does not by any means replace the necessity to test empirically each probe.

Fuchs *et al.* (2000) suggested using helper oligonucleotides to increase the fluorescence signal. These non-fluorescent molecules bind to the rRNA next to the fluorescent probes and open inaccessible regions. The use of some combinations of helper probes effectively raised the fluorescence signal of probes PCP-1-7 and PCP-1-8 following FISH. The differences in the fluorescence signals of probes PCP-1-7 and PCP-1-8 in the presence of different combinations of helper probes can be explained by differences in the accessibility of the helper sites. While Fuchs *et al.* (2000) observed a

general increase of the fluorescence signal with an increase in the number of helper probes used, this was not necessarily the case in our study. For example, only the addition of helper probe h2 increased the fluorescence signal with probe PCP-1-7, while addition of helper probe h1, or both h1 and h2 yielded no or very low signal, respectively. In the case of PCP-1-8, addition of helper probes h3, h4, h5 and h6 yielded less fluorescence than both h3 and h4 together. These results suggest that multiple helper probes do not always increase the fluorescence signal as compared to the use of fewer helper probes.

The fourth step of the FISH protocol was the washing of the samples at 48°C. This step successfully eliminated excess probes from the samples while keeping the fluorescence signal of the cells high. As explained in the literature (Hofman-Bang *et al.*, 2003), the optimum washing temperature should be equal to or slightly higher than the hybridization temperature and should correspond to the temperature at which 50 % of the duplexes remain intact during the washing period. However, since the washing step is also dependent on different factors (probe length and content, hybridization and washing conditions, etc.), these authors strongly suggest to use experimental data to determine the washing step conditions.

4.3.6.2 FISH of biofilm samples from the reactors under study

The protocol for the FISH analysis of biofilm was similar to what was found in the literature for anaerobic biofilms (Manz *et al.*, 1993; Manz *et al.*, 1998; Power *et al.*, 1999) and granular sludge (Rocheleau *et al.*, 1999; Sekiguchi *et al.*, 1999; Lanthier *et al.*, 2002). Probes were labelled with Cy3 and Cy5 fluorochromes to minimize interference with autofluorescent hydrogenotrophic methanogens at 420 nm for FISH experiments in biofilms (Hofman-Bang *et al.*, 2003). A fixation step that will be adequate for all the microorganisms present in a mixed culture biofilm is not easy to establish. Paraformaldehyde was chosen as a fixative agent because this chemical can fix both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Amann *et al.*, 1990b; Zarda *et al.*, 1991; Amann *et al.*, 1992b; Manz *et al.*, 1994) and is also adequate for most *Archaea* (Burggraf *et al.*, 1994). However, some authors (Burggraf *et al.*, 1994) reported that a paraformaldehyde fixation step inhibited the permeabilisation of some *Archaea* like

Methanopyrus kandleri, *Methanothermus fervidus*, *Methanobacterium thermoautothrophicum*, and *Halococcus morphae*, and disrupted cells of *Methanosarcina mazeii* (Sorensen *et al.*, 1997). Thus, it is possible that paraformaldehyde was not adequate for the fixation of some microorganisms present in the biofilm, since this step is species dependent (Hofman-Bang *et al.*, 2003). The permeabilisation step was done with ethanol. This type of permeabilisation was already successfully performed with anaerobic biofilms (Manz *et al.*, 1998) and granular sludge (Rocheleau *et al.*, 1999; Sekiguchi *et al.*, 1999; Lanthier *et al.*, 2002), which contains similar populations of microorganisms and thus seems to be adequate for a large variety of microorganisms. Hybridization temperature and incubation time also need to be determined carefully. Amann (1995b) suggested not hybridizing biofilm samples over 55°C, since it can damage the sample and to adjust the stringency by addition of formamide, which we did. Also, even if Stahl *et al.* (1995) suggested that hybridization of biofilms (less than 50µm thin) should be performed for 8 - 16 hours with three washing steps, few papers have reported the use of long incubation times and many washing steps. Most papers report incubation times between 1.5 - 3 hours with 1-2 washing steps (Manz *et al.*, 1993; Manz *et al.*, 1998; Power *et al.*, 1999; Rocheleau *et al.*, 1999; Lanthier *et al.*, 2002).

The biofilm samples present in our bioreactors were generally thin (10 - 30 µm). This result is consistent with the slow growing nature of anaerobic microorganisms (Morris, 1994) and also with the lesser biomass production in anaerobic bioreactors compared to aerobic systems (Skiadas *et al.*, 2003). The general aspect of biofilm samples from the four reactors was similar to what has been observed with other types of anaerobic biofilm. For example, Amann *et al.* (1992a) studied the structure of anaerobic biofilms in anaerobic FF sulfidogenic bioreactors. These authors have observed that the biofilm growing on glass coverslips was 5 - 10 µm thick and irregular after 3 weeks of reactor operation. Araujo *et al.* (2000) studied an anaerobic biofilm growing in a chemostat containing a Robbin's device and inoculated with disaggregated granular sludge. They observed that the biofilm rapidly colonized the polypropylene surface and formed a biofilm of unequal thickness after 11 days of operation, varying between no biofilm and 7 – 9 µm. No clear mushroom-like structures or channels were observed in the biofilm sampled from our four bioreactors, but the biofilm surface was very uneven.

Shear forces occasioned by the flow in the reactors are probably not responsible for this, since the HRT was always between 28-35 h and was considered low. It is difficult to compare these results with the work of Araujo *et al.* (2000) and Amann *et al.* (1992a), since they worked with relatively young biofilms (our samples were taken after 56 – 213 days of reactor operation), but none of these studies observed such structures. However, it is possible that the fixation and permeabilisation step (mostly the ethanol step) did slightly alter the structure of the biofilm (Manz *et al.*, 1999; Palmer and Sternberg, 1999; Lipski *et al.*, 2001). Probably microsensor studies (Costerton *et al.*, 1994), cryosectioning (Huang *et al.*, 1998), or analysis of tri-dimensionnal images with a tri-dimensionnal imaging software like LaserVox from Bio-Rad could allow the detection or visualisation of these channels.

Quantification of the *Archaea* and *Eubacteria* populations in the biofilm of all four reactors was done with the combination of FISH with CLSM and image analysis. A total area of 193 600 μm^2 was analyzed for this quantification and was statistically significant (Manz *et al.*, 1999). As raised by Manz *et al.* (1999), one of the major drawbacks of image quantification is the difficulty of defining the objects to be quantified. Normally, with pure cultures, cells are well dispersed and easily recognized by imaging software. However, in biofilm all of the cells are packed together and the boundaries of each cell are not easily detected. Modification of the images like thresholding, erosion, or dilatation of images needs to be done to eliminate nonspecific staining or noise. Also, since cells hybridized with the same probe does not necessarily emit with the same intensity, a compromise between the threshold and the individual intensity of the cells is needed. Two methods can be used to quantify the microbial populations in a biofilm. The first method is the calculation of cell numbers and comparison with the total number of cells in the biofilm. The second method is the comparison of specific cell surface with the total surface of the biofilm. Manz *et al.* (1999) found that both methods led to an overestimation of specific populations compared to the total microorganisms present in the biofilm, but the ratio of specific populations in the biofilm could be successfully estimated by both techniques. We found it easier to use the comparison of the hybridized surface with the total surface of the biofilm, because it required less image manipulation.

The dominance of the *Eubacteria* in the biofilms of the PCP-fed reactors compared to the more equilibrated *Archaea* and *Eubacteria* populations in the Of reactor can be explained by two factors. First, the methanogenic *Archaea* are known to be more sensitive to the toxicity of compounds like PCP (Angelidaki *et al.*, 2003). Secondly, it is possible that the paraformaldehyde fixation has caused the lysis of some of the *Archaea* (Sorensen *et al.*, 1997). However, the hypothesis of the toxicity of PCP is more plausible, since disaggregation of *Archaea* cells present in the biofilm would have led to major disturbances in the structure of the biofilm, which was not observed microscopically. The toxicity hypothesis is also supported by the low morphological diversity of *Archaea* present in the P0 biofilm, suggesting that some species or cells have been eliminated. Also, the DGGE profile of the *Archaea* and *Eubacteria* populations present in the Pf and P0 reactors is different from the population profile of microorganisms present in the Of reactor, showing that different microorganisms have been selected in these two reactors (see paper 2).

The *Archaea* and *Eubacteria* populations accounted for approximately half of the total microbial population in the biofilm of the Of reactor. These results are comparable to dot-blot studies done with methanogenic granular sludge, which estimated the content of *Archaea* to be around 34.1 % and the content of *Eubacteria* to be around 63.1 % (Liu *et al.*, 2002). The *Eubacteria* population was also dominant in the Nf reactor compared to the Of reactor. Presence of nitrate transformation products in the bioreactor could explain the lower ratio of *Archaea* in the biofilm (Quevedo *et al.*, 1996). Quevedo *et al.* (1996) found that methanogenic sludge contained a relatively high number of denitrifying bacteria. Thus, these microorganisms are favoured when nitrate is present in the medium, and can outgrow *Archaea* and other microorganisms which cannot use nitrate. Also, it is possible that some of the *Archaea* were lysed following the fixation and permeabilisation step (Sorensen *et al.*, 1997). However, as for the PCP-fed reactors, the most probable hypothesis is the toxicity of the nitrate transformation products, because no important modification to the structure was observed. This hypothesis is also supported by the low morphological diversity of *Archaea* present in this biofilm.

Theoretically the sum of the area hybridized with the *Eubacteria* and the *Archaea* probes should equal 100 % (Hofman-Bang *et al.*, 2003). In the Of reactor, the signal of

both *Archaea* and *Eubacteria* populations accounted for more than 98 % of the total cell surface in the biofilm. However, the total was around 56 % for the Nf reactor and 80 % for the P0 reactor. This means that some of the biomass that was dyed with the universal YOYO-1 fluorochrome did not hybridize with any of these probes. Three reasons can explain these results: some of the cells were not permeabilized, the toxicity of PCP or nitrate transformation compounds has lowered the ribosomal content of some of the cells below the detection limit of this technique, or probe EUB338 was not targeting all of the *Eubacteria*. Probe EUB338 is known to target most but not all of the known *Eubacteria* (Daims *et al.*, 1999). In fact, this probe misses *Planctomycetales* and *Verrucomicrobia*, but both of these groups contain aerobic microorganisms which are not likely to be found in anaerobic bioreactors. Thus, the hypothesis of the lower ribosomal content is more plausible, since the toxicity can directly affect the ribosomal content of the cells, which could lower the fluorescence signal below the detection limit.

Results vary in the literature about the percentage of cells detected by the FISH technique. For example, similar fixation and permeabilisation steps in the FISH protocol have resulted in 70 - 90 % of total cells detected in activated sludge (Wagner *et al.*, 1993; Manz *et al.*, 1994), and were able to permeabilise virtually all biofilm populations in an anaerobic biofilm (Amann *et al.*, 1992a). Other biofilm studies report values between 66 % - 79 % of total hybridized cells (Neu and Lawrence, 1997; Manz *et al.*, 1999). The patchy distribution of the biofilm that we obtained is probably responsible for the high standard deviation seen in our quantification data. This high standard deviation was also observed by Manz *et al.* (1999) in their quantification of bacterial biofilms.

For the first time, cells from a pollutant-degrading bacterial strain were observed directly in the biofilm of an anaerobic FF bioreactor. *D. frappieri* PCP-1 appeared as scattered cells in the biofilm of the PCP-fed reactors, which was clearly different from the disposition as a single layer at the surface of anaerobic granular sludge from a UASB bioreactor treating PCP-contaminated influent (Lanthier *et al.*, 2002). While we had hypothesized that this strain would form some microcolonies or be present mostly at the surface of the biofilm, the PCP-1 strain cells appeared to be mostly scattered. The presence of rare and loose microcolonies of *D. frappieri* PCP-1 in the biofilm suggests that this strain moves in the biofilm. Even if *D. frappieri* PCP-1 is classified as a non-

motile microorganism (Bouchard *et al.*, 1996), some flagellated cells have been observed in pure culture. Also, other members of the *Desulfitobacterium* are motile or are flagellated, like *D. chlororespirans* Co23 (Sanford *et al.*, 1996), *D. dehalogenans* (Utkin *et al.*, 1994), *D. frappieri* DP-7 (van de Pas *et al.*, 2001), TCE1 (Gerritse *et al.*, 1999), TCP-A (Breitenstein *et al.*, 2001), G2 (Shelobolina *et al.*, 2003), *D. hafniense* DCB-2 (Christiansen et Ahring, 1996a), GBFH (Niggemyer *et al.*, 2001) and *Desulfitobacterium* sp. PCE1 (Gerritse *et al.*, 1996), PCE-S (Miller *et al.*, 1997) and Y-51 (Suyama *et al.*, 2001).

Chemotaxis could be responsible for this scattered disposition of the PCP-1 strain in the biofilm. Bacterial chemotaxis has already been demonstrated for other pollutants such as toluene, benzene (Parales *et al.*, 2000), naphthalene (Law et Aitken, 2003) and biphenyls (Wu *et al.*, 2003). However, these pollutants can be used as carbon sources by microorganisms, while the PCP-1 strain use PCP as an electron acceptor, but microbial chemotaxis toward electron acceptor has also been demonstrated for *Shewanella putrefaciens* under anaerobic conditions (Nealson *et al.*, 1995). Also, chemotaxis toward chloroaromatic compounds has already been demonstrated for trichlorobenzene (Parales *et al.*, 2000) and for 3-CB and 4-CB by *Pseudomonas putida*. This microorganism doesn't degrade these compounds but could be moving toward these chemicals because they are recognized by the benzoate chemotaxis system (Harwood *et al.*, 1990). Chemotaxis toward 2,4-diclorophenoxyacetate coupled with degradation has also been observed for *Ralstonia eutropha* (Hawkins et Harwood, 2002).

The detection of a high density of *D. frappieri* cells in the biofilm from the PCP-fed reactors and a low density of these cells in the Of and Nf reactors (not fed with PCP) clearly shows that this strain is competitive when PCP is present in the system. The PCP degradation ability of *D. frappieri* cells probably allows this microorganism to compete well with the other anaerobic microorganisms in the system following exposure to PCP. However, when no PCP is fed to the bioreactors, this strain is present in the biofilm in a very limited amount. These results suggest that *D. frappieri* cells do not colonise the biofilm or are eliminated from the system if they do not confer an advantage to the community, and that they probably don't have a significant role in nitrate reduction in the Nf reactor. Also, it is possible that if no PCP is present this strain is metabolically

weakened and not visible by FISH. This could happen if the synthrophical association of *D. frappieri* PCP-1 with the other members of the anaerobic consortium to obtain a usable carbon source is not going on.

To our knowledge, no work on the FISH detection of specific degradative strains in FF bioreactors has been published. However, successful bioaugmentation and disposition of inoculated cells has been reported for upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactors. For example, UASB reactors bioaugmented with *Sulfurospirillum multivorans* acquired the capacity to transform perchloroethylene (PCE) to dichloroethylene (Horber *et al.*, 1998). Bioaugmentation of *Desulfomonile tiedje* in an UASB reactor led to the degradation of 3-chlorobenzoate (3-CB) by the reactor (Ahring *et al.*, 1992). Also, inoculation of *D. hafniense* DCB-2 in an UASB reactor containing sterilized granular sludge resulted in the acquisition of a PCP degradation capacity by the reactor (Christiansen et Ahring, 1996b).

Bioaugmentation of specific strains in bioreactors has not always been successful. For example, Bouchez *et al.* (2000a; 2000b) reported that an aerobic denitrifying bacterium bioaugmented in a sequencing batch reactor was either eaten by protozoa or causing important imbalances in the system. However, another study was published on the successful bioaugmentation of a nitrifying microorganism in a rotating disk bioreactor (Satoh *et al.*, 2003).

Targeting specific microbial species in anaerobic FF biofilms has not been reported frequently in the literature. Amann *et al.* (1992a) were the first to report the FISH detection of specific microorganisms in anaerobic biofilms. They detected two microorganisms, the first related to *Desulfovibrio vulgaris* (strain PT-2) and the second related to *Desulfuromonas acetoxidans* in a biofilm from an anaerobic sulfidogenic FF reactor. FISH analysis revealed the structural organization of these two populations as microcolonies. Raskin *et al.* (1995) have also detected strain PT-2 by FISH in anaerobic sulfidogenic bioreactors while Poulsen *et al.* (1993) and Raskin *et al.* (1995) have quantified the ribosomal content of strain PT-2 directly in anaerobic multi-species biofilms and calculated the generation time of this strain in the biofilm. However, all these works have used epifluorescence microscopy to study the structure of anaerobic biofilms and the disposition of microorganisms in these biofilms.

The only work published yet reporting the study of anaerobic biofilms by CLSM was done by Araujo *et al.* (2000). They studied the development of a biofilm on a Robbin's device in a chemostat system with FISH and CLSM, and the effect of two surfaces, polypropylene and glass. These researchers inoculated the system with three different microorganisms in pure culture (*Methanobacterium formicum*, *Methanosaeta concilii* and *Methanosarcina barkeri*). Examination of the biofilm revealed that biofilms were present on both surfaces after 2 and 9 days of operation. Another study examined by immunofluorescence the structure of anaerobic biofilm exposed to different C:N ratios with a disaggregated biofilm. Zellner *et al.* (1995) visualized some methanogenic *Archaea* and denitrifying bacteria in a FF bioreactor fed with methanol and nitrate in a 1.3 ratio. They found that the biofilm was composed mainly of cells that were antigenically related to *Methanobrevibacter arboriphilus* and *Pseudomonas stutzeri*.

4.3.7. Conclusion

The application of FISH to biofilms from different anaerobic FF reactors revealed that *D. frappieri* PCP-1 cells appeared as scattered cells in the biofilms from PCP-fed reactors and were relatively abundant in these biofilms. This disposition could be a way to maximize the degradation of PCP by the PCP-1 strain. Chemotaxis toward PCP or nutrients could be responsible for this disposition. When nitrate was added or when PCP was not present in the influent, *D. frappieri* PCP-1 cells were present in low numbers in the biofilm. This suggests that *D. frappieri* PCP-1 cells proliferate in the biofilm only if they bring an advantage to the community. Also, it suggests that the PCP-1 strain probably doesn't have a significant role in the nitrate reduction in this bioreactor. FISH with probes specific to the *Archaea* and *Eubacteria* revealed that in the presence of PCP or nitrate, the biofilm was mostly composed of *Eubacteria*. When no PCP or nitrate was added to the influent, these two populations composed about half of the total surface of the biofilm, thus showing that the presence of these compounds in the influent had significant effects on the relative proportion of these populations.

4.3.8. Acknowledgements

The authors of this papers would like to thank the Fonds pour la Formation de Chercheurs et Aide à la Recherche and the Fondation Armand-Frappier for financial support. Also, we would like to thank Marcel Desrosier for his help and suggestions about all experiments related to FISH and digital imaging.

Conclusion

Le but de ce projet de recherche consistait à déterminer la disposition spatiale de *D. frappieri* PCP-1 dans différents biofilms retrouvés dans des bioréacteurs anaérobies. Le protocole de FISH pour la détection de *D. frappieri* PCP-1 en milieu liquide a d'abord été adapté pour la détection de cette souche dans des biofilms. L'ajout d'une étape d'acétylation, ainsi que l'utilisation d'oligonucléotides auxiliaires a grandement aidé à améliorer la spécificité et l'intensité du signal de fluorescence.

Le protocole de FISH a été utilisé pour la détection de *D. frappieri* PCP-1 dans des boues granulaires provenant d'un réacteur UASB. Ces travaux ont révélé que cette souche était disposée à la périphérie des boues sous la forme de microcolonies denses après trois semaines d'opération du réacteur. Ces microcolonies ont ensuite proliféré à la surface du biofilm, jusqu'à former une couche externe complète après 9 semaines d'opération du réacteur. Cette disposition de la souche PCP-1 dans les boues granulaires a été confirmée par l'utilisation d'un modèle mathématique simulant le processus de colonisation. Les paramètres du modèle devaient être réglés avec une valeur élevée pour le taux de croissance spécifique (2.2 j^{-1}) et une valeur faible pour la diffusion bactérienne ($10^{-7} \text{ dm}^2 \text{ j}^{-1}$) dans le biofilm. Cette simulation a également permis de montrer que la prolifération de la souche PCP-1 à la surface des boues permettait de protéger les micro-organismes situés dans les couches plus internes de la toxicité du PCP. L'hybridation avec des sondes spécifiques aux *Eubacteria* et aux *Archaea* a permis de voir que les *Eubacteria* avaient colonisé la couche externe des boues, alors que les *Archaea* ont été observées à l'intérieur des granules. Ces résultats démontrent qu'il est possible de modéliser des granules ayant l'activité désirée par l'inoculation de souches microbiennes possédant des activités de dégradation spécifiques, puisque la souche PCP-1 s'est attachée et associée à la structure du biofilm.

Quatre réacteurs anaérobies à FF ont ensuite été étudiés. La charge maximale en PCP dégradée par le réacteur P0 ($312 \text{ mg}_{\text{PCP}} \text{ l}_R \text{ j}^{-1}$) était environ 3 fois plus élevée que la charge la plus élevée rapportée dans la littérature pour les réacteurs anaérobies. Aucune différence significative n'a été observée entre les capacités de dégradation des deux réacteurs supplémentés avec du PCP. Ceci démontre que les charges en PCP dégradées par des réacteurs anaérobies peuvent être élevées si l'adaptation au PCP se fait

graduellement. La souche PCP-1 a été détectée par PCR dans les deux réacteurs supplémentés avec du PCP. Celle-ci était probablement présente en faible quantité dans les boues granulaires ayant servi à l'inoculation des réacteurs. L'arrêt de l'activité dans les deux réacteurs supplémentés avec du PCP a été occasionné par deux problèmes fréquemment rencontrés lors de l'opération de réacteurs anaérobies, soit l'entrée d'oxygène et l'exposition à de nouveaux produits toxiques. Ceci démontre que les systèmes anaérobies sont fragiles et doivent être bien protégés des entrées d'oxygène et graduellement adaptés à la présence de nouvelles substances dans l'influent.

Le réacteur Nf possédait une activité méthanogène et pouvait également transformer le nitrate ($476 \text{ mgNO}_3 \text{ l}_R \text{ j}^{-1}$), ce qui suggère que le processus de dénitrification et de méthanogenèse puissent être effectué dans le même réacteur. Cette combinaison des deux processus pour le traitement des eaux usées permettrait de simplifier les systèmes actuels qui sont effectués séparément dans deux réacteurs.

Des analyses DGGE des gènes codant pour l'ARNr 16S provenant d'échantillons de biofilm et de la biomasse en suspension de tous les réacteurs à FF a permis de révéler d'importantes modifications au sein des profils des *Eubacteria* et des *Archaea* comparativement à la boue ayant servi à l'inoculation de ceux-ci et entre les différents bioréacteurs. La seule exception a été les profils de diversité des *Eubacteria* et *Archaea* des deux réacteurs supplémentés avec du PCP qui étaient très similaires.

La technique de FISH a été utilisée afin de visualiser directement les cellules de *D. frappieri* PCP-1 dans les biofilms provenant des quatre réacteurs à FF. Également, l'imagerie numérique a été utilisée afin de quantifier ces populations en relation avec la surface totale du biofilm. L'observation du biofilm avec la CLSM a révélé que les cellules de *D. frappieri* PCP-1 étaient présentes de manière dispersée dans le biofilm des réacteurs supplémentés avec du PCP et étaient relativement abondantes (17-19 %) après 257 jours d'opération. Lorsque du nitrate était présent dans l'influent ou lorsque le PCP était absent de l'influent, les cellules de *D. frappieri* PCP-1 étaient présentes en faible quantité (<1 %) dans le biofilm. Ceci suggère que les cellules de *D. frappieri* PCP-1 prolifèrent dans le biofilm seulement si cette association est avantageuse pour la communauté.

L'utilisation de la technique de FISH avec des sondes spécifiques aux *Archaea* ou aux *Eubacteria* a révélé qu'en présence de PCP ou de nitrate, le biofilm retrouvé dans les réacteurs à FF était composé en majeure partie d'*Eubacteria*. Lorsque le PCP ou le nitrate n'étaient pas présents dans l'influent, ces deux populations comptaient environ la moitié de la surface du biofilm. Ces résultats démontrent que la présence de ces produits dans l'influent a des effets importants sur les proportions relatives de ces deux populations.

Les travaux effectués au cours de ce projet de recherche ont permis d'élargir nos connaissances à propos des biofilms anaérobies. Toutefois, plusieurs expériences pourraient être effectuées dans le but d'éclaircir certaines facettes encore inexplorées. D'abord, l'identification des différents micro-organismes retrouvés dans les biofilms et la phase liquide des réacteurs anaérobies à FF permettrait de connaître les différentes populations microbiennes apparaissant ou disparaissant lors de l'application de différentes conditions d'opération. Le séquençage des bandes obtenues suite aux gels DGGE lors de l'analyse du profil des populations d'*Archaea* et d'*Eubacteria* pourrait permettre d'identifier partiellement ces micro-organismes.

Aussi, il pourrait être intéressant de tester d'autres conditions d'opérations des réacteurs UASB et à FF afin de voir si ces conditions ont un effet sur la disposition ou sur la quantité de cellules de *D. frappieri* PCP-1, d'*Archaea* et d'*Eubacteria* dans le biofilm. Par exemple, les réacteurs pourraient être exposés à une dose de PCP croissante, puis décroissante afin de déterminer l'effet de ces différentes concentrations sur les trois populations ciblées au cours du temps. De plus, différentes autres molécules halogénées dégradées par la souche PCP-1 pourraient être ajoutées à l'influent, comme le PCE. Aussi, il pourrait être intéressant d'étudier les biofilms présents dans d'autres types de bioréacteurs anaérobies, comme par exemple le réacteur à lit-fluidisé afin de voir comment s'y disposent la souche PCP-1, les *Archaea* et les *Eubacteria* lorsque différentes conditions sont testées.

En ce qui concerne la structure du biofilm, celle-ci pourrait être étudiée plus en détail. Il est probable que des coupes minces faites à partir du biofilm retrouvé dans les réacteurs à FF permettrait de mieux voir les canaux et la structure en forme de champignons typique des biofilms. Également, le clonage du gène codant pour la protéine fluorescente verte dans la souche PCP-1 pourrait permettre d'éliminer l'étape de

FISH et d'examiner directement les biofilms sous le CLSM suite à sa croissance dans une chambre à flux continu. Aussi, il pourrait être intéressant de déterminer les conditions nécessaires à la formation d'un biofilm avec une culture pure de souche PCP-1 et de voir comment ce biofilm réagit sous différentes conditions de croissances. De plus, lorsque le séquençage du génome de *D. hafniense* DCB-2 (très similaires à celui de *D. frappieri* PCP-1) sera complété, il sera possible d'utiliser des puces à ADN avec ce génome afin de déterminer quelles sont les gènes impliqués dans la formation de ce biofilm. Ce genre d'expérience pourrait également nous donner des indices sur le type de molécules de QS utilisées par la souche PCP-1. Enfin, il pourrait être possible de créer un modèle mathématique similaire modélisant la formation du biofilm retrouvé dans les bioréacteurs à FF.

La technique de FISH pourrait être raffinée davantage. Par exemple, l'utilisation de balises moléculaires ("molecular beacons") comme sondes fluorescentes pourrait permettre de diminuer l'hybridation non-spécifique dans les biofilms et même éliminer l'étape de lavage, puisque seules les sondes hybridées émettront de la fluorescence (Xi *et al.*, 2003). Aussi, l'utilisation de sondes d'acides nucléiques peptidiques ("peptide nucleic acids") pourrait être avantageuse. Dans ces molécules, le groupement phosphate et le désoxyribose sont remplacés par des polyamides non-chargés. L'hybridation est plus rapide, indépendante de la concentration en sels, le signal est plus intense, sont plus stables à la dégradation, s'hybrident aux séquences complémentaires avec plus d'affinités et diffusent mieux au travers de la paroi hydrophobe des micro-organismes (Moter et Gobel, 2000). Certains chercheurs ont même combiné les balises moléculaires et les acides nucléiques peptidiques (Xi *et al.*, 2003). L'utilisation de "quantum dots" au lieu de fluorochromes sur les sondes moléculaires pourrait également être avantageuse. Les « quantum dots » sont des particules de l'ordre du nanomètre qui émettent de la lumière. Ces "quantum dots" émettent un signal plus intense et sont plus résistants à la photodégradation que les fluorochromes (Gao et Nie, 2003). Enfin, la microautoradiographie couplée à la technique de FISH pourrait permettre de déterminer quels micro-organismes sont responsables de la transformation de différentes molécules dans le biofilm. Le marquage au ¹⁴C des molécules comme les VFA ou le phénol

résultant de la déshalogénéation complète du PCP pourrait permettre de visualiser quelles bactéries dans le biofilms ont incorporé ces molécules (Lee *et al.*, 1999).

L'étude des biofilms anaérobies permettra de mieux comprendre ces systèmes et ainsi d'améliorer les performances des réacteurs anaérobies à FF et UASB. Les résultats de cette étude pourraient avoir des implications importantes pour la décontamination des environnements pollués par le PCP et pour l'amélioration des systèmes de biodégradation anaérobies. La possibilité de créer des granules bactériens adaptés pour la dégradation de produits spécifiques a été confirmée et son application à d'autres types d'effluents permettrait d'améliorer davantage les performances des réacteurs UASB pour la dégradation de nouveaux produits. Également, les résultats obtenus avec les réacteurs à FF pour la dégradation du PCP démontrent que ces réacteurs, s'ils sont bien adaptés préalablement, pourraient atteindre des capacités de dégradation importantes. De plus, les résultats obtenus suite aux expériences de FISH ont permis de visualiser dans les boues granulaires et les biofilms les populations de *D. frappieri* PCP-1, d'*Archaea* et d'*Eubacteria*. Ce projet de recherche a permis d'accroître nos connaissances dans le domaine encore peu exploré des biofilms anaérobies en générant des données fondamentales sur la structure de ces biofilms, ainsi que sur la disposition des micro-organismes dans les biofilms, dont les populations responsables de l'activité de biodégradation.

Appendices: Autre article publié

Travaux en collaboration sur l'hybridation *in situ* de *D. frappieri* PCP-1 dans les boues granulaires

Article A: Strategies for augmenting the pentachlorophenol degradation potential of UASB anaerobic granules

S.R. Guiot^{1*}, B. Tartakovsky¹, M. Lanthier², M.-J. Lévesque¹, M.F. Manuel¹, R. Beaudet², C.W. Greer¹, R. Villemur²

1 Biotechnology Research Institute, NRC, 6100 Royalmount Avenue, Montréal, Québec, H4P 2R2 Canada.

2 INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, H7V 1B7 Canada.

Keywords: Anaerobic granule, bioaugmentation, on-line control, *Desulfobacterium frappieri*, FISH, PCR, pentachlorophenol, selective stress

Cet article a été publié dans Water Science and Technology (2002) Vol 45 No 10 pp 35-41

* Corresponding author. Mailing address: Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Ave., Montréal, Québec, Canada H4P 2R2. Phone: (514) 496-6181. Fax (514) 496-6265. E-mail: serge.guiot@nrc.ca

A1. Résumé

La dégradation anaérobie du pentachlorophénol (PCP) est un exemple de procédé pouvant bénéficier d'un enrichissement ou d'une bioaugmentation. Lors d'une première approche, l'accélération de l'enrichissement de la flore d'un réacteur anaérobie à boues granulaires (UASB) a été tentée par l'application d'une stratégie de sélection basée sur le stress et contrôlée "on-line" par la modification de la charge en PCP dépendamment de la production de méthane. Lors de l'application de cette stratégie, le potentiel de la biomasse du réacteur pour la déchloruration complète du PCP a atteint un taux de 4 mg g^{-1} de solides volatils en suspension (VSS) j^{-1} après une période de 120 jours. Lors de la seconde approche, une culture pure de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, une bactérie à Gram positif et anaérobie stricte, a été utilisée pour bioaugmenter la biomasse granulaire d'un réacteur UASB. Cette approche a permis d'obtenir un taux de dégradation spécifique de $4 \text{ mg PCP gvss}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Toutefois, ce potentiel a été atteint en 56 jours. L'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) a montré que la souche PCP-1 était capable de s'attacher rapidement aux granules et colonisait densément la couche externe de ces granules.

A2. Abstract

Anaerobic degradation of pentachlorophenol (PCP) is an example of a process that may benefit from enrichment or bioaugmentation. In one approach, enrichment acceleration was attempted by applying an on-line control-based selective stress strategy to a native anaerobic upflow sludge bed (UASB) system; this strategy linked PCP loading rate to methane production. As a result, the reactor biomass potential for PCP complete dechlorination reached a rate of 4 mg g^{-1} volatile suspended solid (VSS) day $^{-1}$ within a period of 120 days. In another approach, a pure culture of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, a strictly anaerobic Gram-positive bacterium, was used to augment the granular biomass of the UASB reactor. This also resulted in a specific degradation rate of $4 \text{ mg PCP g}_{\text{vss}}^{-1} \text{ day}^{-1}$; however, this potential was attained within 56 days. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) showed that the PCP-1 strain was able to rapidly attach to the granule and densely colonize the outer biofilm layer.

A3. Introduction

Pentachlorophenol (PCP) can be completely mineralized to CH₄ and CO₂ under anaerobic conditions in a sequential process of dechlorination and mineralization by a mixed bacterial consortium (Mikesell et Boyd, 1986; Mohn et Kennedy, 1992; Duff *et al.*, 1995). First, PCP dehalogenation occurs, resulting in the appearance of lightly chlorinated phenols and phenol. Next, anaerobic bacteria mineralize the dechlorination products. In this two-step biotransformation, the dechlorination step is rate limiting due to the high toxicity of PCP and intermediates; trichlorophenols are even more toxic than PCP (Duff *et al.*, 1995). While a PCP-degrading consortium could be developed by species adaptation to the presence of PCP, the adaptation process is rather slow, requiring a long period of time to achieve a high dechlorination rate (Wu *et al.*, 1993; Juteau *et al.*, 1995b). Augmentation of natural bacterial populations with highly efficient laboratory strains is attractive for maximizing bioprocess performance (Christiansen *et al.*, 1995). In a mixed bacterial community, however, laboratory strains compete with indigenous species for common substrates. This competition often results in a replacement of the laboratory strain by wild-type populations more adapted to that particular environment (Massol-Deya *et al.*, 1997). Retention of the inoculated population is not guaranteed, and thorough monitoring is thus required to evaluate the bioaugmentation efficiency.

A4. Materials and methods

A4.1 Operating conditions

A4.1.1 Inocula

Anaerobic sludge granules were obtained from an upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor treating food manufacturing wastewater (Champlain Industries, Cornwall, Ontario, Canada). *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 (ATCC 700397) was grown under anaerobic conditions at 37°C in a mineral salts medium supplemented with 55 mM pyruvate and 0.1 % yeast extract (Bouchard *et al.*, 1996).

A4.1.2 Reactors

Experiments were performed in 5 L UASB glass reactors equipped with a methane detector (Ultramat 22P, Siemens, Germany) in the off-gas line and a computer-controlled

PCP feeding pump. The first reactor (non-augmented) was inoculated with 77 g of volatile suspended solids (VSS) of anaerobic granular sludge, and the second reactor (bioaugmented) with 92 g VSS and 10 mL of *D. frappieri* pure culture suspension. Both reactors were operated at a residence time of 28 hours, and maintained at a temperature of 35°C and a pH of 7.3 ± 0.1 using a pH controller. All influent solutions were pumped into the liquid recirculating line in different sidestreams. The dilution stream contained a bicarbonate buffer (NaHCO_3 1.36 g l^{-1} , KHCO_3 1.74 g l^{-1} , NaOH 0.15 g l^{-1}). The PCP solution contained 2 g l^{-1} PCP dissolved in a 20 g l^{-1} NaOH solution. The nutritional solution contained (in g l^{-1}): sucrose, 304; butyric acid, 96; yeast extract, 7; ethanol (95 %), 70; KH_2PO_4 , 6; K_2HPO_4 , 7; NH_4HCO_3 , 68. It was fed at a rate of 28 ml day $^{-1}$. The chloride-free trace metal solution was fed at a rate of 14 ml day $^{-1}$. More details can be found in Tartakovsky *et al.* (1999; 2001).

A4.2 Analytical methods

Reactor off-gas composition (CH_4 and CO_2) was determined by a gas chromatography system (Sigma 2000, Perkin-Elmer, Norwalk, CT) equipped with a flame ionization detector. Concentrations of PCP and its metabolites were determined by high performance liquid chromatography (Spectra-Physics, San Jose, CA). Other details can be found in Tartakovsky *et al.* (1999; 2001).

A4.3 DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR)

One- to two-milliliter sludge samples were centrifuged for 5 min at 10,000 x g. The pellet was resuspended in 700 ml of TEN (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 100 mM NaCl), and DNAs were extracted with a glass mill homogenizer according to a protocol described in Lévesque *et al.* (1997). PCR amplifications were performed with 2 ml of sludge DNA in the presence of oligonucleotides specific for PCP-1 - PCP1G (5' CGAACGGTCCAGGTGTCTA 3') and PCP3D (5' ACTCCCATGTTCCACAG 3') as described by Lévesque *et al.* (1997). The enumeration of the PCP-1 strain cells by competitive PCR (cPCR) was based on the procedure described by Zachar *et al.* (1993) and Lévesque *et al.* (1998). Briefly, PCR amplifications were performed on serial dilutions of an internal standard DNA mixed with a constant amount of sludge DNA in

the presence of the specific primers PCP1G and PCP4D (5' AGGTACCGTCATGTAAGTAC 3'). The internal standard was composed of the same primer binding sites, size, and sequence as the target DNA (16S rRNA gene), except that an *EcoRV* restriction site was introduced by PCR-mediated site-directed mutagenesis. The resulting PCR products were digested by *EcoRV*, fractionated by 2 % agarose gel electrophoresis, and colored with Vistra Green (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Densitometric scanning of fluorescent DNA fragments was performed with the Molecular FluorImager (Molecular Dynamics), and the results were analyzed with ImageQuaNT software (Molecular Dynamics). For each PCR amplification, fluorescent intensity results were converted in number of PCP-1 cells per gram of VSS, after calibration against the amount of added internal standard.

A4.4 Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of granule cross sections

Three probes (PCP-1-4, PCP-1-7, and PCP-1-8) were designed for the FISH detection of *D. frappieri* PCP-1 by comparing its 16S ribosomal RNA gene (rDNA) sequences with sequences from GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) and the Ribosomal Database Project II (Michigan State University, East Lansing, MI). The PCP-1-4 sequence is unique to the 16S rDNA sequences of the four *D. frappieri* strains, of *D. chlororespirans* and of *D. hafniense*. The PCP-1-7 sequence is unique to the 16S rDNA sequences of *D. frappieri* strains PCP-1, TCE1 and TCPA (Gerritse *et al.*, 1999), but different to *D. frappieri* DP7 and other bacteria. The PCP-1-8 sequence is unique to the 16S rDNA sequences of the four *D. frappieri* strains and of *D. hafniense*. Both PCP-1-4 and PCP-1-8 sequences have at least 2 mismatches with 16S rDNA sequences of other *Desulfobacterium* species. PCP-1-4 and PCP-1-7 were both labelled with Cy3, and PCP-1-8, with Cy5. The non-augmented sludge was used as a negative control.

After sampling, granules were washed 3 times for 5 minutes each time in ice-cold filtered PBS buffer (NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄H₂O 3 mM) and incubated for 3 hours in paraformaldehyde 4 %/PBS pH 7.2. Then the granules were dehydrated in 50 % ethanol for 20 minutes (3 times) and 70 % ethanol for 40 minutes. After incubation overnight in 70 % ethanol, granules were further dehydrated in 95 % ethanol for 20

minutes (3 times) and 100 % ethanol for 20 minutes (3 times). Granules were then incubated in xylene for 10 minutes (2 times), and in a mixture of xylene/paraplast overnight. After this step, granules were incubated in pure paraplast for 1 hour at 60°C (3 times). The last incubation was done in plastic molds. Paraplast blocks were cut in 7 µm thin sections (Histostat rotary microtome, Reichert/Jung model 820, Buffalo, NY), and sections were mounted on poly-L-lysine coated slides (Polysciences, Warrington, PA). Prior to FISH, sections were deparaffined by incubation in xylene for 20 minutes (2 times) and in 100 % ethanol for 10 minutes (2 times), and acetylated (10 minutes in 100 mM triethanolamine, acetic anhydride 0.25 %, NaCl 0.09 %, pH 7.2) to prevent non-specific binding of probes. The FISH protocol was similar to that used by Rocheleau *et al.* (1999), except that helper oligonucleotides were added to increase the fluorescent signal of Cy5-PCP-1-8 (Fuchs *et al.*, 2000). Slides were examined with an epifluorescence microscope (Laborlux S, Leitz, Germany) equipped with filters for DAPI, Cy3 and Cy5 and a mercury short arc photo optic lamp HBO 103 W/2 (OSRAM, Germany). Images of granule cross sections were acquired using a CCD camera (Coolsnap, RS Photometrics) and Coolsnap V 1.0.0 software (Roper Scientific Inc., Tucson, AZ). The exposure time was 2 seconds for the DAPI and Cy3 probes and 8 seconds for the Cy5 probe. The NIH Image v1.62 program (U.S. National Institutes of Health) was used to quantify signal intensity. Statistical analysis of signal intensity was carried out by dividing each image into 5-6 horizontal subsections, acquiring signal intensity as a function of distance from the granule surface for each subsection, and averaging the results.

A5. Results and discussion

A5.1 Enrichment by optimal selective stress

Fast enrichment in PCP-degraders was first attempted by applying a selective stress strategy to a native UASB system. Although the presence of a toxicant is expected to create growth advantages for microorganisms that are able to degrade this compound, toxicity may limit the rate at which such an adaptation can occur. To address this dilemma, a computer-based on-line feedback control was applied to the continuously PCP-fed reactor, in order to have a continuous incremental increase of the PCP loading

rate (control parameter) while ensuring that methane productivity (process output) did not decrease. Even though methanogens are not directly implicated in PCP dechlorination, methanogens are assumed to be the consortium members which are the most sensitive to chlorophenols (Wu *et al.*, 1993; Stuart et Woods, 1998). If inhibition occurred (methane productivity decreased), the PCP loading was slightly decreased, but increase in the PCP loading was continually attempted. In practice, an increase in the PCP load was imposed only if no decline in methane production was observed over a certain period of time (δt). Each increase was carried out in a step-wise increment denoted as $\delta F+$. If a decline in methane production was detected the control system decreased the PCP load by a value of δF . In addition, the system was programmed to respond to an abrupt decline in methane production (more than 25 % of its previous value) by resetting the PCP load to its start-up, non-toxic value. The δt , $\delta F+$ and δF values (12 h, 2.8 mg l_{rx}⁻¹ day⁻¹, 5.6 mg l_{rx}⁻¹ d⁻¹, respectively) constituted a set of parameters which determined the intensity of selective pressure.

The initial volumetric PCP load was set at 2 mg l_{rx}⁻¹ d⁻¹ (2 mg l⁻¹ in the influent), a value at which PCP was known to be non-toxic. For the first 60 days, the feedback control did not allow for PCP load augmentation since any attempt to increase the load led to a decline in methane production (Figure A1). Reactor effluent analysis showed the presence of PCP (below 0.2 mg l⁻¹), 3,4,5-trichlorophenol (TCP), and traces of phenol, but no di- and monochlorophenols. Afterwards, the effluent analysis showed for the first time 3,5-dichlorophenol (DCP), then 3-monochlorophenol (MCP), while 3,4,5-TCP decreased. Between days 80 and 120 the PCP load increased from 20 to 62 mg l_{rx}⁻¹ d⁻¹ (Figure A1), with a near zero effluent concentration of PCP. Although few abrupt drops in methane production were observed throughout this period, the decline was only temporary. Fast response of the control system at each reactor upset allowed for a subsequent successful recovery. In spite of the increasing PCP load, no increase in the TCP concentration was noted while the MCP concentration in the effluent built up. Also observed over this period was a decrease in the DCP concentration.

Such a strategy is likely maximizing the concentration of the chlorophenols that are in contact with the microbial population, while remaining below the inhibitory level. These chlorophenol-saturating conditions are thought to force the induction of the

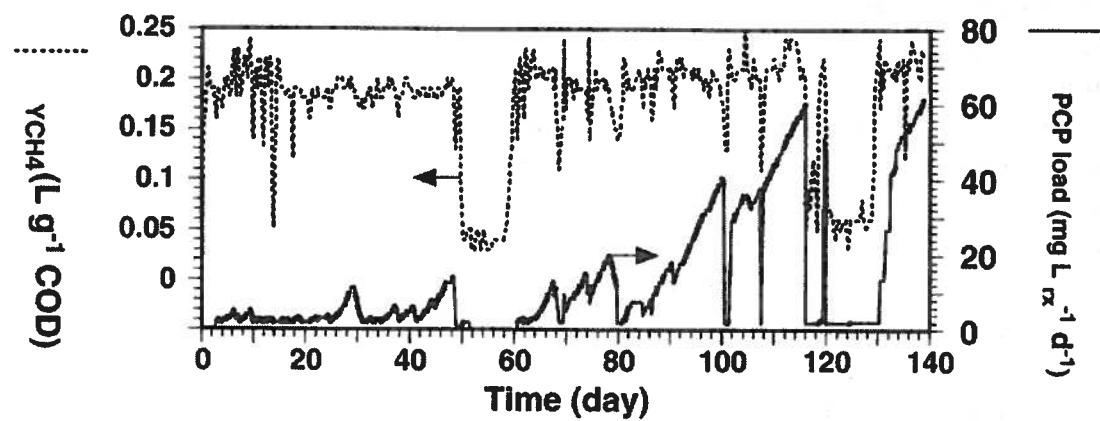


Fig. A.1. Volumetric PCP load and methane production in the PCP-fed UASB reactor (first run, non-augmented), as a result of the operation with on-line feedback control.

dehalogenating enzyme machinery and to maximize the growth of microorganisms that have the potential to dechlorinate chlorophenols. As a result, over a 120 day period, the PCP degradation potential of the reactor biomass was able to reach a value of $4 \text{ mg gvss}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

A5.2 Bioaugmentation with a pure strain

In another approach, a pure strain, *D. frappieri* PCP-1, was used to augment the granule mixed bacterial community in a UASB reactor. This organism is a strictly anaerobic Gram-positive bacterium isolated from a methanogenic consortium degrading PCP (Bouchard *et al.*, 1996). To estimate the efficiency of the augmentation, the population of PCP-1 in the reactor was enumerated by using cPCR (Beaudet *et al.*, 1998; Lévesque *et al.*, 1998). The PCP-1 strain appeared to compete well with other microorganisms of the mixed bacterial community. Proliferation of the PCP-1 strain (increasing from 6×10^6 to between 10^{10} and 10^{11} cells gvss^{-1}) allowed for a substantial increase of the volumetric PCP load from 5 to $80 \text{ mg l}_{\text{rx}}^{-1} \text{ d}^{-1}$, within a period of 56 days. A PCP removal efficiency of 99 % and a dechlorination efficiency of not less than 90.5 % were observed throughout the experiment, with 3-MCP and phenol being observable dechlorination intermediates. This result corresponded to a specific rate of $4 \text{ mg gvss}^{-1} \text{ d}^{-1}$ of PCP complete dechlorination. This specific rate is similar to that of the reactor enriched by selective stress. However, the later enrichment required four months as opposed to only eight weeks for the bioaugmented reactor.

Proliferation of the PCP-1 strain in the reactor could be explained by its complementary role within the anaerobic consortium exposed to PCP. Literature review (Christiansen *et al.*, 1995) suggests the existence of at least two dechlorination pathways. If PCP is initially dechlorinated at the *meta* position, the transformation occurs via a 2,4,6-TCP \rightarrow 2,4-DCP \rightarrow 4-MCP route. Initial *para* or *ortho* dechlorination results in the formation of 3-MCP via either 2,3,5- or 3,4,5-TCP. In a native PCP-degrading consortium, more than one bacterial strain is required for this sequential biotransformation. Accumulation of partially dechlorinated products might occur throughout the adaptation period, as different bacteria have different growth rates. Accumulation of 3,4,5-TCP was indeed observed in the adaptation phase of the first run

(non-augmented). In contrast, 3-MCP was the only observable intermediate in the reactor effluent during the bioaugmented run. This is likely due to the PCP-1 strain which is capable of dechlorination at the *ortho*, *meta*, and *para* positions, resulting in the degradation of PCP to 3-MCP via the formation of 2,3,4,5-, 3,4,5- and 3,5-chlorophenols (Bouchard *et al.*, 1996). The presence of PCP-1 in the reactor reduced the number of consortium members required, thus eliminating rate-limiting steps, in the dechlorination process. This also minimized the number of toxic intermediates in the reactor and offered a less toxic environment to the methanogens and other consortium members.

A5.3 Topography of the bioaugmented granule

The topography of anaerobic granules augmented with *D. frappieri* PCP-1 was studied with FISH, using strain-specific Cy3-PCP-1-4, Cy3-PCP-1-7 and Cy5-PCP-1-8 probes. After 24 hours, no fluorescence was visible. After 5 and 9 weeks, a strong fluorescence signal was present in the granule outer layer with both PCP-1-specific probes. Positive controls always gave intense fluorescence signal in all samples hybridized, while no autofluorescence signal was present. No fluorescence signal was observed with all three probes in FISH of the non-augmented sludge. Statistical analysis of signal intensity confirmed visual observations. At week 5, an increase in the intensity at the edge of the biofilm was observed (not shown). By the end of the experiment, the signal at the granule periphery attained a value of 40-50 arbitrary units (AU) while the average intensity at the center was 10-15 AU (Figure A2). Hence upon attachment to the granule, PCP-1 cells proliferated prominently in the granule periphery. This yielded with time, a dense PCP-1 outer layer of around 50 μm thickness. This is explicable, given that PCP-1 has a relatively high growth rate under optimal conditions (doubling time 3 hours, (Bouchard *et al.*, 1996)), on condition that there is minimal bacterial diffusive transport, if any. Fast PCP consumption was thus predictable at the granule periphery, producing a steep PCP gradient within the anaerobic granule, thus leaving the granule core PCP free. Consequently, methanogens and other bacteria could be shielded from the PCP toxicity and allowed to thrive in this less toxic environment.

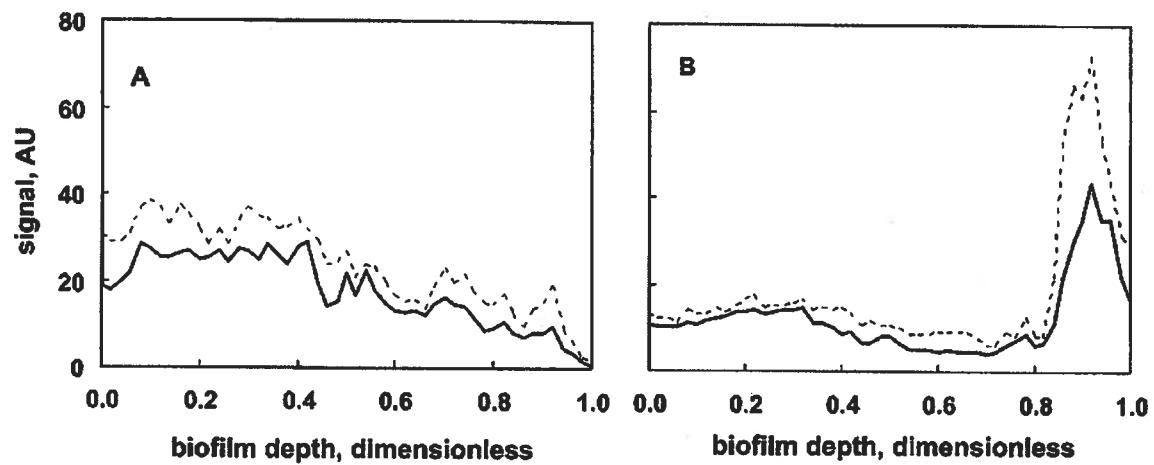


Fig. A.2. Average intensity profiles of granules hybridized with Cy3-PCP-1-4 after one (A) and 9 weeks (B) of reactor operation. AU, arbitrary units. Broken lines show standard deviation of the signal.

A6. Conclusions

The present study has broad implications for decontamination of chemical-polluted waters. These observations confirm the possibility to design granules for specific bioremediation needs. It shows that, in this case, *de novo* biodegradation abilities can be effectively associated to native granules, since the added PCP-1 cells seem to effectively attach to and densely grow on the granule matrix. The anaerobic granule seems to be an adequate support medium for effectively fixing exogenous microorganisms. This is important considering that such reactors are submitted to various shearing factors, such as the liquid superficial velocity, and the release of gas bubbles. On the other hand, the possibility to associate new specific strains with common anaerobic granules offers a relatively easy way for engineering stable multispecies consortia, yet capable of addressing target compounds. Multiple functions (e.g. co-substrate fermentation, intermediates mineralization) and mutualistic ties are essential to the completeness of the degradation. Those assets might be instrumental if such specialized biosystems have to be developed at large scale in an economical manner.

A7. Acknowledgement

The contribution to this research of D. Beaumier, S. Deschamps, and K. Haller was greatly appreciated. This research was supported partly by Natural Science and Engineering Research Council (NSERC No. OGP0155558), and partly by National Research Council Canada (NRC paper registered as No. 44596).

Liste des références

- Ahn, Y. B., Rhee, S. K., Fennell, D. E., Kerkhof, L. J., Hentschel, U. et Haggblom, M. M. 2003. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. Appl Environ Microbiol 69: 4159-4166.
- Ahring, B. K. 2003. Perspectives for anaerobic digestion. Adv Biochem Eng Biotechnol 81: 1-30.
- Ahring, B. K., Sandberg, M. et Angelidaki, I. 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. Appl Microbiol Biotechnol 43: 559-565.
- Ahring, K. B. K., Christiansen, N., Mathrani, I., Hendriksen, H., Macario, A. J. L. et Conway De Macario, E. 1992. Introduction of a *de novo* bioremediation ability, aryl reductive dechlorination, into anaerobic granular sludge by inoculation of sludge with *Desulfomonile tiedje*. Appl Environ Microbiol 58: 3677-3682.
- Akunna, J. C., Bizeau, C. et Moletta, R. 1994a. Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: ammonification, denitrification and methanogenic activities. Environ Technol 15: 41-49.
- Akunna, J. C., Bizeau, C., Moletta, R., Bernet, N. et Héduit, A. 1994b. Combined organic carbon and complete nitrogen removal using anaerobic and aerobic upflow filters. Water Sci Technol 30: 297-306.
- Akunna, J. C. et Moletta, R. 1992. Denitrification in anaerobic digesters: possibilities and influences of wastewater COD/N-NO_x ratio. Environ Technol 13: 825-836.
- Amann, R. I. 1995a. Fluorescently-labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. Mol Ecol 4: 543-554.
- Amann, R. I. 1995b. *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. Molecular microbial ecology manual. Akkermans, A. D. L., Van Elsas, J. D. et de Bruijn, F. J. Boston, Kluwer Academic Publishers. 3.3.6/1-15.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. et Stahl, D. A. 1990a. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial population. Appl Environ Microbiol 56: 1919-1925.
- Amann, R. I., Krumholz, L. et Stahl, D. A. 1990b. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J Bacteriol 172: 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig, W. et Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 59: 143-169.
- Amann, R. I., Snaidr, J., Wagner, M., Ludwig, W. et Schleifer, K.-H. 1996. *In situ* visualisation of high genetic diversity in a natural microbial community. J Bacteriol 178: 3496-3500.
- Amann, R. I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. et Stahl, D. A. 1992a. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. Appl Environ Microbiol 58: 614-623.

- Amann, R. I., Zarda, B., Stahl, D. A. et Schleifer, K.-H. 1992b. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 58: 3007-3001.
- Ando, K., Kato, A. et Suzuki, S. 1970. Isolation of 2,4-dichlorophenol from a soil fungus and its biological significance. Biochem Biophys Res Co 39: 1104-1107.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L. et Ahring, B. K. 2003. Applications of the anaerobic digestion process. Adv Biochem Eng Biotechnol 82: 1-33.
- Angerer, L. M. et Angerer, R. C. 1992. *In situ* hybridization to cellular RNA with radiolabelled RNA probes. In situ hybridization: a practical approach. Wilkinson, D. G. New York, IRL Press. 15-32.
- Araujo, J. C., Brucha, G., Campos, J. R. et Vazotier, R. F. 2000. Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. Water Sci Technol 41: 69-77.
- Arsenault, R. D. 1976. Pentachlorophenol and contained chlorinated dibenzodioxins in the environments. Proc Ann Amer Wood Preservers Assoc 72: 122.
- Assmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J. R. et Hartmann, A. 1995. *In situ* localization of *Azospirillum brasiliense* in the rhizosphere of wheat with fluorescentl-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. Appl Environ Microbiol 61: 1013-1019.
- Atuanya, E. I., Purohit, H. J. et Chakrabarti, T. 2000. Anaerobic and aerobic biodegradation of chlorophenols using UASB and ASG bioreactors. World J Microbiol Biotechnol 16: 95-98.
- Bajpai, R. et Banerji, S. 1992. Bioremediation of soils contaminated with pentachlorophenol. Ann NY Acad Sci 665: 423-434.
- Bauer-Kreisel, P., Eisenbeis, M. et H., S.-M. 1996. Quantification of *Dehalospirillum multivorans* in mixed-culture biofilms with an enzyme-linked immunosorbent assay. Appl Environ Microbiol 62: 3050-3052.
- Beaudet, R., Lévesque, M. J., Villemur, R., Lanthier, M., Chénier, M., Lépine, F. et Bisaillon, 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. et Bisaillon, 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.
- Behrens, S., Fuchs, B. M., Mueller, F. et Amann, R. 2003a. Is the *in situ* accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for Cy3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model of the 30S ribosomal subunit ? Appl Environ Microbiol 69: 4935-4941.
- Behrens, S., Ruhland, C., Inacio, J., Huber, H., Fonseca, A., Spencer-Martins, I., Fuchs, B. M. et Amann, R. 2003b. *In situ* accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains *Bacteria*, *Archaea*, and *Eucarya* to Cy3-labeled oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 69: 1748-1758.
- Bevenue, A. et Beckman, H. 1967. Pentachlorophenol: a discussion of its properties and its occurrence as a residue in human and animal tissues. Residue Rev 19: 83-134.
- Beveridge, T. J., Makin, S. A., Kadurugamuwa, J. L. et Li, Z. 1997. Interactions between biofilms and the environment. FEMS Microbiol Rev 20: 291-303.

- Bouchard, B. 1995. Isolement et caractérisation d'un micro-organisme anaérobie effectuant la déchloruration du pentachlorophénol. Institut Armand-Frappier - Département de Microbiologie Appliquée. Laval, Université du Québec. 105.
- Bouchard, B., Beaudet, R., Villemur, R., McSween, G., Lépine, F. et 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.
- Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Juretschko, S., Dore, J., Delgenes, P., Moletta, R. et Wagner, M. 2000a. Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environ Microbiol* 2: 179-190.
- Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Wagner, M., Delgenes, J. et R., M. 2000b. Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent *in situ* hybridization. *Water Sci Technol* 41: 61-68.
- Bouvier, T. et del Giorgio, P. A. 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol Ecol* 44: 3-15.
- Boyd, S. A., Shelton, D. R., Berry, D. et Tiedje, J. M. 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl Environ Microbiol* 46: 50-54.
- Boyer, A., Pagé-Bélanger, R., Saucier, M., Villemur, R., Lépine, F., Juteau, P. et Beaudet, R. 2003. Purification, cloning and sequencing of an enzyme mediating the reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol from *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Biochem J* 373: 297-303.
- Branda, S. S., Gonzalez-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R. et Kolter, R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11621-11626.
- Breitenstein, A., Saano, A., Salkinoja-Salonen, M., Andreesen, J. R. et Lechner, U. 2001. Analysis of a 2,4,6-trichlorophenol-dehalogenating enrichment culture and isolation of the dehalogenating member *Desulfitobacterium frappieri* TCP-A. *Arch Microbiol* 175: 133-142.
- Brimacombe, R., Atmadja, J., Stiege, W. et Schuler, D. 1988. A detailed model of the three-dimensional structure of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA *in situ* in the 30 S subunit. *J Mol Biol* 199: 115-136.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D. et Noller, H. F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 148: 107-127.
- Brown, P. M., H., W., Myriam, Y., Egan, T., MacDonald, B. et Edwards, F. 1999. Options stratégiques pour la gestion des substances toxiques selon la LCPE provenant du secteur de la préservation du bois. Volume I. Rapport final de la table de concertation. Environnement Canada. 122 p.
- Bruce, K. D., Hiorns, W. D., Hobman, J. L., Osborn, A. M., Strike, P. et Ritchie, D. A. 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 3413-3416.
- Brudermann, G. E. 1999. Recommandations pour la conception et l'exploitation d'installations de préservation du bois. Environnement Canada, Bureau national de la prévention de la pollution, Institut canadien des bois traités. 239 p.
- Brudermann, G. E., Richardson, N. G. et Watson, R. L. 1982. Dioxins and the Canadian pressure wood preserving industry. Canadian institute of treated wood. 35 p.

- Burggraf, S., Mayer, T., Amann, R., Schadhauser, S., Woese, C. R. et Stetter, K. O. 1994. Identifying members of the domain *Archaea* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 60: 3112-3119.
- Buswell, C. M., Herlihy, Y. M., Lawrence, L. M., McGuiggan, J. T. M., Marsh, P. D., Keevil, C. W. et Leach, S. A. 1998. Extended survival and persistance of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. Appl Environ Microbiol 64: 733-741.
- Butte, W., Denker, J., Kirsch, M. et 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 B 9: 29-39.
- Cascorbi, I. et Ahlers, J. 1989. Correlation between the lipophilicity of substituted phenols and their inhibition of the Na^+/K^+ -ATPase of Chinese hamster ovary cells. Toxicology 58: 197-210.
- Cascorbi, I. et Foret, M. 1991. Interaction of xenobiotics on the glucose-transport system and the Na^+/K^+ -ATPase of human skin fibroblasts. Ecotoxicol Environ Saf 21: 38-46.
- CBE ressource library. 2004. Biofilmwb. Bozeman, Center for Biofilm Engineering at Montana State University–Bozeman. 2004: Web site.
- Chang, B. V., Chiang, C. W. et Yuan, S. Y. 1999. Microbial dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol in anaerobic sewage sludge. J Environ Sci Health B 34: 491-507.
- Christiansen, N. et Ahring, B. K. 1996a. *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. Int J Syst Bacteriol 46: 442-448.
- Christiansen, N. et Ahring, 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.
- Christiansen, N., Hendriksen, H. V., Järvinen, K. T. et Ahring, B. K. 1995. Degradation of chlorinated aromatic compounds in UASB reactors. Water Sci Technol 31: 249-256.
- Cirelli, D. P. 1978. Patterns of pentachlorophenol usage in the United States of America - an overview. Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Rao, K. R. New York, Plenum Press. 402 p.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. et Eaton, A. D., Eds. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. Baltimore, American Public Health Association.
- Cole, J., Chai, B., Marsh, T., Farris, R., Wang, Q., Kulam, S., Chandra, S., McGarrell, D., Schmidt, T., Garrity, G. et Tiedje, J. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Nucleic Acids Res 31: 442-443.
- Comité des objectifs des écosystèmes aquatiques. 1980. Report to the Great Lakes science advisory board - recommendations: pentachlorophenol. Commision mixte internationale. Windsor.
- Conseil canadien des ministres de l'environnement. 2002. Soil quality guidelines for the protection of environmental and human health. Conseil canadien des ministres de l'environnement.

- Costerton, J. W., Geesey, G. G. et Cheng, K.-J. 1978. How bacteria stick. Sci Am 238: 86-95.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. et Lappin-Scott, H. M. 1995. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 49: 711-745.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. et James, G. 1994. Biofilms, the customized microniche. J Bacteriol 176: 2137-2142.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. et Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322.
- Costerton, W. J., Cheng, K.-J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. et Marrie, T. J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol 41: 435-464.
- Crosby, D. G. 1981. Environmental chemistry of pentachlorophenol. IUPAC reports on pesticides (14). International union of pure and applied chemistry. 1052-1080.
- Da Silva, M.-N. 2000. Détection de bactéries impliquées dans la biodégradation de contaminants par hybridation *in situ* et cytométrie en flux. Microbiologie et biotechnologie. Laval, INRS-Institut Armand-Frappier.
- Daims, H., Brühl, A., Amman, R., Schleifer, K.-H. et Wagner, M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. Syst Appl Microbiol 22: 434-444.
- Davey, M. E. et O'Toole G, A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 64: 847-867.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. et Greenberg, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280: 295-298.
- Davis, A. J., Campbell, J., Gilbert, C., Ruby, M. V., Bennett, M. et Tobin, S. 1994. Attenuation and biodegradation of chlorophenols in ground water at a former wood treating facility. Environ Monit Assess 32: 248-257.
- De Jong, E., Field, J. A., Spinnler, H. E., Wijberg, J. B. P. A. et De Bont, J. A. M. 1994. Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. Appl Environ Microbiol 60: 264-270.
- de los Reyes, F. L., Ritter, W. et Raskin, L. 1997. Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems. Appl Environ Microbiol 63: 1107-1117.
- De Weerd, K. A., Mandelco, L., Tanner, R. S., Woese, C. R. et Suflita, J. M. 1990. *Desulfomonile tiedje* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. Arch Microbiol 154: 23-30.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S. et Pace, N. R. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science 243: 1360-1363.
- Dennie, D., Gladu, I., Lépine, F., Villemur, R., Bisailon, J.-G. et Beaudet, R. 1998. Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfobacterium frappieri* PCP-1. Appl Environ Microbiol 64: 4603-4606.
- Desaiyah, D. 1978. Effects of pentachlorophenol on the ATPases in rat tissues. Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Rao, K. R. New York, Plenum Press. pp 402.
- Dewanti, R. et Wong, A. C. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. Int J Food Microbiol 26: 147-164.

- Dicorcia, A. et Samperi, R. 1974. Determination of trace amounts of C₂-C₅ acids in aqueous solutions by gas chromatography. *Anal Chem* 46: 140-143.
- Dolfing, J. 1986. Granulation in UASB reactors. *Water Sci Technol* 18: 15-25.
- Dolfing, J., Grifioen, A., van Neerven, A. R. W. et Zevenhuizen, L. P. T. M. 1985. Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can J Microbiol*: 744-750.
- Drong, K. et Lamprecht, I. 1993. Toxicological studies of energy flows in ecological systems. *Pure Appl Chem* 65: 1967-1972.
- Droste, R. L., Kennedy, K. J., Lu, J. et Lentz, M. 1998. Removal of chlorinated phenols in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Sci Technol* 8-9: 359-367.
- Duff, S. J. B., Kennedy, K. J. et Brady, A. J. 1995. Treatment of dilute phenol/PCP wastewaters using the upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Water Res* 29: 645-651.
- Edgehill, R. U. et Finn, R. K. 1983. Activated sludge treatment of synthetic wastewater containing pentachlorophenol. *Biotechnol Bioeng* 25: 2165-2176.
- El Fantroussi, S., Giot, R., Naveau, H. et Agathos, S. N. 1998. Acclimation of a methanogenic consortium to a mixture of hydroxylated aromatic compounds. *Chemosphere* 36: 1575-1583.
- Emson, P. C. et Gait, M. J. 1992. *In situ* hybridization with biotinylated probes. *In situ hybridization: a practical approach*. Wilkinson, D. G. New York, IRL Press. pp 45-59.
- Fahmy, M., Kut, O. M. et Heinze, E. 1994. Anaerobic-aerobic fluidized bed biotreatment of sulfite pulp bleaching effluents-II. Fate of individual chlorophenolic compounds. *Water Res* 28: 1997-2010.
- Fang, H. H., Liu, H. et Zhang, T. 2002. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol Bioeng* 78: 44-52.
- Fang, H. H. P., Chui, H. K. et Li, Y. Y. 1994. Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewaters. *Water Sci Technol* 30: 87-96.
- Fang, H. H. P., Chui, H. K. et Li, Y. Y. 1995. Effects of degradation kinetics on the microstructure of anaerobic biogranules. *Water Sci Technol* 32: 165-172.
- Fathepure, B. Z. et Tiedje, J. M. 1994. Reductive dechlorination of tetrachloroethylene by a chlorobenzoate-enriched biofilm reactor. *Environ Sci Technol* 28: 746-752.
- Finneran, K. T., Forbush, H. M., VanPraagh, C. V. et Lovley, D. R. 2002. *Desulfitobacterium metallireducens* sp. nov., an anaerobic bacterium that couples growth to the reduction of metals and humic acids as well as chlorinated compounds. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1929-1935.
- Fuchs, B. M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W. et Amann, R. 1998. Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64: 4973-4982.
- Fuchs, B. N., Glöckner, F. O., Wulf, J. et Amann, R. 2000. Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 66: 3603-3607.
- Gao, X. et Nie, S. 2003. Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots. *Trends Biotechnol* 21: 371-373.
- Gauthier, E., Déziel, E., Villemur, R., Juteau, P., Lépine, F. et Beaudet, R. 2003. Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic

- aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. J Appl Microbiol 94: 301-311.
- Gebefügi, I., Parlar, H. et Korte, F. 1979. Occurrence of pentachlorophenol in enclosed environments. Ecotoxicol Environ Saf 3: 269-300.
- Gerritse, J., Drzyzga, O., Kloetstra, G., Keijmel, M., Wiersum, L. P., Hutson, R., Collins, M. D. et Gottschal, J. C. 1999. Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. Appl Environ Microbiol 65: 5212-5221.
- Gerritse, J., Renard, V., Pedro Gomes, T. M., Lawson, P. A., Collins, M. D. et 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.
- Ghiorse, W. C., Miller, D. N., Sandoli, R. L. et Siering, P. L. 1996. Applications of laser scanning microscopy for analysis of aquatic microhabitats. Microsc Res Tech 33: 73-86.
- Gilbert, F. I., Jr., Minn, C. E., Duncan, R. C. et 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.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J. et Pace, N. R. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. J Bacteriol 170: 720-726.
- Goeres, D. M., Nielsen, P. H., Smidt, H. D. et Frolund, B. 1998. The effect of alkaline pH conditions on a sulphate reducing consortium from a Danish district heating plant. Biofouling 12: 273-286.
- Grotenhuis, J. T. C., Smit, M., Plugge, C. M., Yuansheng, X., Van Lammeren, A. A. M., Stams, A. J. M. et Zehnder, A. J. B. 1991. Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. Appl Environ Microbiol 57: 1942-1949.
- Guiot, S. R., Pauss, A. et Costerton, J. W. 1992. A structured model of the anaerobic granule consortium. Water Sci Technol 25: 1-10.
- Guthrie, M. A., Kirsch, E. J., Wukash, R. F. et Grady, C. P. L. J. 1984. Pentachlorophenol biodegradation-II anaerobic. Water Res 18: 451-461.
- Haggblom, M. M., Knight, V. K. et Kerkhof, L. J. 2000. Anaerobic decomposition of halogenated aromatic compounds. Environ Pollut 107: 199-207.
- Hakulinen, R. et Salkinoja-Salonen, M. 1982. Treatment of pulp and paper industry wastewater in an anaerobic fluidized bed reactor. Process Biochem 17: 18-22.
- Hanaki, K. et Polprasert, C. 1989. Contribution of methanogenesis to denitrification with an upflow filter. J Water Poll Control Fed 61: 1604-1611.
- Hancock, R. E. 2001. A brief on bacterial biofilms. Nat Genet 29: 360.
- Harayama, S. 2001. Environmental biotechnology. Curr Opin Biotechnol 12: 229-230.
- Harmsen, H. J., Akkermans, A. D., Stams, A. J. et de Vos, W. M. 1996a. Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. Appl Environ Microbiol 62: 2163-2168.
- Harmsen, H. J., Kengen, H. M. P., Akkermans, A. D. L., Stams, A. J. M. et De Vos, W. M. 1996b. Detection and localization of synthrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by *in situ* hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 62: 1656-1663.

- Harwood, C. S., Parales, R. E. et Dispensa, M. 1990. Chemotaxis of *Pseudomonas putida* toward chlorinated benzoates. *Appl Environ Microbiol* 56: 1501-1503.
- Haugland, R. P. 1996. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Eugene, Molecular Probes, Inc.
- Hawkins, A. C. et Harwood, C. S. 2002. Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Appl Environ Microbiol* 68: 968-972.
- Hendriksen, H. V. et Ahring, B. 1993. Anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in fixed-film and upflow anaerobic sludge blanket reactors using different inocula. *Biodegradation* 3: 399-408.
- Hendriksen, H. V., Larsen, S. et Ahring, B. K. 1991. Anaerobic degradation of PCP and phenol in fixed-film reactors: the influence of an additional substrate. *Water Sci Technol* 24: 431-436.
- Hendriksen, H. V., Larsen, S. et Ahring, B. K. 1992. Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 58: 365-370.
- Henrici, A. T. 1933. Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic technique. *J Bacteriol* 25: 277-287.
- Hofman-Bang, J., Zheng, D., Westermann, P., Ahring, B. K. et Raskin, L. 2003. Molecular ecology of anaerobic reactor systems. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 81: 151-203.
- Hoos, R. A. W. 1978. Patterns of pentachlorophenol usage in Canada - an overview. *Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology*. Rao, K. R. New York, Plenum Press. 402 p.
- Horber, C., Christiansen, N., Arvin, E. et Ahring, B. 1998. Improved dechlorinating performance of upflow anaerobic sludge blanket reactors by incorporation of *Dehalospirillum multivorans* into granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 64: 1860-1863.
- Huang, C.-T., Stewart, P. S. et McFeters, G. A. 1998. The study of microbial biofilms by classical fluorescence microscopy. *Digital image analysis of microbes: imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications*. M.H.F. Wilkinson, F. S., John Wiley & Sons, Ltd.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Ohashi, A. et Harada, H. 2000. Cultivation and *in situ* detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 66: 3608-3615.
- Jansenn, K. 1996. *In situ hybridization and immunochemistry. Current protocols in molecular biology*. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidma, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. New York, John Wiley and Sons, Inc.: 14.10.11-14.12.18.
- Jarvinen, K. T., Melin, E. S. et Puhakka, J. A. 1994. High-rate bioremediation of chlorophenol-contaminated groundwater at low temperatures. *Environ Sci Technol* 28: 2387-2392.
- Jayaraman, A., Hallock, P. J., Carson, R. M., Lee, C.-C., Mansfield, F. B. et Wood, T. K. 1999. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated *in situ*. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 267-275.

- Jensen, J. 1996. Chlorophenols in the terrestrial environment. Rev Environ Contam Toxicol 146: 25-51.
- Jones, A. et Zabel, T. 1988. Information related to potential 'Red List' substances. Water Research Center.
- Jones, P. A. 1984. Chlorophenols and their impurities in the Canadian environment: 1983 supplement. Ottawa, Environnement Canada. 93 p.
- Jorgensen, K. et Tiedje, J. M. 1993. Survival of denitrifiers in nitrate-free, anaerobic environments. Appl Environ Microbiol 59: 3297-3305.
- Juteau, P., Beaudet, R., McSween, G., Lépine, F. et Bisailon, J.-G. 1995a. Study of the reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. Can J Microbiol 41: 862-868.
- Juteau, P., Beaudet, R., McSween, G., Lépine, F., Milot, S. et Bisailon, J.-G. 1995b. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. Appl Microbiol Biotechnol 44: 218-224.
- Kennes, C., Wu, W. M., Bhatnagar, L. et 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.
- Khodadoust, A. P., Suidan, M. T., Sorial, G. A. et Dionysiou, D. D. 1999. Desorption of pentachlorophenol from soil using mixed solvents. Environ Sci Technol 33: 4483-4491.
- Khodadoust, A. P., Wagner, J. A., Suidan, M. T. et Brenner, R. C. 1997. Anaerobic treatment of PCP in fluidized-bed GAC bioreactors. Water Res 31: 1776-1786.
- King, R. B., Long, G. M. et Sheldon, J. K. 1992. Anaerobic biodegradation: sans oxygen. Practical environmental biodegradation. Boca Raton, Lewis Publishers.
- Kisand, V., Wikner, J. 2003. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. J Microbiol Methods 54: 183-191.
- Kitunen, V. H., Valo, R. J. et Salkinoja-Salonen, M. S. 1987. Contamination of soil around wood-preserving facilities by polychlorinated aromatic compounds. Environ Sci Technol 21: 101.
- Kjelleberg, S. et Molin, S. 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms ? Curr Opin Microbiol 5: 254-258.
- Knight, V. K., Kerkhof, L. J. et Häggblom, M. M. 1999. Community analysis of sulfidogenic 2-bromophenol-dehalogenating and phenol-degrading microbial consortia. FEMS Microbiol Ecol 29: 137-147.
- Kolter, R. et Losick, R. 1998. One for all and all for one. Science 280: 226-227.
- Konasewich, D. E. et Henning, F. A. 1988. Installations de préservation du bois au pentachlorophénol (PCP). Environnement Canada. 108 p.
- Koran, K. M., Suidan, M. T., Khodadoust, A. P., Sorial, G. A. et Brenner, R. C. 2001. Effectiveness of an anaerobic granular activated carbon fluidized-bed bioreactor to treat soil wash fluids: a proposed strategy for remediating PCP/PAH contaminated soils. Water Res 35: 2363-2370.
- Kosaric, N. et Blaszczyk, R. 1990. Microbial aggregates in anaerobic wastewater treatment. Adv Biochem Eng Biotechnol 42: 27-62.
- Krumme, M. L. et Boyd, S. A. 1988. Reductive dechlorination of chlorinated phenols in anaerobic upflow bioreactors. Water Res 22: 171-177.

- Kuchma, S. L. et O'Toole, G. A. 2000. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 11: 429-433.
- Lange, M. et Ahring, B. K. 2001. A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic *Archaea*. *FEMS Microbiol Rev* 25: 553-571.
- Lanthier, M., Tartakovsky, B., Villemur, R., DeLuca, G. et Guiot, S. R. 2002. Microstructure of anaerobic granules bioaugmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl Environ Microbiol* 68: 4035-4043.
- Lanthier, M., Villemur, R., Lépine, F., Bisailon, J. et Beaudet, R. 2001. Geographic distribution of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 and *Desulfitobacterium* spp. in soils from the province of Quebec, Canada. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 185-191.
- Lanthier, M., Villemur, R., Lépine, F., Bisailon, J. G. et Beaudet, R. 2000. Monitoring of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 in pentachlorophenol-degrading anaerobic soil slurry reactors. *Environ Microbiol* 2: 703-708.
- Law, A. M. et Aitken, M. D. 2003. Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Appl Environ Microbiol* 69: 5968-5973.
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W. et Caldwell, D. E. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 173: 6558-6567.
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Wolfaardt, G. M. et Caldwell, D. E. 1997. Analytical imaging and microscopy techniques. *Manual of environmental microbiology*. Hurst, C. R., American Society for Microbiology. pp 29-51.
- Lawrence, J. R. et Neu, T. R. 1999. Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Method Enzymol* 310: 131-144.
- Lawrence, J. R., Neu, T. R. et Swerhone, G. D. W. 1998a. Application of multiple parameters imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. *J Microbiol Meth* 32: 253-261.
- Lawrence, J. R., Wolfaardt, G. M. et Neu, T. R. 1998b. The study of biofilms using confocal laser scanning microscopy. *Digital image analysis of microbes: Imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications*. Wilkinson, M. H. F. et Schut, F., John Wiley & Sons Ltd.: pp 431-465.
- Lecouturier, D., Godon, J. J. et Lebeault, J. M. 2003. Phylogenetic analysis of an anaerobic microbial consortium deiodinating 5-amino-2,4,6-triiodoisophthalic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 400-406.
- Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K. H. et Wagner, M. 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 65: 1289-1297.
- Lévesque, M.-J., Beaudet, R., Bisailon, J.-G. et 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 Meth* 32: 263-271.
- Lévesque, M.-J., La Boissiere, S., Thomas, J.-C., Thomas, J. C., Beaudet, R. et 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.
- Lipski, A., Friedrich, U. et Altendorf, K. 2001. Application of rRNA-targeted oligonucleotide probes in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 40-57.

- Liu, W. T., Chan, O. C. et Fang, H. H. 2002. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. *Water Res* 36: 3203-3210.
- Liu, Y., Xu, H. L., Yang, S. F. et Tay, J. H. 2003. Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Res* 37: 661-673.
- Loubier, N. 1996. Évaluation des technologies de restauration des sols contaminés par le pentachlorophénol. Montréal, Université du Québec à Montréal. 122 p.
- Loy, A., Horn, M. et Wagner, M. 2003. probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 31: 514-516.
- Luitjen, M. L. G. C., de Weert, J., Smidt, H., Boschker, H. T. S., de Vos, W. M., Schraa, G. et Stams, A. J. M. 2003. Description of *Sulfurospirillum halorespirans* sp. nov, an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfert of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 787-793.
- Macario, A. J. L., Visser, F. A., Van Lier, J. B. et Conway De Macario, E. 1991. Topography of methanogenic subpopulations in a microbial consortium adapting to thermophilic conditions. *J Gen Microbiol* 137: 2179-2189.
- MacLeod, F. A., Guiot, S. R. et Costerton, J. W. 1990. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl Environ Microbiol* 56: 1598-1607.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. et Schleifer, K.-H. 1992. Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* 15: 593-600.
- Manz, W., Eisenbrecher, M., Neu, T. R. et Szewzyk, U. 1998. Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by *in situ* probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiol Ecol* 25: 43-61.
- Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K.-H. et Stenstrom, T.-A. 1993. *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 59: 2293-2298.
- Manz, W., Wagner, M., Amann, R. et Schleifer, K.-H. 1994. *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Water Res* 28: 1715-1723.
- Manz, W., Wendt-Pothoff, W., Neu, T. R., Szewzyk, U. et Lawrence, J. R. 1999. Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microb Ecol* 37: 225-237.
- Massol-Deya, A., Weller, R., Rios-Hernandez, L., Zhou, J. Z., Hickey, R. F. et Tiedje, J. M. 1997. Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 63: 270-276.
- Matsumoto, B., Ed. 1993. *Cell biological applications of confocal microscopy*. Methods in cell biology. Toronto, Academic Press, Inc.
- McLean, R. J., Whiteley, M., Stickler, D. J. et Fuqua, W. C. 1997. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 154: 259-263.

- Meier-Schneiders, M., Busch, C. et Diekert, G. 1993. The attachment of bacterial cells to surfaces under anaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 676-673.
- Michaud, S., Bernet, N., Buffiere, P., Roustan, M. et Moletta, R. 2002. Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. *Water Res* 36: 1385-1391.
- Mikesell, M. D. et Boyd, S. A. 1986. Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 52: 861-865.
- Miller, E., Wohlfarth, G. et Diekert, G. 1997. Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. *Arch Microbiol* 168: 513-519.
- Min, J., Chang, Y. S. et Gu, M. B. 2003a. Bacterial detection of the toxicity of dioxins, polychlorinated diphenyls, and polybrominated diphenyl ethers. *Environ Toxicol Chem* 22: 2238-2242.
- Min, J., Pham, C. H. et Gu, M. B. 2003b. Specific responses of bacterial cells to dioxins. *Environ Toxicol Chem* 22: 233-238.
- Mogensen, A. S., Dolfing, J., Haagensen, F. et Ahring, B. K. 2003. Potential for anaerobic conversion of xenobiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 82: 69-134.
- Mohn, W. M. et Tiedje, J. M. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol Rev* 56: 482-507.
- Mohn, W. W. et Kennedy, K. J. 1992. Limited degradation of chlorophenols by anaerobic sludge granules. *Appl Environ Microbiol* 58: 2131-2136.
- Moller, S., Pedersen, A. R., Poulsen, L. K., Arvin, E. et Molin, S. 1996. Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative *in situ* hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* 62: 4632-4640.
- Morris, J. G. 1994. Obligately anaerobic bacteria in biotechnology. *Appl Biochem Biotechnol* 48: 75-93.
- Mosquera-Corral, A., Sanchez, M., Campos, J. L., Mendez, R. et Lema, J. M. 2001. Simultaneous methanogenesis and denitrification of pretreated effluents from a fish canning industry. *Water Res* 35: 411-418.
- Moter, A. et Gobel, U. B. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Meth* 41: 85-112.
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2: 317-322.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. et Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Muyzer, G. et Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Natarajan, M. R., Nye, J., Wu, W.-M., Wang, H. et Jain, M. K. 1997. Reductive dechlorination of PCB-contaminated Raisin river sediments by anaerobic microbial granules. *Biotechnol Bioeng* 55: 182-190.

- Natarajan, M. R., Wu, W.-M., Nye, J., Wang, H., Bhatnagar, L. et Jain, M. K. 1996. Dechlorination of polychlorinated biphenyls congeners by an anaerobic microbial consortium. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 673-677.
- Natarajan, M. R., Wu, W.-M., Sanford, R. et Jain, M. K. 1999. Degradation of biphenyls by methanogenic microbial consortium. *Biotechnol Lett* 21: 741-745.
- Nealson, K. H., Moser, D. P. et Saffarini, D. A. 1995. Anaerobic electron acceptor chemotaxis in *Shewanella putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol* 61: 1551-1554.
- Neu, T. R. et Lawrence, J. 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol Ecol* 24: 11-25.
- Nielsen, K. M., Smalla, K. et van Elsas, J. D. 2000. Natural transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol* 66: 206-212.
- Niggemyer, A., Spring, S., Stackebrandt, E. et Rosenzweig, R. F. 2001. Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl Environ Microbiol* 67: 5568-5580.
- Nilsson, C.-A., Norstrom, A., Andersson, K. et Rappe, C. 1978. Impurities in commercial products related to pentachlorophenol. *Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology*. Rao, K. R. New York, Plenum Press. 402 p.
- Noftsker, C. et Watwood, M. E. 1997. Removal of tetrachloroethylene in an anaerobic column bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 424-430.
- Oberg, G. 2002. The natural chlorine cycle -- fitting the scattered pieces. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 565-581.
- Oberg, L. G., Glas, B., Swanson, S. E., Rappe, C. et Paul, K. G. 1990. Peroxidase-catalyzed oxidation of chlorophenols to polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Arch Environ Contam Toxicol* 19: 930-938.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. et Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54: 49-79.
- O'Toole, G. A. et Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295-304.
- Ottou, J. M. 1991. Revue de la littérature sur la biodégradation du pentachlorophénol dans le bois. Association Canadienne de l'Électricité. 53 p.
- Paddock, S. W. 1999. Confocal scanning laser microscopy. *Biotechniques* 27: 992-1004.
- Palmer, R. J. et Sternberg, C. 1999. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Curr Opin Biotechnol* 10: 263-268.
- Palmer, R. J. J. et White, D. C. 1997. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol* 5: 435-440.
- Parales, R. E., Ditty, J. L. et Harwood, C. S. 2000. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Appl Environ Microbiol* 66: 4098-4104.
- Park, S., Wolanin, P. M., Yuzbashyan, E. A., Silberzan, P., Stock, J. B. et Austin, R. H. 2003. Motion to form a quorum. *Science* 301: 188.

- Pernthaler, J., Pernthaler, A. et Amann, R. 2003. Automated enumeration of groups of marine picoplankton after fluorescence *in situ* hybridization. Appl Environ Microbiol 69: 2631-2637.
- Picanco, A. P., Vallero, M. V., Gianotti, E. P., Zaiat, M. et Blundi, C. E. 2001. Influence of porosity and composition of supports on the methanogenic biofilm characteristics developed in a fixed bed anaerobic reactor. Water Sci Technol 44: 197-204.
- Pind, P. F., Angelidaki, I. et Ahring, B. K. 2003a. A new VFA sensor technique for anaerobic reactor systems. Biotechnol Bioeng 82: 54-61.
- Pind, P. F., Angelidaki, I., Ahring, B. K., Stamatelatou, K. et Lyberatos, G. 2003b. Monitoring and control of anaerobic reactors. Adv Biochem Eng Biotechnol 82: 135-182.
- Potera, C. 1996. Biofilms invade microbiology. Science 273: 1795-1797.
- Poulsen, L. K., Ballard, G. et Stahl, D. A. 1993. Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. Appl Environ Microbiol 59: 1354-1360.
- Power, M. E., Araujo, J. C., Van Der Meer, J. R., Harms, H. et Wanner, O. 1999. Monitoring sulfate-reducing bacteria in heterotrophic biofilms. Water Sci Technol 39: 49-56.
- Pratt, L. A. et Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol 30: 285-293.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. et Lejeune, P. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol 181: 5993-6002.
- Providenti, M. A., Lee, H. et Trevors, J. T. 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. J Ind Microbiol 12: 379-395.
- Quarmby, J. et Forster, C. F. 1995. A comparative study of the internal architecture of anaerobic granular sludge. J Chem Tech Biotechnol 63: 60-68.
- Quémarais, B., Lemieux, C. et Lum, K. R. 1994. Distribution and fate of chlorophenols in the St-Lawrence river basin, Canada. Chemosphere 28: 1943-1960.
- Quevedo, M., Guynot, E. et Muxi, L. 1996. Denitrifying potential of methanogenic sludge. Biotechnol Lett 18: 1363-1368.
- Rao, K. R. 1978. Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Rao, K. R. New York, Plenum Press. 402 p.
- Raskin, L., Amman, R. I., Poulsen, L. K., Rittmann, B. E. et Stahl, D. A. 1995. Use of ribosomal RNA-based molecular probes for characterization of complex microbial communities in anaerobic biofilms. Water Sci Technol 31: 261-272.
- Raskin, L., Rittmann, B. E. et Stahl, D. A. 1996. Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. Appl Environ Microbiol 62: 3847-3857.
- Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E. et Stahl, D. A. 1994. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. Appl Environ Microbiol 60: 1232-1240.
- Ravanel, P., Taillandier, G., Tissut, M. et Benoit-Guyod, J. L. 1985. Effect of chlorophenols on isolated plant mitochondria activities: a QSAR study. Ecotoxicol Environ Saf 9: 300-320.

- Richardson, R. E., Bhupathiraju, V. K., Song, D. L., Goulet, T. A. et Alvarez-Cohen, L. 2002. Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. Environ Sci Technol 36: 2652-2662.
- Rocheleau, S., Greer, C. W., Lawrence, J., Cantin, C., Laramée, L. et Guiot, S. R. 1999. Differentiation of *Methanosaeta concili* and *Methanosarcina barkeri* in anaerobic mesophilic granular sludge by fluorescent *in situ* hybridization and confocal scanning laser microscopy. Appl Environ Microbiol 65: 2222-2229.
- Romantschuk, M., Sarand, I., Petanen, T., Peltola, R., Jonsson-Vihanne, M., Koivula, T., Yrjala, K. et Haahtela, K. 2000. Means to improve the effect of *in situ* bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. Environ Pollut 107: 179-185.
- Ruckdeschel, G., Renner, G. et Schwarz, K. 1987. Effects of pentachlorophenol and some of its known and possible metabolites on different species of bacteria. Appl Environ Microbiol 53: 2689-2692.
- Salkinoja-Salonen, M. S. 1990. Biochemistry and ecology of the clean-up of pentachlorophenol from contaminated soils. 5th colloquium on pulp and paper mill effluents.
- Salkinoja-Salonen, M. S., Hakulinen, R., Valo, R. et Apajalahti, J. 1983. Biodegradation of recalcitrant organochlorine compounds in fixed film reactors. Water Sci Technol 15: 309-319.
- Samson, R. 1994. 1- Les technologies *ex situ*. Biorestauration des sites contaminés. Centre québécois de valorisation de la biomasse. Sainte-Foy. 19 p.
- Sanchez, J. M., Arijo, S., Munoz, M. A., Morinigo, M. A. et Borrego, J. J. 1994. Microbial colonization of different support materials used to enhance the methanogenic process. Appl Microbiol Biotechnol 41: 480-486.
- Sanford, R. A., Cole, J. R., Loffler, F. E. et Tiedje, J. M. 1996. Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. Appl Environ Microbiol 62: 3800-3808.
- Santegoeds, C., Damgaard, L. R., Hesselink, G., Zopfi, J., Lens, P., Muyzer, G. et De Beer, D. 1999. Distribution of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in anaerobic aggregates determined by microsensor and molecular probes. Appl Environ Microbiol 65: 4618-4629.
- Satoh, H., Okabe, S., Yamaguchi, Y. et Watanabe, Y. 2003. Evaluation of the impact of bioaugmentation and biostimulation by *in situ* hybridization and microelectrodes. Water Res 37: 2206-2216.
- Sauer, K. et Camper, A. K. 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. J Bacteriol 183: 6579-6589.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. et Davies, D. G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol 184: 1140-1154.
- Schloz-Muramatsu, H., Neumann, A., Messner, M., Moore, E. et Diekert, G. 1995. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. Arch Microbiol 163: 48-56.

- Schmidt, J. E. et Ahring, B. K. 1995. Granulation in thermophilic upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. Antonie van Leeuwenhoek 68: 338-344.
- Schmidt, J. E. et Ahring, B. K. 1996. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. Biotechnol Bioeng 49: 229-246.
- Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P., Ramsing, N. B., Amann, R. et Schleifer, K.-H. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. Appl Environ Microbiol 62: 4641-4647.
- Schuppler, M., Wagner, M., Schon, G. et Gobel, U. B. 1998. *In situ* identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes. Microbiology 144 (Pt 1): 249-259.
- Schut, F., Wilkinson, M. H. F., Jansen, G. J. et Van Der Waaj, D. 1998. Quantitating single-colour fluorescence: immunofluorescence and fluorescence *in situ* hybridization. Digital image analysis of microbes: imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications. Wilkinson, M. H. F. et Schut, F., John Wiley & Sons, Ltd.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T. et Uchiyama, H. 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Biotechnol Lett 23: 1205-1208.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A. et Harada, H. 1999. Fluorescence *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. Appl Environ Microbiol 65: 1280-1288.
- Shelobolina, E. S., VanPraagh, C. G. et Lovley, D. R. 2003. Use of ferric and ferrous iron containing minerals for respiration by *Desulfitobacterium frappieri*. Geomicrobiol J 20: 143-156.
- Shen, C. F. et Guiot, S. 1996. Long-term impact of dissolved O₂ on the activity of anaerobic granules. Biotechnol Bioengin 49: 611-620.
- Siuda, J. F. 1980. Natural production of organohalogens. Water chlorination: environmental impact and health effects. Jolley, R. L., Brungs, W. A., Cummings, R. B. et Jacobs, V. A. Ann Arbor, Ann Arbor Science Publisjers Inc.: p 63-72.
- Siuda, J. F. et DeBernardis, J. F. 1973. Naturally occurring halogenated organic compounds. Lloydia (Cinci.) 36: 107-143.
- Skiadas, I. V., Gavala, H. N., Schmidt, J. E. et Ahring, B. K. 2003. Anaerobic granular sludge and biofilm reactors. Adv Biochem Eng Biotechnol 82: 35-67.
- Sorensen, A. H., Torsvik, V. L., Torsvik, T., Poulsen, L. K. et Ahring, B. K. 1997. Whole-cell hybridization of *Methanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 63: 3043-3050.
- Speece, R. E. 1996. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Nashville, Tenn., Archae Press.
- Spiers, A. J., Bohannon, J., Gehrig, S. M. et Rainey, P. B. 2003. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. Mol Microbiol 50: 15-27.
- Stahl, D. A. et Amann, R. 1991. Development and application of nucleic acid probes. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E. et Goodfellow, M. New York, John Wiley & Sons Ltd.: p 205-248.

- Stahl, D. A., Amann, R. I., Poulsen, L. K., Raskin, L. et Capman, W. C. 1995. Use of fluorescent probes for determinative microscopy of methanogenic *Archaea*. *Archaea: a laboratory manual. Methanogens*. Sowers, K. R. et Schreier, H. J. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 111-121.
- Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R. et Montgomery, L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 54: 1079-1084.
- Stams, A. J., Oude Elferink, S. J. et Westermann, P. 2003. Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 81: 31-56.
- Steenstrup, T., Clase, K. L. et Hannon, K. M. 2000. Rapid quantification of cell numbers using computer images. *Biotechniques* 28: 624-628.
- Steffan, R. J. et Atlas, R. M. 1991. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Ann Rev Microbiol* 45: 137-161.
- Stephens, R. W., Brudermann, G. E., Morris, P. I., Hollick, M. S. et Chalmers, J. D. 1994. Value assesment of the Canadian pressure treated wood industry. Ltd., C.-H., Service Canadien des forêts.
- Stinson, M. K., Skovronek, H. S. et Chresand, T. J. 1991. EPA site demonstration of BioTrol aqueous treatment system. *J Air Waste Manage Assoc* 41: 228-233.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. et Costerton, J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209.
- Stuart, S. L. et Woods, S. L. 1998. Kinetic evidence for pentachlorophenol-dependent growth of a dehalogenating population in a pentachlorophenol- and acetate-fed methanogenic culture. *Biotechnol Bioeng* 57: 420-429.
- Supelco Inc., Ed. 1975. Separating aqueous free carboxylic acids (C2-C5) at ppm concentration. Bulletin. Bellafonte.
- Supelco Inc., Ed. 1995. Analysing fatty acids by packed column gas chromatography. Bulletin. Bellafonte, Supelco Inc.
- Sutherland, I. W. 2001. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9: 222-227.
- Suyama, A., Iwakiri, R., Kai, K., Tokunaga, T., Sera, N. et Furukawa, K. 2001. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 1474-1481.
- Tagawa, T., Syutsubo, K., Sekiguchi, Y., Ohashi, A. et Harada, H. 2000. Quantification of methanogen cell density in anaerobic granular sludge consortia by fluorescent *in-situ* hybridization. *Water Sci Technol* 42: 77-82.
- Tartakovsky, B. et Guiot, S. R. 1997. Modeling and analysis of layered stationary anaerobic granular biofilms. *Biotechnol Bioeng* 54: 122-130.
- Tartakovsky, B., Lévesque, M.-J., Dumortier, R., Beaudet, R. et Guiot, S. R. 1999. Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl Environ Microbiol* 65: 4357-4362.
- Tartakovsky, B., Manuel, M. F., Beaumier, D., Greer, C. W. et Guiot, S. R. 2001. Enhanced selection of an anaerobic pentachlorophenol-degrading consortium. *Biotechnol Bioeng* 73: 476-483.

- Themel, K., Sparling, R. et Oleszkiewicz, J. 1996. Anaerobic dehalogenation of 2-chlorophenol by mixed bacterial cultures in absence of methanogenesis. Environ Technol 17: 869-875.
- Thomas, J.-C., Desrosiers, M., St-Pierre, Y., Lurette, P., Bisailon, J.-G., Beaudet, R. et Villemur, R. 1997. Quantitative flow cytometric detection of specific microorganisms in soil using rRNA targeted fluorescent probes and ethidium bromide. Cytometry 27: 224.
- Tourova, T. P. 2003. Copy number of ribosomal operons in prokaryotes and its effect on phylogenetic analyses. Microbiology 72: 437-452.
- Utkin, I., Woese, C. et Wiegel, J. 1994. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. Int J Syst Bacteriol 44: 612-619.
- Vallecillo, A., Garcia-Encina, P. A. et Pena, M. 1999. Anaerobic biodegradability and toxicity of chlorophenols. Water Sci Technol 40: 161-168.
- van de Pas, B. A., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., de Vos, W. M., Schraa, G. et Stams, A. J. 2001. A *Desulfitobacterium* strain isolated from human feces that does not dechlorinate chloroethenes or chlorophenols. Arch Microbiol 175: 389-394.
- Van Delden, C. et Iglesias, B. H. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerg Infect Dis 4: 551-560.
- van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W. et Zehnder, A. J. B. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. Microbiol Rev 54: 75-87.
- van Schie, P. M. et Fletcher, M. 1999. Adhesion of biodegradative anaerobic bacteria to solid surfaces. Appl Environ Microbiol 65: 5082-5088.
- Villemur, R., Déziel, E., Benachenhou, A., Marcoux, J., Gauthier, E., Lépine, F., Beaudet, R. et Comeau, Y. 2000. Two-liquid-phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Biotechnol Prog 16: 966-972.
- Villemur, R., Saucier, M., Gauthier, A. et Beaudet, R. 2002. Occurrence of several genes encoding putative reductive dehalogenases in *Desulfitobacterium hafniense/frappieri* and *Dehalococcoides ethenogenes*. Can J Microbiol 48: 697-706.
- Vogel, T. M. et McCarty, P. L. 1985. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions. Appl Environ Microbiol 49: 1080-1083.
- von Wintzingerode, F., Selent, B., Hegemann, W. et Gobel, U. B. 1999. Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. Appl Environ Microbiol 65: 283-286.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. et Schleifer, K.-H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. Appl Environ Microbiol 59: 1520-1525.
- Wagner, M., Amman, R., Kämpfer, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N. et Schleifer, K.-H. 1994a. Identification and *in situ* detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. Syst Appl Microbiol 17: 405-417.
- Wagner, M., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P. et Amann, R. 1994b. *In situ* analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-

- targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. *J Microsc* 176: 181-187.
- Wagner, M., Hutzler, P. et Amann, R. 1998. Three-dimensional analysis of complex microbial communities by combining confocal laser scanning microscopy and fluorescence *in situ* hybridization. *Digital image analysis of microbes: imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications*. Wilkinson, M. H. F. et Schut, F., John Wiley & Sons, Ltd.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.-P., Flood, J. et Amann, R. 1996. *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage water treatment plants. *Water Sci Technol* 34: 237-244.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Déziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R. et Vivanco, J. M. 2003. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol* 134: 320-331.
- Wallner, G., Amann, R. et Beisker, W. 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14: 136-143.
- Wang, H. Y., Wu, W. M., Natarajan, M. R. et Hickey, R. F. 1995. Engineering anaerobic dechlorination for bioremediation. *Environmental biotechnology: principles and applications*. Moo-Young, M., Anderson, W. A. et Chakrabarty, A. M. Boston, Kluwer Academic Publishers. 259-268.
- Wanner, O. et Reichert, P. 1996. Mathematical modeling of mixed-culture biofilm. *Biotechnol Bioeng* 49: 172-184.
- Watnick, P. I. et Kolter, R. 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* 34: 586-595.
- Webber, M. D. et Singh, S. S. 2003. Contamination of agricultural soils. Environnement Canada. http://res2.agr.gc.ca/publications/hs/chap09_e.htm
- Weinbach, E. C. et Garbus, J. 1965. The interaction of uncoupling phenols with mitochondria and with mitochondrial protein. *J Biol Chem* 240: 1811-1819.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. et Mattick, J. S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295: 1487.
- Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. et Greenberg, E. P. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413: 860-864.
- Wild, S. R., Harrad, S. J. et Jones, K. C. 1993. Chlorophenols in digested U.K. sewage sludges. *Water Res* 27: 1527-1534.
- Wintzingerode, F. V., Gobel, U. B. et Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based RNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21: 213-229.
- Woods, S. L., Ferguson, J. F. et Benjamin, M. M. 1989. Characterization of chlorophenol and chloromethoxybenzene biodegradation during anaerobic treatment. *Environ Sci Technol* 23: 62-68.
- World Health Organization. 1987. *Pentachlorophenol*. Finland, United Nations Environment Program, International Labour Organization, World Health Organization.
- World Health Organization. 1989. *Pentachlorophenol health and safety guide. IPCS international program on chemical safety*. Finland, World health organization for the International Program on Chemical Safety.

- Wu, G., Feng, Y. et Boyd, S. A. 2003. Characterization of bacteria capable of degrading soil-sorbed biphenyl. Bull Environ Contam Toxicol 71: 768-775.
- Wu, J. H., Liu, W. T., Tseng, I. C. et Cheng, S. S. 2001. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. Microbiology 147: 373-382.
- Wu, W.-M., Bhatnagar, L. et Zeikus, J. G. 1993. Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. Appl Environ Microbiol 59: 389-397.
- Xi, C., Balberg, M., Boppart, S. A. et Raskin, L. 2003. Use of DNA and peptide nucleic acid molecular beacons for detection and quantification of rRNA in solution and in whole cells. Appl Environ Microbiol 69: 5673-5678.
- Zachar, V., Thomas, R. A. et Goustin, A. S. 1993. Absolute quantification of target DNA: a simple competitive PCR for efficient analysis of multiple samples. Nucleic Acids Res 21: 2017-2018.
- Zarda, B., Amann, R., Wallner, G. et Schleifer, K.-H. 1991. Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides. J Gen Microbiol 137: 2823-2830.
- Zellner, G., Feuerhake, E., Jordening, H.-J., Macario, A. J. L. et Conway De Macario, E. 1995. Denitrifying and methanogenic bacteria in the biofilm of a fixed-film reactor operated with methanol/nitrate demonstrated by immunofluorescence and microscopy. Appl Microbiol Biotechnol 43: 566-571.
- Zheng, D. et Raskin, L. 2000. Quantification of *Methanosaeta* species in anaerobic bioreactors using genus- and species-specific hybridization probes. Microbial Ecol 39: 246-262.
- Zobell, C. E. et Anderson, D. Q. 1936. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored seawater and the influence of oxygen tension and solid surfaces. Biol Bull Woods Hole 71: 324-342.

