

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

***ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DE LA DIVERSITÉ
MICROBIENNE LORS DU PROCESSUS D'ACTIVATION
D'UN SOL POUR LA BIODÉGRADATION DU
PENTACHLOROPHÉNOL***

Par
Maude Beaulieu

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

Été 2000

© droits réservés de Maude Beaulieu, 2000

Citations

Possibilities

What we see depends on what we look for

Focus

*Obstacles are those frightful things you see when
you take your eyes off your goals*

Imagine

Imagination is more important than knowledge

Dreams

*The future belongs to those who believe
in the beauty of their dreams*

TABLE DES MATIÈRES

Citations.....ii

Table des matières.....iii

Liste des figures.....vi

Liste des tableaux.....viii

Liste des abréviations.....ix

Sommaire.....xi

Abstract.....xiv

Introduction.....1

Revue de la littérature.....4

1. Le pentachlorophénol.....5

 1.1 Généralités sur le pentachlorophénol.....5

 1.2 La problématique de l'élimination du PCP.....7

2. La biodégradation du pentachlorophénol.....8

 2.1 Généralités sur la biodégradation du PCP.....8

 2.2 La biodégradation du PCP par les eucaryotes.....9

 2.3 La biodégradation du PCP par les procaryotes.....10

 2.3.1 La biodégradation du PCP par les bactéries Gram positif.....10

 2.3.2 La biodégradation du PCP par les bactéries Gram négatif.....13

3. Les biotraitements des sols.....18

 3.1 Généralités sur les biotraitements des sols.....18

 3.2 Biotraitements des sols contaminés par le PCP.....18

 3.2.1 Biotraitements par la biostimulation.....19

 3.2.2 Biotraitements par la bioaugmentation.....19

 3.2.2.1 Biotraitements par la méthode du sol activé.....22

4. Étude de la biodiversité dans les biotraitements.....	23
4.1 Généralités sur l'étude de la biodiversité.....	23
4.2 Problématique de l'étude de la biodiversité.....	23
4.3 Les méthodes moléculaires.....	24
4.3.1 Extraction des acides nucléiques.....	25
4.3.2 Amplification par PCR.....	27
4.3.2.1 Techniques quantitatives par PCR.....	28
4.3.2.2 Le PCR compétitif.....	28
4.3.3 Empreinte génétique des communautés microbiennes.....	29
4.3.3.1 Électrophorèse sur gel contenant un gradient dénaturant (DGGE).....	31
4.3.3.2 Le polymorphisme de conformation des ADN simples brins (SSCP).....	32
4.3.4 Génothèque des gènes de l'ARN 16S ribosomal.....	33
4.3.5 Analyse phylogénétique.....	34
Matériel et méthodes.....	36
1. Production de sol activé.....	37
2. Extraction de l'ADN total des mélanges boueux.....	39
3. Construction des amorces.....	41
4. Amplification par PCR.....	43
5. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	43
6. Digestion enzymatique.....	44
7. Ligations.....	44
7.1 Ligation dans le vecteur plasmidique pGEM [®] -T.....	44
7.2 Ligation dans le vecteur plasmidique PCR [™] II.....	44
8. Préparation de cellules compétentes.....	45
9. Transformation.....	45
10. Mini préparation d'ADN plasmidique.....	46
11. Extraction de l'ADN plasmidique.....	47
12. Détermination de la concentration d'ADN.....	48
13. Technique SSCP.....	48
13.1 Coloration au nitrate d'argent.....	49
14. Construction du standard interne pour le PCR compétitif.....	51
15. PCR compétitif.....	53
16. Purification de l'ADN plasmidique des clones.....	55
17. Séquençage et analyse des séquences.....	55

Résultats.....	57
1. Production de sol activé.....	58
2. Première activation.....	59
2.1 Gènes <i>pcpB</i>	59
2.2 Gènes de l'ARN 16S ribosomal.....	64
3. Deuxième activation.....	66
3.1 Gènes <i>pcpB</i>	69
3.1.1 Suivi des gènes <i>pcpB</i>	69
3.1.2 Quantification des gènes <i>pcpB</i> par PCR compétitif.....	69
3.1.3 Diversité des gènes <i>pcpB</i>	74
3.1.3.1 Analyse phylogénétique des gènes <i>pcpB</i>	77
3.2 Gènes de l'ARN 16S ribosomal.....	82
3.2.1 Suivi des gènes de l'ARN 16S ribosomal.....	82
3.2.2 Suivi de l'évolution de la microflore.....	82
3.2.3 Génothèque des gènes de l'ARN 16S ribosomal.....	86
Discussion.....	89
1. Production de sol activé.....	90
2. Extraction des acides nucléiques et amplification par PCR.....	91
3. Détection des gènes <i>pcpB</i>	93
4. Quantification des gènes <i>pcpB</i>	96
5. Diversité des gènes <i>pcpB</i>	98
6. Suivi de la microflore totale.....	100
6.1 Méthode SSCP.....	100
6.2 Diversité des gènes de l'ARN 16S ribosomal.....	104
7. Limitations des méthodes moléculaires.....	106
Conclusion.....	110
Remerciements.....	113
Bibliographie.....	115

Liste des figures

Figure #1 :	Structure du pentachlorophénol	7
Figure #2 :	Transformation du pentachlorophénol en pentachloroanisol	10
Figure #3 :	Biodégradation du PCP par <i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>	12
Figure #4 :	Biodégradation du PCP par <i>Sphingomonas chlorophenolica</i>	16
Figure #5 :	Utilisation des méthodes moléculaires	26
Figure #6 :	Montage expérimental des bioréacteurs	38
Figure #7 :	Montage de la colonne de PVPP	41
Figure #8 :	Principe de la méthode SSCP	50
Figure #9 :	Construction du standard interne pour le PCR compétitif	52
Figure #10 :	Principe du PCR compétitif	54
Figure #11 :	ADN total extrait du mélange boueux de la 1 ^{ère} activation ainsi que les produits de PCR des gènes de l'ARNr 16S et pcpB	60
Figure #12 :	Séquence en acides nucléiques du clone pcpB-1 comparée à la séquence du gène <i>pcpB</i> de la souche <i>Sphingomonas</i> sp. UG30	62
Figure #13 :	Séquence déduite en acides aminés du clone pcpB-1 comparée à la séquence déduite en acides aminés du gène <i>pcpB</i> de la souche <i>Sphingomonas</i> sp. UG30	63
Figure #14 :	Suivi de la concentration de PCP, des ions chlorures et du pH lors de la deuxième série d'activation du sol	67
Figure #15 :	Schéma de l'ensemble des manipulations effectuées sur l'ADN total extrait des mélanges boueux des réacteurs de la deuxième activation	68

Figure #16 : Suivi par PCR des gènes <i>pcpB</i> dans les mélanges boueux des bioréacteurs	70
Figure #17 : PCR compétitif pour quantifier le nombre de copies des gènes <i>pcpB</i> dans le mélange boueux du bioréacteur #1	72
Figure #18 : PCR compétitif pour quantifier le nombre de copies des gènes <i>pcpB</i> dans le mélange boueux du bioréacteur #2	73
Figure #19 : Criblage des clones <i>pcpB</i> sur gel de polyacrylamide de type SSCP	75
Figure #20 : Arbre phylogénétique des séquences déduites en acides aminées des gènes <i>pcpB</i> des clones <i>pcpB</i> et de trois souches bactériennes de référence	81
Figure #21 : Suivi par PCR des gènes de l'ARNr 16S dans les mélanges boueux des bioréacteurs	83
Figure #22 : Suivi de l'évolution de la microflore dans le mélange boueux du bioréacteur #1	84
Figure #23 : Suivi de l'évolution de la microflore dans le mélange boueux du bioréacteur #2	85

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Propriétés physiques et chimiques du pentachlorophénol	6
Tableau 2 :	Exemples de bactéries Gram positif dégradant le PCP	11
Tableau 3 :	Exemples de bactéries Gram négatif dégradant le PCP	14
Tableau 4 :	Caractérisation du sol utilisé pour les activations	37
Tableau 5 :	Concentration de PCP ajoutée dans les réacteurs lors des deux séries d'activation	39
Tableau 6 :	Séquences des amorces	42
Tableau 7 :	Microorganismes possédants les séquences des gènes de l'ARNr 16S et <i>pcpB</i> les plus apparentées aux clones <i>pcpB</i> et 16S de la première activation	65
Tableau 8 :	Microorganismes possédants les séquences des gènes <i>pcpB</i> les plus apparentées aux clones <i>pcpB</i> de la deuxième série d'activation.	76
Tableau 9 :	Alignement des séquences déduites en acides aminés des gènes <i>pcpB</i> des clones <i>pcpB</i> et de trois souches bactériennes de référence	78
Tableau 10 :	Table des distances évolutives entre les différentes séquences déduites en acides aminés des gènes <i>pcpB</i> des clones <i>pcpB</i> et de trois souches bactériennes de référence	79
Tableau 11 :	Microorganismes possédants les séquences des gènes de l'ARNr 16S les plus apparentées aux clones 16S de la deuxième activation	88

Liste des abréviations

A	: adénine
ADN	: acide désoxéribonucléique
ARN	: acide ribonucléique
BrEt	: bromure d'éthidium
BSA	: bovine serum albumine (albumine de sérum bovin)
C	: cytosine
CLHP	: chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)
cPCR	: competitive polymerase chain reaction
CTAB	: cethylmethylammonium bromide
DCH	: dichloro- <i>para</i> -hydroquinone
DCP	: dichlorophénol
DGGE	: denaturing gradient gel electrophoresis
DO	: densité optique
EDTA	: acide éthylènediaminetétraacétique
g	: gramme
G	: guanine
IPTG	: isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
Kb	: kilo paire de base
l	: litre
<i>lac</i>	: gène de la β -galactosidase
M	: molaire
MCH	: monochloro- <i>para</i> -hydroquinone
MCP	: monochlorophénol
MSM	: milieu salin minéral
Na-PCP	: pentachlorophénate de sodium
NPP	: nombre le plus probable
p/v	: poids/volume
pb	: paire de base
PCA	: pentachloroanisole

PCDD	: dibenzo- <i>p</i> -dioxines polychlorées
PCDF	: dibenzo- <i>p</i> -furannes polychlorées
PCP	: pentachlorophénol
PCR	: polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PVPP	: polyvinylpolypyrrolidone
RFLP	: restriction fragment gel electrophoresis
rpm	: rotation par minute
RT-PCR	: reverse transcriptase PCR
SDS	: sodium dodécyl sulfate
sp.	: espèce
SPB	: solution de préservation du bois
SSCP	: single strand conformation polymorphism
T	: tyrosine
TCH	: trichloro- <i>para</i> -hydroquinone
TeCH	: tétrachloro- <i>para</i> -hydroquinone
TEMED	: N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TGGE	: temperature gradient gel electrophoresis
THB	: 1,2,4-trihydroxybenzène
THTCB	: 1,2,4-trihydroxy-3,5,6-trichlorobenzène
UFC	: croissance sur milieu solide d'unité formatrice de colonie
UV	: ultra-violet

Sommaire

Sommaire

Un sol légèrement contaminé au pentachlorophénol (2,3 mg/kg de sol) a été utilisé pour la production de deux types de sols activés en phase boueuse (sol/eau : 10 % poids/volume) en bioréacteurs de 10 litres. Le premier bioréacteur a été activé à l'aide d'une solution alcaline de PCP et le bioréacteur #2 a été activé à l'aide d'un mélange de PCP dissous dans une solution de préservation du bois. Cette technique a permis le développement rapide et spécifique d'une biomasse performante pour la biodégradation du PCP. En effet, la dégradation du PCP a été supérieure à 99% et des taux moyens de dégradation de 21 et 22 mg/l par jour ont été atteints pour les réacteurs #1 et #2 respectivement. Les taux de dégradation maximaux sont passés de 19 à 132 mg/l par jour pour le réacteur #1 et de 41 à 112 mg/l par jour pour le réacteur #2.

Le présent travail a porté sur l'étude de l'évolution de la diversité microbienne lors de l'établissement du processus d'activation du sol. Tout d'abord, les gènes *pcpB*, codant pour la PCP-4-monooxygénase, ont été détectés et suivis dans les bioréacteurs grâce à l'utilisation du PCR en présence d'amorces spécifiques à ces gènes. Cela a permis de constater l'apparition d'un signal témoignant de la présence de ceux-ci dès le 13^{ième} jour du processus d'activation et ce pour les deux bioréacteurs. Les gènes *pcpB* ont aussi été quantifiés. La technique du PCR compétitif a été utilisée et a permis de déduire le nombre de copie de ces gènes dans les échantillons analysés. Les bioréacteurs #1 et #2 contenaient $4,5 \times 10^6$ gènes *pcpB* par ml et 12×10^6 gènes *pcpB* par ml aux jours 40 et 31 respectivement.

Une génothèque des gènes *pcpB* a été construite et plus d'une centaine de clones ont été criblés. Parmi ceux-ci, 16 clones ont été sélectionnés et leur gène *pcpB* séquencé; puis, une analyse phylogénétique a été réalisée. Les séquences des gènes *pcpB* de 12 de ces clones étaient très similaires à la séquence du gène *pcpB* de la souche *Sphingomonas* sp. UG30; alors que les 4 autres séquences étaient similaires aux séquences des gènes *pcpB* des souches *S. flava* et *S. chlorophenolica*. Ces trois microorganismes sont reconnus pour leur capacité de biodégradation du pentachlorophénol. L'analyse phylogénétique a permis de découvrir un groupe de trois séquences des gènes *pcpB* très éloignées génétiquement des bactéries de référence ci-haut mentionnées.

Le suivi de la microflore totale a été effectué via l'utilisation du PCR en présence d'amorces universelles pour les gènes de l'ARN 16S ribosomal des eubactéries. La méthode SSCP a été employée pour visualiser l'évolution de la diversité microbienne dans les bioréacteurs pendant les 80 jours du processus d'activation du sol. Dans le cas du bioréacteur #1, cette technique a réussi à démontrer visuellement des changements dans la microflore, à savoir une diminution de la diversité totale occasionnée par le développement spécifique d'une biomasse particulière dégradant le PCP. Dans le cas du bioréacteurs #2, la diversité est restée beaucoup plus complexe.

Une génothèque des gènes de l'ARN 16S ribosomal a été construite et plusieurs centaines de clones ont été criblés. En tout, 14 clones ont été sélectionnés et leurs gènes séquencés. Les séquences des gènes ont été regroupées en trois catégories : 1) 5 séquences étaient similaires aux séquences des gènes de l'ARNr 16S de bactéries provenant d'échantillons de l'environnement; 2) 6 séquences étaient similaires aux séquences des gènes de l'ARNr 16S de bactéries de la famille des *α -Proteobacteria*; et 3) 3 séquences étaient similaires aux séquences des gènes de l'ARNr 16S de bactéries de la famille des *Cytophagales*.

Abstract

Abstract

Two activated soils were generated in a previous work (Becaert et al., 2000), one acclimated with PCP and the second with a wood preservative mixture (WPM) containing several pollutants such as PCP, petroleum hydrocarbons and polychlorinated dioxins and furans. The impact of these compounds on the microbial diversity was studied using molecular approaches. PCR amplification of the 16S rDNA gene sequences was carried out with total DNA extracted from soil samples taken at different time during the acclimation process of each reactor. The composition of these PCR products, reflecting the microbial diversity, was monitored by the single-strand-conformation polymorphism (SSCP) method. Our results showed that the complexity of the SSCP patterns in the PCP reactor decreased significantly during the activation process whereas they remained complex in the WPM reactor. Cloning and sequencing of the 16S PCR products followed by a phylogenic analysis revealed that, in the PCP reactor, most of the clones were related to the genus *Sphingomonas*. These results showed that the activation with PCP resulted in a selection of few microorganisms. Furthermore, Bécaert et al. (2000) also showed the appearance by PCR of *pcpB* sequence, encoding for the PCP-4-monooxygenase in *Sphingomonas* bacteria, during the activation process in both reactors. Cloning and sequencing of PCR amplified *pcpB* sequences revealed that most of the clones were related to *Sphingomonas* sp. strain UG30 *pcpB*. However, three *pcpB* clones were not closely related to the three known *Sphingomonas pcpB* genes.

Introduction

Introduction

L'utilisation du pentachlorophénol en tant qu'agent de conservation du bois remonte au début des années 1930. Ses puissantes propriétés biocide en ont fait un produit qui a été employé massivement dans l'industrie. Cette utilisation abusive s'est manifestée par de sérieux problèmes de contamination du sol et des eaux puisqu'il s'agit d'un composé xénobiotique difficilement biodégradable dans l'environnement. Si bien que le PCP est maintenant sur la liste des contaminants jugés prioritaires par le US Environmental Protection Agency (US EPA). Au Québec, il existe depuis 1988 une politique de réhabilitation des sols contaminés qui implique diverses actions correctrices lorsque la contamination en PCP dépasse une concentration limite appelé critère C.

Malgré que le PCP soit difficilement biodégradable, il est reconnu que certains microorganismes possèdent la capacité de s'y attaquer. Cependant, les conditions nécessaires à la biodégradation du PCP ne sont pas toujours présentes dans les environnements naturels. C'est pourquoi des méthodes de biotraitement se sont développées. Les biotraitement sont des procédés biologiques qui impliquent l'utilisation de microorganismes possédant des capacités de dégradation de polluants, et ils sont effectués dans des conditions favorisant l'activité métabolique de dégradation des polluants par les microorganismes.

Parmi les biotraitement, la technique de production de sol activé a été développée au cours des cinq dernières années et s'avère très efficace. Le but est de produire une biomasse performante pour la biodégradation du PCP dans un laps de temps le plus court possible. Le concept du sol activé repose sur le développement d'un consortium provenant d'une fraction de sol contaminé et possédant l'activité recherchée. Cette biomasse est développée en réacteur par enrichissement sélectif

pour son utilisation subséquente comme inoculum pour le traitement de sol contaminé en biopile.

Lors de l'utilisation d'un biotraitement, il est important de pouvoir détecter la présence et la performance des microorganismes qui effectuent la biodégradation. Les méthodes traditionnelles de suivi des microorganismes nécessitent une étape de culture et ne sont plus appropriées car il est maintenant reconnu que moins de 1% des microorganismes de l'environnement sont cultivables. Des nouvelles approches basées sur la biologie moléculaire se sont donc développées au milieu des années 1980 et proposent l'utilisation des acides nucléiques. Elles permettent d'effectuer la détection, le suivi et l'étude de la diversité microbienne dans l'environnement et dans les biotraitements.

L'utilisation des techniques moléculaires dans les biotraitements permet : 1- d'évaluer la capacité de la flore indigène du site à dégrader les contaminants (détection de gènes cataboliques), 2- de s'assurer du maintien des microorganismes tout au long du biotraitement (suivi des microorganismes dégradeurs), 3- de corréler la disparition des contaminants à un processus biologique (activité métabolique) et 4- de prévenir l'arrêt du biotraitement dû à la disparition des souches impliquées dans la biodégradation (constaté lors du suivi).

Le projet de maîtrise ici présenté avait pour objectif principal l'étude de la diversité microbienne dans un bioprocédé via l'utilisation des méthodes moléculaires. Les objectifs spécifiques ont été d'effectuer la détection, le suivi et la quantification des gènes *pcpB*, codant pour l'enzyme PCP-4-monooxygénase, dans des bioréacteurs contenant un sol activé pour la biodégradation du PCP. Ceci a permis de construire une génothèque et d'effectuer une analyse phylogénétique des gènes *pcpB*. Un autre objectif était d'effectuer le suivi de la microflore totale via les gènes de l'ARN 16S ribosomal et la construction d'une génothèque permettant d'identifier certains microorganismes.

Revue de la littérature

1. Le pentachlorophénol

1.1 Généralités sur le pentachlorophénol

Le pentachlorophénol (PCP) est un xénobiotique de la famille des organochlorés qui a été utilisé massivement comme bactéricide, fongicide, herbicide, algicide, insecticide et molluscicide depuis le début des années 1930. Même s'il est surtout utilisé dans l'industrie du traitement et de la conservation du bois, il possède plusieurs autres applications. Il est employé pour ces propriétés biocides dans certains matériaux de construction, dans les textiles et cuirs, dans la peinture et les adhésifs, etc. (Moos *et al.*, 1983). Il est estimé que la production mondiale de PCP dépasse les 100 000 tonnes annuellement (McAllister *et al.*, 1996). L'utilisation abusive de ce composé versatile mais récalcitrant à la biodégradation (Alexander, 1994) a occasionné de nombreux problèmes de contamination des sols et des eaux un peu partout dans le monde. Si bien que le PCP est maintenant inscrit sur la liste des polluants prioritaires par le U.S. Environmental Protection Agency et par la Communauté Économique Européenne (Wild *et al.*, 1993). Ici au Québec, il existe depuis 1988 une politique de réhabilitation des sols contaminés; faute de normes légales, cette politique implique diverses actions correctrices lorsque la contamination dépasse une concentration limite appelé critère C, qui est de 5 mg/kg pour le PCP (MEF, 1998). Les principales sources de contamination sont les lieux où s'effectue le traitement, l'égouttement et l'entreposage du bois traité ainsi que les déversements accidentels (Bouchard, 1995).

La fabrication du PCP s'effectue par la chloration catalytique du phénol ou par l'hydrolyse de l'hexachlorobenzène. Ces procédés étant peu coûteux favorisent davantage l'utilisation excessive de ce contaminant (Barbeau, 1996). La toxicité du PCP provient du fait qu'il est un découpleur d'électron de la phosphorylation oxydative; il déstabilise la membrane cellulaire, la rendant perméable aux protons, ce qui dissipe le gradient de pH transmembranaire et donc le potentiel électrique de la cellule (Steiert *et al.*, 1987).

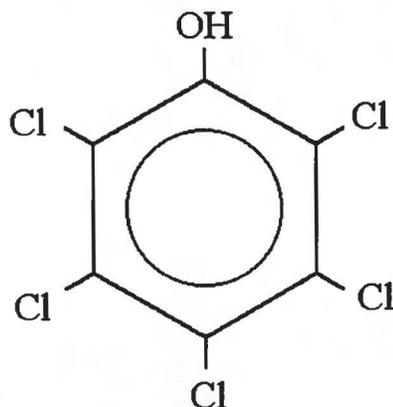
Chez les mammifères, le PCP est corrosif et peut causer des brûlures graves alors qu'une exposition aiguë cause une hausse de la température corporelle, une baisse du taux respiratoire, une pression sanguine élevée, de l'hyperglycémie et une détresse cardiovasculaire. Il n'est pas suspecté être cancérigène, mutagène ou tératogène mais est fortement embryotoxique (EPA, 1978). La structure chimique et les principales propriétés physico-chimiques du PCP sont illustrées à la figure #1 et au tableau #1.

Tableau #1: Propriétés physiques et chimiques du pentachlorophénol

Propriétés	Valeurs
Poids moléculaire	266,36 g
Point de fusion	190°C
Point d'ébullition	293°C
Densité	1,85 g/l
Pression de vapeur (20°C à 100°C)	0,00011-0,12 mm Hg
Constante de dissociation pKa	4,75
Solubilité dans l'eau (20°C à 30°C)	14 à 19 mg/l
Solubilité dans 100 g de méthanol (20°C à 30°C)	57 à 65 g
Coefficient d'adsorption sur la matière organique (log K _{oc})	4,80
Coefficient de partition octanol-eau (log K _{ow})	3,69 ^a

^a : à pH 7,2 et force ionique 0,1M (Nowosielski et Fien, 1998)

Source : Handbook of chemistry and physics, 68th edition, 1987-88, CRC press.

Figure #1: Structure chimique du pentachlorophénol

1.2 La problématique de l'élimination du PCP

Actuellement, l'élimination du PCP demeure un enjeu environnemental majeur. Les procédés de décontamination dits physico-chimiques majoritairement utilisés sont : l'extraction à l'aide de solvants, l'incinération, la déchloration chimique, les traitements électrochimiques, les procédés photochimiques et la destruction sonochimique (Hitchmann *et al.*, 1995). Toutefois, certaines de ces techniques peuvent générer des intermédiaires encore plus toxiques que le PCP et elles occasionnent des coûts élevés; de plus, l'opinion publique ne leur est pas favorable. De nouvelles technologies sont donc les bienvenues et sont même nécessaires. D'ailleurs, depuis plusieurs années, l'intérêt pour l'étude et la recherche de microorganismes possédant des capacités de dégradation de polluants est croissant (Morgan et Watkinson, 1989). En ce sens, l'utilisation de microorganismes pour dégrader des composés polluants est une alternative très prometteuse.

2. La biodégradation du pentachlorophénol

2.1 Généralités sur la biodégradation du PCP

Malgré sa grande toxicité, il existe une variété de microorganismes capables de dégrader le PCP. La biodégradation du PCP peut s'effectuer en conditions aérobies et anaérobies. Pour de plus amples informations sur l'aspect anaérobie, le lecteur est invité à consulter la revue de littérature du mémoire de Martin Chénier (1997) puisque la présente revue ne traite que de l'aspect aérobie.

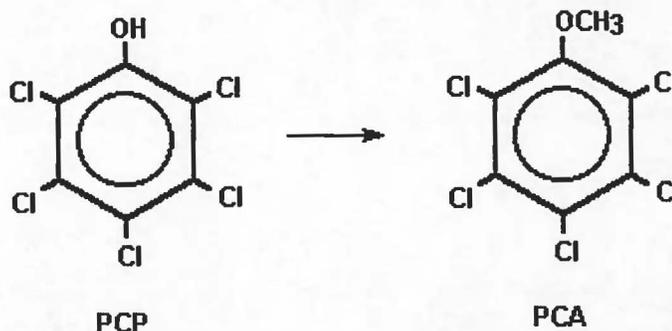
De façon générale, lors de la biodégradation aérobie du PCP, les carbones du cycle aromatique peuvent soit servir au métabolisme cellulaire pour la production de biomasse ou servir à la production d'énergie et être minéralisés en CO₂. Le groupement chlorure est quant à lui libéré sous forme de HCl (Premalatha et Rajakumar, 1994). Le clivage de la liaison carbone-chlore est une étape critique dans la dégradation du PCP car les atomes de chlore nuisent au clivage enzymatique du noyau aromatique. Le PCP peut être déchloré en condition aérobie via 3 types de réactions : 1- la déchloration hydrolytique, il s'agit d'une hydroxylation où une hydrolase remplace l'atome de chlore par un groupement hydroxyle (OH) provenant de l'eau; 2- la déchloration oxygénolytique (oxygénolyse) implique aussi une hydroxylation mais le groupement OH provient de l'oxygène, et la réaction est catalysée par une oxygénase; puis, 3- la déchloration réductrice, qui remplace l'atome de chlore par un atome d'hydrogène (H) à l'aide d'une déshalogénase.

Il est intéressant de noter qu'une abondance de composés halogénés sont produits naturellement par divers organismes marins, des plantes supérieures, des insectes, des bactéries et champignons ainsi que par des mammifères dans des stratégies de défense chimique : dissuasif de la prédation, pesticide, etc. (Gribble, 1994). Les feux de forêt et de brousse et l'activité volcanique sont aussi des sources naturelles mais abiotiques de

composés organohalogénés (Gribble, 1996). De plus, les microorganismes de l'environnement capables de dégrader le PCP se retrouvent habituellement dans des lieux contaminés ou ayant déjà été contaminés par cette substance.

2.2 La biodégradation du PCP par les eucaryotes

Parmi les microorganismes eucaryotes, certains champignons sont connus pour s'attaquer au PCP. Les plus étudiés appartiennent à la famille des Basidiomycètes (moisissures blanches du bois ou "white-rot fungi"). Les souches *Phanerochaete chrysosporium* et *Phanerochaete sordida* ont été particulièrement étudiées (Lamar et Evans, 1993) mais les souches *Trametes versicolor* (Tuomela *et al.*, 1999) et *Trametes hirsuta* ont aussi démontré un potentiel de dégradation du PCP. D'autres familles de champignons possèdent aussi ce potentiel. Il s'agit des Micromycètes comme les Ascomycètes, les levures, les Zygomycètes et les Deutéromycètes (McAllister *et al.*, 1996). Les champignons dégradent le PCP par la production d'enzymes extra-cellulaires non-spécifiques qui transforment le PCP surtout via la O-méthylation. Il s'agit d'une réaction dans laquelle l'hydrogène du groupement hydroxyle (OH) du PCP est substitué par un groupement méthyle (ajout de $-CH_3$ donc formation de $-OCH_3$). Il en résulte quelque fois des intermédiaires qui s'accumulent dans le milieu ou qui peuvent être plus toxiques que le composé de départ. Par exemple, la figure #2 illustre la transformation du PCP en pentachloroanisole (PCA). Ce composé est moins toxique que le PCP, mais plus difficilement biodégradable (Roy-Arcand et Archibald, 1991). Il semblerait que la majorité des champignons dégradent le PCP en des produits plutôt non-transformables (PCA et autres) (McAllister *et al.*, 1996). De ce fait, il apparaît que les champignons en général ne sont pas efficaces pour minéraliser complètement le PCP. Seuls *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete sordida* et *Trametes hirsuta* ont démontré des capacités de minéraliser le PCP, mais en faibles proportions et à des doses minimales (Mileski *et al.*, 1988 et Lamar et Dietrich, 1990).

Figure #2: Transformation du pentachlorophénol en pentachloroanisole

2.3 La biodégradation du PCP par les procaryotes

Plusieurs types de bactéries sont reconnus pour leur capacité de biodégradation du PCP. On les divise en deux groupes: les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif.

2.3.1 La biodégradation du PCP par les bactéries Gram positif

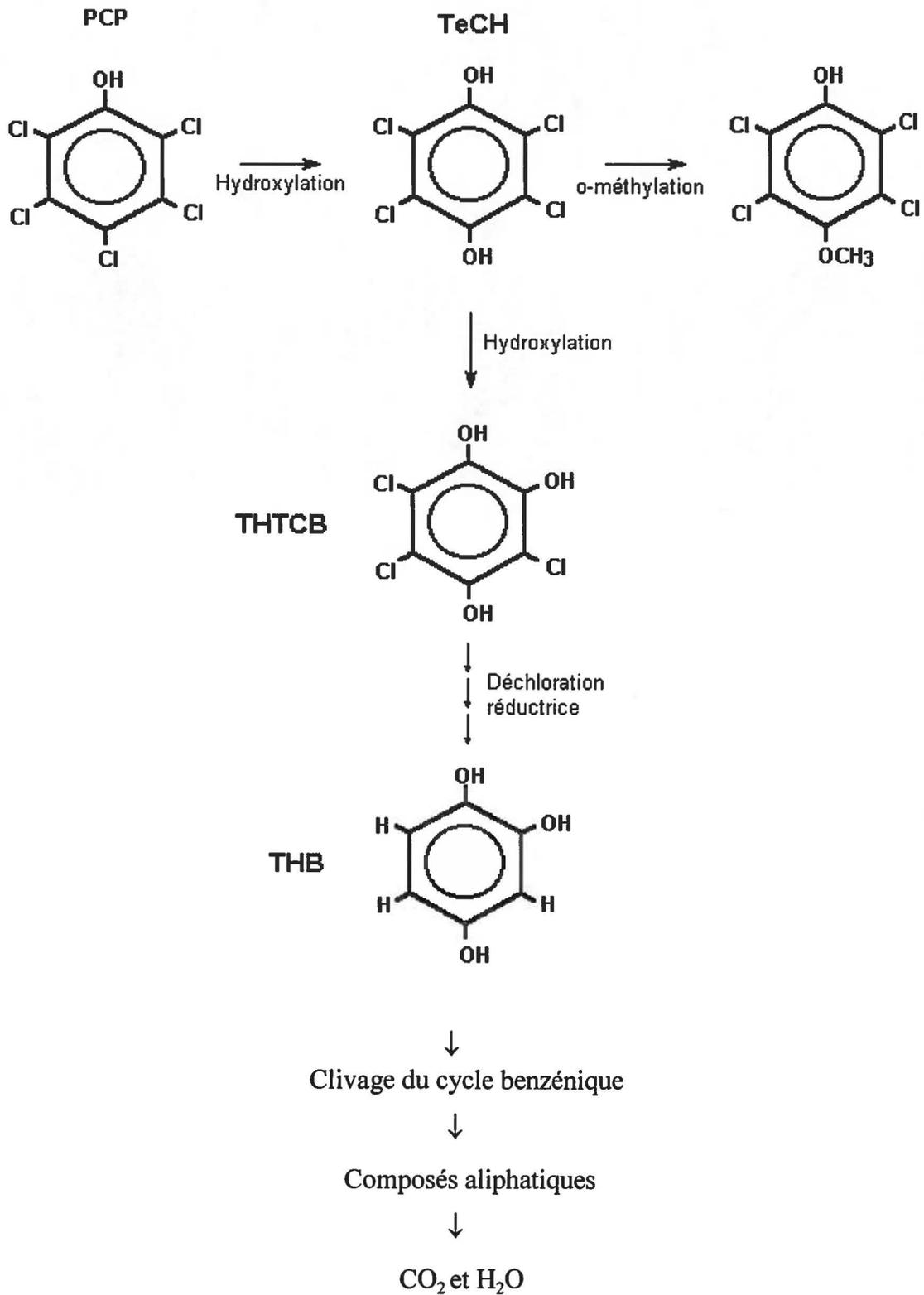
Au sein des bactéries Gram positif, on compte deux familles de bactéries du groupe des Actinomycètes qui sont des dégradeurs du PCP; il s'agit de *Mycobacterium* et *Streptomyces*. Häggblom *et al.* (1988a, et b) ont isolé des souches de *Mycobacterium* capables de dégrader le PCP; il s'agit des souches : *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP-1, CP-2 et CG-1, et la souche *Mycobacterium fortuitum* CG-2. La même équipe a aussi reclassé *Rhodococcus chlorophenolicus* comme étant *Mycobacterium chlorophenolicum* (Häggblom *et al.*, 1994). De leur côté, Golovleva *et al.* (1993) ont observé une activité de dégradation des chlorophénols par la souche *Streptomyces rochei* 303. Le tableau #2 résume ces informations.

Tableau #2: Exemples de bactéries Gram positif dégradant le PCP

Organismes	Particularités	Références
<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i> PCP-1	100% de dégradation en 10,4 jours	Apajalahti <i>et al.</i> , 1986
<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i> CP-2	100% de dégradation en 1 jour, (PCP: 2,7 mg/l)	Häggbloom <i>et al.</i> , 1988b
<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i> CG-1	100% de dégradation en 1 jour, (PCP: 2,7 mg/l)	Häggbloom <i>et al.</i> , 1988b
<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i> CG-2	100% de dégradation en 1 jour, (PCP: 2,7 mg/l)	Häggbloom <i>et al.</i> , 1988b
<i>Streptomyces rochei</i> 303	80% de dégradation en 1 jour (PCP: 20 mg/l)	Golovleva <i>et al.</i> , 1992
<i>Streptomyces rochei</i> 303	100% de dégradation en 0,52 jour (PCP: 53 mg/l)	Golovleva <i>et al.</i> , 1993

Il n'y a pas de voie métabolique connue pour la biodégradation du PCP par les *Streptomyces*. Ce n'est pas le cas pour les bactéries apparentées à *Mycobacterium chlorophenolicum*, dont les voies métaboliques sont assez bien connues (figure #3). Ces dernières transforment le PCP en tetrachlorohydroquinone (TeCH) en substituant l'atome de chlore en position *para* par un groupement hydroxyle provenant soit d'une molécule d'H₂O en conditions anaérobies ou soit d'une molécule d'oxygène en conditions aérobies (Uotila *et al.*, 1992). Cette réaction d'hydroxylation est catalysée par une enzyme de type cytochrome P-450 associée à la membrane (Xun et Orser, 1991), et est induite par la présence de PCP (Apajalahti & Salkinoja-solonen, 1987). Il a ensuite été observé que le TeCH pouvait être soit O-méthylé en tétrachlorométhoxyphénol par un processus constitutif (Häggbloom *et al.*, 1988b), ou subir une deuxième hydroxylation pour former

Figure #3: Biodégradation du PCP par *Mycobacterium chlorophenolicum*



le 1,2,4-trihydroxy-3,5,6-trichlorobenzène (THTCB). Puis, trois déchloration réductrices successives sur le THTCB mènent à la formation du 1,2,4-trihydroxybenzène (THB) (Hägglom *et al.*, 1988b et 1989). Les réactions et les enzymes responsables de la fission de l'anneau aromatique non-chloré ne sont pas connues et sont probablement différentes selon la voie métabolique empruntée. On peut toutefois supposer que l'ouverture du THB est effectuée entre les groupements OH par une 1,2-dioxygénase, comme c'est le cas pour les chlorophénols faiblement chlorés (Chénier, 1997). Par la suite, la dégradation et la minéralisation des sous-produits aliphatiques s'effectuent via les voies biochimiques classiques (Hägglom, 1990).

2.3.2 La biodégradation du PCP par les bactéries Gram négatif

Les bactéries Gram négatif connues capables de dégrader le PCP appartiennent à trois grandes familles : *Sphingomonas*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas*. Il faut noter que récemment, les quatre bactéries suivantes : *Arthrobacter* sp. souche ATCC 33790, *Flavobacterium* sp. souche ATCC 39732, *Pseudomonas* sp. souche RA2 et *Pseudomonas* sp. souche SR3 ont été reclassées dans le genre *Sphingomonas* sur la base d'informations chimiotaxonomiques, physiologiques, structurales et d'après les séquences de leurs gènes de l'ARN 16S ribosomal (ARNr 16S) (Nohynek *et al.*, 1995, Karlson *et al.*, 1995, et Ederer *et al.*, 1997). Le tableau #3 résume les plus récents exemples de biodégradation du PCP par ces bactéries. D'après les résultats de ce tableau et l'ensemble de la littérature consultée, les bactéries Gram négatif sont les microorganismes les plus performants pour la biodégradation du PCP.

La voie métabolique de minéralisation du PCP par les *Sphingomonas* sera vue plus en détails, car elle est une des bases du présent travail, et est illustrée à la figure #4. Mentionnons tout d'abord que la déchloration du PCP est l'étape limitant le processus de dégradation du PCP (Leung *et al.*, 1997). La première étape transforme le PCP en 2, 3, 5, 6-tétrachloro-*p*-hydroquinone (TeCH) sous l'action de l'enzyme PCP-4

Tableau #3 : Exemples de bactéries Gram négatif dégradant le PCP

Organismes	% de dégradation	Références
<i>Sphingomonas</i>		
<i>Sphingomonas flava</i> souche RA-2	96% en 6 jours (PCP: 150 mg/l)	Radehaus et Schmidt, 1992
<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> souche ATCC 33790	99% en <1 jour (PCP: 500 mg/l)	Edgehill, 1994
<i>Sphingomonas flava</i> souche ATCC 39723	100% en <1 jour (PCP: 150 mg/l)	Gu et Korus, 1995
<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> souche SR3	100% en 5 jours (PCP: 0,04 mg/l)	Middaugh <i>et al.</i> , 1993
<i>Sphingomonas</i> souche P5	N.D. (PCP: 45 mg/l)	Rutgers <i>et al.</i> , 1996
<i>Sphingomonas</i> sp. souche UG30	65% en 14 jours (PCP: 600 mg/l)	Cassidy <i>et al.</i> , 1996
<i>Flavabacterium</i>		
sp.	100% en 3,3 jours (PCP: 154 mg/l)	Gonzalez et Hu, 1995
ATCC 53874	N.D. (PCP: 0,1 mg/l)	Wall et Stratton, 1994
<i>Pseudomonas</i>		
<i>aeruginosa</i>	100% en 6 jours (PCP: 800 mg/l)	Premelatha et Rajakumar, 1994
<i>cepacia</i>	N.D. (PCP: 26,6 mg/l)	Karns <i>et al.</i> , 1983
spp.	50% en 12 jours (PCP: 50 mg/l)	Trevors, 1982
<i>resinovorans</i>	N.D.	Seech <i>et al.</i> , 1994

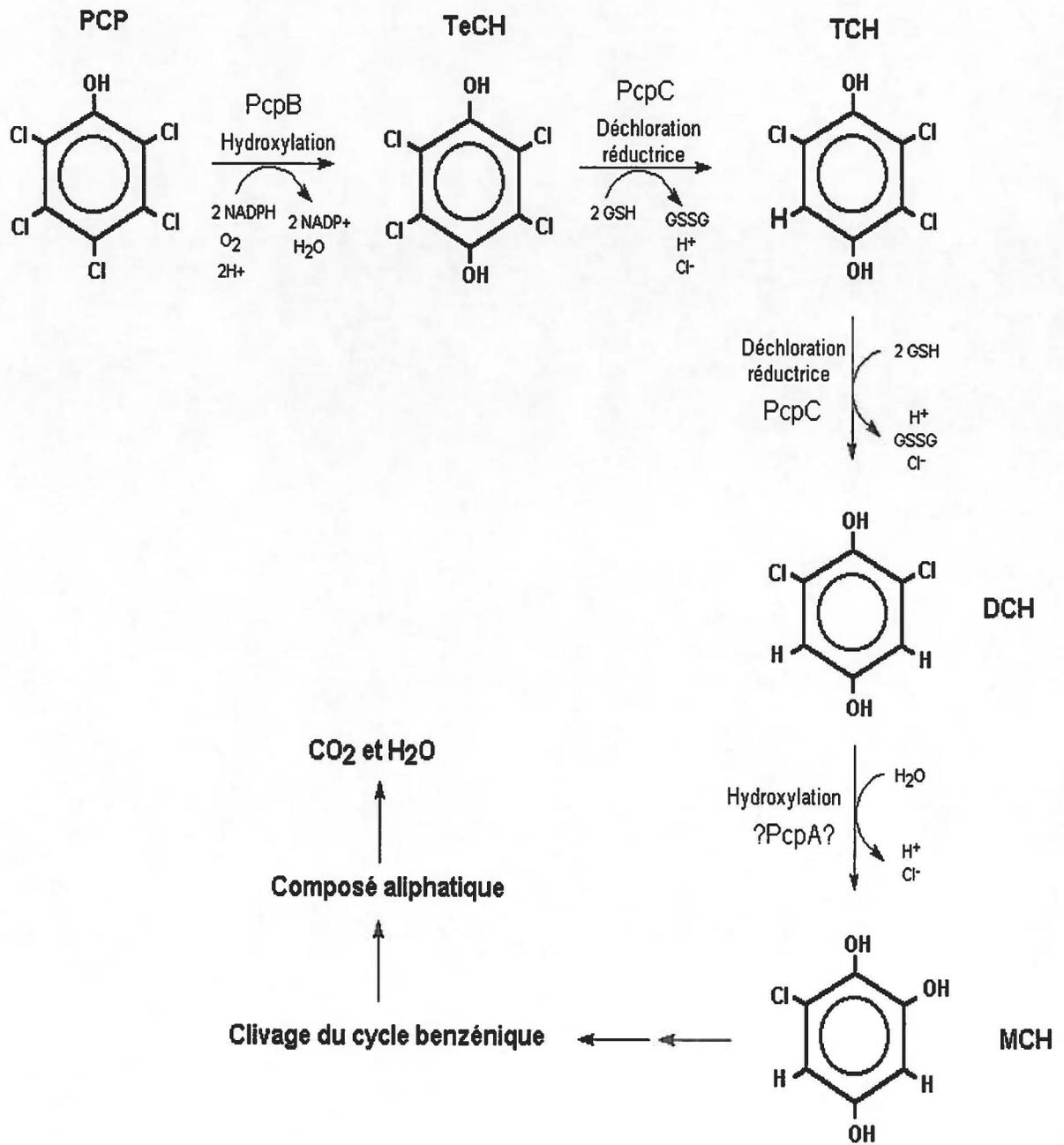
N.D. : non disponible

monooxygénase (PcpB). Cette réaction d'hydroxylation nécessite 2 molécules de NADPH, 1 molécule d'oxygène et 1 molécule de flavine pour remplacer le groupement Cl du PCP en position *para* par un groupement hydroxyle (OH) provenant de l'oxygène. Le PCP induit l'expression du gène *pcpB* codant pour l'enzyme PcpB. Il est aussi un de ses substrats, mais on le qualifie de substrat faible (Xun et Orser, 1991). Cette enzyme a un large spectre de spécificité de substrats, comme c'est le cas pour d'autres monooxygénases (Bertoni *et al.*, 1998). Elle catalyse le relâchement de plusieurs groupements en position *para* du phénol : groupement amino, nitro, cyano, bromo, chloro et iodo, en plus de déshalogéner certains tétrachlorophénols et trichloro-, tribromo- et triiodophénols (Xun *et al.*, 1992b). Le gène *pcpB* a été bien caractérisé chez *S. chlorophenolica*. Il code pour une protéine de 538 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 59 932 Da (Orser *et al.*, 1993a, 1993b). Toutefois, l'enzyme fonctionnelle se présente sous la forme d'un dimère de 132 kDa (Tomasi *et al.*, 1995).

Les deux prochaines étapes sont des déchlorationes réductrices. Elles sont catalysées par l'enzyme tétrachlorohydroquinone déhalogénase réductrice (PcpC) qui est une protéine dépendante de la glutathione pour la catalyse. Ces réactions transforment le TeCH en 2,3,6-trichloro- (TCH) et en 2,6-dichloro-*p*-hydroquinone(DCH) en remplaçant les atomes de chlore par des atomes d'hydrogène. L'enzyme PcpC est codée par un gène ayant 747 nucléotides, correspondant à une protéine de 248 acides aminés et à un poids moléculaire de 28 263 Da. De plus, cette enzyme est exprimée de façon constitutive (Orser *et al.*, 1993b).

Le DCH est ensuite transformé en 6-chloro-1,2,4-trihydroxybenzène (6-CHQ ou monochlorophénol, MCH) par hydroxylation sous l'action de l'enzyme 2,6-dichloro-*p*-hydroquinone chlorohydrolase. Tout porte à croire que cette enzyme est codée par le gène *pcpA*, puisqu'il est observé que des mutants ne possédant pas cette protéine ne sont pas capables de dégrader le PCP plus loin que le DCH (Orser et Lange, 1994, et Chanama et Crawford, 1997).

Figure #4: Biodégradation du PCP par *Sphingomonas chlorophenolica*



source : Fetzner, 1998

La transcription de ce gène exprime une protéine de 30 kDa. Celle-ci possède une activité catalytique induite par le PCP et requiert l'ion Fe^{2+} (Lee et Xun, 1997).

Encore une fois, les réactions de clivage de l'anneau aromatique demeurent méconnues chez les *Sphingomonas*. Deux enzymes 1,2-dioxygénases provenant des souches *Azotobacter* sp. GP1 et *Streptomyces rochei* 303 ont été étudiées à cet effet. Elles sont actives sur le 6-CHQ et sur le 1,2,4-trihydroxybenzène (ou hydroxyquinone HQ). Il en résulte une fission du cycle benzénique. Toutefois, il reste à élucider si le 6-CHQ est transformé en HQ avant la fission ou si les enzymes impliquées sont capables de briser le cycle aromatique sur les deux composés (Latus *et al.*, 1995 et Zaborina *et al.*, 1995).

La dégradation du PCP par *S. chlorophenolica* est médiée par quatre gènes structuraux : *pcpA*, *pcpB*, *pcpC* et *pcpD*, ainsi qu'un gène régulateur : *pcpR*. Les fonctions des gènes *pcpA*, *pcpB* et *pcpC* ont déjà été décrites plus haut. Le gène *pcpD* code quant à lui pour une PCP-4-monooxygénase réductase et le gène *pcpR* code pour un régulateur positif de la transcription du gène *pcpB* (Saboo et Gealt, 1998).

Il a été mentionné à la première section que l'élimination du PCP était problématique. Il a toutefois été proposé une alternative biologique à cette élimination. La deuxième section faisait état de cette alternative biologique en énumérant presque tous les micro-organismes connus à ce jour capables de dégrader le PCP et décrivait comment ils le faisaient. La prochaine section traite des moyens ou procédés (les biotraitements) par lesquels ces microorganismes sont utilisés pour dégrader le PCP d'un sol ou d'un site contaminé.

3. Les biotraitements des sols

3.1 Généralités sur les biotraitements des sols

Les biotraitements sont des procédés de restauration de sites contaminés qui impliquent l'utilisation de microorganismes pour dégrader des substances organiques polluantes. Ce type de technologie est en plein essor depuis la fin des années 1980 et est de plus en plus utilisé à la place des traditionnelles méthodes physico-chimiques et thermiques (Comeau, 1998). Le principe vise l'amélioration des conditions environnementales des sols à traiter pour favoriser la dégradation des contaminants par la microflore indigène.

Les biotraitements des sols peuvent être divisés en deux catégories : *in situ* et *ex situ*. Les biotraitements *in situ* s'effectuent sur place, le sol n'étant pas déplacé pour être traité et des amendements et des nutriments sont fournis directement sur le site à traiter. Le sol peut être retourné (labouré) et oxygéné (ajout de peroxyde d'hydrogène). Les méthodes *ex situ* impliquent quant à elles l'excavation du sol contaminé. Le traitement peut être fait près des lieux ou dans un centre spécialisé via diverses techniques comme les biopiles, les bioréacteurs, etc (Déziel, 1997). Il existe deux approches en ce qui a trait à ces deux catégories de biorestauration, il s'agit de la biostimulation et la bioaugmentation. Ces concepts seront détaillés dans les sections qui suivent.

3.2 Biotraitements de sols contaminés par le PCP

Il existe plusieurs exemples dans la littérature de biotraitements de sol contaminé au PCP. Ceux-ci seront présentés en deux catégories : les exemples de biotraitements via la biostimulation et via la bioaugmentation. Il est bon de savoir comme référence que selon l'annexe 2, (les critères génériques pour les sols et pour les eaux souterraines) de la politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés du

Ministère de l'environnement et de la faune du Québec, il est nécessaire que des actions correctrices soient entreprises lorsque la contamination du sol au PCP dépasse le critère C, soit 5 mg/kg de matière sèche. À titre indicatif, le critère B est de 0,5 mg/kg et le critère A de moins de 0,1 mg/kg.

3.2.1 Biotraitement par la biostimulation

La biostimulation est impliquée l'addition de nutriments et la modification de divers paramètres afin d'optimiser l'activité de dégradation de la microflore indigène du sol. L'aération, l'arrosage, l'ajustement du pH, de la température, de la texture et du potentiel d'oxydo-réduction du sol et l'ajout de nutriments ou de co-substrats sont des exemples de modifications afin de stimuler la biodégradation (Alexander, 1994). Les exemples qui suivent démontrent l'utilisation de la biostimulation pour bio-restaurer des sols contaminés au PCP.

Huling *et al.* (1995) ont effectué un traitement *in situ* par biostimulation en utilisant la méthode de labour («land farming») à l'échelle terrain. Les unités de traitements étaient d'un acre et étaient labourées et arrosées d'une solution de nutriments. Les résultats ont démontré une réduction de 60% de la concentration du PCP en 60 jours, passant de 115 mg/kg à 46 mg/kg. Après plus de 14 mois, la concentration de PCP était descendue à 17 mg/kg.

3.2.2 Biotraitement par la bioaugmentation

La bioaugmentation réfère à l'addition de microorganismes dans le sol à décontaminer. Cette approche peut s'avérer nécessaire dans des cas où : 1) le contaminant est trop toxique pour la flore indigène; 2) celui-ci est présent en concentration trop élevée pour permettre une bonne activité microbienne; ou 3) le sol en question ne possède pas de flore indigène capable de dégrader le polluant (Alexander, 1994). La bioaugmentation

peut se faire à l'aide d'inoculum sous forme de souches pures ou mixtes. Celles-ci peuvent être encapsulées, immobilisées ou acclimatées au polluant avant leur introduction dans le sol contaminé.

Voici des exemples de biorestauration de sol contaminé au PCP par la bioaugmentation avec des microorganismes. Colores *et al.*, (1995) ont utilisé la souche *Sphingomonas* sp. RA2, qu'ils avaient isolés d'un site contaminé au PCP, pour inoculer un sol fortement contaminé au PCP. Ces expériences, à l'échelle laboratoire, ont permis de conclure que cette souche était capable de minéraliser le PCP jusqu'à une concentration de 1,2 mg de PCP par gramme de sol (1200 ppm). À cette concentration, 79% du PCP a été minéralisé en moins de 200 jours, alors qu'à 300 ou 600 ppm, il a été minéralisé à 90% en moins de 60 jours. Des essais à l'échelle laboratoire et terrain ont été effectués avec la souche *Mycobacterium chlorophenolicum* CP-2 par l'équipe de Karlson *et al.* (1995). Ils ont étudié les effets du niveau d'inoculum, de l'immobilisation des cellules et la dynamique de la population bactérienne dégradant le PCP. Les résultats ont démontré que l'immobilisation des cellules sur de la mousse de polyuréthane stimule le taux de biodégradation en plus d'améliorer la survie à long terme de l'inoculum. Une étude récente (Tuomela *et al.*, 1999) fait état de la biorestauration d'un sol contaminé au PCP par bioaugmentation avec le champignon *Trametes versicolor*. Celui-ci a minéralisé seulement 29% des 200 mg de PCP par kg de sol.

Il existe aussi de plus en plus d'exemples de biorestauration combinants les deux types d'approches. Il y a d'abord biostimulation d'une flore microbienne, permettant aux microorganismes de s'acclimater au contaminant tout en augmentant les performances de dégradation. Ensuite, cette flore activée sert d'inoculum pour bioaugmenter un sol contaminé. La période d'acclimatation est très importante dans les procédés de biodégradation de composés organiques récalcitrants. C'est une période qui peut permettre entre autre l'induction des enzymes de la voie métabolique ou l'adaptation des microorganismes aux toxines et inhibiteurs présents dans le milieu. De plus, ce laps de

temps permet le développement d'une bonne biomasse dégradant le polluant (Bécaert, 1999).

Voici un premier exemple d'application de cette méthode. La souche *Flavobacterium* sp. a été utilisée par Gonzalez et Hu (1995) pour inoculer des bioréacteurs contenant diverses concentrations de PCP : 1, 22, 50, 99, 154 mg/l. La souche a été préalablement exposée à 50 mg/l de PCP pour 4 heures. Les effets de la concentration de PCP sur la viabilité des cellules et sur la dégradation du PCP ont été étudiés sur une période de 80 heures. Ils ont conclu qu'il y a diminution de la viabilité des bactéries dans les bioréacteurs ayant une concentration en PCP supérieure à celle utilisée lors de l'induction des cellules, c'est à dire supérieur à 50 mg/l. Plutôt que d'utiliser une souche pure, une publication de Laine et Jorgensen (1996) a évalué l'emploi d'un compost de paille et d'un sol décontaminé du PCP en tant qu'inoculum pour restaurer un sol contaminé au PCP. Ils ont aussi comparé l'effet d'acclimater pendant 3 mois les inoculums au PCP avant le traitement. Ils ont trouvé qu'avant l'adaptation au PCP, le compost et le sol décontaminé minéralisaient 0% et 24% du PCP respectivement et qu'après l'acclimatation, les deux inoculums permettaient d'atteindre un taux de minéralisation de 56%.

Un paramètre crucial lorsqu'il est question d'inoculer un sol avec des microorganismes, c'est de s'assurer de leur survie dans leur nouvel environnement. Sur ce sujet, Van Elsas *et al.* (1998) ont recommandé l'utilisation de souches bactériennes isolées du même milieu que celui dans lequel elles seront inoculées. Étant déjà adaptées à ce milieu, elles devraient théoriquement mieux supporter les stress environnementaux. Ou encore mieux, au lieu d'isoler des souches bactériennes spécifiques et de les acclimater au contaminant, il pourrait être avantageux de biostimuler une fraction complète du sol en question. Ce concept introduit bien la prochaine technique, qui biostimule une fraction de sol contaminé pour ensuite l'utiliser comme inoculum pour bioaugmenter le même sol contaminé.

3.2.2.1 Biotraitement par la méthode du sol activé

La méthode du sol activé a pour but de permettre une biodégradation efficace du PCP dans un laps de temps le plus court possible. Le principe est d'utiliser une fraction du sol contaminé contenant une biomasse mixte déjà présente et possédant la capacité de dégrader le contaminant. Cette biomasse est cultivée en bioréacteur en phase boueuse en présence de concentration croissante du contaminant particulier comme seule source de carbone. Ceci a pour but de stimuler spécifiquement la croissance des microorganismes dégradant ce contaminant. La présence de sol est très favorable à la croissance des microorganismes. Il servirait de support à ceux-ci et la surface spécifique élevée des particules de sol favoriserait l'adsorption du contaminant, abaissant sa concentration effective en phase aqueuse (Bécaert, 1999). De plus, le fait d'utiliser la flore indigène et de la cultiver à même son sol d'origine diminue le stress qu'ont à subir les microorganismes lors de leur réintroduction dans le sol (Otte, 1998).

Jusqu'à maintenant, deux types de production de sol activé ont été expérimentés. Le premier type est par alimentation en continue. Otte *et al.* (1994) ont fait la production de sol activé dans un bioréacteur de 15 litres alimenté progressivement de 0 à 900 mg/l en mode continue sur une période de 35 jours. Le taux de dégradation du PCP est passé de 70 à 700 mg/l par jour en 25 jours. Mais la complexité et les coûts associés à ce genre de méthode ont mené au développement du mode d'alimentation par ajouts. Barbeau *et al.* (1997) ont produit un sol activé par des ajouts successifs de concentrations croissantes de PCP (50 à 300 mg/l). Le taux de dégradation du PCP dans ce sol activé a atteint 200 mg/l par jour. Dans la même étude, le sol activé a été utilisé comme inoculum pour bioaugmenter un sol fortement contaminé au PCP. Celui-ci a permis d'abaisser la concentration en PCP de 400 mg/kg à 5 mg/kg en 130 jours. Ces résultats positifs permettent de considérer le traitement de sol très contaminé par bioaugmentation avec du sol activé comme technologie fort prometteuse dans le domaine de la biorestauration (Bécaert, 1999).

4. Étude de la biodiversité dans les biotraitements

4.1 Généralités sur l'étude de la biodiversité

Comme mentionné à la fin du paragraphe 3.2.2, l'efficacité d'un biotraitement impliquant une bioaugmentation dépend beaucoup du devenir des microorganismes suivant leur introduction dans le sol. Selon Häggblom et Valo (1995), la survie des microorganismes est le facteur limitant de la bioaugmentation. C'est donc pourquoi, en plus de toutes les stratégies pour augmenter les chances de survie des populations microbiennes inoculées, il y a de plus en plus de techniques qui se développent pour pouvoir détecter, identifier et suivre le maintien de ces populations après leur introduction dans un biotraitement ou dans l'environnement (Muyzer, 1998). Ces techniques, appliquées aux biotraitements dans le présent travail, sont en fait issues d'un vaste champs d'étude, celui de la biodiversité. Ce dernier chapitre de la revue de littérature aborde la problématique de l'étude de la biodiversité et fait état de plusieurs méthodes couramment employées pour étudier la diversité microbienne.

4.2 La problématique de l'étude de la biodiversité

Pour étudier les microorganismes, il faut posséder un moyen de détecter leur présence. De façon traditionnelle, les microorganismes sont détectés par culture ou isolement sur des milieux de croissance nutritifs ou sélectifs, ce qui permet la croissance de la biomasse ou la sélection de souches spécifiques. Toutefois, ces méthodes traditionnelles posent plusieurs problèmes. Au sein d'une biomasse, il y a des organismes à croissance plus lente dont la présence est masquée par ceux à croissance rapide (Atlas, 1984). De plus, l'isolement et le suivi d'une souche spécifique nécessitent que celle-ci possède un marqueur particulier ou qu'elle croisse sur un milieu sélectif, ce qui n'est pas toujours le cas. Et puis, l'identification ou le suivi de microorganismes spécifiques par les méthodes traditionnelles est basé sur le phénotype, c'est-à-dire sur des critères

morphologiques (apparence des cultures) et métaboliques (expression de gènes pour la synthèse d'enzymes) (Istock *et al.*, 1996). Même si un organisme possède de tels gènes, ceux-ci pourraient s'exprimer à un niveau non-détectable ou ne pas s'exprimer du tout à cause des conditions du milieu, ce qui donnerait des résultats négatifs dans les tests d'identification biochimiques courants (Torsvik *et al.*, 1996). En somme, le problème principal provient du fait que les méthodes traditionnelles sont restreintes à l'étude de la microflore pouvant être cultivée. Et comme il est maintenant reconnu que moins de 1% des microorganismes de l'environnement sont cultivables, il est alors facile de constater que l'étude de la biodiversité par les méthodes traditionnelles n'est pas appropriée et est bien loin de représenter les communautés bactériennes entières (Amann *et al.*, 1995).

4.3 Les méthodes moléculaires

C'est suite à toutes ces contraintes que s'est développée une nouvelle approche basée sur l'utilisation des acides nucléiques pour effectuer la détection, le suivi et l'étude de la diversité des microorganismes dans l'environnement et dans les biotraitements. Cette approche moléculaire s'est développée au milieu des années 1980; ses applications dans les bioprocédés sont en plein développement puisqu'elles sont d'une si grande utilité (Brockman, 1995). Head (1998) et Lévesque (1998) ont bien décrit le rôle de la biologie moléculaire dans l'évaluation de la faisabilité et le suivi d'un projet de biorestoration. L'utilisation des techniques moléculaires dans les bioprocédés permet : 1- d'évaluer la capacité de la flore indigène du site à dégrader les contaminants (détection de gènes cataboliques); 2- de s'assurer du maintien des microorganismes tout au long du biotraitement (suivi des microorganismes dégradeurs); 3- de relier la disparition des contaminants à un processus biologique (activité métabolique); et 4- de prévenir l'arrêt du biotraitement dû à la disparition des souches impliquées dans la biodégradation (constaté lors du suivi).

Les principaux avantages des méthodes moléculaires proviennent tout d'abord du

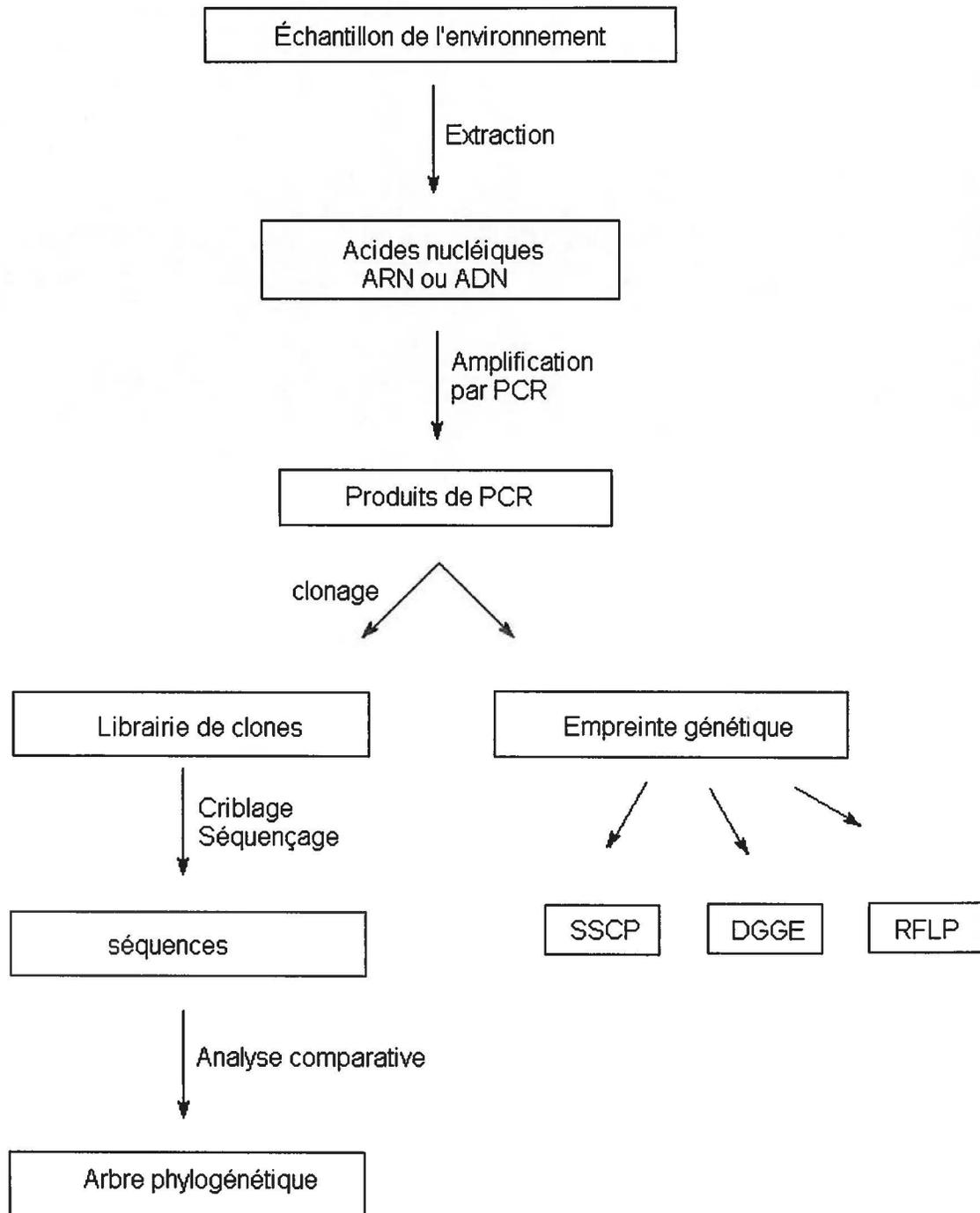
fait que les échantillons sont congelés immédiatement après l'échantillonnage, ce qui prévient les changements dans la structure de la communauté microbienne et dans les activités métaboliques, pouvant survenir quand les échantillons sont cultivés lors d'analyses traditionnelles de laboratoire. De plus, il n'y a plus de limitation dans le nombre d'organismes à analyser (occasionné par l'étape de culture) car les acides nucléiques sont extraits de la biomasse totale présente dans l'échantillon (Brockman, 1995). Cette approche se base sur le génotype plutôt que sur le phénotype, c'est-à-dire le potentiel génétique des microorganismes indépendamment des conditions du milieu ou de l'environnement (Torsvik *et al.*, 1996).

L'utilisation des acides nucléiques (ADN ou ARN) comme base pour l'étude de la microflore permet de détecter des souches spécifiques ou de suivre la biomasse totale via diverses techniques qui seront vues plus en détails dans les paragraphes suivants. La figure #5 permet de visualiser les diverses utilisations des méthodes moléculaires pour l'étude de la biodiversité.

4.3.1 Extraction des acides nucléiques

Malgré que certaines méthodes utilisent les cellules intactes, la majorité des méthodes moléculaires débutent par l'extraction des acides nucléiques. Ceux-ci doivent être suffisamment purs pour ne pas inhiber les étapes subséquentes. Toutefois, l'extraction d'ADN à partir d'échantillon de sols ou de sédiments entraîne la co-extraction d'impuretés telles les acides humiques, les particules d'argile ou des métaux (Romanowski *et al.*, 1992). Pour diminuer cette co-extraction, Holben *et al.* (1988) ont été parmi les premiers à ajouter du polyvinylpyrrolidone (PVPP), un polymère insoluble, au tampon d'extraction. Le PVPP est en effet reconnu pour adsorber les composés phénolés tel que les acides humiques. D'autres substances sont aussi utilisées, comme le bromure de cetyltriméthylammonium ou CTAB (Zhou *et al.*, 1996) et la poudre de lait écrémé (Volossiuk *et al.*, 1995) dont chacun à ses avantages et inconvénients. Même en utilisant

Figure #5: Utilisation des méthodes moléculaires



ces substances, les réactions subséquentes peuvent être inhibées, surtout lorsque beaucoup d'ADN est nécessaire pour hausser le seuil de détection, ce qui augmente du même coup la concentration des inhibiteurs. Il faut alors balancer les effets d'inhibition et la quantité d'ADN utilisé en diluant jusqu'à une concentration optimum (Lévesque, 1998).

4.3.2 Amplification par PCR

Dans toutes les méthodes moléculaires décrites ci-dessous, les acides nucléiques sont amplifiés par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) après avoir été extraits. Le principe du PCR consiste à générer des copies multiples d'une séquence d'ADN donnée à l'aide de deux amorces. Celles-ci sont des oligonucléotides qui s'hybrident à des séquences hautement similaires sur l'ADN cible (ici l'ADN extrait du sol) et délimitent le fragment à amplifier. Cette amplification de type exponentielle permet de détecter des séquences nucléotidiques présentes en faible quantité parmi un échantillon hétérogène d'ADN, conférant à cette technique une grande sensibilité (Steffan et Atlas, 1991). Pour augmenter d'avantage la sensibilité et la spécificité, un PCR interne peut être effectué. Ceci consiste à amplifier (avec des amorces dites internes) un fragment plus petit compris à l'intérieur de l'amplicon obtenu lors du premier PCR. La spécificité de l'amplification est aussi augmentée puisqu'il y a diminution de l'hybridation non-spécifique des amorces qui pourrait survenir lors du premier PCR (Steffan et Atlas, 1991).

L'amplification par PCR peut permettre de détecter des souches spécifiques (via un gène spécifique) dans le sol ou dans les biotraitements. Des amorces spécifiques sont alors utilisées lors de l'amplification. Celles-ci s'hybrident à des séquences d'un gène propre à la souche étudiée et seul ce fragment du gène visé sera amplifié et détecté. Par exemple, Herrick *et al.* (1993) ont utilisé cette technique pour détecter la présence du gène *nahA* impliqué dans le catabolisme du naphthalène dans un site contaminé avec ce composé.

4.3.2.1 Techniques quantitatives par PCR

La nature exponentielle du procédé de PCR fait qu'il est difficile d'utiliser cette technique de façon quantitative (Ferre, 1992). Différentes stratégies ont été envisagées pour arriver à une interprétation quantitative des résultats. Il existe de nombreuses approches pour effectuer un PCR quantitatif. L'une d'elles est basée sur l'analyse du nombre le plus probable (NPP-PCR). Dans cette approche, le PCR est effectué sur plusieurs réplicats de différentes dilutions de l'ADN cible (Lee *et al.*, 1996). La quantité d'ADN est calculée sur une base statistique en fonction des résultats négatifs obtenus par rapport au nombre total d'échantillons. Leung *et al.* (1997) ont utilisé cette méthode pour quantifier dans le sol la souche *Sphingomonas* sp. UG30, qui est reconnue pour dégrader le pentachlorophénol. Cette technique nécessite toutefois la manipulation d'une grande quantité d'échantillons et ne tient pas compte des effets de l'amplification différentielle entre les échantillons. Une autre méthode, utilisée par Romanoski *et al.* (1993), amplifie l'ADN cible et en parallèle des standards externes en diverses dilutions. La quantité d'ADN est mesurée à l'aide des courbes de standards externes. Mais encore une fois, on ne tient pas compte des variations d'amplification entre les échantillons et le standard externe qui pourraient survenir.

4.3.2.2 Le PCR compétitif

Le PCR compétitif permet de contourner les inconvénients des autres méthodes quantitatives. Le principe consiste à co-amplifier l'ADN cible en présence d'une quantité connue d'un standard interne (Galliland *et al.*, 1990). Ce standard doit idéalement être amplifié avec les mêmes amorces que l'ADN cible. De plus, sa séquence doit être à peu près de la même longueur et le plus similaire possible avec l'ADN cible; tout ceci pour que les amplifications du standard interne et de l'ADN cible soient affectées de la même manière (Lee *et al.*, 1996). Le nombre initial de molécules d'ADN cible est déterminé lorsqu'il y a équivalence entre le produit de PCR de l'ADN cible et celui du standard

interne (SI).

L'étape clef du PCR quantitatif est la construction d'un SI adéquat. Il existe plusieurs approches pour construire un SI. À partir d'un fragment d'ADN du produit de PCR de l'ADN cible, on peut procéder par mutagenèse dirigée ou utiliser un transposon afin d'ajouter ou de déléter quelques nucléotides pour créer un site de restriction unique (Galliland *et al.*, 1990). Le SI ainsi produit peut se distinguer de l'ADN cible suite à une digestion au site de restriction unique ajouté. Lévesque *et al.* (1998) ont utilisé cette technique pour la quantification de la souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 et de la souche 6 apparentée au genre *Clostridium* dans une population bactérienne mixte. Une autre approche consiste à modifier la longueur du fragment d'ADN cible soit en effectuant un PCR à une température d'hybridation moins spécifique ou encore en l'allongeant ou le raccourcissant par insertion ou délétion de séquence. Après migration, la distinction entre l'ADN cible et l'ADN du SI est directe et ne nécessite pas de digestion préalable puisque les fragments sont de longueurs différentes. Pour quantifier la souche *Pseudomonas* sp. B13 (FR1), Leser (1995) a utilisé cette méthode et a généré un standard interne de 588 pb suite à l'enlèvement de 124 nucléotides d'un fragment d'ADN cible de 712 pb.

4.3.3 Empreinte génétique des communautés microbiennes

Il a été mentionné que le PCR peut permettre la détection de souches spécifiques et la quantification de gène. Cette technologie permet aussi l'étude de communautés microbiennes mixtes. Il est alors question d'empreinte génétique ("fingerprinting"). Ces techniques donnent un patron ou un profil de la diversité génétique totale d'une population microbienne et sont basées sur la séparation physique des acides nucléiques suite à une amplification par PCR des gènes de l'ARNr 16S (Stahl et Capman, 1994). L'intérêt grandissant pour l'utilisation de ces techniques tient au fait qu'elles sont rapides et relativement faciles à accomplir. Encore plus important, elles permettent l'analyse

simultanée de plusieurs échantillons, ce qui rend possible la comparaison de communautés microbiennes issues de différents milieux, ou encore l'évolution de celles-ci dans le temps (Muyzer, 1998).

Pour la détection de l'ensemble d'une population bactérienne, l'amplification par PCR des gènes de l'ARNr 16S s'accomplit en présence d'amorces dites universelles. Dans ce cas-ci, ce n'est pas une séquence propre à une souche donnée qui sera amplifiée mais une séquence d'ADN présente dans toutes les eubactéries contenues dans l'échantillon car les gènes l'ARNr 16S sont communs à toutes. Ces gènes sont d'excellents marqueurs moléculaires car ils peuvent posséder des régions spécifiques à une espèce et d'autres communes à toutes les eubactéries (Pace, 1996). Les particularités des gènes de l'ARNr 16S permettent autant la construction d'amorces spécifiques que d'amorces universelles. D'une longueur approximative de 1500 paires de bases, ils contiennent suffisamment d'information génétique pour des analyses phylogéniques, et des banques de données sont bien établies (Muyzer, 1998).

Les applications de cette méthode à l'étude de la biodiversité seront vues dans les deux prochaines sections. Les deux méthodes présentées ci-dessous débutent par l'extraction de l'ADN total de l'échantillon et par une amplification par PCR des gènes de l'ARNr 16S. Elles diffèrent par le moyen utilisé pour effectuer la séparation physique des amplicons résultants. L'amplification par PCR des gènes de l'ARNr 16S à partir de l'ADN total extrait d'une multitude de microorganismes, comme tel est le cas dans le sol ou les biotraitements, génère un amplicon d'une même longueur. Toutefois, cet amplicon est composé d'une multitude de fragments de séquences différentes représentant la diversité microbienne. Les deux prochaines méthodes décrites permettent de visualiser cette diversité par le comportement des ADN simples brins séparés par électrophorèse.

4.3.3.1 Électrophorèse sur Gel contenant un Gradient Dénaturant (DGGE)

Pour cette technique, l'amplification se fait à l'aide de deux amorces dont l'une d'elles contient à son extrémité 5' une séquence supplémentaire d'environ 20 bases G et C (pince GC). Les amplicons résultants sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant un gradient d'urée et de formamide dénaturant l'ADN (Muyzer, 1998). Il peut aussi s'agir d'un gradient dénaturant de température dans le cas de la méthode Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) (Riesner *et al.*, 1991).

Le pourcentage des bases G/C contenu dans les séquences des différents fragments d'ADN influence la dénaturation. De plus, la pince GC empêche les deux brins d'ADN de se séparer complètement lors de la dénaturation. Les deux brins d'ADN séparés, mais retenus par la pince GC, vont migrer beaucoup plus lentement qu'un ADN non-dénaturé. Par conséquent, les fragments de différentes séquences vont migrer à différentes positions dans le gel. La méthode DGGE a de multiples applications, en voici les principales : 1- l'étude de la diversité génétique des communautés microbiennes; 2- l'étude de la dynamique des populations dans les communautés microbiennes; 3- l'étude de l'expression de gène dans des populations mixtes; 4- le suivi de l'enrichissement des cultures et la caractérisation des souches en présence; et 5- le criblage d'une banque de clones (Muyzer, 1998).

Duarte *et al.* (1998) ont étudié la diversité des communautés bactériennes indigènes d'un sol par cette méthode et ont comparé les résultats obtenus en utilisant de l'ADN (diversité génétique) et de l'ARN (diversité dans l'activité métabolique) extrait du sol. Les profils générés montraient des différences, suggérant des contenus variables en ARN selon les statuts physiologiques des bactéries dans le sol. Les travaux d'Heuer *et al.* (1997) sont un autre exemple d'utilisation de cette méthode. Ils ont analysé les changements dans des communautés d'actinomycètes dans différents environnements en utilisant des amorces spécifiques pour les gènes de l'ARNr 16S des actinomycètes et pour

les gènes de l'ARNr 16S des eubactéries.

Cette technique très versatile a tout de même ses limites : 1-seule la séparation de fragments relativement courts (jusqu'à 500 paires de bases) est possible (Myers *et al.*, 1985); 2- il n'est pas toujours possible de séparer des fragments qui diffèrent quelque peu dans leur séquence (Vallaey *et al.*, 1997); 3-la reproductibilité et la comparaison entre différents gels peuvent être problématiques s'il n'y a pas standardisation et précautions des manipulations; et 4-la co-migration de bandes et la formation d'hétéroduplexes peuvent rendre difficile l'interprétation du profil de la complexité d'une communauté (Ferris et Ward, 1997).

4.3.3.2 Le polymorphisme de conformation des ADN simples brins (SSCP)

Cette technique d'empreinte génétique est basée sur la dénaturation des produits de PCR, produisant des ADN simples brins, suivi d'une migration électrophorétique sur un gel non-dénaturant de polyacrylamide. De façon générale, la mobilité électrophorétique d'un fragment d'ADN double brin dans un gel est fonction de sa taille et de sa forme (compacte ou relâchée). En condition non-dénaturante, les ADN simples brins se replient en une structure tridimensionnelle causée par les interactions intramoléculaires déterminées par leur séquence primaire en acides nucléiques (Muyzer, 1998). La séparation des fragments de PCR de même longueur, devenus simples brins par dénaturation, sera donc fonction de leur séquence primaire. Le haut pouvoir de résolution d'un gel d'acrylamide est tel qu'il permet de détecter les changements conformationnels causés par la substitution de quelques bases dans une séquence de plusieurs centaines de bases. Cette méthode a d'ailleurs été utilisée à ses débuts pour détecter ou sélectionner des mutations dans les gènes potentiellement impliqués dans des maladies héréditaires ou dans des cancers (Hayashi, 1991). Lors d'analyses d'échantillons plus complexes, comme des échantillons de l'environnement, le profil électrophorétique peut générer plusieurs fragments spécifiques à l'échantillon étudié.

L'équipe de Lee *et al.* (1996) ont étudié la structure et la diversité de communautés bactériennes dans l'écosystème naturel d'un lac oligotrophique et d'un étang eutrophique par la méthode SSCP. Ils ont démontré que le profil électrophorétique par SSCP du produit de PCR des gènes de l'ARNr 16S d'une souche bactérienne particulière génère un patron de bandes qui lui est propre et distinct du patron de bandes d'autres souches. Ainsi, ils ont été en mesure de calculer la diversité relative de cette souche au sein de communautés bactériennes. Leur méthode leur a aussi permis de détecter une population bactérienne représentant moins de 1,5% de la communauté.

4.3.4 Génothèque des gènes de l'ARN 16S ribosomal

La production d'une génothèque des gènes de l'ARNr 16S, obtenus à partir de l'amplification d'ADN extrait d'un environnement complexe comme le sol ou un biotraitement, peut être un autre moyen, comme les méthodes d'empreinte génétique, pour étudier la diversité des communautés bactériennes (Crozier *et al.*, 1999). Comme dans le cas des empreintes génétiques, la première étape est une amplification par PCR des gènes de l'ARNr 16S. Les produits de PCR sont ensuite clonés pour construire une génothèque (ou banque de gènes) des gènes de l'ARNr 16S. Il y a alors criblage et sélection des clones représentatifs pour leur séquençage. Les séquences des gènes de l'ARNr 16S sont ensuite comparées avec celles des banques de données (alignement des séquences). Ainsi, une forte homologie entre une séquence d'un gène de l'ARNr 16S étudiée et certaines séquences contenues dans les banques de données suggère une parenté rapprochée entre les microorganismes respectifs.

La production d'une génothèque et la caractérisation de certains de ses clones ont beaucoup été utilisées pour évaluer la biodiversité totale dans divers milieux naturels. Borneman et Triplett (1997) l'ont appliqué à l'étude des populations microbiennes des sols de zones de déforestation en Amazonie. Par l'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S, ils ont constaté des changements de populations associés au phénomène de

la déforestation en plus de noter la présence de microorganismes peu communs. Crozier *et al.* (1999) ont pu estimer la biodiversité du sous-sol (stratum) de la région d'Oklo au Gabon. Il s'agit du seul lieu où il existe encore un phénomène de réacteur nucléaire naturel. La présence du réacteur est due à la concentration en minerai d'uranium et il a été formé par la sédimentation il y a plusieurs milliard d'années. Ils ont pu analyser plus de 40 gènes de l'ARNr 16S différents dont 24 avaient une forte homologie avec des séquences contenues dans des banques de données. C'est ainsi qu'ils ont pu savoir quels microorganismes leur sol pouvait contenir.

La biodiversité dans divers procédés de biotraitement a aussi été évaluée à l'aide d'analyse de génothèque des gènes de l'ARNr 16S. Snaidr *et al.* (1997) ont étudié la structure de la communauté bactérienne contenue dans des boues activées issues d'une usine de traitement des eaux usées. L'analyse phylogénétique des séquences des gènes de l'ARNr 16S a permis de grouper 52% des clones dans la classe des β -*Proteobacteria*, 19% dans les γ -*Proteobacteria* et 12% et 6% dans les ϵ - et α -*Proteobacteria* respectivement. Godon *et al.* (1997) ont procédé de la même façon pour déterminer la diversité microbienne dans un réacteur anaérobie. La majorité des 579 séquences des gènes de l'ARNr 16S analysées ont été classée dans trois grands phylums : 1) 34% dans la classe des bactéries Gram positif avec faible contenu en G+C; 2) 26% parmi les *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*; et 3) 17% dans la classe des *Proteobacteria*.

4.3.5. Analyse phylogénétique

Il y a aussi d'autres applications à la caractérisation des gènes de l'ARNr 16S. Il est possible d'utiliser ces analyses pour tenter d'identifier une souche nouvellement isolée en établissant les relations phylogéniques entre la séquence des gènes de l'ARNr 16S de cette souche et celles contenues dans les banques de données. La phylogénétique est la branche de la génétique traitant des modifications d'ordre génétique qui se produisent au sein d'une espèce. L'analyse comparative des séquences des gènes de l'ARNr 16S a

d'abord permis, vers la fin des années 1970, une première compréhension phylogénique des microorganismes, c'est-à-dire le mode de formation des espèces et le développement des espèces au cours de l'évolution (Woese, 1987). Ceci a mené l'équipe de Fox *et al.* (1980) à proposer la phylogénie des procaryotes. Puis, Woese (1987) et Woese *et al.* (1990) ont proposé un nouveau modèle pour la classification des êtres vivants, ceux-ci étant divisés dans trois grands règnes : les eucaryotes, les archaebactéries et les eubactéries.

Actuellement, elle permet entre autre d'explorer la diversité des populations microbiennes environnementales (Stahl, 1995). En plus d'être un outil très puissant pour l'étude de la biodiversité des communautés naturelles (Semenova et Kuznedelov, 1998), ces analyses sont applicables à l'étude de consortiums ou de populations bactériennes spécifiques ou encore d'une souche particulière (Scheinert *et al.*, 1996). C'est ce que Bouchard *et al.* (1996) ont fait avec la souche PCP-1, impliquée dans la déshalogénéation des chlorophénols, dont le PCP. Les gènes de l'ARNr 16S de cette souche possèdent 95% d'homologie avec celui de la souche *Desulfitobacterium dehalogenans*, aussi impliquée dans la déshalogénéation des produits chlorés. À l'aide d'analyse phylogénétique et d'autres critères, cette souche représentait une nouvelle espèce qui était apparentée au genre *Desulfitobacterium* et a été nommée *Desulfitobacterium frappieri*.

L'enjeu majeur de l'étude de la biodiversité provient de l'abondance de diversité de microorganismes présents dans les échantillons de l'environnement. Avec plus de 10^8 - 10^9 bactéries par gramme de sol, il faudrait analyser plus de 10^4 - 10^6 clones pour détecter un seul représentant d'une population minoritaire (10^2 - 10^4 cellules par gramme de sol). Ceci amène à introduire des techniques qui visent à diminuer la diversité des échantillons avant le PCR, ce qui contournerait une partie du problème, et celles-ci seront décrites à la section discussion (Muyzer, 1998).

Matériel et Méthodes

1. Production de sol activé

Les bioréacteurs étaient des cuves de 10 litres en acier inoxydable, munis de deux agitateurs et d'un aérateur fait de tubes en acier inoxydable perforés. L'air a été humidifié avant d'être injecté dans les réacteurs et le débit a été contrôlé selon les besoins de la flore bactérienne, en mesurant l'oxygène dissous. Les réacteurs étaient fermés par un couvercle et un port d'échantillonnage ainsi qu'une sortie d'air étaient situés sur ce couvercle. L'air sortant des réacteurs a été acheminé vers un condenseur en verre afin de limiter l'évaporation (figure #6). Le mélange sol/eau ou phase boueuse (10% poids/volume) était composé de 8 litres de milieu salin minéral (MSM : 1M de : NH_4SO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaNO_3 et de traces de métaux, Greer *et al*, 1990) et de 800 grammes de sol contaminé au PCP à 2,3 mg/kg (tableau #4). Le sol provenait du centre de traitement de sol contaminé B.S.L. inc. de St-Anaclet. Il a été tamisé à 2 mm et conservé à 4°C dans des contenants fermés jusqu'à son utilisation.

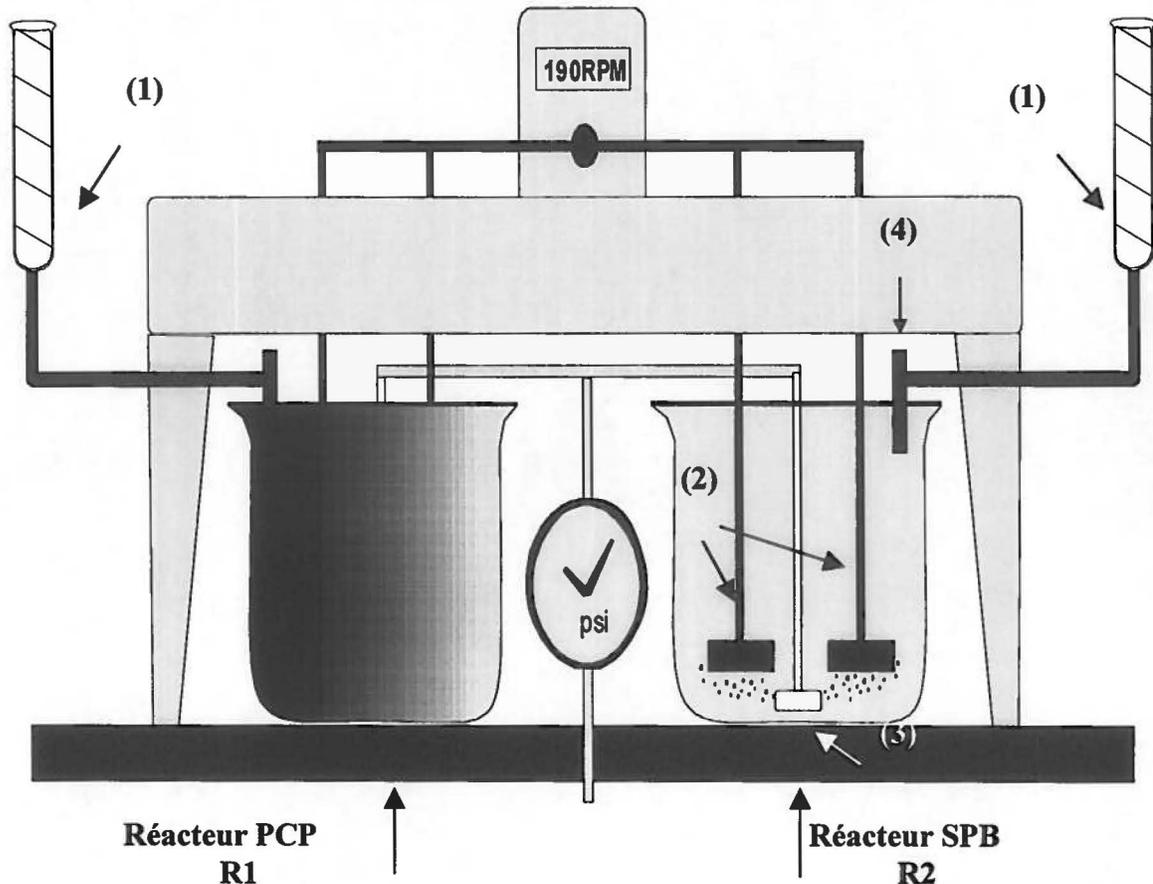
Tableau #4: Caractérisation du sol utilisé pour les activations

Paramètres	Sol B.S.L. Inc.
pH	7,02
Contenu en carbone organique total	14 g/kg
Granulométrie	89% sable, 10% silt, 1% argile
Contenu en PCP	2,3 mg/kg
Contenu en *C ₁₀ -C ₅₀	68 mg/kg
Contenu en Cl ⁻	3,2 mg/kg
Contenu **PCDD/DF (en équivalent toxique)	221,9 x 10 ⁻⁶ mg/kg

*hydrocarbures pétroliers, **dibenzo-*p*-dioxines et dibenzofurannes polychlorées.

Figure #6: Montage expérimental des bioréacteurs

1) condenseurs, 2) agitateurs, 3) diffuseur d'air, 4) port d'échantillonnage.



Le mélange boueux a été agité à 190 rpm (HS-4 Stirrer, Phipps & Bird, Richmond) et laissé à la température de la pièce, soit environ 22°C. Les réacteurs ont été alimentés en concentration croissante de PCP (tableau #5). Un premier type de réacteur (le réacteur #1 ou R1) a été alimenté par une solution alcaline de PCP (pureté 85%) grade technique (Anachemia, Montréal, Canada), à 16 g de PCP par litre de NaOH 0,25 N. Le deuxième type de réacteur (réacteur #2 ou R2) a été alimenté par une solution de préservation du bois (SPB) (utilisé par Bell Canada) fait de PCP grade commercial dissous dans du diesel #2, puis dilué dans du NaOH 0,25 N jusqu'à une concentration finale de PCP de 11g/l. À noter qu'il y a eu deux séries

d'activation. Lors de la première, seul le réacteur #1 a été suivi et le sol utilisé était frais. Lors de la deuxième activation, les deux réacteurs ont été suivis et le sol avait vieilli 6 mois à 4°C dans des contenants fermés.

Tableau #5: Concentration de PCP ajoutée dans les réacteurs lors des deux séries d'activation

No de l'ajout	Activation #1		Activation #2		
	mg/L	jour de l'ajout R1	mg/L	R1 (jour de l'ajout)	R2
1	50	2	50	4	4
2	60	12	100	15	18
3	110	15	100	24	26
4	110	20	100	30	33
5	110	23	200	35	40
6	230	27	200	50	50
7			300	60	60

2. Extraction de l'ADN total des mélanges boueux

Les échantillons de 5 ml de mélange boueux ont été centrifugés (Micromax, IEM, MA, États-Unis) 5 minutes à 1800 g. Le culot a été pesé et mélangé à 1 ml de tampon TEP (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA [acide éthylènediaminetétra-acétique] 1 mM); avec 1% de polyvinylpyrrolidone (PVPP, A&C, American Chemical Ltd, Montréal, Canada) et à un poids égal de billes de verre de 0,5 mm de diamètre (B. Braun Co. Melsungen, Allemagne). Le tout a été broyé à l'aide d'un homogénéisateur (glass mill homogenizer Sybron, Brinkmann, Rexdale, Ontario, Canada) pendant 5 minutes puis centrifugé 15 minutes à 16 000 g. L'ADN du surnageant a été extrait avec 1 volume d'une solution de phénol (BDH Chemicals Inc., Toronto, Canada) /

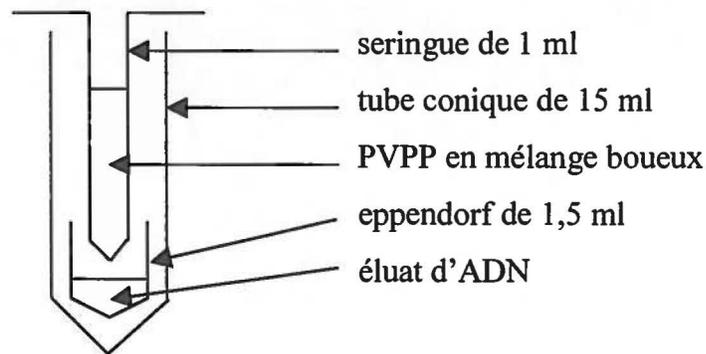
chloroforme (A&C) / alcool isoamylique (A&C) (25/24/1) puis avec 1 volume d'une solution de chloroforme / alcool isoamylique (24/1). Les impuretés ont été éliminées en précipitant la phase aqueuse avec 1/4 de volume d'AcNH₄ 10 M pendant 20 minutes sur glace, puis en centrifugeant à 16 000 g pendant 15 minutes. L'ADN du surnageant a été précipité avec 2 volumes d'EtOH 95% pendant au moins 30 minutes à -20°C, puis centrifugé 15 minutes à 16 000 g. Le culot d'ADN a ensuite été resuspendu dans 200 µl d'H₂O et finalement purifié sur une colonne de PVPP. Un estimé de la pureté de l'ADN extrait pouvait être déterminé par l'observation de la couleur de l'échantillon. Une coloration jaunâtre ou brunâtre signifiait une co-extraction de l'ADN et des acides humiques. Quelque fois, et surtout dans le cas du réacteur #2, un deuxième passage sur la colonne de PVPP était nécessaire pour un maximum de pureté.

La colonne de PVPP était constituée de 1 ml d'un mélange de PVPP dissous dans du tampon phosphate 20 mM à pH 7,4 (figure #7). Le PVPP avait préalablement été traité 12-16 heures dans du HCl 3 M (20 g pour 100 ml) puis filtré sur entonnoir Buchner avec un papier filtre Whatman #1, lavé abondamment avec de l'H₂O et avec 500 ml du même tampon phosphate puis séché à l'air. La colonne remplie a été centrifugée 2 minutes à 200 g pour éliminer le surplus de liquide, puis l'échantillon d'ADN a été déposé sur la colonne et centrifugé 2 minutes à 200 g. Sur ce type de colonne, l'élution d'impuretés comme les acides humiques est retardée alors que l'ADN élue rapidement par centrifugation. L'éluat d'ADN ainsi purifié a été précipité avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'EtOH 95% au moins 30 minutes à -70°C, puis centrifugé 15 minutes à 16 000 g et resuspendu dans un volume minimal d'H₂O.

Malgré l'absence de coloration jaune, la concentration de l'ADN après purification n'a pu être déterminée par spectrophotométrie tel que décrit à la section 12 à cause d'une forte absorption à une DO_{280nm} et DO_{230nm}, empêchant des mesures précises. Cette absorption est due à la persistance d'impuretés dans les échantillons

malgré la purification sur colonne de PVPP. Une autre méthode a donc été utilisée pour évaluer approximativement la quantité d'ADN des échantillons. Il s'agissait de faire migrer par électrophorèse sur gel d'agarose l'ADN des échantillons en présence d'un ADN standard dont le profil de migration était semblable à celui de l'ADN à quantifier. Ce standard a pu être conçu par digestion d'un ADN génomique bactérien avec l'endonucléase *Bam*H1.

Figure #7: Montage de la colonne de PVPP.



3. Construction des amorces

Les trois amorces spécifiques aux gènes *pcpB* sont : *pcpB*-G, *pcpB*-D₁ et *pcpB*-D₂ (tableau #6). L'amplification des gènes *pcpB* avec les amorces *pcpB*-G et *pcpB*-D₂ génère un fragment de 701 pb, et un fragment de 362 pb avec les amorces *pcpB*-G et *pcpB*-D₁ (fragment interne au 701 pb). Ces amorces sont issues d'une étude comparative des séquences des gènes *pcpB* de deux bactéries : *Sphingomonas chlorophenolica* sp. ATCC 33790 et *S. flava* sp. ATCC 39723. Au moment de la construction des amorces, il s'agissait des deux seules séquences du gène *pcpB* bien documentées et disponibles. Les séquences en acides nucléiques et les séquences en acides aminés déduites ont été alignées à l'aide du programme PILEUP (Genetics

Computer Group, Université du Wisconsin). Trois régions ont été sélectionnées pour leur très forte homologie et leur faible taux de dégénérescence. Les alignements et le design des amorces ont été effectués par le Dr Villemur. Il s'agit de trois oligonucléotides dont les séquences sont présentées au tableau #6. Toutes les amorces ont été synthétisées à l'aide du Gene Assembler (Pharmacia, Baie-d'Urfée, Canada) dans le laboratoire du Dr F. Shareck (INRS-IAF).

Les amorces universelles pA, pH et 533r correspondent à des régions très conservées des gènes de l'ARNr 16S de toutes les eubactéries. L'utilisation des amorces pA et de pH lors des amplifications par PCR génère des fragments de 1500-1600 pb alors que l'utilisation de pA et 533r génère des fragments de 450-550 pb. Les séquences de ces amorces sont aussi présentées au tableau #6.

Tableau #6: Séquences des amorces

Amorce	Séquences	Position
pA	5' AGA GTT TGA TC ^(C/A) TGG CTG AG 3'	8-27*
pH	5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3'	1541-1522*
533r	5' TTA CCG CGG C ^(T/G) G CTG GCA C 3'	533-515*
pcpB-G	5' GG ^(G/C) TTC AC ^(G/C) TTC AA ^(T/C) TTC GA 3'	611-592**
pcpB-D ₁	5' AT ^(G/C) CC ^(G/C) AC ^(A/G) TC CAT CAT CTG 3'	250-269**
pcpB-D ₂	5' TC CTG CAT ^(G/C) CC ^(G/C) AC ^(A/G) TT CAT 3'	950-931**

* position relative aux gènes de l'ARNr 16S de *E. coli*. ** position relative au codon ATG du gène *pcpB* de *S. chlorophenolica* ATCC 33790 et de *S. flava* sp. ATCC 39723.

4. Amplification par PCR

Les amplifications ont été effectuées dans un volume de 50 µl contenant du tampon Taq polymérase (Pharmacia, Tris-HCl 10 mM pH 9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM), 200 µM de dNTP, 10 pmol de chacune des amorces, de 2,5 U de l'enzyme Taq ADN polymérase (Pharmacia) et de 20 µg de BSA (20 mg/ml, albumine de sérum bovin, Sigma). L'appareil utilisé était le «DNA thermal cyclor 480» (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, États-Unis) avec le programme suivant : 5 minutes à 80°C (temps pour ajouter l'ADN aux tubes réactionnels), 2-5 minutes à 94°C, 5 minutes à 55°C, suivi de 30-35 cycles de 2 minutes à 72°C, 40 secondes à 94°C et 1 minute à 55°C. La réaction d'amplification a été complétée par une extension de 10 minutes à 72°C.

5. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les échantillons d'ADN ont été mélangés à un tampon de charge LB 6X (glycérol 10%, EDTA 50 mM, 0,02% de bromophénol bleu et xylène cyanol) et ont été fractionnés par électrophorèse sur des gels composés de 0,8 à 2% d'agarose (ICN Biomedicals Inc., Ohio, États-Unis) dissous dans le tampon TAE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8 et acétate 20 mM). Les migrations électrophorétiques duraient de 45 à 90 minutes à 40-80 volts dans une chambre électrophorétique (mini SUB DNA CELL, Bio Rad, Mississauga, Ontario, Canada) remplie de tampon TAE. Les ADN ont ensuite été colorés 15 minutes dans une solution de bromure d'éthidium 0,5 µg/mL (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). Quelques fois, les ADN ont été décolorés 15-30 minutes dans de l'eau. Les fragments d'ADN ont été visualisés sous rayonnement U.V. et l'image a été digitalisée à l'aide du Gel Doc 1000 (Bio-Rad). Les marqueurs utilisés étaient l'ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme *SlyI* ou l'ADN du vecteur Bluescript digéré par l'enzyme *Sau3A* (Pharmacia).

6. Digestion enzymatique

Les digestions des ADN ont été effectuées à l'aide d'enzymes de restriction (Pharmacia) et du tampon de digestion "One-Phor-All buffer PLUS" 10X (Tris-acétate 100 mM pH 7,5, acétate de magnésium 100 mM et acétate de potassium 500 mM) selon les conditions spécifiées par le fabricant. Les réactions de digestion enzymatique ont été effectuées pendant au moins une heure à 37°C.

7. Ligations

Les fragments d'ADN issus des amplifications par PCR ont été clonés dans des vecteurs spécifiques au clonage de produits de PCR.

7.1 Ligation dans le vecteur plasmidique pGEM[®]-T

La réaction de ligation a été effectuée avec la trousse pGEM[®]-T easy de Promega (Madison, Wisconsin, États-Unis) dans un volume de 10 µl avec 1 µl de tampon de ligation 10X (Tris-HCl 300 mM pH 7,8, MgCl₂ 100 mM, DTT [dithiothréitol] 100 mM, ATP 10 mM), 1 µl de vecteur, 1 µl de l'enzyme T4 ADN ligase et des volumes variables d'H₂O et du fragment d'ADN à cloner. Le tout a été incubé toute la nuit à 4°C. Le résultat de la ligation a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose avant la transformation.

7.2 Ligation dans le vecteur plasmidique pCR[™]II

La réaction de ligation a été effectuée avec la trousse TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, San Diego, CA, États-Unis) dans un volume de 10 µl avec 1 µl de tampon de ligation 10X (Tris-HCl 60 mM pH 7,5, MgCl₂ 60 mM, NaCl 50 mM, albumine

sérique de boeuf 1 mg/ml, β -mercaptoéthanol 70 mM, ATP 1 mM, DTT 20 mM, spermidine 10 mM), 2 μ l de vecteur, 1 μ l de l'enzyme T4 ADN ligase et des volumes variables d'H₂O et du fragment d'ADN à cloner. Le tout a été incubé toute la nuit à 14°C. Le résultat de la ligation a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose avant la transformation.

8. Préparation de cellules compétentes

La souche *E. coli* XL-1 Blue MRF' (génotype : Δ (*mrcA*)183, Δ (*mrcCB-hsdSMR-mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, λ^- , [F', *proAB*, *lacI^qZAM15*, Tn10, (*tet^r*)], Stratagene, La Jolla, Ca, États-Unis) a été étalée sur gélose SOB (20 g/l de bactotryptone (Difco), 5 g/l d'extrait de levure (ICN), 0,5 g/l de NaCl, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, agar 15 g/l, et 10 μ g/ml de tétracycline) et incubée à 37°C toute la nuit. Une colonie a ensuite été inoculée dans 30 ml de milieu SOB sans agar et incubée à 37°C sous agitation (225 rpm) jusqu'à ce que la culture ait une DO à 600 nm entre 0,4 et 0,6. Les cellules ont alors été déposées sur glace 10 minutes et centrifugées à 4°C 5 minutes à 1800 g. Le culot bactérien a été resuspendu dans 20 ml de CaCl₂ 100 mM, placé sur glace 10 minutes et centrifugé à 4°C 5 minutes à 1800g. Le culot bactérien a été resuspendu dans 10 ml de CaCl₂ 100 mM, placé sur glace 10 minutes et centrifugé à 4°C 5 minutes à 1800g. Le culot bactérien a été resuspendu dans 1,2 ml de CaCl₂ 100 mM; les cellules sont alors prêtes pour être transformées en présence d'un produit de ligation.

9. Transformation

Les produits de ligation (2-5 μ l) ont été utilisés pour transformer 200 μ l de bactéries compétentes. Les bactéries ont ensuite été incubées 30 minutes sur la glace, 90 secondes à 42°C, puis 2 minutes de nouveau sur la glace. Après ce choc thermique,

les cellules ont été transférées dans des tubes stériles contenant 800 µl de milieu SOC (milieu SOB plus glucose 10 mM), agitées à 225 rpm pendant 1 heure à 37°C, puis 20-200 µl ont été étalés sur géloses SOB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) (Boehringer Mannheim, Laval, Canada), et de l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (0,14 mg/ml) (IPTG, Boehringer Mannheim), du 5-bromo-4-chloro-3-indoly-b-D-galactopyranoside (0,04 mg/ml) (X-Gal, Boehringer Mannheim) et du MgCl₂ 1M (10 ml/l). Les transformants ont été sélectionnés sur les géloses après 16-24 heures d'incubation à 37°C. L'identification visuelle des transformants a été faite grâce à l'action de l'enzyme β-galactosidase sur le substrat X-gal qui génère un produit de couleur bleu. L'enzyme β-galactosidase est synthétisée suite à l'induction de l'opéron lactose par l'IPTG. Le vecteur pCRTMII possède un fragment d'ADN codant pour les 145 premiers acides aminés de la β-galactosidase, qui complète la protéine β-galactosidase tronquée de la bactérie hôte et ceci permet la production d'une enzyme fonctionnelle. L'insertion d'un fragment d'ADN étranger dans le vecteur interrompt l'expression de la β-galactosidase puisque ce gène est situé dans le site de clonage. Ainsi, les colonies ayant intégré le fragment d'ADN étaient blanches (colonies transformantes) alors que les autres étaient bleues (Sambrook *et al.*, 1989).

10. Mini préparation d'ADN plasmidique

Les colonies transformantes blanches ont été repiquées dans 2 ml de milieu SOB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et incubées à 37°C pendant 18 heures avec agitation de 225 rpm. Un ml de culture a été prélevé et centrifugé 30 secondes à 1600 g. Le culot de cellules a ensuite été lavé avec 500 µl de solution TEN (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8,0 et NaCl 100 mM), puis resuspendu dans 200 µl de TEN. L'extraction de l'ADN des bactéries a été faite avec 300 µl de phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25 : 24 : 1) en agitant vigoureusement pour 30 secondes jusqu'à l'obtention d'une bonne émulsion. Les deux phases ont été séparées

par une centrifugation de 5 minutes à 16 000 g. La phase aqueuse a été précipitée avec ¼ de volume d'AcNH₄ 10 M et 2 volumes d'EtOH 95% à -20°C au moins 30 minutes. Après 5 minutes de centrifugation à 16 000 g, le culot d'ADN a été lavé à l'EtOH 70% puis dissous dans 50 µl de d'H₂O contenant 10 µg/ml de ribonucléase A (Boehringer Mannheim). L'identification des bons transformants a été effectuée par digestion de l'ADN des clones par l'enzyme *EcoRI* (Pharmacia) afin de libérer l'insert du vecteur, et leur fractionnement a été effectué par électrophorèse sur gel d'agarose. Les souches transformantes ayant le clone possédant l'insert de longueur attendue ont été congelées à -70°C dans 15% de glycérol pour utilisation ultérieure.

11. Extraction de l'ADN plasmidique

Les plasmides des bactéries recombinantes ont été extraits selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989). Après une incubation de 18 heures à 37°C sous une agitation de 225 rpm, une culture bactérienne de 500 ml a été centrifugée à 10 000 g pendant 15 minutes. Les cellules ont été lavées avec une solution de TEG (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM et glucose 50 mM), puis centrifugées 15 minutes à 10 000 g et resuspendues dans 18 ml de TEG. Après l'ajout de 2 ml de lysozyme (Boehringer Mannheim) (10 mg/mL dans TEG), les cellules ont été incubées pendant 10 minutes à la température de la pièce. Soixante ml d'une solution contenant du NaOH 0,2 M / SDS 1% ont été ajoutés, puis le tout a été incubé 5 minutes à la température de la pièce. Trente ml d'acétate de potassium 3 M ont été ajoutés, suivi d'une incubation de 15 minutes sur la glace et d'une centrifugation de 15 minutes à 10 000 g. Le surnageant a été filtré sur du coton à fromage et précipité au moins 1 heure à la température de la pièce avec 0,6 volume d'isopropanol, puis centrifugé 15 minutes à 10 000 g. L'extrait nucléique brut a été dissous dans 3,75 ml de tampon TE (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10mM), puis précipité sur la glace 20 minutes avec 1/3 de volume d'AcNH₄ 10 M, et ensuite centrifugé 15 minutes 10 000 g. L'ADN contenu dans le surnageant a été précipité sur glace pendant 20 minutes avec 2

volumes d'EtOH 95% et centrifugé 15 minutes à 16 000 g. Le culot d'ADN a été dissous dans 500 µl de TE, puis incubé 15 minutes à 37°C avec 2 µl de ribonucléase A (10 µg/ml). L'ADN a ensuite été purifié par précipitation au polyéthylène glycol (PEG) : 214 µl de NaCl 5 M et 178 µl d'une solution de PEG 30% / NaCl 1,5 M ont été ajoutés à la solution d'ADN. Le tout a été incubé 30 minutes sur glace, puis centrifugé 15 minutes à 16 000 g. Le culot d'ADN a été resuspendu dans le tampon TE et l'ADN plasmidique a été extrait avec 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1), puis avec 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique (24 : 1), et précipité à -20°C pour au moins 30 minutes avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et de 2 volumes d'EtOH 95%. Après une centrifugation de 15 minutes à 16 000 g, le culot d'ADN plasmidique a été lavé à l'EtOH 70% et dissous dans de l'H₂O.

12. Détermination de la concentration d'ADN

Les échantillons d'ADN ont été dilués dans l'H₂O (dilution 1/50 ou 1/100), puis la densité optique (DO) à 280 nm et à 260 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration d'ADN en µg/ml a été calculée à l'aide de la formule suivante : concentration d'ADN = $[(DO_{260} - DO_{280}) \times 100] \times \text{dilution}$.

13. Technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

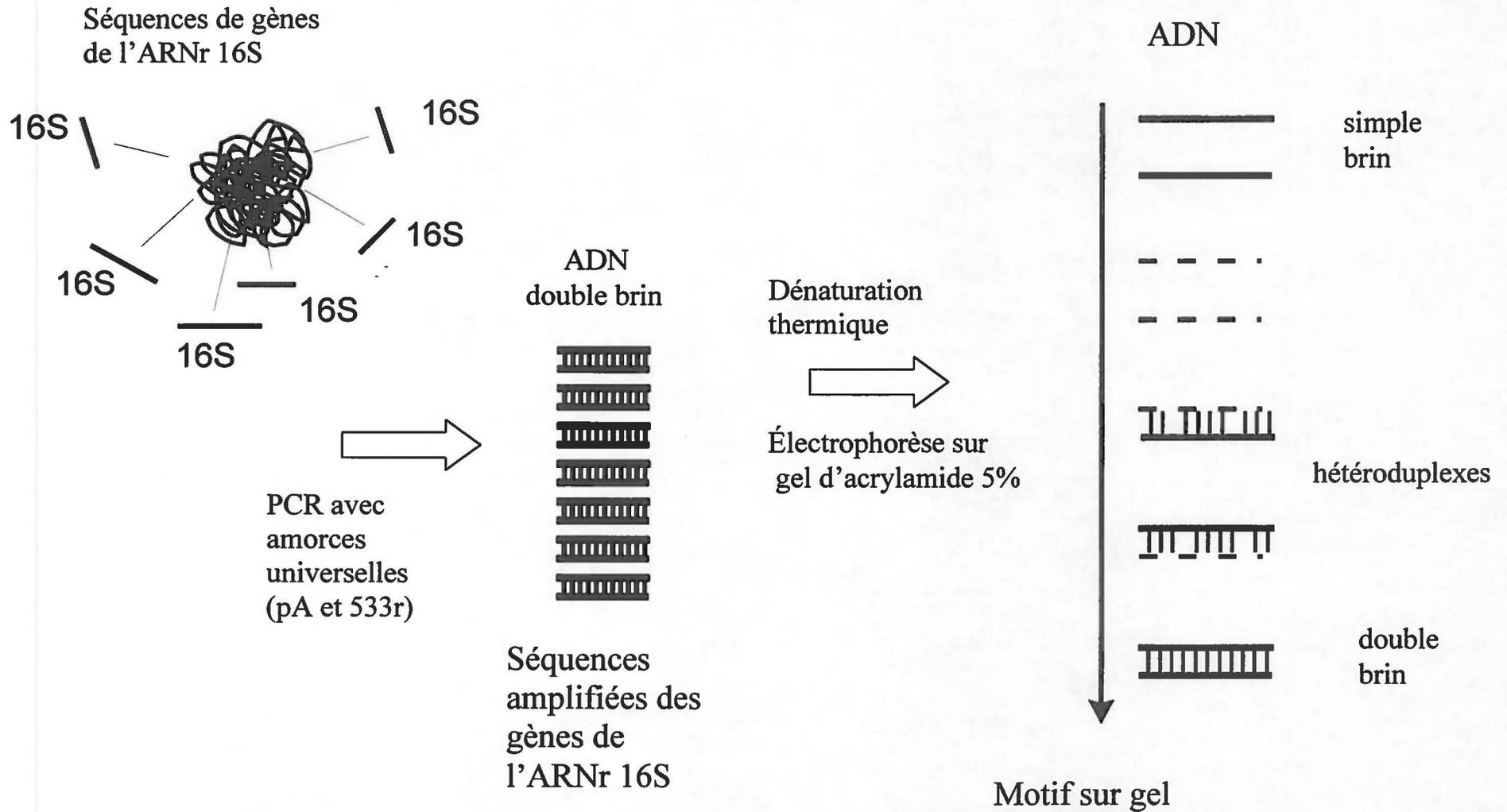
La figure #8 illustre le principe général de cette méthode. Les ADN des produits de PCR ont été dilués à 100 µl avec de l'H₂O et ont été extraits avec 1 volume de phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25 : 24 : 1) et avec 1 volume de chloroforme / alcool isoamylique (24 : 1), puis précipités avec ¼ de volume d'AcNH₄ 10M et 2 volumes d'EtOH 95% à -20°C au moins 20 minutes. Après une centrifugation de 15 minutes à 16 000 g, les ADN ont été dissous dans 10 µl d'H₂O. De 1 à 3 µl d'ADN

ont ensuite été dénaturés en présence de 5 µl de tampon de charge frais (formamide 95%, EDTA 20 mM, NaOH 200 mM et 0,02% de bromophénol bleu et xylène cyanol) et par une incubation de 10 minutes à 95°C. Les échantillons ont été refroidis 10 minutes sur glace et centrifugés 5 secondes. Ils ont ensuite été chargés sur des gels de polyacrylamide de 5% (acrylamide (Bio Rad) 50% (acrylamide 49 : 1 bisacrylamide), TBE 5X, 1% glycérol, et migrés à 150 volts (model 250, Bio Rad) pour 3-4 heures dans une chambre (Mini PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio Rad) contenant 100 ml de tampon TBE (TBE 5X : 54 g/l de Tris, 27,5 g/l d'acide borique et 0,01M d'EDTA pH 8).

13.1 Coloration au nitrate d'argent

Après la migration des ADN, les gels de polyacrylamide ont été baignés sous agitation (50 rpm) 20 minutes dans 400 ml d'acide acétique 10%, puis rincés 2 fois 10 minutes dans 400 ml d'H₂O. Ils ont ensuite été colorés 30 minutes dans une solution fraîche de nitrate d'argent 500 mg/l (AgNO₃ Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ, États-Unis) et formaldéhyde 0,03% (Baker), puis rincés 3 fois dans de l'H₂O avant d'être révélés environ 5 minutes dans 100 ml de solution fraîche de révélation (1,5 g de Na₂CO₃, 50 µl de formaldéhyde 37% et 50 µl d'une solution 2 mg/ml de sodium thiosulfate (Bio Rad) dans 50 ml d'H₂O). Lorsque la coloration désirée a été atteinte, la réaction a été arrêtée en aspirant la solution de révélation et en ajoutant 400 ml d'acide acétique 10% et en laissant tremper pour un minimum de 15 minutes. Les gels ont finalement été séchés toute la nuit entre deux membranes de cellulose fixées sur un support (Promega).

Figure #8: Principe de la méthode SSCP

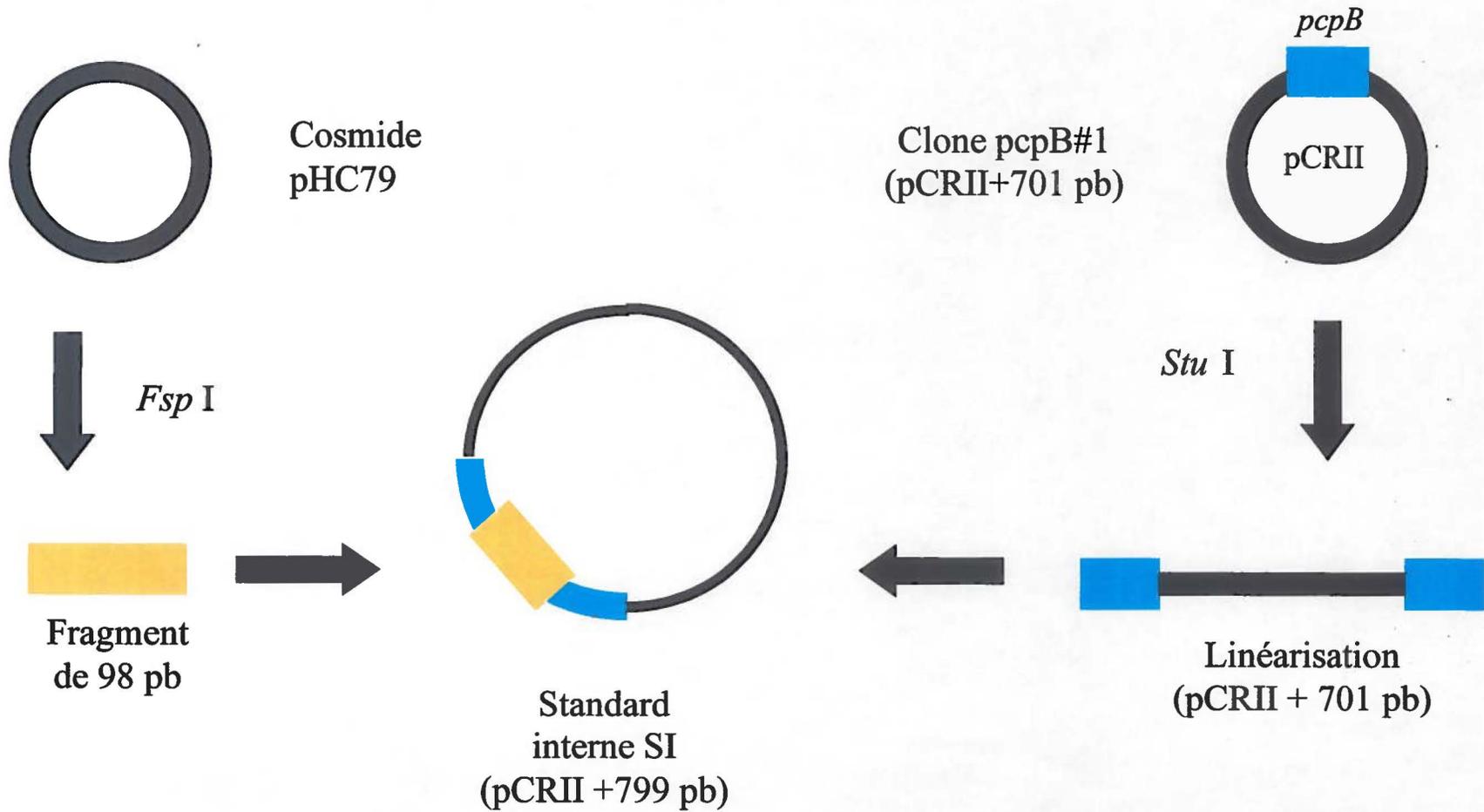


14. Construction du standard interne pour le PCR compétitif

Le standard interne de 799 pb provient de la ligation du clone pcpB-1 avec un fragment de 98 pb provenant du cosmide pH79. Le clone pcpB-1 est constitué du plasmide pCR™II (Invitrogen) dans lequel un fragment du gène *pcpB* de 701 pb a été cloné (résultant d'un PCR sur le l'ADN d'un échantillon du mélange boueux de la première activation avec les amorces spécifiques pour le gène *pcpB* : pcpB-G/D₂). La stratégie de construction du standard interne est illustrée à la figure #9. L'ADN du clone pcpB-1 (10 µg) a été digéré avec l'enzyme *StuI* (Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). Cette enzyme coupe une seul fois le clone, au centre de l'insert de 701 pb, produisant un fragment linéaire avec des bouts francs. Ce fragment a été isolé par deux passages par électrophorèse préparatif sur gel d'agarose 1% et suite à la coloration au bromure d'éthidium, celui-ci a été découpé sous rayonnement UV, puis purifié à l'aide de la trousse QIAEX II (Qiagen Inc, Mississauga, Ontario, Canada) selon les directives du manufacturier. La technique est basée sur l'absorption de l'ADN sur un gel formé de billes de silice, en présence d'une concentration élevée de sel. Après le lavage des billes, l'ADN est élué des billes avec de l'eau.

Le cosmide pH79 (70 µg) a été digéré avec l'enzyme *FspI* (New England Biolabs Inc., Mississauga, Ontario, Canada). Cette enzyme coupe 5 fois le cosmide, produisant 5 fragments dont celui d'intérêt de 98 pb. Cette digestion a été migrée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 15% (15% acrylamide, 0,08% persulfate d'ammonium, TEMED 0,35 µl/ml, TBE 5X 294 µl/ml) 1 heure à 100 volts afin d'isoler le petit fragment. Après coloration au bromure d'éthidium, le fragment de 98 pb a été découpé sous rayonnement UV et a été élué du gel pendant 1 heure à 37°C en présence de 500 µl de tampon d'éluion (AcNH₄ 0,5 M, acétate de magnésium 10 mM, EDTA 1 mM et SDS 0,1% [sodium dodécyl sulfate, ICN]). Le surnageant, après centrifugation de 1 minute à 16 000 g pour éliminer les particules d'acrylamide, a été précipité avec 2 volumes d'EtOH 95% au moins 1 heure à -70°C, puis centrifugé 15

Figure #9 : Construction du standard interne (SI) pour le PCR compétitif.



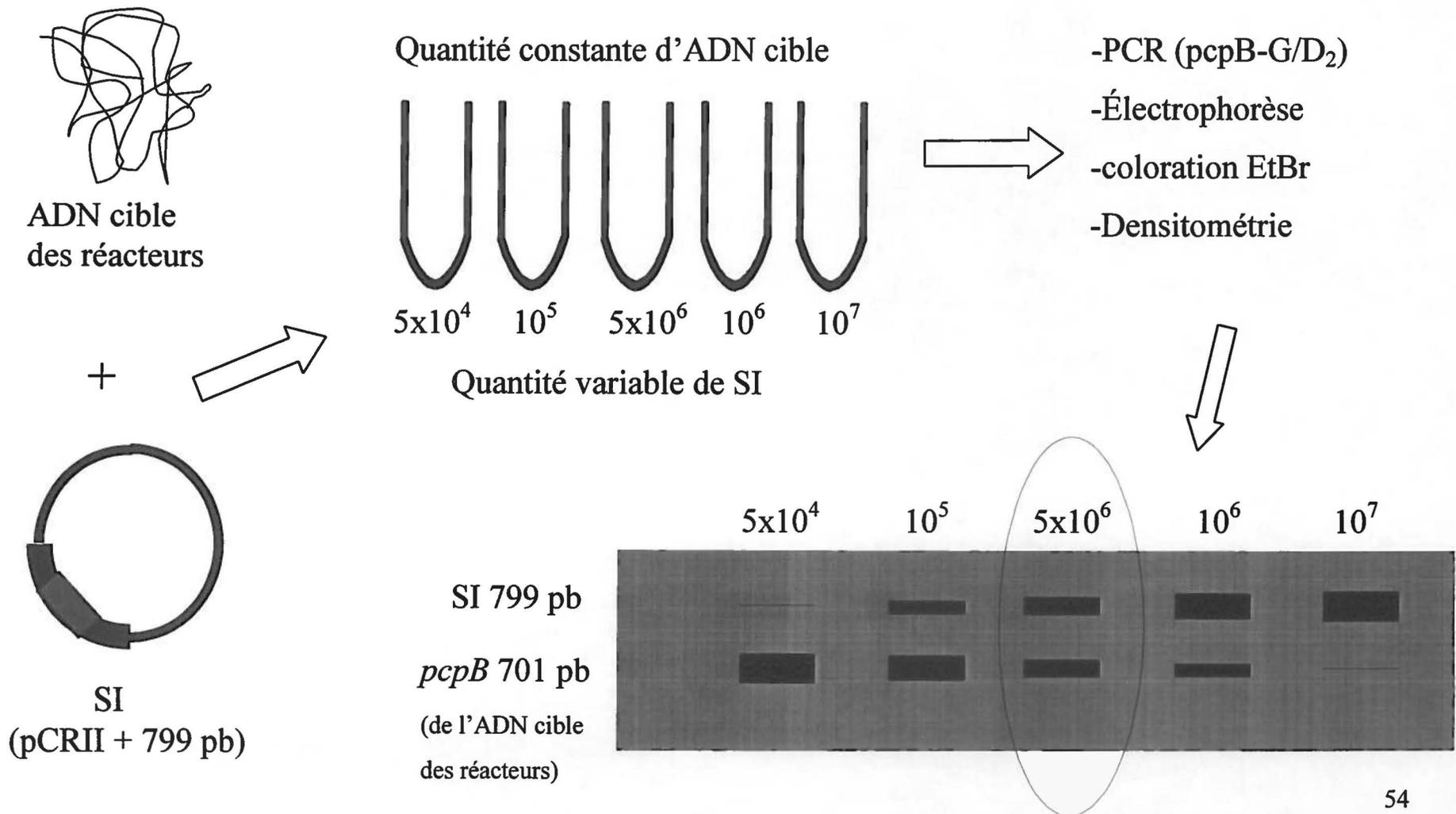
minutes à 16 000 g. Le culot d'ADN a été dissous dans 100 µl d'H₂O, puis de nouveau précipité avec 2 volumes d'EtOH 95% et 1/10 de volume d'AcNa 3 M au moins 1 heure à -70°C. Après centrifugation de 15 minutes à 16 000g, le culot d'ADN a été dissous dans 20 µl d'H₂O.

La ligation des deux fragments d'ADN à bouts francs a été effectuée comme décrit à la section 7:2 mais avec 0,5 mM d'ATP. La réaction de ligation a été incubée à 14°C pendant 18 heures, puis transformée dans des cellules *E. coli* XL-1 compétentes. Après l'identification d'un clone recombinant approprié et la production de son ADN plasmidique, celui-ci a été digéré par l'enzyme *Bgl*III, qui coupe une seule fois dans le vecteur afin de linéariser la construction. Cet ADN a servi comme standard interne pour les PCR compétitifs.

15. PCR compétitif

Les réactions de PCR compétitif ont été effectuées avec une concentration constante d'ADN total (100 ηg), provenant des échantillons de mélange boueux, avec des concentrations croissantes du standard interne (1×10^4 à 1×10^7 molécules, 1 molécule = $4,937 \times 10^{-9}$ ηg) et avec les amorces spécifiques au gène *pcpB* : *pcpB*-G/D₂ (figure #10). Les conditions et le programme de PCR utilisés étaient les mêmes que ceux décrits à la section #4. Après l'amplification, les produits de PCR ont été directement fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,8% et colorés au bromure d'éthidium. Les profils électrophorétiques des fragments d'ADN ont été digitalisés à l'aide du Gel Doc 1000 (Bio Rad) et l'intensité de chacune des bandes a été mesurée à l'aide du logiciel informatique Molecular Analyst/PC (Bio Rad).

Figure #10: Principe du PCR compétitif



16. Purification de l'ADN plasmidique des clones

La préparation de l'ADN pour le séquençage a été faite à l'aide de la trousse QIAprep Miniprep (Qiagen) selon les directives du manufacturier. Un volume correspondant à 20 µg d'ADN a été dilué à 100 µl d'H₂O, puis 500 µl de tampon PB (Qiagen) ont été ajoutés. Le tout a été mélangé et déposé sur une mini-colonne, puis centrifugé 2 minutes à 16 000 g. L'ADN resté accroché sur la colonne a été élué avec 150 µl de tampon EB (Qiagen). Les mêmes opérations ont été répétées avec un autre 20 µg d'ADN en utilisant la même mini-colonne. Les éluats d'ADN ont été rassemblés (300 µl) et précipités avec 1/10 de volume AcNa 3N et 2 volumes d'EtOH 95% à -20°C au moins 20 minutes, puis centrifugés 15 minutes à 16 000 g. Le culot d'ADN a été lavé à l'EtOH 70% et resuspendu dans 20-25 µl d'H₂O. L'ADN était maintenant prêt à être séquençé.

17. Séquençage et analyse des séquences

Les préparations d'ADN purifiées ont été envoyées au service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier, où 800 ng d'ADN ont été utilisés pour la réaction de séquençage, selon la réaction de Sanger *et al.* (1977), avec incorporation de didéoxynucléotides de terminaison marqués de fluorochromes. La réaction de séquençage a été effectuée à l'aide de la trousse BigDye™ Terminator cycle (ABI, États-Unis) avec la polymérase AmpliTaq® et avec soit l'amorce SP6 ou T7, qui s'hybride à une séquences bordant l'une des extrémités des inserts. La fragmentation des réactions de séquençage a été faite sur un séquenceur à électrophorèse capillaire de Perkin Elmer (ABI, États-Unis)

Les séquences des gènes *pcpB* et de l'ARNr 16S ont été analysées dans le logiciel Chromas pour vérifier l'exactitude des séquences. Puis, elles ont subi une analyse BLAST (site Internet du NCBI: National Center for Biotechnology

Information) pour effectuer le traitement, l'édition, les analyses et les comparaisons de séquences des gènes.

L'analyse phylogénétique des séquences en acides aminés des gènes *pcpB* a été effectuée à l'aide des programmes PileUp et Pretty (GCG) pour créer un alignement et une disposition des séquences à analyser. Cet alignement a ensuite été utilisé dans le programme SEQBOOT (version 3.5b, provenant de PHYLIP, Joseph Felsenstein, Université de Washington) (idem pour tous les programmes suivants) pour en faire une analyse bootstrap afin de générer un mélange de séquences en 230 répliquats (maximum de capacité de l'ordinateur). Les distances évolutives ont été calculées pour chaque répliquat avec le programme PROTDIST utilisant la matrice Dayhoff PAM 001 (Margaret Dayhoff, 1979), qui permet d'obtenir une table de distance représentant le nombre de substitution d'acide aminé par site (par acide aminé) entre deux séquences. Le programme FITCH a dérivé le meilleur arbre pour chacun des répliquats à partir des distances évolutives et le programme CONSENSE a dérivé l'arbre consensus à partir des 230 arbres.

Résultats

1. Production de sol activé

Ce projet de maîtrise a été réalisé en collaboration avec la Chaire industrielle CRSNG sur les bioprocédés d'assainissement des sites et des sols de l'École Polytechnique de Montréal. L'activation des sols et le suivi physico-chimique et microbiologique ont été effectués dans les laboratoires de la Chaire sous la responsabilité de l'étudiante à la maîtrise Valérie Bécaert. Les analyses moléculaires des microorganismes dégradants le PCP et les analyses de la diversité microbienne dans les réacteurs ont constitué le présent travail.

Un sol faiblement contaminé au PCP (2,3 mg/kg de sol) a été utilisé pour la production de sol activé, c'est-à-dire un sol contenant une biomasse acclimatée au PCP et performante pour sa dégradation. L'hypothèse de départ étant que le sol faiblement contaminé utilisé contenait une flore indigène capable de dégrader le PCP. L'activation du sol a été faite par ajouts successifs de concentrations croissantes de PCP, afin de stimuler uniquement la croissance des microorganismes dégradants le PCP. Les ajouts successifs de PCP ont été effectués lorsque la concentration de PCP résiduel atteignait la limite de détection (0,5 mg/l). Deux réacteurs identiques ont été activés de façon distincte à l'aide de deux solutions d'activation différentes. Le réacteur #1 (R1) a été activé avec une solution alcaline de PCP alors que le réacteur #2 (R2) a été activé avec une solution de préservation du bois (SPB : PCP dissous dans du diésel #2).

Il y a eu deux séries d'activation. La première, qui a duré environ 30 jours, a servi à la mise au point et au raffinement des techniques, et seul le réacteur #1 a été analysé. Lors de la deuxième activation, les deux réacteurs ont été analysés. Cette activation a duré 90 jours et a servi à la production d'une biomasse. Un suivi plus exhaustif des paramètres physico-chimiques et biologiques a aussi été caractéristique de cette deuxième activation.

2. Première activation

Comme déjà mentionné, seul le réacteur #1 a été suivi lors de la première activation. Au début du projet, nous avons posé l'hypothèse que des bactéries du genre *Sphingomonas* étaient présentes dans les bioréacteurs. Le gène de la PCP-4-monooxygénase, la première enzyme impliquée dans la dégradation du PCP, a été isolé chez trois souches de *Sphingomonas* : *S. flava* ATCC 39723, *S. chlorophenolica* ATCC 33790 et *Sphingomonas* sp. UG30. Dans les trois cas, les gènes codent pour une protéine de 538 acides aminés. L'homologie entre les trois séquences varie de 88 à 91% en acides nucléiques et de 92 à 94% en acides aminés. À partir de la comparaison des séquences disponibles à l'époque (soit *S. flava* ATCC 39723, *S. chlorophenolica* ATCC 33790 uniquement), trois oligonucléotides ont été synthétisés (tableau #6) et ont servi à la détection des gènes *pcpB* dans les réacteurs à l'aide de l'amplification par PCR.

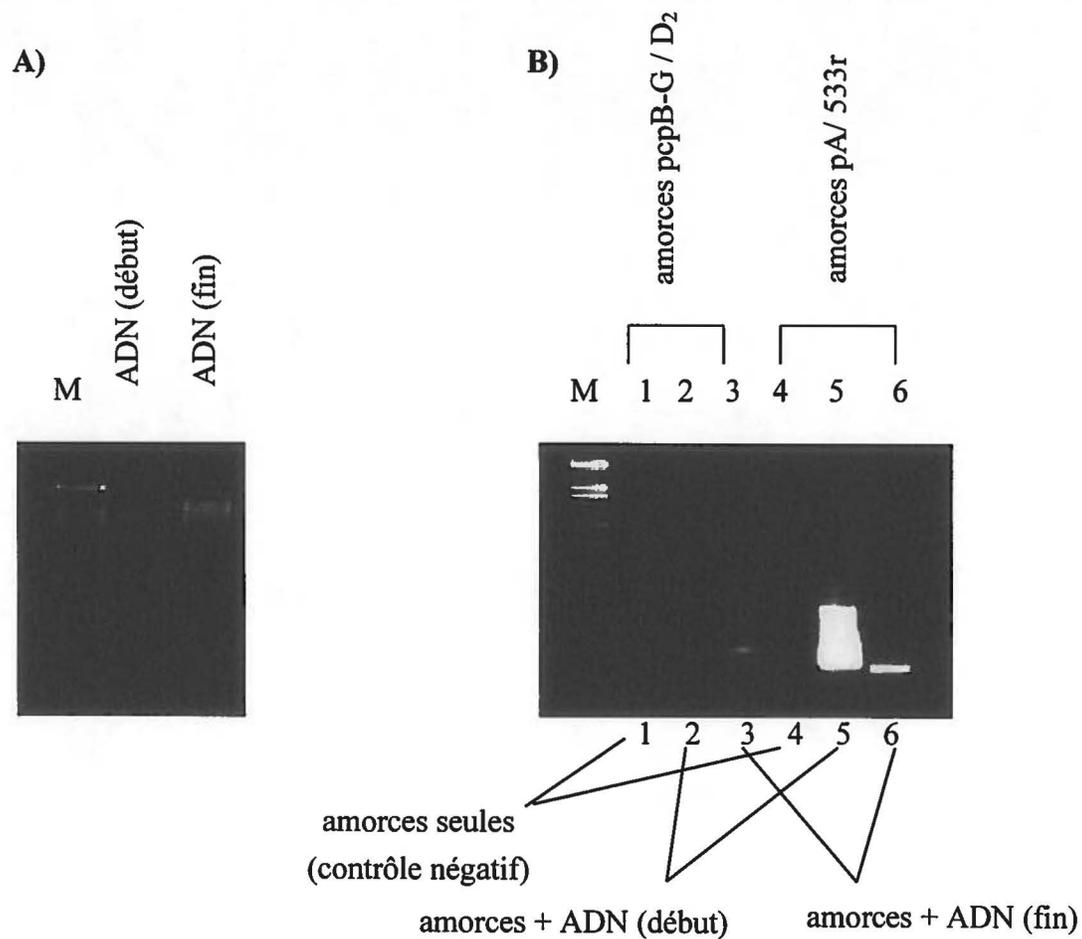
L'ADN total du mélange boueux du réacteur #1 (au début et à la fin de l'activation) a été extrait. L'ADN obtenu s'est avéré être partiellement dégradé; son poids moléculaire variait de 1 à 10 Kb (figure #11 A). Nous avons aussi remarqué qu'il y avait plus d'ADN dans le mélange boueux à la fin de l'activation par rapport à l'échantillon prélevé au début, suggérant une augmentation importante de la biomasse.

2.1 Gènes *pcpB*

Le suivi des gènes *pcpB* dans les bioréacteurs a servi à faire le suivi des microorganismes dégradant le PCP en assumant comme hypothèse que les dégradeurs du PCP (principalement les *Sphingomonas*) possèdent ce gène. La figure #11 B (puits 1 à 3) présente les résultats des amplifications par PCR effectuées en présence des amorces *pcpB*-G et *pcpB*-D₂. Aucun signal n'a été obtenu avec l'ADN

Figure #11: ADN total extrait du mélange boueux de la première activation ainsi que les produits de PCR des gènes de l'ARNr 16S et *pcpB*.

A) L'ADN total a été fractionné sur gel d'agarose de 0,8% et colorés au bromure d'éthidium. B) Les PCR ont été effectués avec les amorces spécifiques au gène *pcpB* (*pcpB*-G et *pcpB*-D₂) ainsi qu'avec les amorces universelles pour les gènes de l'ARNr 16S (*pA* et 533r). Le marqueur M= ADN du phage Lambda digéré par *StyI*.



extrait avant l'activation (puits 2). Par contre, un produit de PCR de 700 pb a été obtenu avec l'ADN du sol activé (puits 3). Il est intéressant de noter que la longueur du gène *pcpB* bordés des amorces *pcpB-G* et *pcpB-D₂* chez les deux souches de *Sphingomonas* déjà citées est de 701 pb, ce qui est la longueur observée du produit de PCR du puits 3.

Le fragment de 700 pb a ensuite été cloné. Plusieurs clones ont été criblés par une double digestion avec premièrement *EcoRI*, pour exciser l'insert de 700 pb, et avec *BstBI*, qui devrait couper uniquement dans l'insert. Suite à la migration de cette double digestion, différents profils ont été obtenus et cinq clones ont été sélectionnés et séquencés.

La figure #12 montre que le clone *pcpB-1* a une séquence de 701 paires de bases, exactement la même longueur que les séquences obtenues pour les gènes *pcpB* des trois espèces de *Sphingomonas* mentionnées plus haut. La séquence du clone *pcpB-1* a une homologie de 98,1% avec la séquence en acides nucléiques du gène *pcpB* de la souche *Sphingomonas* sp. UG30. Il y a entre ces deux séquences seulement 13 substitutions, dont deux dans les amorces dégénérées. Leurs séquences déduites en acides aminés (figure #13) sont quasi identiques, l'homologie est en effet de 99,1%; elles diffèrent de seulement quatre acides aminés.

Le tableau #7 résume les pourcentages de similarité en acides nucléiques et en acides aminés des séquences des autres clones *pcpB* obtenus. On constate que quatre clones sur cinq ont des séquences qui sont fortement apparentées à la séquence du gène *pcpB* de la souche *Sphingomonas* sp. UG30. Le cinquième clone *pcpB* est quant à lui plus apparenté à la souche *S. flava* ATCC 39723.

2.2 Gènes de l'ARN 16S ribosomal

Une partie des gènes de l'ARNr 16S contenue dans l'ADN extrait du sol activé a été amplifiée par PCR avec les amorces universelles. La figure #11 B (puits 4 à 6) montre qu'un fragment de longueur attendu, soit environ 500 paires de bases, a été obtenu du sol et du sol activé. On constate aussi que le fragment d'ADN du sol est plus diffus et étendu. Ce fragment est en fait composé d'une multitude de fragments de longueurs similaires (plus ou moins 50 paires de bases) représentant une forte diversité microbienne. Le fragment d'ADN du sol activé est plus compact, suggérant une diversité microbienne moindre. Ce dernier produit de PCR a été cloné et deux clones ont été séquencés (tableau #7). Dans les deux cas, les séquences étaient les plus homologues à la séquence des gènes de l'ARNr 16S appartenant au genre *Sphingomonas* sp., dont la souche CF06, qui est reconnue pour dégrader les carbofurannes (Feng *et al.*, 1997).

Tableau #7: Microorganismes possédants les séquences des gènes de l'ARNr 16S et *pcpB* les plus apparentées aux clones *pcpB* et 16S de la première activation.

# du clone	Nom du microorganisme le plus apparenté	% de similarité en acides nucléiques	% de similarité en acides aminés
16S-R1	<i>Sphingomonas</i> sp.souche CF06 (U52146)	98,3%	
16S-R17	<i>Sphingomonas</i> sp.souche CF06 (U52146)	94%	
pcpB-1	<i>Sphingomonas</i> sp. UG30 (AF059680)	98,1%	99,1%
pcpB-4	<i>Sphingomonas flava</i> ATCC 39723 (M98557)	94,9%	96%
pcpB-11	<i>Sphingomonas</i> sp. UG30 (AF059680)	98,3%	97,5%
pcpB-15	<i>Sphingomonas</i> sp. UG30 (AF059680)	97,6%	96,7%
pcpB-19	<i>Sphingomonas</i> sp. UG30 (AF059680)	98,1%	93,4%

Entre parenthèse, le numéro d'accèsion dans la banque de gènes de GeneBank.

3. Deuxième activation

Lors de la deuxième série d'activation, deux types de bioréacteurs ont été acclimatés de façon distincte. Le premier, le réacteur #1 (R1) a été alimenté avec une solution alcaline de PCP et le réacteur #2 (R2) a été alimenté avec une solution de préservation du bois (SPB : PCP dissous dans du diésel #2). Au cours de cette activation, qui a duré environ 90 jours, il y a eu 7 ajouts de PCP (tableau #5, dans la section matériel et méthodes). À la suite du dernier ajout de PCP de 300 mg/l (1800 mg), aucune dégradation du PCP n'a été observée dans les deux bioréacteurs. L'hypothèse la plus probable pour expliquer cet arrêt serait qu'une concentration létale de PCP pour les microorganismes présents ait été atteinte, soit ici de 300 mg/l.

La figure #14 présente le suivi de la concentration en PCP, en ions chlorures et le pH lors de la deuxième série d'activation pour les 2 bioréacteurs. On remarque bien l'arrêt de la dégradation du PCP suivant le dernier ajout de 300 mg/l au jour 60. Le pH a été mesuré par potentiométrie et maintenu constant (entre 6,8 et 7,5) par des ajouts de H₂SO₄ 1N et NaOH 1N dans le but de ne pas influencer la solubilité du PCP. L'oxygène dissous a été mesuré et maintenu au-dessus de 2 mg de O₂ par litre (saturation). Le lecteur est invité à consulter le mémoire de Valérie Bécaert pour plus de détails sur le suivi exhaustif des paramètres physico-chimiques et biologiques. Le schéma de la figure #15 présente l'ensemble des manipulations effectuées sur l'ADN des mélanges boueux des réacteurs #1 et #2 lors de la deuxième activation. Après l'extraction de l'ADN total des mélanges boueux, des PCR ont été effectués à l'aide d'amorces spécifiques aux gènes *pcpB* et universelles aux gènes de l'ARNr 16S. Des génothèques des gènes *pcpB* et des gènes de l'ARNr 16S ont été construites. Une analyse phylogénétique des gènes *pcpB* a été effectuée. Ceux-ci ont aussi été quantifiés dans les bioréacteurs par PCR compétitif. Finalement, le suivi de l'évolution de la microflore totale a été réalisé à l'aide de la génothèque des gènes de l'ARNr 16S et de la technique SSCP.

Figure #14: Suivi de la concentration de PCP, des ions chlorures et du pH lors de la deuxième série d'activation du sol.

A) Réacteur alimenté au PCP (R1), **B)** réacteur alimenté à la solution de préservation du bois (SPB) (R2). Pour A et B : graphiques 1) suivi de la concentration de PCP, 2) suivi de la concentration des ions chlorures, 3) suivi du pH.

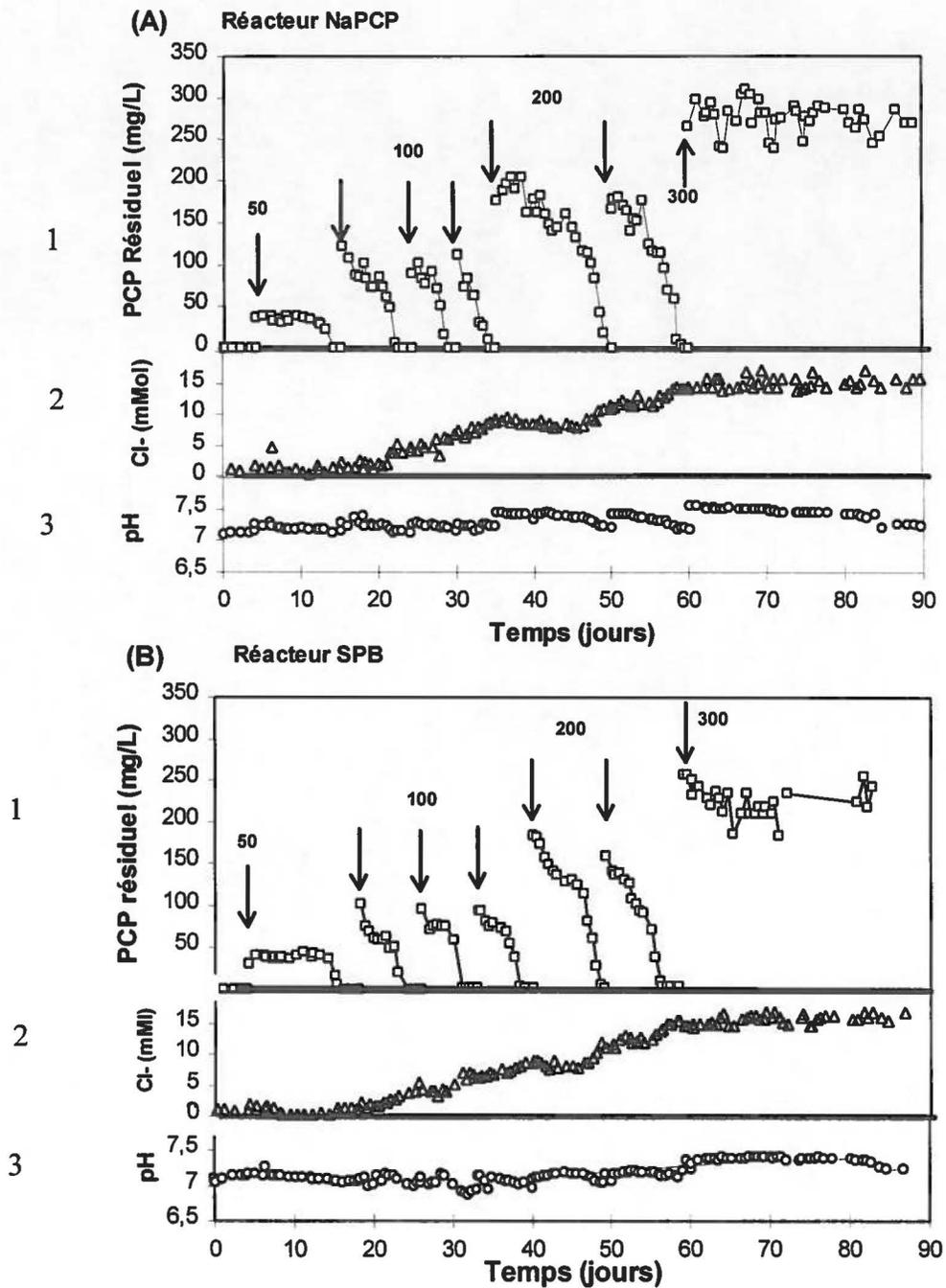
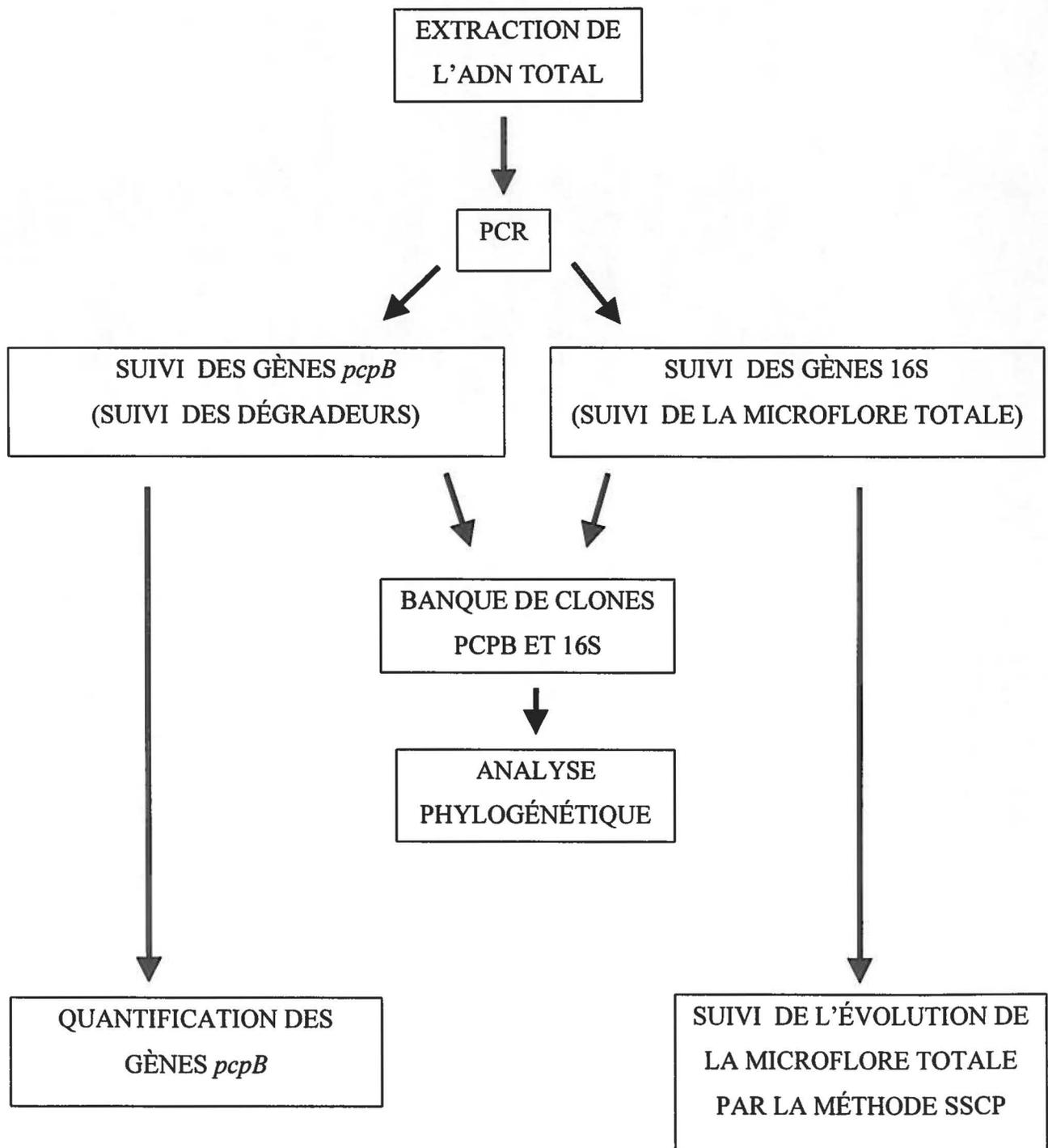


Figure #15: Schéma de l'ensemble des manipulations effectuées sur l'ADN total extrait des mélanges boueux des réacteurs de la deuxième activation.



3.1 Gènes *pcpB*

3.1.1 Suivi des gènes *pcpB*

Le suivi des gènes *pcpB* dans les bioréacteurs a servi à faire le suivi des microorganismes dégradants le PCP en assumant comme hypothèse que tous les dégradeurs du PCP possèdent ce gène. Des échantillons de 5 ml des mélanges boueux ont été prélevés à différents temps tout au long du processus d'activation, et l'ADN total en a été extrait. Des amplifications par PCR ont été effectuées avec les amorces spécifiques au gène *pcpB* : *pcpB*-G et *pcpB*-D₂. Pour bien détecter le signal du gène, il a été nécessaire de faire des PCR internes avec 2 µl du produit des premiers PCR et avec les amorces *pcpB*-G et *pcpB*-D₁ (amorce interne). Le premier PCR génère un fragment de 701 pb alors que le deuxième génère un fragment de 362 pb. Le résultat des amplifications est illustré à la figure #16. L'apparition du signal a été observée dès le treizième jour, et ce pour les deux bioréacteurs (visible sur photo originale). Pour le réacteur #1, le signal disparaît aux jours 16 et 21, réapparaît au jour 29 et demeure présent jusqu'à la fin. Toutefois, le signal au jour 34, absent sur la photo ici présentée, a été détecté dans une autre série d'amplification (résultat non illustré).

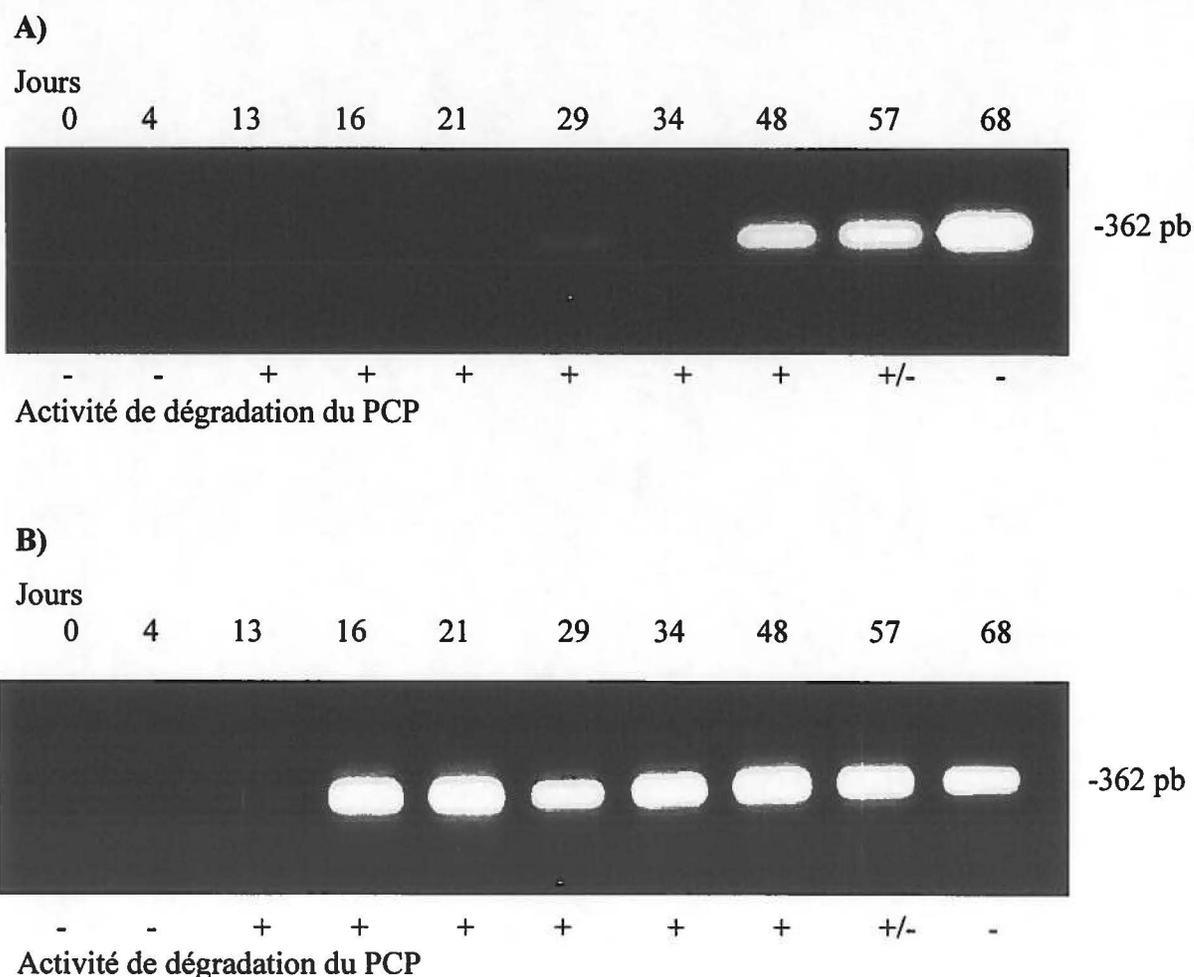
Sur la même figure est aussi présenté l'activité de dégradation du PCP mesuré par la minéralisation du PCP en microcosmes et via sa disparition mesuré par HPLC (Bécaert, 1999). Les deux premiers échantillonnages n'ont pas présenté d'activité de dégradation du PCP. De plus, il y a eu perte d'activité à la fin de l'activation, suite au dernier ajout de PCP au jour 60.

3.1.2 Quantification des gènes *pcpB* par PCR compétitif

Une méthode quantitative par PCR a été adaptée pour quantifier le gène *pcpB* dans les deux bioréacteurs. Cette technique, appelé PCR compétitif, consiste à

Figure #16: Suivi par PCR des gènes *pcpB* dans les boues des bioréacteurs.

Les amplifications par PCR ont été effectuées à partir d'échantillons d'ADN extraits des mélanges boueux des bioréacteurs à différents temps et avec les amorces spécifiques pour les gènes *pcpB* : *pcpB*-G et *pcpB*-D₂ pour le premier PCR et avec les amorces *pcpB*-G et *pcpB*-D₁ pour le PCR interne. Les produits de PCR ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1,6% et colorés au bromure d'éthidium. A) R1, B) R2.



co-amplifier l'ADN cible (l'ADN extrait des mélanges boueux) en présence d'un standard interne très semblable à l'ADN cible mais pouvant facilement être distingué de celui-ci.

Les détails de la construction du standard interne (SI) sont présentés à la section matériel et méthode. Le principe était de fabriquer un fragment d'ADN possédant les mêmes sites d'attachement des amorces *pcpB*-G et *pcpB*-D₂ et ayant une séquence très semblable aux séquences de l'ADN cible à amplifier, c'est à dire le gène *pcpB*. Le clone *pcpB*-1 de 701 pb précédemment obtenu (activation 1) a servi de base à la construction de ce standard interne. Pour pouvoir le distinguer de l'ADN cible, qui génère aussi un fragment à 701 nucléotides, ce clone a été modifié par l'ajout de 98 nucléotides au centre de son insert, ce qui n'a pas modifié les sites d'attachements aux amorces. Après amplification, ce clone (le standard interne) produit donc un fragment de 799 pb, permettant ainsi de distinguer les deux types d'ADN suite à une migration électrophorétique sur gel d'agarose.

La concentration de microorganismes dégradants le PCP dans les réacteurs a été évaluée par la méthode du PCR compétitif via l'amplification des gènes *pcpB* et en assumant qu'il n'y avait qu'un gène par bactérie. L'ADN a été extrait à partir d'échantillons de 5 ml prélevés aux jours 40 et 31 pour les réacteurs #1 et #2 respectivement. L'amplification a été effectuée avec approximativement 100 ng d'ADN en présence de quantités de standard interne variants de 1×10^4 à 1×10^7 molécules. Les figures #17A et #18A montrent les produits de PCR après migration électrophorétique sur gel d'agarose de 1,8%. Nous pouvons constater la ségrégation entre l'ADN cible et le standard interne. Une équivalence entre l'intensité de la bande du standard interne à 799 pb et celle de l'ADN cible à 701 pb a été observée dans le puits où il y avait 5×10^5 molécules de standard interne. Plus précisément, les pentes des graphiques des figures #17B et #18B permettent d'obtenir à quelle concentration le ratio SI 799 pb/ ADN cible 701 pb est égal à 1; c'est-à-dire la concentration recherchée de l'ADN cible. Pour le réacteur #1, il y avait, dans le tube réactionnel,

Figure #17: PCR compétitif pour quantifier le nombre de copies des gènes *pcpB* dans le mélange boueux du bioréacteur #1.

A) Les amplifications par PCR ont été effectuées à partir d'un échantillon d'ADN extrait au jour 40, en présence d'une quantité croissante de standard interne (S.I.) et des amorces spécifiques pour le gène *pcpB* : *pcpB-G* et *pcpB-D₂*. Les produits de PCR ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1,8% et colorés au bromure d'éthidium. L'intensité des fragments d'ADN a été mesurée par densitométrie. B) Représentation graphique à l'échelle logarithmique du PCR compétitif où le ratio de l'intensité des fragments (SI 799 pb/ADN cible 701 pb) est fonction de la quantité de standard interne ajoutée lors de la réaction de PCR. Chaque point représente la moyenne de trois PCR compétitifs.

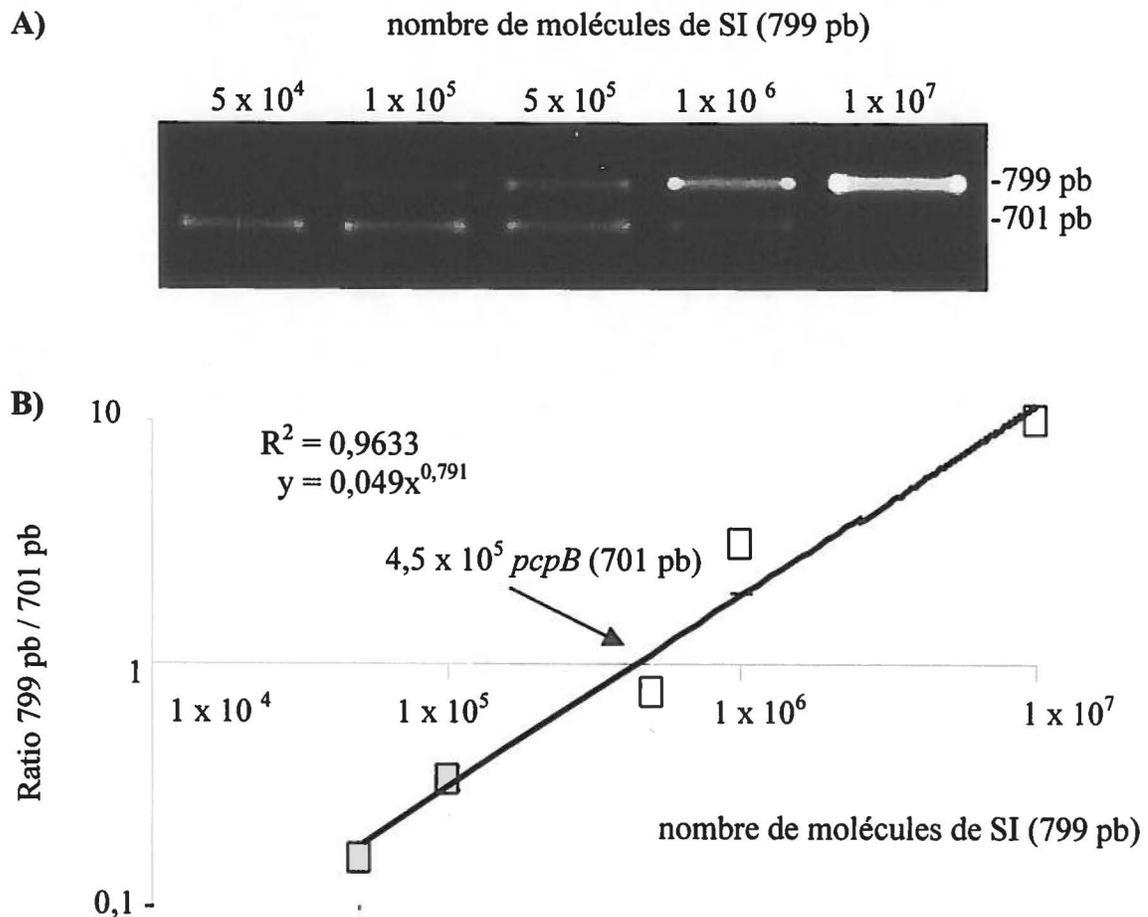
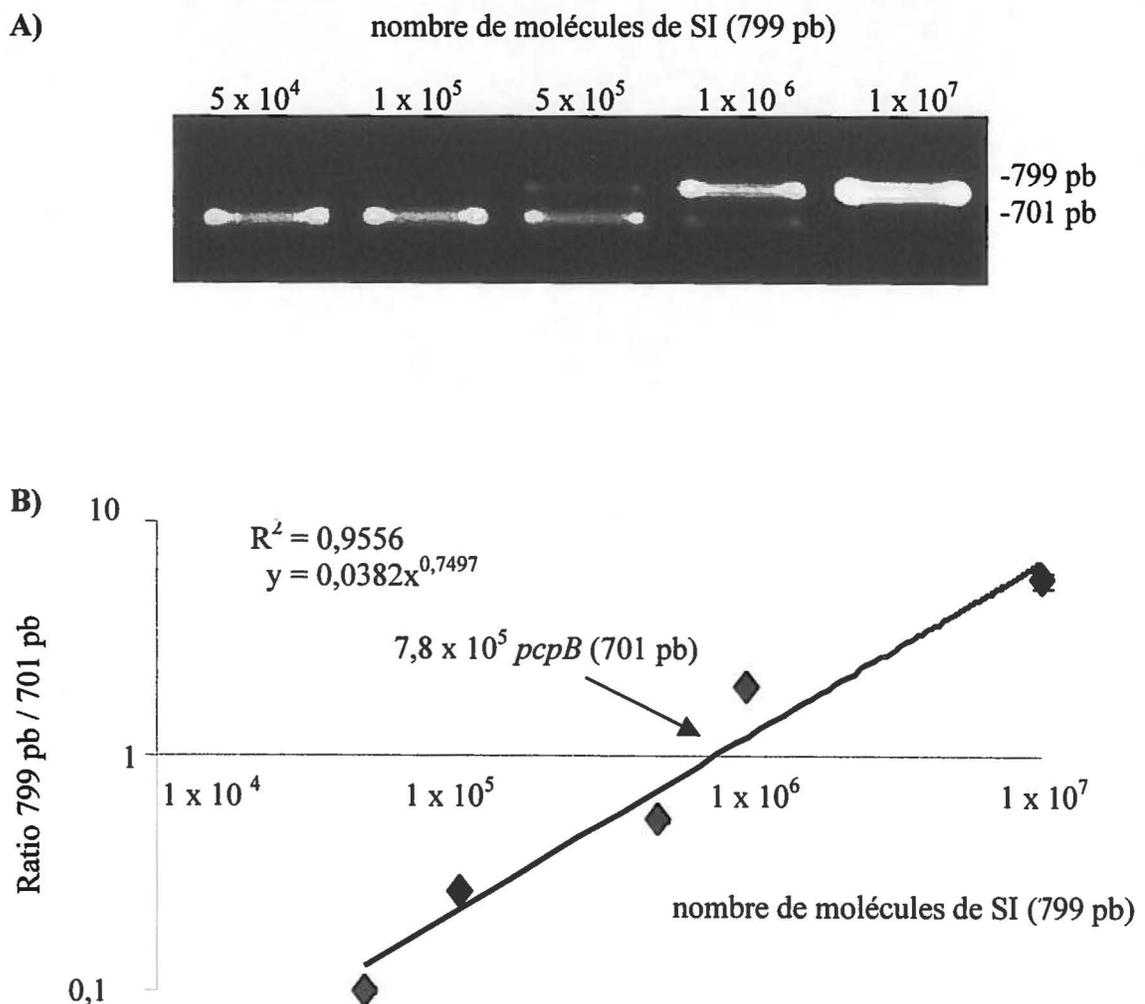


Figure #18: PCR compétitif pour quantifier le nombre de copies des gènes *pcpB* dans le mélange boueux du bioréacteur #2.

A) Les amplifications par PCR ont été effectuées à partir d'un échantillon d'ADN extrait au jour 31; pour la suite, voir la légende de la figure #17.



$4,5 \times 10^5$ copies du gène *pcpB*. Ceci correspondait à $4,5 \times 10^6$ gènes *pcpB* par ml de mélange boueux (1/50 de l'ADN extrait de 5 ml de mélange boueux) ou encore $4,5 \times 10^6$ dégradeurs par ml de mélange boueux. Le même calcul pour le réacteur #2 donne 12×10^6 *pcpb/ml* (1/77 de d'ADN extrait de 5 ml de mélange boueux).

3.1.3 Diversité des gènes *pcpB*

La construction d'une banque de gènes *pcpB* a servi à vérifier le niveau de diversité au sein des microorganismes dégradant le PCP dans les réacteurs au cours du processus d'activation du sol. Pour ce faire, des échantillons de 5 ml de boue ont été prélevés au début (06/04/98), au milieu (12/05/98) et à la fin (23/06/98) de l'activation et ce pour les deux bioréacteurs. L'ADN a été extrait, amplifié par PCR avec les amorces spécifiques aux gènes *pcpB* (*pcpB-G* et *pcpB-D₁*), et les produits de PCR ont été clonés. Les plasmides possédants l'insert approprié ont été digérés par l'enzyme *EcoRI* pour exciser l'insert du vecteur, puis dénaturés et fractionnés sur gel de polyacrylamide 5% non-dénaturant. Cette technique se base sur la méthode SSCP et permet de distinguer des fragments de même longueur mais possédant des séquences différentes (figure #19). Les inserts des plasmides ainsi sélectionnés ont été séquencés. Les séquences résultantes ont été comparées avec les trois séquences du gène *pcpB* disponibles (tableau #8). Les numéros 1 à 99, 201 à 299 et 401 à 499 correspondent aux clones du réacteur #1 du 06/04/98, 12/05/98 et 23/06/98 respectivement, alors que les numéros 100 à 199, 300 à 399 et 500 à 599 correspondent aux clones du réacteur #2 pour ces mêmes dates. Huit des onze séquences s'apparentent fortement à la séquence du gène *pcpB* de la souche *Sphingomonas* sp. UG30, tandis que les trois autres sont beaucoup moins apparentés aux trois séquences de références.

Figure #19: Criblage des clones *pcpB* sur gel de polyacrylamide de type SSCP.

L'amplification par PCR a été effectuée à partir d'échantillon d'ADN extrait des mélanges boueux des bioréacteurs, en présence d'amorces spécifiques pour les gènes *pcpB* : *pcpB*-G et *pcpB*-D₁. Les produits de PCR ont été dénaturés et fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 5% non-dénaturant et colorés au nitrate d'argent. Les numéros de puits 1 à 8 correspondent aux clones *pcpB*-32, 309, 402, 211, 408, 201, 215, 223 respectivement. SB : ADN simple brin, DB : ADN double brin (362 pb).

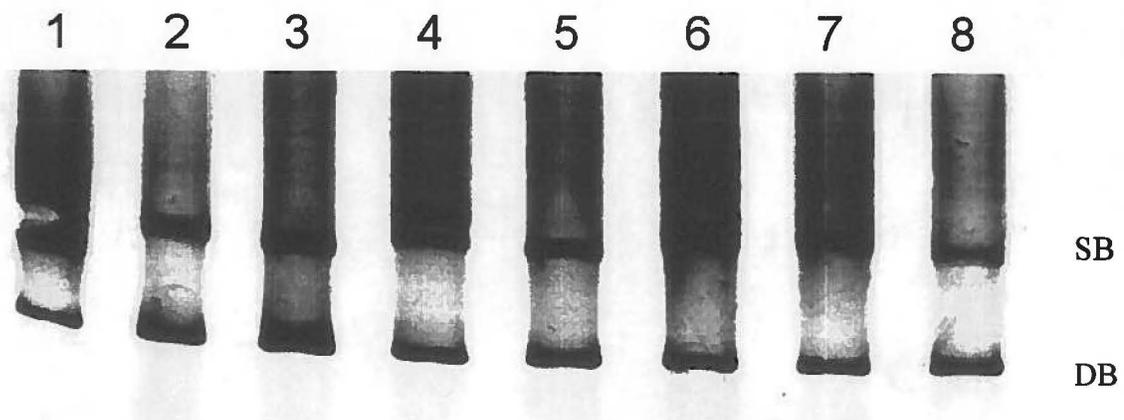


Tableau #8: Microorganismes possédants les séquences des gènes *pcpB* les plus apparentées aux clones *pcpB* de la deuxième série d'activation.

# du clone	# a.n.	Nom du microorganisme le plus apparenté	% similarité en acides nucléiques	% de similarité en acides aminés
pcpB-36	362	<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> ATCC 33790 (U60175)	76%	84,2%
pcpB-112	245	<i>Sphingomonas flava</i> ATCC 39723 (M98557)	75,1%	81,5%
pcpB-118	360	<i>Sphingomonas</i> sp.UG30 (AF059680)	97,5%	98,3%
pcpB-209	362	<i>Sphingomonas</i> sp.UG30 (AF059680)	98,1%	98,3%
pcpB-211	362	<i>Sphingomonas</i> sp.UG30(AF059680)	90,3%	96,7%
pcpB-215	363	<i>Sphingomonas</i> sp.UG30 (AF059680)	97%	96,7%
pcpB-312	341	<i>Sphingomonas</i> sp.UG30 (AF059680)	97,4%	98,2%
pcpB-320	351	<i>Sphingomonas</i> sp.UG30 (AF059680)	98%	97,4%
pcpB-415	362	<i>Sphingomonas flava</i> ATCC 39723 (M98557)	76,8%	85%
pcpB-532	362	<i>Sphingomonas</i> sp.UG30 (AF059680)	97,8%	98,3%
pcpB-540	362	<i>Sphingomonas</i> sp.UG30 (AF059680)	97,3%	98,3%

Entre parenthèse, le numéro d'accèsion dans la banque de gènes GeneBank.

3.1.3.1 Analyse phylogénétique des gènes *pcpB*

Pour permettre de mieux visualiser la relation entre les clones *pcpB* et les trois séquences de références, une étude phylogénétique a été effectuée. Une analyse phylogénétique est une représentation des liens génétiques évolutifs entre les séquences des gènes. Les séquences de nucléotides dans un gène évoluent différemment en fonction de la position qu'ils occupent. En effet, la troisième position de plusieurs codons n'a pas de pression de sélection pour être conservée puisqu'elle peut coder pour le même acide aminé (ex : valine, alanine, ...). Par conséquent, les séquences en acides aminés déduites des gènes ont été utilisées pour les analyses phylogénétiques car elles devraient mieux refléter les divergences.

Les 11 séquences des gènes *pcpB* de la deuxième activation plus 3 des 5 séquences de la première activation (excluant les clones *pcpB*-4 et 11, tableau #7) ont été analysées. Après leur traduction en acides aminés, celles-ci ont été alignées. Cet alignement, qui est présenté au tableau #9, a ensuite été utilisé pour générer une table des distances évolutives. Le tableau #10 donne les distances évolutives entre nos différentes séquences des gènes *pcpB* et les trois séquences de référence. La distance évolutive est ici définie comme le nombre de substitutions en acides aminés par sites, un site étant défini par la position d'un acide aminé dans l'alignement. Les distances ont été calculées en tenant compte du type de substitution (table PAM), une substitution d'une valine par une alanine n'ayant pas le même poids qu'une substitution d'une valine par une cystéine. La figure #20 est la représentation de l'arbre phylogénétique des séquences déduites en acides aminés de nos clones *pcpB*. Deux groupes distincts de séquences *pcpB* peuvent être observés sur cet arbre. Le premier, comportant le plus de séquences, regroupe celles qui sont les plus apparentées à la souche *Sphingomonas* sp. UG30. Ce groupe compte 11 séquences, dont 6 ne sont pas indiquées car elles sont identiques à la séquence du clone *pcpB*-540 (les clones *pcpB*-1, 15, 19, 209, 312 et 532). Le deuxième groupe est très éloigné génétiquement et contient les clones *pcpB*-36, 112 et 415.

Tableau #10: Table des distances évolutives entre les différentes séquences déduites en acides aminés des gènes *pcpB* des clones *pcpB* et des trois souches bactériennes de référence.

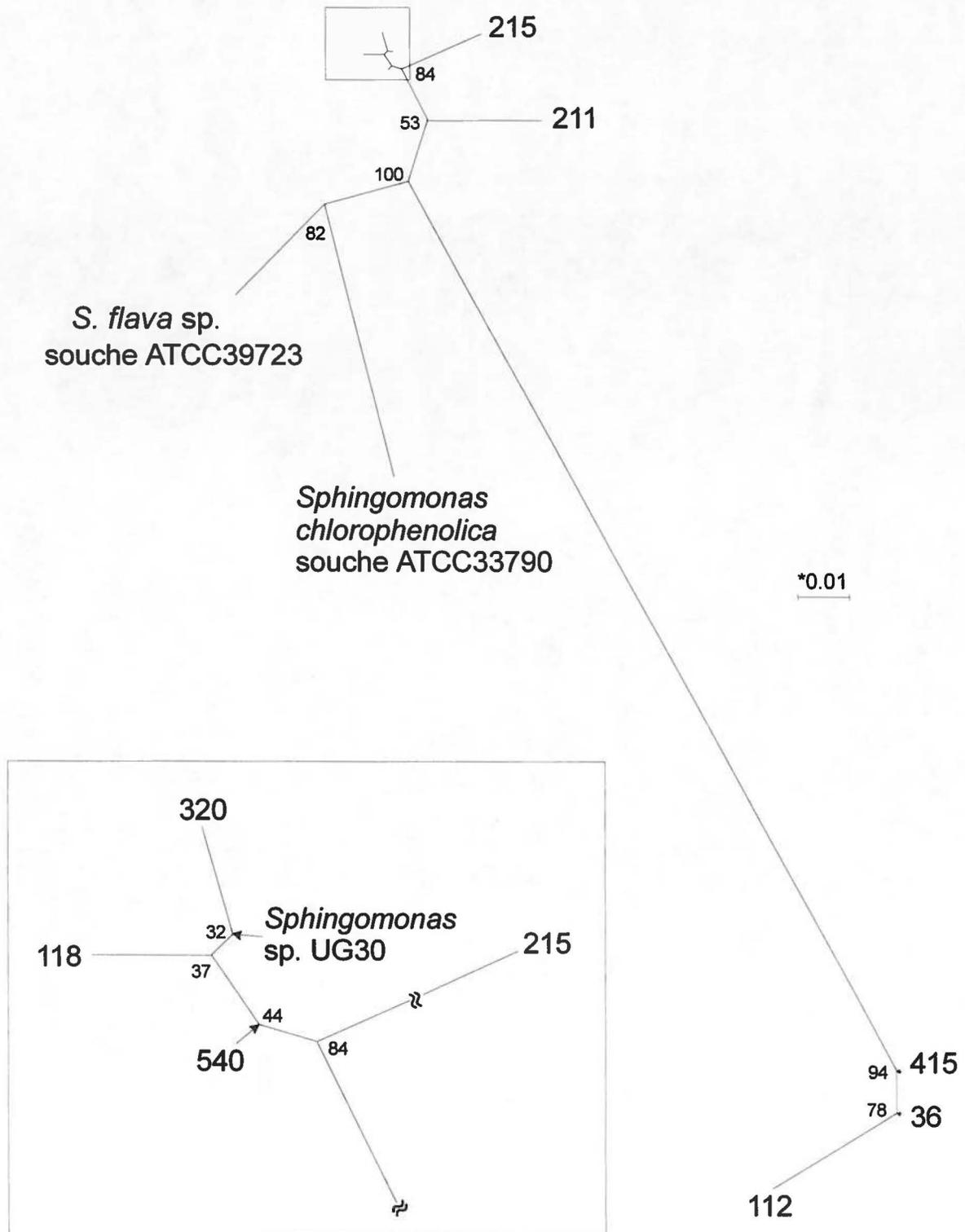
Les distances ont été calculées à l'aide du programme PROTDIST et représentent le nombre de substitution d'acides aminés par site. Les trois souches bactériennes de références sont : **UG30** : *Sphingomonas* sp. UG30; **flavo** : *Sphingomonas flava* ATCC 39723; et **sphin** : *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 33790.

pcpb36	0.00000											
pcpb415	0.00820	0.00000										
pcpb112	0.02598	0.03933	0.00000									
pcpb540	0.21920	0.22307	0.30671	0.00000								
pcpb118	0.22873	0.23273	0.30671	0.00813	0.00000							
pcpb320	0.22913	0.23315	0.32291	0.00765	0.01461	0.00000						
pcpb215	0.24468	0.24898	0.30671	0.01689	0.02536	0.02540	0.00000					
UG30	0.24600	0.25034	0.32631	0.00250	0.00338	0.00327	0.03527	0.00000				
pcpb211	0.20023	0.20382	0.29198	0.03289	0.04118	0.04124	0.05121	0.05146	0.00000			
flavo	0.23626	0.24035	0.31968	0.06645	0.07487	0.07499	0.08600	0.08643	0.08382	0.00000		
sphin	0.26912	0.27370	0.34146	0.09251	0.10108	0.10124	0.11305	0.11362	0.12786	0.08301	0.00000	
	pcpb36	pcpb415	pcpb112	pcpb540	pcpb118	pcpb320	pcpb215	UG30	pcpb211	flavo	sphin	

Figure #20: Arbre phylogénétique des séquences déduites en acides aminées des gènes *pcpB* des clones *pcpB* et de trois souches bactériennes de référence (légende).

L'arbre a été dérivé à partir du programme FITCH en utilisant la table de distance du tableau #10 avec la séquence du clone #415 comme racine. Une analyse statistique (bootstrap) des mêmes séquences a été faite avec le programme SEQBOOT en 230 réplicats. Les distances ont été calculées pour chaque réplicat à l'aide du programme PROTDIST. Le programme FITCH a dérivé le meilleur arbre pour chaque réplicat. Le programme CONSENSE a dérivé l'arbre consensus à partir des 230 arbres. Les nombres inscrits dans les fourches indiquent le pourcentage de chance que le groupement de séquences fourche à cet endroit plutôt qu'à un autre endroit. *distance évolutive en nombre de substitution d'acides aminés par site.

Figure #20: Arbre phylogénétique des séquences déduites en acides aminés des gènes *pcpB* des clones *pcpB* et de trois souches bactériennes de référence.



3.2 Gènes de l'ARN 16S ribosomal

3.2.1 Suivi des gènes de l'ARN 16S ribosomal

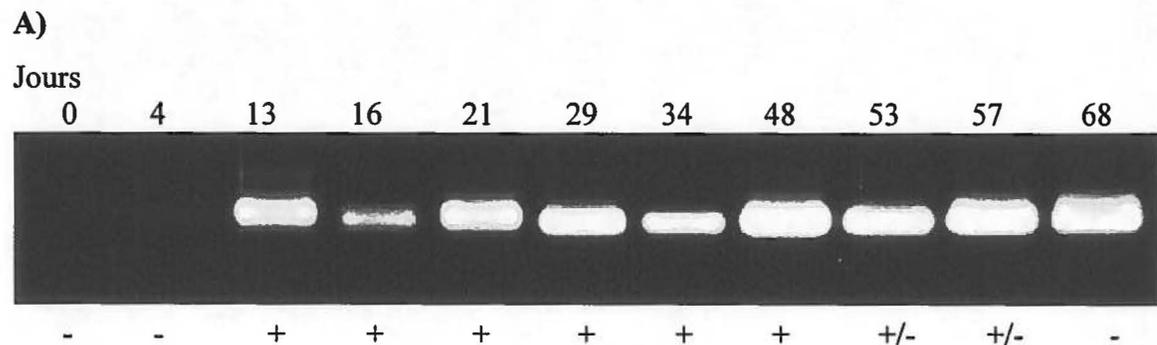
De la même façon que les gènes *pcpB*, le suivi des gènes de l'ARNr 16S a été effectué. Cette fois-ci, cela a permis de suivre les eubactéries dans les deux bioréacteurs puisque des amorces universelles pour les gènes de l'ARNr 16S de toutes les eubactéries ont été utilisées pour l'amplification par PCR. Sur la figure #21, il y a eu apparition du signal dès le quatrième jour et ce pour les deux réacteurs. Une bonne biomasse s'est instaurée et est demeurée volumineuse jusqu'à la fin de l'activation, comme en témoigne l'intensité du signal. Sur la même figure, nous pouvons observer la perte de l'activité de dégradation du PCP, comme déjà énoncé plus haut.

3.2.2 Suivi de l'évolution de la microflore totale

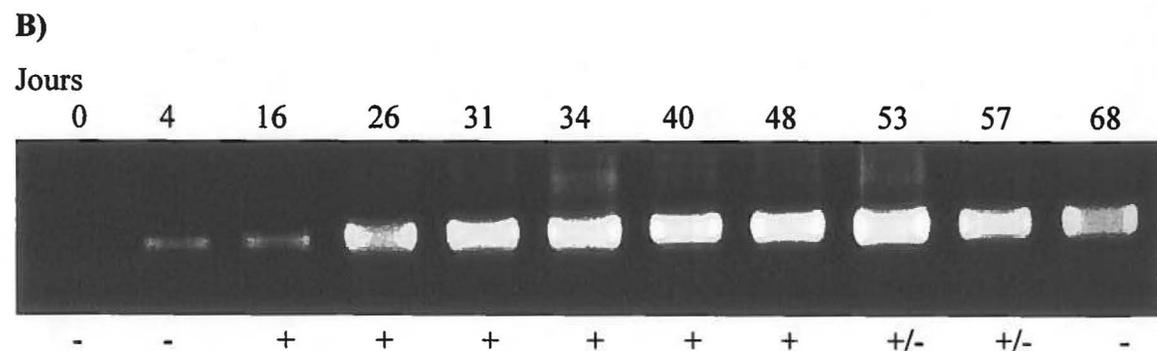
La technique SSCP a été utilisée pour visualiser l'évolution de la diversité microbienne lors du processus d'activation du sol. Des échantillons des mélanges boueux de 5 ml ont été prélevés dans chacun des bioréacteurs à différents temps. L'ADN a été extrait puis amplifié par PCR avec les mêmes amorces universelles utilisées aux sections précédentes. Les produits de PCR ont été dénaturés et fractionnés sur gel de polyacrylamide 5% non-dénaturant. Sur ce type de gel, les simples brins d'ADN migrent en fonction de leur séquence et non en fonction de leur longueur ou de leur poids moléculaire. Comme les fragments amplifiés ont tous à peu près le même poids moléculaire, soit environ 550 pb, cette technique nous a permis de distinguer les variations dans les séquences des gènes 16S. Sur les figures #22 et #23, la multitude de bandes migrant à différentes hauteurs dans chacun des puits (jours 0 à 82) représente la diversité dans les séquences de gènes 16S provenant d'une diversité de microorganismes présents dans les réacteurs à ces moments particuliers. Autrement dit, il s'agit d'une illustration de la diversité des microorganismes; et le suivi dans le temps nous a permis de visualiser l'évolution de la microflore dans les bioréacteurs

Figure #21: Suivi par PCR des gènes de l'ARNr 16S dans les mélanges boueux des bioréacteurs.

L'amplification par PCR a été effectuée à partir d'échantillons d'ADN extraits des mélanges boueux à différents temps et avec les amorces universelles pour la région 5' des gènes de l'ARNr 16S : pA et 533r. Les produits de PCR ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1,6% et colorés au bromure d'éthidium. Le fragment d'ADN migre à 550 pb. **A) R1, B) R2.**



Activité de dégradation du PCP



Activité de dégradation du PCP

Figure #22 : Suivi de l'évolution de la microflore dans le mélange boueux du bioréacteur #1.

L'amplification par PCR s'est effectuée à partir d'échantillon d'ADN extrait du mélange boueux à différents temps et avec les amorces universelles pour la région 5' des gènes de l'ARNr 16S : pA et 533r. Les produits de PCR ont été dénaturés et fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 5% non-dénaturant et colorés au nitrate d'argent. **SB** : ADN simple brin, **DB** : ADN double brin (500-550 nucléotides)

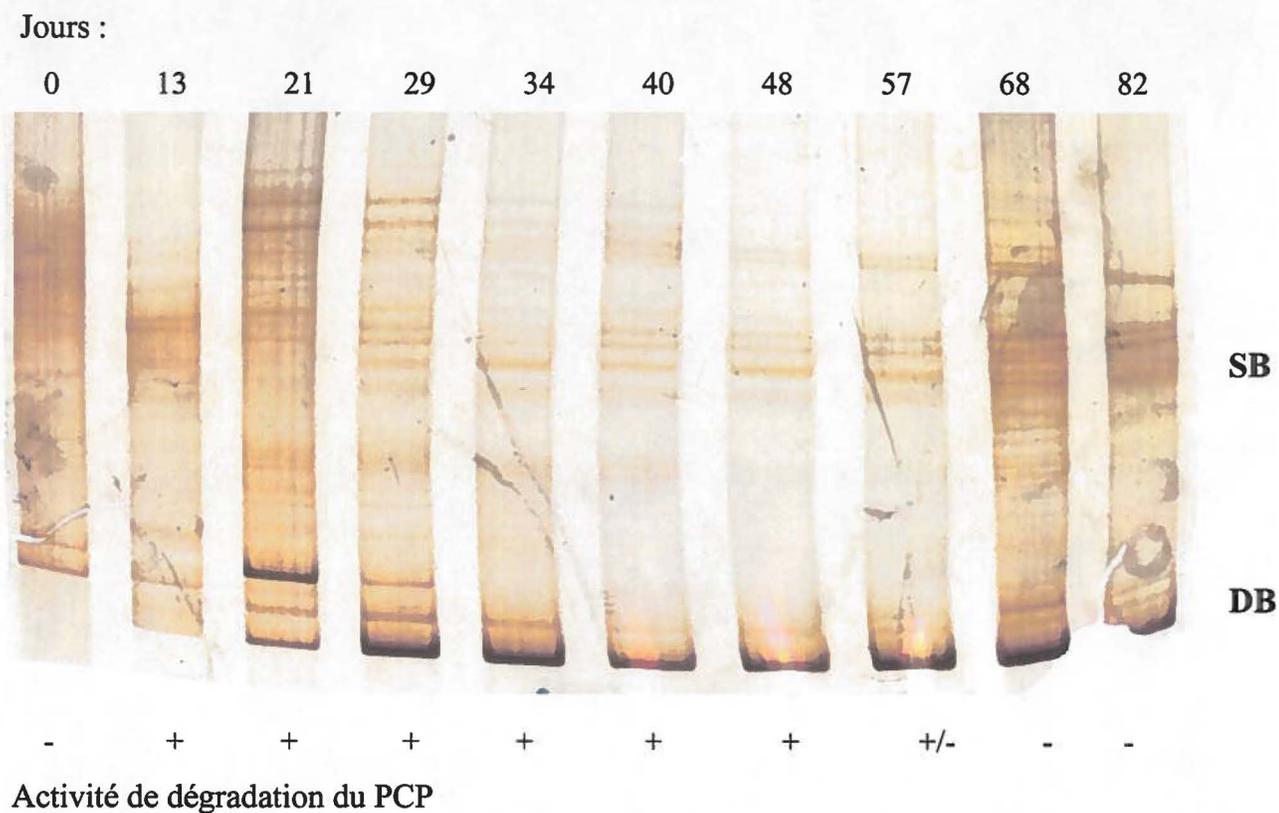
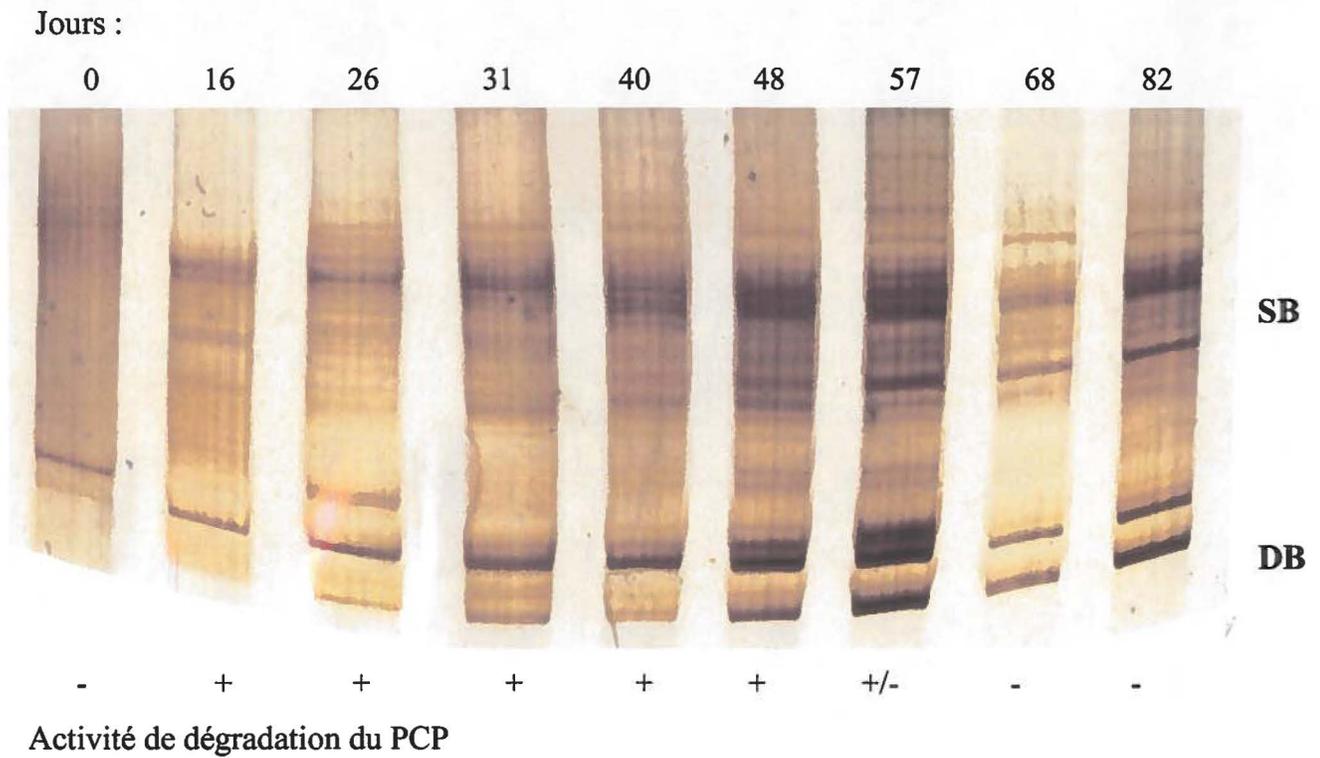


Figure #23 : Suivi de l'évolution de la microflore dans le mélange boueux du bioréacteur #2.

Voir la légende de la figure #22.



tout au long du processus d'activation des mélanges boueux.

Le résultat illustré à la figure #22 démontre une évolution de la diversité de la microflore du réacteur #1. Elle était complexe au début de l'activation comme en témoigne la présence d'une multitude de bandes, puis le nombre de bandes diminua et seulement quelques-unes dominent entre les jours 29 et 57, correspondant à la période de bonne dégradation du PCP. Puis vers la fin, il y a eu retour de la complexité de la microflore, à peu près au même moment où il y a eu perte de l'activité de dégradation du PCP. Dans le cas du réacteur #2 (figure #23), il n'est pas vraiment possible de voir de telles modifications. La microflore est demeurée très complexe, plus complexe que pour le réacteur #1, et ce du début jusqu'à la fin de l'activation.

3.2.3 Génothèque des gènes de l'ARN 16S ribosomal

La construction d'une banque de gènes de l'ARNr 16S a servi à avoir une idée de la diversité microbienne présente dans les réacteurs au cours du processus d'activation des mélanges boueux. Pour ce faire, des échantillons de 5 ml ont été prélevés au début (06/04/98), au milieu (12/05/98) et à la fin (23/06/98) de l'activation et ce pour les deux bioréacteurs. L'ADN a été extrait et amplifié par PCR avec les amorces universelles pour la partie 5' des gènes de l'ARNr 16S. Les produits de PCR ont été clonés et les clones obtenus ont été digérés par l'enzyme *EcoRI* pour exciser l'insert du vecteur plasmidique puis, dénaturés et fractionnés sur gel de polyacrylamide 5% non-dénaturant pour effectuer le criblage (même stratégie que pour les clones pcpB). Les clones ainsi sélectionnés ont été séquencés et comparés avec les banques de données pour obtenir une liste des microorganismes possédant les gènes de l'ARNr 16S les plus homologues.

Le tableau #11 présente les microorganismes possédant les séquences les plus apparentées aux séquences de nos clones. Les numéros 1 à 99, 201 à 299 et 401 à 499 correspondent aux clones du réacteur #1 du 06/04/98, 12/05/98 et 23/06/98

respectivement, alors que les numéros 100 à 199, 300 à 399 et 500 à 599 correspondent aux clones du réacteur #2 pour ces mêmes dates.

Le tableau #11 permet de constater que les séquences des clones des gènes de l'ARNr 16S s'apparentent à une diversité de microorganismes, dont plusieurs sont non-identifiés, non-cultivables ou encore provenant d'échantillons de l'environnement. Trois séquences sont apparentées aux genres *Flavobacterium* et *Sphingomonas* mais aucune n'est apparentée à des bactéries reconnues pour dégrader le PCP. Les réacteurs présentent tous deux une diversité microbienne importante.

Tableau #11: Microorganismes possédants les séquences des gènes de l'ARNr 16S les plus apparentées aux clones 16S de la deuxième activation.

# du clone	Nom du microorganisme le plus apparentés	% de similarité en a.n.
R3	Bactérie non cultivable, échantillon de l'environnement (AF018064)	95%
R4	<i>Flexibacter</i> sp. (D84581)	96%
R17	Bactérie verte non-sulfureuse non-identifiée de l'environnement (AF027044)	76,1%
R101	<i>Flavobacterium</i> sp. (U63955)	88,6%
R109	<i>Afipia broomeae</i> F186 (U87759)	99%
R110	bactérie filamenteuse type 0803, échantillon de l'environnement (X86071)	98,5%
R118	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> (M59051)	95,8%
R119	Eubactérie non-cultivable 4-59, échantillon de l'environnement (AJ011164)	96%
R208	<i>Sphingomonas</i> sp. CF06 (U52146)	98,5%
R392	<i>Acinetobacter</i> sp. (Z93451)	99,2%
R406	Eubactérie non-identifiée, échantillon de l'environnement (AJ232799)	99,2%
R510	<i>Codakia costata</i> (L25712)	88,8%

Entre parenthèse, le numéro d'accèsion dans la banque de gènes GeneBank.

Discussion

1. Production de sol activé

La production d'une biomasse active sous forme de sol activé a été réalisée dans les laboratoires de la Chaire industrielle CRSNG sur les bioprocédés d'assainissement des sites et des sols de l'École Polytechnique de Montréal, sous la responsabilité de l'étudiante à la maîtrise Valérie Bécaert. Lors de la première activation, il a été possible d'obtenir un taux de dégradation moyen du PCP, pour le réacteur #1, de 16 mg/l par jour. Pour la deuxième activation, ces taux ont été de 21 et 22 mg/l par jour pour les réacteurs #1 et #2 respectivement. Les taux de dégradation maximaux sont passés de 19 à 132 mg/l par jour pour le réacteur #1 et de 41 à 112 mg/l par jour pour le réacteur #2. De plus, dans les trois cas, la dégradation du PCP a été de 99,6% (Bécaert *et al.*, 2000). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Barbeau *et al.* (1997), qui ont obtenu un taux de dégradation passant de 7 à 167 mg/l par jour et 99,7% de dégradation, pour un bioréacteur semblable.

Les travaux de plusieurs équipes de chercheurs ont permis d'identifier certains éléments cruciaux se rapportant à l'aspect microbiologique du processus d'activation d'un sol en bioréacteur. En effet, les performances de dégradation du PCP par la flore sont entre autre influencées par le mode d'alimentation. Il a été possible d'obtenir des taux de dégradation supérieurs en utilisant la méthode d'alimentation en continu (Otte *et al.*, 1994). Mais la nécessité d'une infrastructure et d'un suivi plus complexes entraînant des coûts plus élevés élimine cette option pour une application sur le terrain. Le mode d'alimentation par ajouts est ici avantageux. En utilisant ce mode d'alimentation, il est possible d'en optimiser ses performances en effectuant les ajouts au moment approprié. Bécaert (1999) a observé une augmentation du taux de dégradation moyen du PCP lorsque la solution d'activation a été ajoutée en phase de dégradation active du PCP dans le bioréacteur (plutôt que d'attendre la disparition du PCP du dernier ajout pour alimenter de nouveau le réacteur). L'alimentation en PCP devrait donc se faire en période de dégradation active afin de stimuler le plus possible la flore dégradant le PCP. De plus, il a été observé que si le nouvel ajout de PCP se

fait un peu après (1 à 3 jours) la disparition complète du PCP du dernier ajout, la flore subit alors une période dite de famine (manque de substrat) qui lui est néfaste. Bécaert (1999) a observé une inhibition de la dégradation du PCP suivant une période de famine d'une journée. Plus la période de famine est longue, plus le temps de latence avant de débiter la dégradation du nouvel ajout de PCP est long, comme décrit dans Morita (1993). L'auteur ajoute que le nombre de dégradeur ne varie pas nécessairement (aussi observé par Bécaert, 1999), mais ceux-ci changent plutôt de mode métabolique, pour passer à celui de survie. Buitron *et al.* (1994) ont observé l'influence négative d'une période de famine sur l'activité d'une biomasse acclimatée au 4-chlorophénol alors qu'une baisse de 80% de l'activité enzymatique a été notée après seulement 6 heures de famine. Megharaj *et al.* (1997) ont démontré que la densité d'une population de la souche *Sphingomonas* sp. RW1 acclimatée au dibenzofuranne, diminuait sous les limites de détection après avoir été privée de substrat, pour réapparaître dès l'ajout de dibenzofuranne frais. Selon Milette *et al.* (1995), une biomasse très active se caractérise par de courtes périodes de latence et des pourcentages élevés de minéralisation.

2. Extraction des acides nucléiques et amplification par PCR

L'extraction des acides nucléiques d'échantillons de sol en vue d'une amplification par PCR est caractérisée par la co-extraction d'inhibiteurs de la réaction de PCR. En effet, les acides humiques, les particules d'argile et des métaux peuvent persister lors de l'extraction et de la purification et sont nuisibles à l'amplification (Romanowski *et al.*, 1992). La méthode d'extraction de l'ADN développée par Lévesque (Lévesque, 1998) s'est avérée très efficace. Cette méthode a donc été retenue au cours de la présente étude. Elle a toutefois été modifiée; la dernière étape de purification n'a pas été la filtration sur gel de Sephadex mais l'utilisation d'une colonne de PVPP (Berthelet *et al.*, 1996). Holben *et al.* (1988) ont été parmi les premiers à utiliser le PVPP pour diminuer la co-extraction d'inhibiteurs lors de l'étape

d'extraction de l'ADN. Ce polymère insoluble est en effet reconnu pour adsorber les composés phénolés tel que les acides humiques. La technique d'extraction modifiée a permis d'optimiser cette étape critique.

L'extraction de l'ADN du réacteur #1 de la première activation a montré une faible quantité d'ADN au début de l'activation et une plus grande quantité d'ADN à la fin de l'activation. Ceci suggère la présence d'une biomasse plus importante à la fin de l'activation par rapport au début. Ce résultat était attendu puisqu'il s'agit de l'objectif principal de la production du sol activé, c'est-à-dire la production d'une biomasse significative.

L'ADN extrait des boues des bioréacteurs a servi de matrice pour une amplification de type exponentiel par PCR. Le but était d'amplifier des gènes (*pcpB* ou ARNr 16S) pour les détecter et suivre leur présence dans les réacteurs. Le PCR est une technique très sensible; seulement une très faible quantité initiale d'ADN est requise pour obtenir un signal. Toutefois, lorsque la réaction est inhibée par certaines substances, il est possible de diluer l'échantillon pour diluer les effets des inhibiteurs. Par contre, étant donné la dilution de l'échantillon, la sensibilité de la technique est du même coup diminuée. Il a été observé que l'ajout de BSA lors de la réaction de PCR permet de hausser la quantité d'ADN utilisé, dans une certaine limite, sans avoir d'effet inhibiteur. Cette protéine complexe les surplus d'ADN et d'inhibiteurs, rendant plus favorable l'amplification (Lévesque, 1998).

Dans la présente étude, les gènes de l'ARNr 16S et les gènes *pcpB* ont été amplifiés par PCR et leur détection sur gel a servi à effectuer le suivi des populations de microorganismes dégradants le PCP et de la biomasse totale respectivement. L'amplification par PCR effectuée sur l'ADN extrait du réacteur #1 de la première activation n'a pas permis d'obtenir un signal pour le gène *pcpB* au début de l'activation. Il est fort probable que les microorganismes possédant ce gène n'étaient pas assez nombreux au début de l'activation pour permettre l'obtention d'un signal.

Par contre, un signal a été obtenu à la fin de l'activation. Ceci suggère fortement une augmentation de la biomasse, et plus spécifiquement, une augmentation des microorganismes dégradant le PCP. C'était précisément l'objectif visé par la production du sol activé : la production d'une biomasse active capable de dégrader le PCP. Ces premiers résultats semblent le confirmer.

Le PCR effectué avec les amorces universelles a permis d'obtenir, au début de l'activation, un fragment d'ADN diffus et étendu. Ce fragment était en fait composé d'une multitude de fragments de longueurs similaires (plus ou moins 50 paires de bases), provenant d'une multitude de microorganismes. Il y avait dans cet échantillon une forte diversité microbienne. Par contre, le fragment d'ADN du sol activé était plus compact, suggérant une diversité microbienne moindre. Il y avait, entre le début et la fin de l'activation, plus d'ADN donc plus de copie des gènes *pcpB* et moins de diversité microbienne. Tout ceci appuie l'hypothèse suggérant qu'il y ait eu augmentation importante de la biomasse spécifique capable de dégrader le PCP.

3. Détection des gènes *pcpB*

Dans la présente étude, les gènes *pcpB* ont été détectés et suivis dans des bioréacteurs grâce à l'utilisation du PCR en présence d'amorces spécifiques à ce gène. Ceci nous a permis de suivre les microorganismes dégradants le PCP en assumant comme hypothèse que les dégradeurs du PCP possèdent ce gène.

Steffan *et al.* (1988) ont été parmi les premiers à utiliser la technique de PCR pour suivre la présence de microorganismes inoculés dans un sol. Ils ont amplifié et détecté l'ADN de *Pseudomonas cepacia* AC1100 à l'aide d'amorces spécifiques qui sont homologues pour une région hautement répétitive et qui est présente de 15 à 20 fois dans le génome de cette bactérie. Herrick *et al.* (1993) ont quant à eux utilisé le même principe mais ils ont détecté à la fois les gènes de l'ARNr 16S et un gène

catabolique précis. Il s'agit du gène *nahAc* qui est impliqué dans le catabolisme du naphthalène, et les chercheurs l'ont détecté dans un site contaminé au naphthalène. Les gènes *pcpB* et *pcpC* ont pour leur part déjà été détectés par hybridation et amplifiés par PCR dans des isolats microbiens obtenus par enrichissement d'échantillon de sol contaminé au PCP par l'équipe de Leung *et al.* (1997). Leurs analyses préliminaires leur ont permis d'identifier deux isolats performants pour la dégradation du PCP (nommés UG25 et UG30).

Le suivi par PCR des gènes *pcpB* dans les boues des réacteurs #1 et #2 lors de la deuxième série d'activation est illustré à la figure #16. Dans les deux cas, il y a eu apparition du signal au jour 13. Ce signal a augmenté en intensité et est demeuré présent jusqu'à la fin dans le cas du réacteur #2. Ceci suggère que la biomasse possédant le gène *pcpB* s'est implantée et est demeurée présente jusqu'à la fin. Dans le cas du réacteur #1, le signal a disparu aux jours 16 et 21 et n'a réapparu, pour demeurer, qu'au jour 29. La biomasse s'est développée et a pu être détectée en début d'activation (jour 13) mais sa croissance a dû chuter et le signal a été perdu. On pourrait expliquer ce phénomène par la chronologie et la concentration des ajouts de PCP. En effet, le premier ajout a été fait au jour 4 et a été de 50 mg/l, pour les deux réacteurs. La biomasse dégradant le PCP s'est développée et a été détectée au jour 13. Mais le deuxième ajout a été de 100 mg/l et a été fait au jour 15 (jour 18 pour le réacteur #2). Vraisemblablement, cette augmentation dans la concentration a été un peu trop brutale pour la microflore du réacteur #1, qui a pris quelques jours pour s'y acclimater, avec le retour du signal au jour 29.

Une question se pose alors, pourquoi la microflore du réacteur #2 n'a pas réagit comme celle du réacteur #1 à cette hausse de la concentration de PCP? Le phénomène de partage du PCP entre la phase aqueuse et le diésel serait responsable de cette différence. Rappelons que le réacteur #2 a été alimenté avec une solution de PCP dissous dans de l'huile diésel #2. Le diésel influencerait la dégradation du PCP en absorbant une partie de celui-ci puis en le relargant lentement dans la phase aqueuse,

selon un équilibre de partage du PCP entre la phase aqueuse et la phase organique. Le coefficient de partage octanol-eau ($\text{Log } K_{ow}$) quantifie l'hydrophobicité des contaminants organiques; plus les valeurs du $\text{Log } K_{ow}$ sont élevées, plus le contaminant préférera la phase organique. Liu *et al.* (1982) ont rapporté une valeur de $\text{Log } K_{ow}$ pour le PCP de 3.20 à un pH 7.2; et Nowosielsky et Fien (1998) une valeur de 3,69 à pH 7,2. Ces valeurs élevées impliquent qu'une portion du PCP du réacteur #2 se retrouverait dans la phase organique, en l'occurrence le diésel. Ce phénomène de partage peut aussi influencer le seuil de tolérance (toxicité) au PCP des microorganismes en abaissant sa concentration en phase aqueuse.

Un autre résultat intéressant sur cette figure est l'activité de dégradation du PCP mesurée par la minéralisation du PCP en microcosmes et via sa disparition, mesurée par HPLC (Bécaert, 1999). Les deux premiers échantillonnages (jours 0 et 4) n'ont pas présenté d'activité de dégradation du PCP, ce qui est normal puisque le premier ajout de PCP n'a été effectué qu'au jour 4. Il y a ensuite eu activité de dégradation du PCP pendant plusieurs semaines. Puis il y a eu perte d'activité de dégradation à la fin de l'activation suite au dernier ajout de PCP de 300 mg/l au jour 60. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que le seuil de toxicité a été atteint et l'activité de dégradation du PCP a été inhibée. Barbeau *et al.* (1997) ont aussi observé une inhibition de la dégradation du PCP à une concentration de 300 mg/l, dans un bioréacteur alimenté par ajout.

Pourtant, malgré la perte d'activité de dégradation du PCP, le signal des gènes *pcpB* était toujours présent. L'explication serait que le PCR a amplifié de l'ADN provenant de cellules mortes. Il s'agit en effet d'un inconvénient de la technique PCR. L'ADN de cellules mortes n'ayant pas encore été dégradé par les nucléases a servi de matrice à l'amplification. La détection par PCR n'est donc pas une indication de la viabilité des cellules étudiées. Par contre, Josephson *et al.* (1993) ont affirmé que l'ADN relâché dans l'environnement est habituellement dégradé rapidement. Mais

dans le sol, Romanowski *et al.* (1993) ont mentionné que les particules d'argiles peuvent adsorber l'ADN, qui demeure donc inaccessible aux nucléases.

Il serait possible de contourner le problème de la présence d'ADN de cellules mortes en effectuant un RT-PCR ("reverse transcription" ou transcription inverse PCR). Il s'agit d'extraire non pas l'ADN mais l'ARN du sol. L'ARN est ensuite converti en ADN par transcription inverse, et cet ADN est utilisé pour l'amplification par PCR. L'utilisation de l'ARN reflète plus justement la viabilité des cellules car l'ARN relâché des cellules mortes est dégradé beaucoup plus rapidement que l'ADN. De plus, le niveau d'ARN varie en fonction de l'état physiologique des cellules et reflète donc aussi l'activité métabolique. L'équipe de Ogram *et al.* (1995) ont utilisé cette approche pour développer et évaluer trois méthodes d'extraction de l'ARN de biomasses minoritaires contenues dans des sédiments d'eaux souterraines. Suite à ces extractions, ils ont pu évaluer le rendement de chacune des méthodes d'extraction et caractériser les biomasses. Pour ce faire, ils ont effectué des RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques à chacun des trois domaines : *Archae*, *Bacteria* et *Eucarya*. Ils ont aussi détecté par RT-PCR, et avec des amorces spécifiques, les gènes *tmoA* (gène de la toluène-4-monooxygénase de *Pseudomonas mendocina* KR1) et *todC1* (gène de la toluène-dioxygénase de *Pseudomonas putida* F1).

4. Quantification des gènes *pcpB*

Le PCR compétitif a été la stratégie retenue pour quantifier les gènes *pcpB* dans les deux réacteurs. Ceci a permis de déduire le nombre de copie des gènes *pcpB* présent dans les deux bioréacteurs. Suite à cette mesure, il a été possible d'évaluer la concentration de microorganismes dégradants le PCP en assumant comme hypothèse qu'il n'y a qu'un gène *pcpB* par bactérie.

Au jour 40, le réacteur #1 contenait $4,5 \times 10^6$ gènes *pcpB* par ml alors qu'au jour 31, le réacteur #2 en contenait plus que le double, soit 12×10^6 gènes *pcpB* par ml. Pourtant, les deux réacteurs ont été alimentés avec les mêmes quantités de PCP. La différence dans le nombre de dégradeurs pourrait venir du fait que le PCP qui a servi à alimenter le réacteur #2 était dissous dans une solution de préservation du bois à base de diesel. L'abondance et la diversité des sources de carbone de cette solution pourraient soutenir une meilleure croissance de la microflore totale et des microorganismes dégradant le PCP par le fait même.

Il est intéressant de mentionner que Bécaert (1999) a aussi quantifié les microorganismes dégradant le PCP. Pour ce faire, elle a utilisé la méthode du nombre le plus probable NPP (ou "Most Probable Number", MPN). La méthode employée a été inspirée de celle de Wiggins *et al.* (1988), et est basée sur une analyse statistique des résultats. Des échantillons de boue étaient incubés en diverses dilutions (en quintuplicat) en présence de PCP et le pH était ensuite mesuré. Un résultat positif étant une mesure de pH plus faible que le témoin. L'analyse statistique des résultats obtenus a donné des valeurs de $1-5 \times 10^5$ et de $6-10 \times 10^5$ dégradeurs du PCP par ml pour le réacteur #1 (jour 35) et le réacteur #2 (jour 33) respectivement. Comme pour les résultats obtenus avec le PCR compétitif, il y avait plus de microorganismes dégradant le PCP dans le réacteur #2 par rapport au réacteur #1. Toutefois, les valeurs obtenues avec la méthode NPP sont de 10 à 50 fois inférieures à celles obtenues avec la méthode du PCR quantitatif. Hallier-Soulier *et al.* (1996) ont aussi obtenu ce genre d'écart en évaluant le nombre de dégradeurs du toluène en quantifiant d'une part le gène *xyIE* par PCR, et d'autre part, en calculant le nombre UFC (unité formatrice de colonie). Il peut y avoir plusieurs explications pour justifier cet écart. D'abord, les méthodes NPP et UFC nécessitent une étape de culture qui peut nuire ou ne pas permettre la croissance de certains microorganismes. De plus, comme il a déjà été mentionné, le PCR amplifie l'ADN de cellules mortes et pourrait ainsi surestimer le nombre de dégradeurs. Lévesque *et al.* (1998) ont aussi mentionné ce phénomène dû aux cellules mortes.

5. Diversité des gènes *pcpB*

La construction et l'analyse de la génothèque des gènes *pcpB* a permis d'étudier la diversité des microorganismes dégradant le PCP dans les bioréacteurs. Lors de la première activation, seulement cinq séquences de clones *pcpB* ont été analysées (tableau #7). Quatre de celles-ci s'apparentent à la séquence du gène *pcpB* de la souche *Sphingomonas* sp. UG30 dans des pourcentages variants de 97,6 à 98,3%. Le cinquième clone a quant à lui 94,9% de similarité avec *S. flava*. Le tableau #8 (deuxième activation) rapporte que sur les 11 séquences du gène *pcpB* analysées, 8 sont fortement apparentées à la séquence du gène *pcpB* de la souche *Sphingomonas* sp. UG30. En effet, le pourcentage de similarité en acides aminés entre les séquences des gènes *pcpB* des 11 clones et cette souche est près ou dépasse 97% dans tous les cas. Pour ce qui est des trois autres clones, leur séquence du gène *pcpB* a un pourcentage de similarité beaucoup plus faible, de moins de 85%, et s'apparentent aux autres gènes *pcpB* connus chez les *Sphingomonas*.

Toutes les séquences de ces clones (excluant les clones *pcpB*-4 et 11 de la première activation) ont ensuite été étudiées pour en faire une analyse phylogénétique. L'arbre obtenu a permis d'observer deux groupes distincts de séquences des gènes *pcpB*. Le premier groupe réunit les séquences en acides aminés apparentées à celle de la souche *Sphingomonas* sp. UG30, et compte 11 séquences : *pcpB*-118, 211, 215, 320, 540 et les 6 qui lui sont identiques : *pcpB*-1, 15, 19, 209, 312 et 532. Les deux premières séquences, *pcpB*-211 et 215, sont les plus éloignées du groupe. Leur pourcentage de similarité en acides aminés avec la souche *Sphingomonas* sp. UG30 est de 96,7% dans les deux cas. La publication de la séquence du gène *pcpB* de cette souche est récente (Leung *et al.*, 1999). Dans ce même article, suite à la digestion par *EcoRI* de l'ADN génomique de deux souches et après hybridation Southern, il a été observé qu'il y avait une différence dans le poids moléculaire du fragment du gène *pcpB* détecté. Celui de la souche *Sphingomonas* sp. UG30 est de 2,5 kb alors que celui de *S. flava* est de 3 kb. Ederer *et al.* (1997) avaient déjà rapporté que le gène *pcpB* de

S. chlorophenolica souches ATCC 33790 et SR3 puis *S. flava* souches ATCC 39723 et RA2 était situé sur un fragment de 3 kb provenant de la digestion de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction *EcoRI*. Ceci suggère donc des différences entre la souche *Sphingomonas* sp. UG30 et les autres souches dégradants le PCP. Ce qui est aussi supporté par l'observation sur l'arbre phylogénétique de l'éloignement de cette souche par rapport aux deux autres souches de référence : *S. chlorophenolica* et *S. flava*.

Le deuxième groupe est très éloigné génétiquement et peu apparenté aux trois souches de référence. Il contient trois séquences du gène *pcpB* : *pcpB*-36, 112 et 415. Ces séquences ont des pourcentages de similarité en acides nucléiques et en acides aminés ne dépassant pas 77 % et 85% respectivement avec les souches de référence. Il n'y a pas encore de souche de référence possédant une séquence du gène *pcpB* hautement similaire aux séquences des gènes *pcpB* de ces trois clones. Ces séquences proviennent très probablement de microorganismes inconnus, mais probablement des *Sphingomonas*, et à découvrir (Beaulieu *et al.*, 2000). Ces microorganismes pourraient être des nouvelles souches capables de dégrader le PCP. Toutefois, la littérature prouve que la seule présence du gène *pcpB* n'est pas suffisante pour affirmer que la microflore pourrait posséder une activité de dégradation du PCP. En effet, Saboo et Gealt (1998) ont identifié deux bactéries possédants le gène *pcpB* qui étaient capables de croître en présence de PCP mais incapables de le dégrader. Les séquences du gène *pcpB* des deux souches étaient identiques à 99% avec celle de *S. chlorophenolica*, mais les séquences de leurs gènes de l'ARNr 16S étaient complètement différentes. L'une s'apparentait à *Pseudomonas fulva* et l'autre à *Ralstonia eutropha*. La méthodologie employée dans le cadre de ce projet de recherche n'a pas permis d'obtenir parallèlement la séquence des gènes de l'ARNr 16S des microorganismes étudiés, ce qui aurait été fort intéressant dans le cas des ces trois clones. Toutefois, la forte divergence de leurs séquences laisse plutôt croire qu'il pourrait s'agir d'un nouveau gène *pcpB* présent dans des microorganismes jusqu'à maintenant non-étudiés.

6. Suivi de la microflore totale

Le suivi de la microflore totale a permis d'observer l'évolution des populations microbiennes pendant l'établissement d'un biotraitement; ici une activation d'un sol pour la biodégradation du PCP. Le suivi a été fait via l'utilisation des gènes de l'ARNr 16S.

Tout comme pour les gènes *pcpB*, le suivi des gènes de l'ARNr 16S a été effectué. Dans un premier temps, le suivi a été effectué par électrophorèse sur gel d'agarose, ce qui a permis de rapidement visualiser les eubactéries dans les deux bioréacteurs. Ensuite, un suivi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide par la technique SSCP a permis de visualiser l'évolution de la diversité des eubactéries tout au long du processus d'activation. Puis finalement, une génothèque des gènes de l'ARNr 16S a permis d'apparenter 12 séquences de clones à des microorganismes les plus similaires.

Il a été possible de détecter des eubactéries dès le quatrième jour de l'activation et ce pour les deux bioréacteurs. Ces signaux témoignent de l'augmentation de la biomasse tôt dans le processus d'activation des sols. Un accroissement dans l'intensité du signal pour les 3 ou 4 premiers échantillons a été noté, ce qui correspondait aux 25 premiers jours d'activation. Ceci suggère une augmentation de la biomasse, et était un résultat attendu puisque le processus d'activation du sol permet d'accroître rapidement une biomasse. De plus, il n'y a pas eu de différence significative entre les deux réacteurs, le développement de leur biomasse totale semblait comparable.

6.1 Méthode SSCP

La technique SSCP est basée sur la dénaturation thermique et chimique des produits de PCR, ce qui produit des ADN simples brins, qui sont migrés par

électrophorèse sur un gel non-dénaturant de polyacrylamide. Dans un tel gel, la séparation des fragments de PCR de même longueur, devenus simples brins par dénaturation, sera fonction de leur séquence primaire. Le haut pouvoir de résolution d'un gel de polyacrylamide est tel qu'il permet de détecter les changements conformationnels causés par la substitution de quelques bases dans une séquence de plusieurs centaines de bases. Lors d'analyses d'échantillons plus complexes, comme des échantillons de l'environnement, le profil électrophorétique peut générer plusieurs fragments spécifiques à l'échantillon étudié.

La technique SSCP a été utilisée pour visualiser l'évolution de la diversité microbienne lors du processus d'activation du sol dans les deux bioréacteurs. Dans le cas du réacteur #1, des variations significatives dans les motifs des bandes ont été observées. Aux jours 0, 13 et 21, le motif des bandes était très complexe, suggérant une diversité complexe de la microflore. En milieu d'activation, aux jours 29 à 57, le nombre de bande a diminué en même temps que certaines bandes spécifiques se sont intensifiées. Il est possible d'interpréter cette observation en affirmant qu'il y a eu diminution de la diversité microbienne et prédominance de certaines souches, en l'occurrence celles étant capables de dégrader le PCP. Ceci va dans le même sens que certaines observations déjà mentionnées dans les sections 2 et 3.

Pour ce qui est du réacteur #2, il n'a pas été possible de constater des variations aussi claires. Les motifs des bandes étaient beaucoup plus complexes que pour le réacteur #1. Ceci suggère une microflore très complexe, en accord avec le fait que ce réacteur a été alimenté avec une solution de préservation du bois (SPB), contenant plusieurs sources de carbone et pouvant soutenir la croissance d'une plus vaste biomasse. De plus, selon les motifs du gel SSCP (figure #23), cette forte diversité demeurerait inchangée du début à la fin du processus d'activation. Ceci semble contredire le fait que le processus d'activation du sol permet un accroissement d'une biomasse spécifique dégradant le PCP. Cet accroissement spécifique peut effectivement avoir eu lieu, mais il n'a pu être observé par la méthode employée

probablement à cause de l'accroissement parallèle de la biomasse totale soutenue par les multiples sources de carbone contenues dans la SPB. En complément, il aurait été pertinent d'effectuer des PCR compétitifs à plusieurs moments pendant le processus d'activation pour quantifier les dégradeurs et davantage appuyer l'hypothèse de leur accroissement. Toutefois, les travaux de Valérie Bécaert (Bécaert, 1999) portant sur les comptes microbiens par NPP soutiennent cette hypothèse. En effet, elle a obtenu des comptes d'hétérotrophes totaux passant de 10^3 à 10^7 bactéries par ml pour le réacteur #1 et de 10^3 à 10^9 bactéries par ml pour le réacteur #2. Pour ce qui est des comptes sélectifs pour les dégradeurs du PCP, ceux-ci sont passés de 10^1 à 10^5 bactéries par ml pour le réacteur #1 et 10^1 à 10^6 bactéries par ml pour le réacteur #2.

En ce qui à trait à la technique SSCP, la coloration des bandes d'ADN dans ce type de gel ce fait préférentiellement au nitrate d'argent, qui se lie aux acides nucléiques et permet leur visualisation directe. Cette alternative est beaucoup plus sensible que la coloration au bromure d'éthidium, cette haute sensibilité permet de détecter une quantité d'acides nucléiques de l'ordre du picogramme. L'ajout du formaldéhyde augmente aussi la sensibilité de la coloration ainsi que le contraste. La coloration au nitrate d'argent peut être aussi sensible que les méthodes radio isotopiques mais elle est moins complexe, moins longue et demande moins de manipulation (Bassam *et al.*, 1991). En revanche, ce genre de coloration peut occasionner un bruit de fond important si tous les paramètres ne sont pas parfaitement maîtrisés. Le sodium thiosulfate semble diminuer cette coloration non-spécifique en dissolvant les sels d'argent insolubles à la surface du gel par la formation de complexe (Bassam *et al.*, 1991). Tous les autres paramètres, comme la température, l'exposition à la lumière, la composition des solutions et du gel, les temps de trempage, etc., doivent être minutieusement accomplis et standardisés afin d'augmenter les performances et la reproductibilité de cette méthode. Enfin, le phénomène de traînée d'ADN dans le haut des puits serait diminué par l'utilisation d'un tampon de charge contenant 50% de formamide et 7 M d'urée (Liu et Sommer, 1994).

Lee *et al.* (1996) ont étudié à l'aide d'un densitomètre au laser les profils génétiques de communautés bactériennes naturelles obtenus par la méthode de PCR-SSCP. Ils ont effectué des profils standards avec des souches pures afin de calculer la diversité relative de ces mêmes souches au sein des communautés bactériennes mixtes. Leurs résultats ont démontré qu'il était possible de détecter une population représentant aussi peu que 1,5% de la communauté totale par cette méthode. Ils ont aussi été confrontés à des problèmes de complexité des patrons de bandes dûs à la formation d'hétéroduplexes. Ils ont donc mis au point une autre méthode pour réduire leur formation, en utilisant un tampon dénaturant alcalin et un gel de polyacrylamide sans glycérol. Les patrons ainsi obtenus ne présentaient effectivement pas d'hétéroduplexe mais l'absence de glycérol diminuait la résolution du patron de bandes. Un gel contenant de 5 à 10% de glycérol a amélioré la séparation des bandes et son effet serait relié à ses propriétés dénaturantes des structures secondaires des macromolécules (Orita *et al.*, 1989). De plus, les ADN simples brins seraient mieux séparés dans un gel faiblement ramifié. Ce gel possède des pores plus gros et serait plus sensible à la conformation des ADN simples brins repliés. Les auteurs suggèrent donc un gel 49:1 (acrylamide:bisacrylamide). Ils voient aussi un autre avantage à cette technique; il s'agit de la possibilité d'exciser une bande particulière du gel, d'en éluer l'ADN, de le ré-amplifier et de le séquencer afin d'obtenir plus de détails spécifiques.

Widjoatmodjo *et al.* (1994 et 1995) ont détecté et identifié plus d'une centaine de bactéries et la technique PCR-SSCP leur a permis de discriminer celles-ci au niveau du genre et de l'espèce. Eux aussi ont observé qu'une concentration en glycérol de 10% stabilise les ADN simples brins. Ils ont d'ailleurs noté que ces ADN possédaient des conformations multiples et que cela pouvait nuire à l'interprétation des profils. Pour surpasser les difficultés de comparaison entre gels, les auteurs ont proposé d'incorporer un ADN simple brin standard. Ils ont aussi suggéré l'emploi de plus d'une paire d'amorces pour effectuer le PCR (PCR multiplex), ce qui permettrait de discriminer un plus large spectre de bactéries au niveau de l'espèce. De plus, ils ont

utilisé une alternative à la coloration à l'argent en incorporant des amorces marquées d'un fluorochrome lors du PCR pour permettre la visualisation sur le gel. Cette intervention modifie un peu la migration des fragments mais les profils obtenus avec et sans fluorochrome sont demeurés semblables.

6.2 Diversité des gènes de l'ARNr 16S ribosomal

La construction d'une banque de gènes de l'ARNr 16S a servi à avoir une idée de la diversité microbienne dans les réacteurs au cours du processus d'activation des mélanges boueux. Pour ce faire, 12 séquences de clones différents ont été séquencées. Trois catégories de séquences ont été obtenues. Il y a d'abord cinq clones dont les séquences s'apparentent aux séquences des gènes de l'ARNr 16S de microorganismes provenant d'échantillons de l'environnement. Il s'agit des clones R3, R17, R110, R119 et R406. Le premier s'apparente à 95% à la séquence du gène de l'ARNr 16S d'une bactérie non-cultivable provenant d'un échantillon de l'environnement. Le clone R17 a seulement 76,1% de similarité avec la séquence d'une bactérie verte non-sulfureuse et non-identifiée isolée d'une source thermale dans le parc national de Yellowstone. Le clone R110 est quant à lui très similaire (98,5%) à une bactérie filamenteuse non-identifiée provenant d'un isolat Gram négatif d'une boue activée. Ce clone est intéressant puisqu'il provient d'un sol activé et s'apparente à un microorganisme provenant lui aussi d'un bioprocédé, soit une boue activée. Le clone R119 possède 96% de similarité avec un *Actinobacteria* non-cultivable provenant d'un échantillon de picoplancton. Finalement, le clone R406 est fortement similaire (99,2%) à la séquence du gène de l'ARNr 16S d'une bactérie non-identifiée issue d'un échantillon de sol.

Le deuxième groupe compte 4 clones dont les séquences s'apparentent aux séquences des gènes de l'ARNr 16S des bactéries de la classe des *Proteobacteria*. Deux de ceux-ci se subdivisent dans la sous-classe des α -*Proteobacteria*. Il s'agit des

clones R109 et R208. Le premier a 99% de similarité avec la séquence du gène de l'ARNr 16S de *Afipia broomeae*, du groupe des *Bradyrhizobium*. Le second possède 98,5% de similarité avec la souche *Sphingomonas* sp. CF06, reconnu pour minéraliser le carbofuranne. Ce clone provient du réacteur #1. Fait intéressant, les deux seuls clones séquencés provenant du réacteur #1 de la première activation s'apparentent eux aussi à ce même organisme (tableau #11). Étant donné que les gènes *pcpB* ont été caractérisés chez les *Sphingomonas*, cette bactérie ferait peut-être partie des dégradeurs du PCP. Les deux autres clones de ce deuxième groupe, les clones R302 et R510, se retrouvent quant à eux dans la sous-classe des γ -*Proteobacteria*. La séquence du clone R302 à 99,2% de similarité avec celle d'une bactérie du groupe des *Pseudomonas* : *Acinetobacter* sp. La séquence du clone R510 a quant à elle seulement 88,8% de similarité avec celle d'une bactérie symbiote oxydant le soufre : *Codakia costata*.

Le dernier groupe réunit trois séquences de clones étant apparentées aux séquences des gènes de l'ARNr 16S de trois bactéries du groupe des *Cytophagales*. En effet, les clones R101 et R118 sont similaires à 88,6% et 95,8% à deux *Flavobacteriaceae* : *Flavobacterium* sp. et *Flavobacterium johnsoniae* respectivement. Le clone R101 serait le seul clone analysé à posséder une similarité, quoique faible (88,6%), avec un organisme reconnu pour dégrader le PCP : *Flavobacterium* sp. (Gonzalez et Hu, 1995). Le clone R4 possède pour sa part une séquence similaire à 96% à celle de *Flexibacter* sp.

En regardant l'ensemble des clones analysés, nous avons réalisé que 8 clones sur 12 provenaient d'échantillons du début du processus d'activation (numéros R1 à R99 et R100 à R199 pour les réacteurs #1 et #2 respectivement). Sur plusieurs centaines de clones criblés, ceux les plus représentatifs et distinctifs étaient sélectionnés et séquencés. Nous pourrions affirmer, sous toute réserve, car le faible nombre de clones séquencés ne permet pas de fondement solide, qu'il y avait plus de clones distincts les uns des autres, donc une plus grande diversité au début de

l'activation par rapport à la fin. Ceci a aussi été observé sur les profils SSCP, et s'expliquerait par le fait que la microflore initiale du sol était encore présente en début d'activation (Beaulieu *et al.*, 2000). En ce qui concerne la différence entre les deux réacteurs, les analyses des cinq clones du premier et des sept clones du second ne permettent pas de tirer de grande conclusion. Ces douze clones se divisent comme suit : des trois groupes cités plus haut, le réacteur #1 comptait trois bactéries du premier (environnement), une du deuxième (Protéobactéries) et une de groupe de Cytophagales. Pour sa part, le réacteur #2 comptait deux bactéries du premier groupe, trois du deuxième groupe et deux du dernier groupe. En complément, mentionnons que d'autres clones ont été séquencés récemment et des analyses plus approfondies de ces séquences ont révélé une prédominance des bactéries du genre *Sphingomonas* en milieu et à la fin de l'activation du bioréacteur #1. Dans le même sens, d'autres conclusions sont à venir dans le cas du bioréacteur #2 à la suite des résultats du séquençage de plus de clones (Beaulieu *et al.*, 2000).

7. Limitations des méthodes moléculaires

Malgré leur grande versatilité et popularité, les méthodes moléculaires ne sont pas exemptes de sources d'erreurs. Dès le départ, les analyses peuvent être biaisées par un échantillonnage non-représentatif (Brockman, 1995), et les conditions d'entreposage de ces échantillons peuvent affecter la composition de la biomasse de ces derniers (Rochelle *et al.*, 1994). De plus, la lyse cellulaire et l'extraction des acides nucléiques peuvent ne pas être uniformes. Certaines bactéries, comme les méthanogènes ou les très petites bactéries, sont beaucoup plus résistantes à la lyse comparées aux bactéries Gram négatif (Harris, 1994 et Brockman, 1995). De plus, la co-extraction d'acides humiques, de particules de sédiments et exopolysaccharides bactériens peut nuire à la réaction d'amplification par PCR (Muyzer, 1998). Le PCR comme tel peut être source d'erreur et biaiser les résultats. Plusieurs publications mentionnent l'amplification préférentielle des ADN des populations dominantes. Les

ADN les plus abondants au début de la réaction de PCR se trouvent à être beaucoup plus amplifiés à la fin car le processus est exponentiel. Ceci risque de nuire et même de réduire l'amplification des ADN moins nombreux, et leur visualisation sera masquée par les ADN plus abondants (Reysenbach *et al.*, 1992). Il est aussi question d'une amplification sélective, en fonction du niveau d'affinité des amorces et de l'ADN cible (Gray et Herwig, 1996). Lorsqu'on amplifie de l'ADN d'une diversité d'organismes, il peut y avoir la formation de chimères, occasionnée par l'appariement de deux parties de gènes de l'ARNr 16S d'espèces différentes qui sont amplifiés par PCR (Liesack *et al.*, 1991). Le nombre de copie des gènes de l'ARNr 16S varie dans une même espèce et aussi d'espèce en espèce (Amann *et al.*, 1995), et peut biaiser les résultats. Scheinert *et al.* (1996) ont soulevé d'autres limitations à l'utilisation des gènes de l'ARNr 16S. Ils ont affirmé que malgré l'abondance des banques de données sur ces gènes, il est difficile d'établir des séquences spécifiques pour des souches très rapprochées. C'est le cas pour le genre *Mycobacterium*, où il y a 99,9% d'identité entre les gènes de l'ARNr 16S de *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium paratuberculosis*.

De plus, la séparation des fragments des gènes de l'ARNr 16S après un PCR nécessite un pouvoir de résolution très élevé dû au fait qu'il y a très peu de variation de longueur au sein des ces gènes. C'est pourquoi Scheinert *et al.* (1996) ont proposé l'amplification non pas des gènes de l'ARN 16S ribosomal mais de la région hypervariable située entre les gènes de l'ARNr 16S et 23S. En plus d'être très variable en séquence, cette région varie aussi beaucoup en longueur, ce qui permet, selon les auteurs, de mieux discriminer entre espèces très parentes. Ils ont effectué des amplifications par PCR sur une cinquantaine de souches bactériennes. Les fragments obtenus, après une migration sur gel de polyacrylamide, variaient en longueur de 280 à 1300 pb. Ils ont été capables de faire la distinction entre 15 espèces de *Mycoplasma*. Finalement, ils ont analysé des échantillons mixtes dans lesquels ils ont pu distinguer les souches *Streptococcus* et *Clostridium botulinum*.

Idéalement, le mélange complexe de séquences obtenu après PCR, et dans la banque de clones si tel est le cas, devrait contenir un ensemble de gènes qui est qualitativement et quantitativement représentatif de la communauté microbienne de départ. Mais à la lumière de toutes les sources d'erreur qui viennent d'être énoncées, et malgré la puissance des méthodes moléculaires, il y a encore place à l'amélioration. Tout compte fait, l'enjeu majeur de l'étude de la biodiversité provient justement de cette abondance de diversité de microorganismes présents dans les échantillons de l'environnement. Avec plus de 10^8 à 10^9 bactéries par gramme de sol, il faudrait analyser plus de 10^4 à 10^6 clones pour détecter un seul représentant d'une population minoritaire (10^2 à 10^4 cellules par gramme de sol) (Muyzer, 1998).

Ceci amène à introduire des techniques qui visent à diminuer la diversité des échantillons avant le PCR, ce qui contournerait une partie du problème. Déjà en 1994, Harris proposait de diminuer la complexité de la diversité d'échantillons de l'environnement par fractionnement selon le pourcentage en base G et C (%G+C). Dans cette technique, l'ADN extrait de la communauté microbienne a été traité au bisbenzimidazole puis fractionné sur un gradient de densité sur chlorure de césium. L'ADN double brin se lie au bisbenzimidazole selon son pourcentage en bases guanine et cytosine (%G+C). En effet, les régions riches en A+T se lie davantage au bisbenzimidazole, réduisant la densité de l'ADN. Par centrifugation, les ADN sont fractionnés selon leur densité et chaque fraction peut être analysée séparément. L'auteur affirme qu'il pouvait ainsi diminuer la limite de détection de bactéries peu abondantes. Jaspers et Overman (1997) ont eux aussi utilisé une méthode de pré-sélection avant PCR. Toutefois, au lieu d'effectuer une pré-sélection sur l'ADN des bactéries, ils ont plutôt fractionné les bactéries directement. Ils ont fractionné les cellules selon leur point isoélectrique dans un gradient de pH de 2 à 10 dans du Ficoll. Ils ont obtenu une dizaine de bandes microbiennes, desquelles l'ADN a été extrait, puis, les gènes de l'ARNr 16S ont été amplifiés et résolus par la méthode DGGE. Ils ont réussi à détecter trois fois plus de signal de gènes de l'ARNr 16S dans l'échantillon préalablement fractionné comparé à l'échantillon directement analysé.

Ils ont conclu que ce genre de méthode permet d'augmenter significativement le degré de résolution des méthodes de biologie moléculaire pour l'analyse de communauté microbienne complexe.

Conclusion

Conclusion

Au cours de ce projet de maîtrise, un sol légèrement contaminé au PCP a été utilisé pour la production, en bioréacteurs, de deux types de biomasses actives sous la forme de sols activés. Ces biomasses ont été capables de dégrader le PCP en bonne concentration et à des taux moyens et maximaux comparables à la littérature.

Le suivi de la microflore contenue dans les deux bioréacteurs a été effectué à l'aide de différentes techniques de biologie moléculaire. L'utilisation de l'amplification par PCR en présence d'amorces spécifiques pour le gène de la PCP-4-monooxygénase (*pcpB*) a permis de détecter la présence de souches spécifiques possédant ce gène, qui est impliqué dans la première étape de la biodégradation du PCP. L'analyse phylogénétique de ces gènes a révélé une forte homologie avec le gène *pcpB* retrouvé chez *Sphingomonas* sp. UG30 ; ainsi qu'un nouveau gène *pcpB* moins apparenté à ceux retrouvés chez les espèces *Sphingomonas*. Il a aussi été possible de quantifier le nombre de copies des gènes *pcpB* présents dans les bioréacteurs à l'aide de la technique quantitative du PCR compétitif.

Le suivi de l'évolution de la microflore totale a été effectué via l'amplification des gènes de l'ARN 16S ribosomal et par la technique SSCP. Ce type de gel a permis une visualisation rapide de la diversité microbienne présente dans les bioréacteurs. Une évolution de la diversité était visible dans le cas du réacteur #1 mais la diversité beaucoup plus large du deuxième bioréacteur a empêché de voir des changements. Et puis, une génothèque des gènes de l'ARNr 16S a regroupé les microorganismes étudiés dans trois catégories ; ceux étant apparentés à : 1) des microorganismes de l'environnement, 2) des *Proteobacteria* et 3) des *Cytophagales*.

Les outils de la biologie moléculaire ont grandement amélioré les possibilités de compréhension du vaste champs d'étude de la biodiversité. Cela permettra de mieux comprendre les fonctions, les structures et la dynamique des communautés microbiennes de l'environnement. Souhaitons qu'une meilleure compréhension amènera un plus grand respect. De plus, ces outils, combinés aux résultats des travaux de cette maîtrise, pourront aider au développement et au maintien de procédés de biorestauration plus efficace permettant d'assainir l'environnement, et plus particulièrement, les sols contaminés au PCP.

Remerciements

Remerciements

Maintenant tout ce grand travail terminé, je tiens à remercier premièrement mon directeur de recherche, le Dr Richard Villemur, pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses nombreux conseils. Un gros merci à toute l'équipe du laboratoire : Francine Turcotte, Éric Déziel, Christian Gauthier et Marie-Noël da Silva pour l'agréable climat de travail. Merci aussi à Éric Déziel, Marie-Josée Lévesque, Marco Raposo et Martin Chénier pour leur aide en informatique. Je veux aussi remercier tous ceux et celles qui m'ont côtoyé au sein de l'association étudiante, de la FEUQ ainsi que dans la vie sociale à l'Institut pour cette ambiance stimulante et enrichissante.

Je réserve un gros merci à Ann et Martine, pour leur soutien, leur compréhension et surtout pour leur amitié formidable. Une reconnaissance particulière va à mes parents, à ma famille et à Patrick pour leur support continu, leurs encouragements débordants et la fierté qu'ils ont pour mes réalisations. Finalement, je veux remercier le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie et l'Institut National de la Recherche Scientifique et l'Institut Armand-Frappier, pour l'octroi de bourses pour la durée de mes études.

Bibliographie

- ALEXANDER, M. 1994. Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego, 500 Pages.
- ACINAS, S.G., J. ANTÓN et F. RODRÍGUEZ-VALERA. 1999. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, p. 514-522.
- AMANN, R.I., W. LUDWIG et K.H. SCHEIFLER. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, vol. 59, p. 143-169.
- APAJALAHTI, J.H.A. et M.S. SALKINOJA-SALONEN. 1986. Degradation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenicus*. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, vol. 25, p. 62-67.
- APAJALAHTI, J.H.A. et M.S. SALKINOJA-SALONEN. 1987. Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenicus*. *J. Bacteriol.*, vol. 169, p. 675-681.
- ATLAS, R.M. 1984. Diversity of microbial communities. *Adv. in Microbial Ecology*, vol. 7, p. 1-48.
- BARBEAU, C. 1996. Bioaugmentation de sols contaminés au pentachlorophénol par la méthode des sols activés. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, 153 pages.
- BARBEAU, C., D. KARAMAREV, Y. COMEAU et R. SAMSON. 1997. Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, vol 48, p. 745-752.
- BASSAM, B.J., G. CAETANO-ANOLLÉS et P.M. GRESSHOFF. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.*, vol. 196 (1), p. 80-83.

- BEAULIEU, M., V. BÉCAERT, L. DESCHÊNES et R. VILLEMUR. 2000. Evolution of the microbial diversity during the activation of a soil with pentachlorophenol (PCP) and PCP based wood preservative mixture. *Microbial Ecology*. (Soumis).
- BÉCAERT, V. 1999. Production et caractérisation d'un consortium microbien pour le traitement de sol contaminé aux produits de préservation du bois. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, 135 pages.
- BÉCAERT, V., M. BEAULIEU, J. GAGNON, R. VILLEMUR, L. DESCHÊNES et R. SAMSON. 2000. Development of activated soils degrading PCP and wood-preserving oil from contaminated soil. *Bioremediation Journal*. (Soumis).
- BERTHELET, M., L.G. WHYTE et C.W. GREER. 1996. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone. *FEMS Microbiol. Let.*, vol. 138, p. 17-22.
- BERTONI, G., M. MARTINO, E. GALLI et P. BARBIERI. 1998. Analysis of the gene cluster encoding toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, p. 3626-3632
- BORNEMAN, J. et E. W. TRIPLETT. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, p. 2647-2653
- BOUCHARD, B. 1995. Isolement et caractérisation d'un microorganisme anaérobie effectuant la déchloration du pentachlorophenol. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, 105 pages.
- BOUCHARD, B., R. BEAUDET, R. VILLEMUR, G. McSWEEN, F. LÉPINE et J.-G. BISAILLON. 1996. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri*, sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 46, p. 1010-1015.

- BROCKMAN, F.J. 1995. Nucleic-acid-based methods for monitoring the performance of in situ bioremediation. *Molecular Ecology*, vol. 4, p. 567-578.
- BUITRON, G., B. CAPDEVILLE et P. HORNY. 1994. Improvement and control of the microbial activity of a mixed population for degradation of xenobiotic compounds. *Water Science and Technology*, vol. 29(7), p. 317-326.
- CASSIDY, M.B., K. SHAW, H. LEE et J.T. TREVORS. 1996. Dechlorination and mineralization of pentachlorophenol (PCP) by PCP-degrading bacteria in free and k-carrageenan encapsulated cells. *Manuscrit et Congrès Annuel de la S.C.M., Charlottetown, I.P.-É., 16 au 20 juin 1996.*
- CHANAMA, S. et R.L. CRAWFORD. 1997. Mutational analysis of *pcpA* and its role in pentachlorophenol degradation by *Sphingomonas (Flavobacterium) chlorophenolica* ATCC 39723. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, p. 4833-4838.
- CHÉNIER, M. 1997. Étude de la biodégradation du pentachlorophénol en conditions aérobies et anaérobies. *Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Institut-Armand-Frappier, 194 pages.*
- COLORES, G.M., P.M. RADEHAUS et S.K. SCHMIDT. 1995. Use of a pentachlorophenol degrading bacterium to bioremediate highly contaminated soil. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 54, p. 271-275.
- COMEAU, Y., É. DÉZIEL et N. ROSS. 1998. Biorestauration des sols contaminés. *Notes de cours CIV 6216, École Polytechnique de Montréal.*
- CROZIER R.H., P.-M. AGAPOW et K. PEDERSEN. 1999. Towards complete biodiversity assessment: an evaluation of the subterranean bacterial communities in the Oklo region of the sole surviving natural nuclear reactor. *FEMS Microbiol. Ecology*, vol 28, p. 325-334.

- DÉZIEL, É. 1996. Étude de la production de biosurfactants par des souches bactériennes métabolisant les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Institut-Armand-Frappier, 248 pages.
- DUARTE, G.F., A.S. ROSADO, L. SELDIN, A.C. KEIJZER-WOLTERS et J.D. VAN ELSAS. 1998. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *J. Microbiol. Methods*, vol 32, p. 21-29.
- EDERER, M.M., R.L. CRAWFORD, R.P. HERWING et C.S. ORSER. 1997. PCP degradation is mediated by closely related strains of genus *Sphingomonas*. *Molecular Ecology*, vol. 6, p. 39-49.
- EDGEHILL, R.U. 1994. Pentachlorophenol removal from slightly acidic mineral salts, commercial sand, and clay soil by recovered *Arthrobacter* strain ATCC 33790. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 41, p. 142-148.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USA), 1978. Report of the Ad Hoc study group on pentachlorophenol contaminants, EPA/SAB/78/001, Washigton, D.C.
- FENG, X., L.T. OU et A. OGRAM. 1997. Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain CF06. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, p. 1332-1337.
- FERRE, F. 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus myth. *PCR Methods and Applications*, vol. 2, p.1-9
- FERRIS, M. J. et D.M. WARD. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, p. 1375-1381
- FETZNER, S. 1998. Bacterial dehalogenation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 50(6), p. 633-57.

- FOX, G.E., E. STACKEBRANDT, R.B HESPELL, J. GIBSON, J. MANILOFF, T.A. DUER, R.S. WOLFE, W.E. BALCH, R.S. TANNER, L.J. MAGRUM, L.B. ZABLEN, R. BLACKMORE, R. GUPTA, L. BONEN, B.J. LEWIS, D.A. STAHL, K.R. LUEHRSEN, K.N. CHEN et C.R. WOESE. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science*, vol. 25; 209(4455), p. 457-463.
- GALLILAND, G., S. PERRIN, K. BLANCHARD et H.F. BUNN. 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 87, p. 2725-2729.
- GODON, J. J , E. ZUMSTEIN, P. DABERT, F. HABOUZIT et R. MOLETTA. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, p. 2802-2813
- GOLOVLEVA, L.A., O.E. ZABORINA et A.Y. ARINBASAROVA. 1993. Degradation of 2,4,6-TCP and a mixture of isomeric chlorophenols by immobilized *Streptomyces rochei* 303. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 38, p. 815-819.
- GOLOVLEVA, L.A., O.E. ZABORINA, R. PERTSOVA, B. BASKUNOV, Y. SCHURUKHIN et Z. KUZMIN. 1992. Degradation of polychlorinated phenols by *Streptomyces rochei* 303. *Biodegradation*, vol. 2, p. 201-208.
- GONZALEZ, J.F., et W.-S. HU. 1995. Pentachlorophenol biodegradation: simple models. *Environmental Technology*, vol. 16, p. 287-293.
- GRAY, J.P. et R.P HERWIG. 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, p. 4049-4059.
- GREER, C. W., J. HAWARI ET R. SAMSON. 1990. Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* Isolated from Peat. *Arch. Microbiology*, vol. 154, p. 317-322.

- GRIBBLE, G. W. 1994. The natural production of chlorinated compounds. Environ. Sci. Technol., vol. 28, p. 310A-319A.
- GRIBBLE, G. W. 1996. Naturally occurring organohalogen compounds: a comprehensive survey. Fortschr. Chem. Org. Naturst., vol. 68, p. 1-423.
- GU, Y. et R.A. KORUS. 1995. Effects of *p*-cresol and chlorophenols on pentachlorophenol degradation. Biotechnol. Bioeng., vol. 47, p. 470-475.
- HÄGGBLOM M.M. et R.J. VALO. 1995. Bioremediation of chlorophenol wastes. Dans: Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. Wiley-Liss, Inc. p. 389-434.
- HÄGGBLOM, M.M. 1990. Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds. J. Basic. Microbiol. 2:115-141.
- HÄGGBLOM, M.M., D. JANKE et M.S. SALKINOJA-SALONEN. 1989. Hydroxylation and dechlorination of tetrachlorohydroquinone by *Rhodococcus* sp. strain CP-2 cell extracts. Appl. Environ. Microbiol., vol. 55, p. 516-519.
- HÄGGBLOM, M.M., J.H.A. APALAJAHTI et M.S. SALKINOJA-SALONEN. 1988a. Hydroxylation and dechlorination of chlorinated guaiacols and syringols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. Appl. Environ. Microbiol., vol. 54, p 683-688.
- HÄGGBLOM, M.M., J.H.A. APALAJAHTI et M.S. SALKINOJA-SALONEN. 1988b. O-methylation of chlorinated parahydroquinones by *Rhodococcus chlorophenolicus*. Appl. Environ. Microbiol., vol. 54, p. 1818-1824.

- HÄGGBLUM, M.M., L.J. NOHYNEK, N.J. PALLERONI, K. KRONQVIST, E.-L. NURMIAHO-LASSILA, M.S. SALKINOJA-SALONEN, S. KLATTE et R.M. KROPPESTEDT. 1994. Transfer of polychlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apalajahti *et al.*, 1986.) to the genus *Mycobacterium* as *Mycobacterium chlorophenolicum* comb. nov. Intl. J. Syst. Bacteriol., vol. 44, p. 482-493.
- HALLIER-SOULIER, S., V. DUCROCQ, N. MAZURE et N. TRUFFAUT. 1996. Detection and quantification of degradative genes in soils contaminated by toluene. FEMS Microbiol. Ecology, vol. 20, p.121-133.
- HARRIS, D. 1994. Analyses of DNA extracted from microbial communities. Dans Ritz, K., Dighton, J. and Giller, K. E. Éd. Beyond the Biomass. British Society of Soil Science (BSSS). A Wiley-Sayce Publication. p.111-118.
- HAYASHI, K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Methods Appl., vol. 1(1), p. 34-8.
- HEAD, I.M. 1998. Bioremediation : towards a credible technology. Microbiology, vol. 144, p. 599-608.
- HERRICK, J.B., E.L. MADSEN, C.A. BATT et W.C. GHIORSE. 1993. Polymerase chain reaction amplification of naphthalene-catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria. 1993. Appl. Environ. Microbiol., vol. 59, p. 687-694.
- HEUER, H., M. KRSEK, P. BAKER, K. SMALLA et E.M. WELLINGTON. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl. Environ. Microbiol., vol. 63, p. 3233-3241.
- HITCHMAN, M.L., R.A. SPARKMAN, N.C. ROSS et C. AGRA. 1995. Disposal methods for chlorinated aromatic waste. Chem. Soc. Rev., vol. 24, p. 432-430.

- HOLBEN, W.E., J.K. JANSSON, B.K. CHELM, et J.M. TIEDJE, 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54, p. 703-711.
- HULING, S.G., D.F. POPE, J.E. MATTHEWS, J.L. SIMS, R.C. SIMS et D.L. SORENSON. 1995. Wood preserving waste-contaminated soil : treatment and toxicity response. Dans Hinchee, R.E., Hoeppe, R. E., Anderson, D. B. Éd. *Bioremediation of Recalcitrant Organics*. Battelle Press, Columbus. p. 101-109.
- ISTOCK, C.A., J.A. BELL, N. FERGUSON et N.L. ISTOCK. 1996. Bacterial species and evolution : theoretical and practical perspectives. *J. Indust. Microbiol.*, vol. 17, p. 137-150.
- JASPERS, E. et J. OVERMANN. 1997. Separation of bacterial cells by isoelectric focusing, a new method for analysis of complex microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, p. 3176-3181
- JOSEPHSON, K.L., C.P. GERBA et I.L. PEPPER. 1993. Polymerase chain reaction detection of non viable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, p. 3513-3515.
- KARLSON, U., F. ROJO, J.D. VAN ELSAS et E. MOORE. 1995. Genetic and serological evidence for the recognition of four pentachlorophenol-degrading strains as a species of the genus *Sphingomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 18, p. 539-548.
- KARNS, J.S., S. DUTTAGUPTA et A.M. CHAKRABARTY. 1983. Regulation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and chlorophenol metabolism in *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 46, p. 1182-1186.
- LAINE, M.M. ET K.S. JORGENSEN. 1996. Straw Compost and bioremediated soil as inocula for the bioremediation of chlorophenol-contaminated Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62(5), p. 1507-1513.

- LAMAR, R.T. et D.M. DIETRICH. 1990. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. Appl. Environ. Microbiol., vol. 56, p.3093-3100.
- LAMAR, R.T. et J.W. EVANS. 1993. Solid-phase treatment of a pentachlorophenol-contaminated soil using lignin-degradins fungi. Environ. Sci. Technol., vol. 27, p. 2566-2571.
- LATUS, M., H.-J. SEITZ, J. EBERSPACHER et F. LINGENS. 1995. Purification and characterization of hydroxyquinol 1,2-dioxygenase from *Azotobacter* sp. Strain GP1. Appl. Environ. Microbiol., vol. 61, p. 2453-2460.
- LEE, D.H., Y.G. ZO et S.J. KIM. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. Appl. Environ. Microbiol., vol. 62, p. 3112-3120
- LEE, J.Y. et L. XUN. 1997. Purification and characterization of 2,6-dichloro-p-hydroquinone chlorohydrolase from *Flavobacterium* sp. strain ATCC 39723. J. Bacteriol., vol. 179, p. 1521-1524.
- LEE, S.-Y., J. BOLLINGER, D. BEZDICEK et A. OGRAM. 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive PCR method. Appl. Environ. Microbiol., vol. 62, p. 3787-3793.
- LESER, T.D. 1995. Quantitation of *Pseudomonas* sp. strain B13 (FR1) in the marine environment by competitive polymerase chain reaction. J. Microbiol. Methods, vol. 22, p. 249-262.
- LEUNG, K.T., S. CAMPBELL, Y. GAN, D.C. WHITE, H. LEE et J.T. TREVORS. 1999. The role of the *Sphingomonas* species UG30 pentachlorophenol-4-monooxygenase in *p*-nitrophenol degradation. FEMS Microbiol. Lett., vol. 173(1), p. 247-253.

- LEUNG, K.T., M.B. CASSIDY, K.W. SHAW, H. LEE, J.T. TREVORS, E.M. LOHMEIER-VOGEL et H.J. VOGEL. 1997. Pentachlorophenol biodegradation by *Pseudomonas* spp. UG25 and UG30. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 13(3), p. 305-313.
- LÉVESQUE, M.-J. 1998. Détection de souches bactériennes cibles impliquées dans la biodégradation de contaminant. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Institut-Armand-Frappier, 97 pages.
- LÉVESQUE, M.-J., R. BEAUDET, J.-G. BISAILLON, R. VILLEMUR. 1998. Quantification of *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1 and *Clostridium*-like strain 6 in mixed bacterial populations by competitive polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods*, vol. 32, p. 263-271.
- LIESACK, W., H. WEYLAND et E. STACKEBRANDT. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rRNA analysis of mixed cultured of strictly barophilic bacteria. *Microbial Ecology*, vol. 21, p. 191-198.
- LIU, D., K. THOMSON et K.L.E. KAISER. 1982. Quantitative structure-toxicity relationship of halogenated phenols on bacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 20, p. 130-136.
- LIU, Q. et S.S. SOMMER. 1994. Parameters affecting the sensitivities of dideoxy fingerprinting and SSCP. *PCR Methods Appl.*, vol. 4(2), p. 97-108.
- McALLISTER, K.A., H. LEE et J.T. TREVORS. 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation*, vol. 7, p. 1-40.
- MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE (MEF). 1998. Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés. Québec, Canada, Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec.

- MEGHARAJ, M., R.-M. WITTICH, R. BLASCO, D.H. PIEPER et K.N. TIMMIS. 1997. Superior survival and degradation of dibenzo-dioxin and dibenzofuran in soil by soil-adapted *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 48, p. 109-114.
- MIDDAUGH, D.P., S.M. RESNICK, S.E. LANTZ et J.G. MUELLER. 1993. Toxicological assessment of biodegraded pentachlorophenol: Microtox and fish embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 24, p. 165-172.
- MILESKI, G.J., J.A. BUMPUS, M.A. JUREK et S.D. AUST. 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54, p. 2885-2889.
- MILLETTE, D., J.F. BARKER, Y. COMEAU, B.J. BUTLER, E.O. FRIND, B. CLEMENT et R. SAMSON. 1995. Substrate Interaction during aerobic biodegradation of creosote-related compounds: a factorial batch experiment. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 29, p. 1944-1952.
- MOOS, L.P., E.J. KIRSCH, R.F. WUKASCH et C.P.L. GRADY. 1983. Pentachlorophenol biodegradation I-Aerobic. *Water Res.*, vol. 17, p. 1575-1584.
- MORGAN, P., et R.J. WATKINSON. 1989. Microbiological methods for the cleanup of soil and ground water contaminated with halogenated organic compounds. *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 5(4), p. 277-99.
- MORITA, R.Y. 1993. Starvation-survival strategies in bacteria. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr and J. J. Cole. USA, Lewis Publisher, p. 441-445.
- MOYER, C.L., F.C. DOBBS et D.M. KARL. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, p. 871-879.

- MUYZER, G. 1998. Structure, function and dynamics of microbial communities : the molecular biological approach. *Advances in Molecular Ecology*. G.R. Carvalho Éd. (IOS Press). p. 87-117.
- MYERS, R.M., S.G. FISCHER, L.S. LERMAN et T. MANIATIS. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, vol. 13, p. 3131-3145.
- NOHYNEK, L.J., E.L. SUHONEN, E.L. NURMIAHO-LASSILA, J. HANTULA et M. SALKINOJA-SALONEN. 1995. Description of four pentachlorophenol-degrading bacterial strains as *Sphingomonas chlorophenolica* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.*, vol. 18, p. 527-538.
- NOWOSIELSKI, B.E. et J.B. FIEN. 1998. Experimental study of octanol-water partition coefficients for 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol: Derivation of an empirical model of chlorophenol partitioning behaviour. *Appl. Geochemistry*, vol. 13(7), p. 893-904.
- OGRAM, A., W. SUN, F.J. BROCKMAN, et J.K. FREDRICKSON. 1995. Isolation and characterization of RNA from low-biomass deep-subsurface sediments *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, p. 763-768.
- ORITA, M., H. IWAHANA, H. KANAZAWA, K. HAYASHI et T. SEKIYA. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 86, p. 2766-2770.
- ORSER, C.S. et C.C. LANGE. 1994. Molecular analysis of pentachlorophenol degradation. *Biodegradation*, vol. 5, p. 277-288.
- ORSER, C.S., C.C. LANGE, L. XUN et B.J. SCHNEIDER. 1993b. Cloning, sequence analysis, and expression of the *Flavobacterium* pentachlorophenol-4-monooxygenase gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, vol. 175, p. 411-416.

- ORSER, L., J. DUTTON, C. LANGE, P. JABLONSKI, L. XUN et M. HARGIS. 1993a. Characterization of a *Flavobacterium* glutathione S-transferase gene involved in reductive dechlorination. *J. Bacteriol.*, vol. 175, p. 2640-2644.
- OTTE, M.-P. (1998). Le sol activé: optimisation de l'activité d'un consortium indigène dégradant le pentachlorophénol. *Science de l'Environnement*. Montréal, Université du Québec à Montréal, 119 pages.
- OTTE, M.P., J. GAGNON, Y. COMEAU, N. MATTE, C.W. GREER, et R. SAMSON. 1994. Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 40, p. 926-932.
- PACE, N. R. 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News*, vol. 62, p. 463-470.
- PREMALATHA, A. et G.S RAJAKUMAR. 1994. Pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 10, p. 334-337.
- RADEHAUS, P.M. et S.K. SCHMIDT. 1992. Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. that mineralizes high concentrations of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58, p. 2879-2885.
- REYSENBACH, A. L., L. J. GIVER, G. S. WICKHAM et N. R. PACE. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58, p. 3417-3418
- RIESNAR, D., K. HENCO et G. STEGER. 1991. Temperature-gradient gel electrophoresis: a method for analysis of conformational transitions and mutations in nucleic acids and proteins. *Adv. Electrophoresis*, vol. 4, p. 169-250.

- ROCHELLE, P.A., B.A. CRAGG, J.C. FRY, R.J. PARKES et A.J. WEIGHTMAN. 1994. Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecology*, vol. 15, p. 215-226.
- ROMANOWSKI, G., M.G. LORENZ et W. WACKERNAGEL. 1993. Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, p. 3438-3446.
- ROMANOWSKI, G., M.G. LORENZ et W. WACKERNAGEL. 1992. Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3012-3019.
- ROY-ARCAND, L., et F.S. ARCHIBALD. 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, vol. 13, p.194-203.
- RUTGERS, M., D.D. GOOCH, A.M. BREURE et J.G. VAN ANDEL. 1996. Assessment of inhibition kinetics of the growth of strain P5 on pentachlorophenol under steady-state conditions in a nutritat. *Arch. Microbiol.*, vol. 165, p. 194-200.
- SABOO, V.M. et M.A. GEALT. 1998. Gene sequences of the pcpB gene of pentachlorophenol-degrading *Spingomonas chlorophenolica* found in nondegrading bacteria. *Canadian J. Microbiol.*, vol. 44(7), p. 667-675.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Dans : *Molecular Biology, a Laboratory Manual*, 2^{ème} édition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 69, p. 1408-1412.

- SCHEINERT, P., R. KRAUSSE, U. ULLMANN, R. SOLLER et G. KRUPP. 1996. Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer. *J. Microbiol. Methods*, vol. 26, p. 103-117.
- SEECH, A.G., I.J. MARVAN et J.T. TREVORS. 1994. On site ex situ bioremediation of industrial soils containing chlorinated phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons. Dans : Hinchee, R. E., Leeson, A., Semprini, L., Ong, S. K. Ed. *Bioremediation of Chlorinated and Polycycli Aromatic Hydrocarbon Compounds*. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida. pp.451-455.
- SEMENOVA, E.A. et K.D. KUZNEDELOV. 1998. Species diversity of picoplankton from Lake Baikal by comparative analysis of 5'-terminal segments of 16S rRNA genes. *Mol. Biol. (Mosk)*, vol. 32(5), p. 895-901.
- SNAIDR, J, R. AMANN, I. HUBER, W. LUDWIG et K.H. SCHLEIFER. 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, p. 2884-2896.
- STAHL, D.A. 1995. Applications of phylogenetically based hybridization probes to microbial ecology. *Molecular Ecology*, vol. 4, p. 535-542.
- STAHL, D.A. et W.C. CHAPMAN. 1994. Application of molecular genetics to the study of microbial communities. *NATO ASI Series, G35*, p. 193-206.
- STEFFAN R.J., J. GOKSOYR, A.K. BEJ et R.M. ATLAS. 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54, p. 2908-2915.
- STEFFAN, R., et R.M. ATLAS. 1991. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 45, p. 137-161.
- STEIERT J.G., J.J. PIGNATELLO et R.L. CRAWFORD. 1987. Degradation of chlorinated phenols by a pentachlorophenol-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 53(5), p. 907-10.

- TOMASI, I., I. ARTAUD, Y. BERTHEAU et D. MANSUY. 1995. Metabolism of polychlorinated phenols by *Pseudomonas cepacia* AC1100: determination of the first two steps and specific inhibitory effect of methimazole. *J. Bacteriol.*, vol. 177, p. 307-311.
- TORSVIK, V., R. SORHEIM et J. GOKSOYR. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities-a review. *J. Indust. Microbiol.*, vol. 17, p. 170-178.
- TREVORS, J.T. 1982. Effect of temperature on the degradation of pentachlorophenol by *Pseudomonas* species. *Chemosphere*, vol. 11(4), p. 471-475.
- TUOMELA, M., M. LYYTIKÄINEN, P. OIVANEN et A. HATAKKA. 1999. Mineralization and conversion of pentachlorophenol (PCP) in soil inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Soil Biol. Biochem.*, vol 31, p. 65-74
- UOTILA, J.S., V.H. KITUNEN, J.H.A. APALAJAHTI et M.S. SALKINOJA-SALONEN. 1992. Environment-dependent mechanism of dehalogenation by *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 38, p. 408-412.
- VALLAEYS, T., F. PERSELLO-CARTIEAUX, N. ROUARD, C. LORS, G. LAGUERRE et G. SOULAS. 1997. PCR-RFLP analysis of 16S rRNA, *tfdA* and *tfdB* genes reveals a diversity of 2,4-D degraders in soil aggregates. *FEMS Microbiol. Ecology*, vol. 24, p. 269-278.
- VAN ELSAS, J.D., G.F. DUARTE, A.S. RUSADO et K. SMALLA. 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J. Microbiol. Methods*, vol. 32, p. 133-154.
- VOLOSSIOUK, T., E.J. ROBB et R.N. NAZAR. 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays for soil organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, p. 3972-3976.

- WALL, A.J. et G.W. STRATTON. 1994. Effects of a chromated-copper-arsenate wood preservative on the bacterial degradation of pentachlorophenol. *Can. J. Microbiol.* vol. 40, p. 388-392.
- WEAST, R.C., M.J. ASTLE et W.H. BEYER Éd. 1987-88. Handbook of chemistry and physics, CRC Press.
- WIDJOJOATMODJO, M.N., A.D. FIUIT et J. VERHOEF. 1994. Rapid identification of bacteria by PCR-single-strand conformation polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 32(12), p. 3002-3007.
- WIDJOJOATMODJO, M.N., A.D. FIUIT et J. VERHOEF. 1995. Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 33(10), p. 2601-2606.
- WIGGINS, B. A. et M. ALEXANDER. 1988. Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54, p. 2803-2807.
- WILD, S.R., S.J. HARRAD et K.C. JONES. 1993. Chlorophenols in digested U.K. sewage sludges. *Water Res.*, vol. 27, p. 1527-1534.
- WOESE, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.*, vol. 51, p. 221-271
- WOESE, C.R., O. KANDLER et M.L. WHEELIS. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS*, vol. 87, p. 4576-4579.
- XUN, L. et C.S. ORSER. 1991. Purification of a *Flavobacterium* pentachlorophenol-induced periplasmic protein (PcpA) and nucleotide sequence of the corresponding gene (pcpA). *J. Bacteriol.*, vol. 173, p. 2920-2926.

XUN, L., E. TOPP et C.S. ORSER. 1992b. Diverse substrate range of a *Flavobacterium* pentachlorophenol hydroxylase and reaction stoichiometries. *J. Bacteriol.*, vol. 174, p. 2898-2902.

ZABORINA, O., M. LATUS, J. EBERSPACHER, L.A. GOLOVLEVA et F. LINGENS. 1995. Purification and characterization of 6-chlorohydroxyquinol 1,2- dioxygenase from *Streptomyces rochei* 303: comparison with an analogous enzyme from *Azotobacter* sp. strain GP1. *J. Bacteriol.*, vol. 177, p. 229-234.

ZHOU, J., M.A. BRUNS et J.M. TIEDJE. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, p. 316-322.

