

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Comparaison des capacités de biodégradation du 17 $\beta$ -estradiol chez  
différentes bactéries isolées d'un traitement biologique par boues activées**

**Par  
Chantal Lachance**

Mémoire présenté  
pour l'obtention  
du grade Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

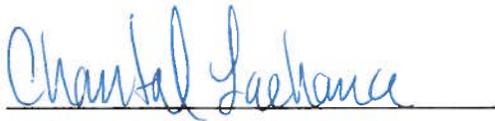
Examineur interne	Claude Dupont INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Serge Guiot, Ph.D. CNRC-Institut de recherche en biotechnologies
Directeur de recherche	François Lépine INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Pierre Juteau Cégep St-Laurent, INRS-Institut Armand-Frappier



## Résumé

Plusieurs effets des estrogènes naturels ont été rapportés dans la littérature, notamment la féminisation et la présence d'intersexualité chez plusieurs espèces de poissons. Le projet porte sur la biodégradation d'un estrogène naturel, le 17 $\beta$ -estradiol (E2), dans une optique de traitement biologique du lisier de porcs. Lors de travaux précédents, quatre souches dégradant les estrogènes, soit l'estrone (E1) et l'E2, ont été isolées à partir d'un procédé par boues activées utilisé pour le traitement du lisier de porc. Ces bactéries ont été isolées sur des milieux contenant des concentrations très faibles d'estrogènes (1 mg/L) et agiraient par cométabolisme. Dans la littérature, d'autres auteurs ont isolé des bactéries sur des milieux contenant de fortes concentrations d'hormones et ces bactéries utilisent ces substances comme seule source de carbone. Puisque dans les effluents d'eaux usées municipales, les estrogènes sont présents à des concentrations de l'ordre du ng/L, nous posons comme hypothèse que généralement dans les bioprocédés de traitement d'eaux usées municipales par boues activées ce sont les bactéries agissant par cométabolisme qui sont principalement impliquées dans la biodégradation des estrogènes. Les objectifs de cette étude étaient, dans un premier temps, d'isoler des souches provenant d'un enrichissement de boues activées contenant une concentration de 100 mg/L d'estrogènes et comparer leur cinétique d'utilisation de l'E2 à celle des souches isolées sur un milieu contenant une faible concentration d'estrogènes. Un total de 16 souches associées à 12 genres et capables de transformer l'E2 ont été isolées. Les cinétiques d'utilisation d'E2 ont été calculées pour quatre de ces souches ainsi que pour les quatre souches isolées sur un milieu contenant une faible concentration d'E2. Ces expériences de dégradation ont été effectuées dans quatre milieux différents. Les résultats obtenus ont montré que deux souches, CL-9.02 et CL-9.04, isolées à partir d'un milieu contenant une forte concentration d'E2 ont été généralement plus efficaces pour dégrader ce composé à une concentration de 1 mg/L que les quatre souches isolées à partir d'un milieu contenant une faible concentration d'E2. Une souche a été plus rapide, MI-21.2, dans un seul des quatre milieux testés. Ces résultats montrent que la sélection faite par la concentration d'estrogènes dans l'enrichissement ne vient pas influencer la capacité des souches à dégrader l'E2 à une concentration 100 fois plus faible. Les bactéries isolées à

une faible concentration d'estrogènes ne sont pas plus efficaces pour dégrader l'E2 que les bactéries isolées à une forte concentration d'estrogènes.



Chantal Lachance, étudiante



François Lépine, directeur

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, François Lépine, de m'avoir pris sous son aile et permis de terminer avec succès ma maîtrise mais également de m'avoir donné d'excellents conseils pour l'analyse des modulateurs endocriniens. Je remercie mon co-directeur, Pierre Juteau, de m'avoir confié le projet et permis de découvrir le monde merveilleux de la recherche. Les conditions particulières de ma maîtrise m'ont donné une grande liberté et m'ont permis de savoir qui j'étais vraiment et de tomber en amour avec la recherche. Je voudrais également remercier les autres chercheurs du groupe, Richard Villemur, Éric Déziel et Réjean Beaudet et le chimiste, Sylvain Milot, pour leurs précieux conseils. Ces deux années m'ont permis de rencontrer des gens extraordinaires et je voudrais les remercier pour les bons moments passés en leur présence; ma partenaire de modulateurs endocriniens Julianne, ma coloc préférée Vero, mes collègues de bureau Marianne et Julie M. et aussi Geneviève, Julien, Julie D. et Ariane. Un merci spécial à Julie A. pour son aide, sa présence et son attitude positive. Merci à Serge Guiot et Claude Dupont, qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer mon mémoire. Finalement, je remercie le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et la Fondation Armand-Frappier qui m'ont supporté financièrement durant ces deux années.

Merci à tous,

Chantal

Lachance

## Table des matières

Résumé.....	iii
Remerciements .....	v
Table des matières.....	vi
Liste des figures .....	ix
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Introduction .....	1
Chapitre 1 : Revue bibliographique .....	5
1.1 Généralités sur les estrogènes .....	6
1.1.1 Structures et propriétés physicochimiques .....	6
1.1.2 Solubilité dans l'eau.....	7
1.1.3 Biosynthèse et rôle .....	8
1.2. Présence dans l'environnement.....	9
1.3. Modulateurs endocriniens et potentiel estrogénique .....	12
1.4 Traitements.....	16
1.4.1 Traitements biologiques.....	16
1.4.2 Traitements abiotiques.....	19
1.5 Souches isolées.....	20
1.6 Les estrogènes dans le lisier porc.....	26
1.7 Cinétique de dégradation.....	28
1.7.1 Ordre Zéro .....	28
1.7.2 Ordre Un .....	29

1.8 Analyse instrumentales des estrogènes .....	31
Chapitre 2 : Matériel et méthodes .....	35
2.1 Enrichissement et isolement de souches .....	36
2.1.1 Enrichissement.....	36
2.1.2 Isolement des souches .....	36
2.2 Évaluation de la diversité microbienne par électrophorèse .....	37
2.2.1 Extraction d'ADN génomique par billes de verre .....	37
2.2.2 Amplification de l'ADNr 16s .....	38
2.2.3 Criblage par DGGE .....	39
2.3 Identification des isolats provenant de l'enrichissement .....	40
2.3.1 Extraction de l'ADN .....	40
2.3.2 Amplification de l'ADNr 16S .....	41
2.3.3 Séquençage de l'ADNr 16S des isolats.....	41
2.3.4 Classification phylogénétique des isolats .....	42
2.4 Méthode de dosage des estrogènes par CG-SM.....	42
2.4.1 Extraction liquide-liquide .....	42
2.4.2 Dérivation des estrogènes .....	43
2.4.3 Paramètres d'analyse du CG-SM .....	43
2.5 Détermination de la biodégradation estrogénique.....	44
2.5.1 Biodégradation par le consortium .....	44
2.5.2 Biodégradation par les isolats.....	45
2.6 Détermination de la cinétique de dégradation .....	45
2.6.1 Courbe de croissance.....	45
2.6.2 Cinétique de dégradation des isolats .....	46
2.6.3 Cinétique de dégradation de cultures mixtes .....	47

Chapitre 3 : Résultats .....	49
3.1 Enrichissement et isolement .....	50
3.1.1 Suivi de la diversité du consortium .....	50
3.1.2 Suivi de la dégradation .....	50
3.1.3 Isolats identifiés par BLASTN .....	52
3.1.4 Analyses phylogénétiques des isolats .....	53
3.2. Extraction et analyse de l'E2 par CG-SM .....	63
3.3 Dégradation de l'E2 .....	66
3.3.1 Détermination du potentiel de dégradation .....	66
3.3.2 Caractérisation de la dégradation .....	67
3.3.3 Effet du milieu de culture .....	75
3.3.4 Cinétique de dégradation .....	82
3.3.5 Cultures mixtes .....	86
Chapitre 4 : Discussion .....	89
4.1 Diversité bactérienne .....	90
4.1.1 Description des genres .....	90
4.1.2 Influence de l'enrichissement .....	91
4.2 Dégradation de l'E2 .....	92
4.2.1 Comparaison de l'efficacité .....	93
4.2.2 Consortium versus souches seules .....	95
4.2.3 Facteurs influençant la dégradation .....	96
Conclusion et perspectives .....	101
Annexe 1. Numéros d'accès GenBank .....	103
Annexe 2. Courbe de croissance des souches .....	105
Références .....	107

## Liste des figures

Figure 1. Voie métabolique de l'E2 par des bactéries provenant de boues activées. (Lee et Liu, 2002).....	17
Figure 2. Description du comportement de dégradation de l'E2 .....	31
Figure 3. Programme de l'appareil PCR GeneAmp PCR system 2700.....	39
Figure 4. Migration de l'ADN des consortiums.....	51
Figure 5. Profil de dégradation des consortiums durant les 5 semaines pour les deux enrichissements.....	51
Figure 6. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant à la classe des Actinobacteria. ..	56
Figure 7. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant à la classe des Alphaproteobacteria. ....	57
Figure 8. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant à la classe des Betaproteobacteria. ....	58
Figure 9. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant au phylum des Firmicutes. ....	59
Figure 10. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant à la classe des Gammaproteobacteria. ....	60
Figure 11. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant au phylum des Bacteroidetes. L'analyse est basée sur les séquences de l'ADNr 16S. Les espèces <i>Chlorobium limicola</i> et <i>Chloroherpeton thalassium</i> ont servi de groupe externe pour l'arbre. ....	61
Figure 12. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant à l'ordre des Xanthomonadales.	

L'analyse est basée sur les séquences de l'ADNr 16S. Les espèces *Ignatzschineria larvae* et *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* ont servi de groupe externe pour l'arbre. .... 62

Figure 13. Chromatogramme de l'E2 avec l'aire sous la courbe et le temps de rétention indiqué ..... 64

Figure 14. Chromatogramme de l'E2-D4 avec l'aire sous la courbe et le temps de rétention indiqué..... 64

Figure 15. Courbe standard d'E2 présentant le quotient de l'aire d'E2 sur l'aire d'E2-D4 en fonction de la concentration de la solution standard..... 65

Figure 16. Chromatogramme de l'E1 avec l'aire sous la courbe et le temps de rétention indiqué. .... 65

Figure 17. Concentration d'E2 présent dans le milieu de culture (ESM et TSB) après 4 jours d'incubation..... 68

Figure 18. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-9.04 ..... 70

Figure 19. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.4 ..... 71

Figure 20. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.14 ..... 71

Figure 21. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-9.3..... 72

Figure 22. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-14.1..... 72

Figure 23. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-21.2..... 73

Figure 24. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-9.02. .... 73

Figure 25. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.3a..... 74

Figure 26. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.9.....	74
Figure 27. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-6.1B. ....	75
Figure 28. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, PBS + C et ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-9.02.....	77
Figure 29. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, PBS + C, ESM et ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-9.04.....	78
Figure 30. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS et ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.3a.....	78
Figure 31. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, PBS + C, ESM et ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.4.....	79
Figure 32. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, ESM et ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.14.....	79
Figure 33. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS et ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-6.1B. ....	80
Figure 34. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, ESM et ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-9.3. ....	80
Figure 35. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, PBS + C et ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-14.1. ....	81
Figure 36. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, PBS + C, ESM et ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-21.2. ....	81
Figure 37. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour les souches « CL » groupées.....	87
Figure 38. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour les souches « MI » groupées.....	88
Figure 39. Courbes de dégradation d'E2, d'E2, d'E3 et d'EE2 par l'isolat Y 50158.....	94

Figure 40. Dégradation aérobie d'E2 par la souche LHJ3 avec différentes concentrations initiales.....	100
Figure 41. Courbe de croissance de la densité optique en fonction du temps pour la souche CL-10.3a .....	106

## Liste des tableaux

Tableau 1. Propriétés physicochimiques des estrogènes .....	7
Tableau 2. Plages de concentrations de trois estrogènes mesurés dans des effluents d'usines de traitements des eaux usées de différents pays.....	11
Tableau 3. Plages de concentrations de trois estrogènes mesurés dans des rivières de différents pays.....	11
Tableau 4. Paramètres des enrichissements qui ont servi à isoler les souches rapportées dans la littérature pour leur activité de dégradation des estrogènes. ....	23
Tableau 5. Transformation des estrogènes par les souches isolées à une faible concentration d'estrogènes. ....	26
Tableau 6. Concentrations des estrogènes dans le lisier de porc.....	27
Tableau 7. Méthodes d'analyses des estrogènes .....	33
Tableau 8. Masse des composés analysés au CG-SM .....	44
Tableau 9. Résultat de l'analyse des séquences avec BLASTN .....	55
Tableau 10. Constantes de cinétique d'ordre 0 et 1 pour les sept souches sélectionnées..	85
Tableau 11. Constantes de cinétique d'ordre 1 pour les souches « CL » groupées et les souches « MI » groupées. ....	88
Tableau 12. Numéros d'accès GenBank des séquences des souches «CL» isolées dans la présente étude. ....	104

## Liste des abréviations

$\beta$ E2	17 $\beta$ -estradiol
E1	Estrone
E1-D4	Estrone-D4
E3	Estriol
EQO	Équol
EE2	Éthynyl estradiol
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CG	Chromatographie en phase gazeuse
SM	Spectrométrie de masse
SPE	« Solid Phase Extraction »
TEA	Triéthylamine
VTG	Vitellogénine plasmatique
YES	« Yeast Estrogens Screen test »

## Introduction

En 2008, un peu plus de 7,8 millions de porc ont été produits au Québec par près de 4000 de producteurs dont le plus grand nombre est situé dans la région de St-Hyacinthe, selon la Fédération des Producteurs de Porcs du Québec (2009). La concentration de fermes porcines, accompagnée de la grande production de lisier, a entraîné des préoccupations au niveau social et environnemental. Une des préoccupations concerne la présence d'estrogènes dans le lisier de porc. Ceux-ci ont été plus étudiés dans les eaux usées municipales que dans le lisier de porc et ils sont les composés ayant le potentiel estrogénique le plus élevé dans celles-ci (Racz et Goel, 2010). Aussi, plusieurs effets des estrogènes naturels ont été rapportés dans la littérature, notamment la féminisation et la présence d'intersexualité chez plusieurs espèces de poissons (Tyler *et al.*, 1998). Le 17 $\beta$ -estradiol (E2), l'estrone (E1) et l'équol (EQO), sont présents dans le lisier en quantité assez importante pour avoir un impact sur la faune aquatique (Burnison *et al.*, 2003; Furuichi *et al.*, 2006).

Un traitement Aérobic-Thermophile auto-chauffant de type Réacteur Biologique Séquentiel (AT-RBS) avait été développé dans notre laboratoire dans le but d'éliminer les pathogènes, les mauvaises odeurs ainsi qu'une charge considérable de matériel organique, d'azote et de phosphore présents dans le lisier. Deux traitements secondaires (RBS-1 et RBS-2) avaient également été étudiés afin de diminuer la charge organique de l'effluent du AT-RBS pour permettre son rejet dans l'environnement ou sa recirculation comme eau de lavage pour la porcherie. Le consortium bactérien du RBS-2 avait été étudié afin d'identifier des bactéries capables de dégrader les estrogènes (Isabelle *et al.*, 2007). Un enrichissement de la biomasse du RBS-2 a été effectué avec une faible concentration d'estrogènes comme seule source de carbone (1 mg/L) et cinq souches utilisant les estrogènes à cette concentration ont été isolées.

Dans la littérature, plusieurs souches ont déjà été isolées pour leur capacité à dégrader les estrogènes. Par contre, les concentrations utilisées dans certaines de ces études étaient très élevées, entre 100 et 1000 mg/L (Fahrbach *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2004). Dans ces conditions, les bactéries étaient capables

d'utiliser les estrogènes comme seule source de carbone. Par contre, ces études n'ont pas testé la dégradation des estrogènes à des concentrations plus faibles, de l'ordre du ng/L, telles que retrouvées dans l'environnement (Baronti *et al.*, 2000; Belfroid *et al.*, 1999; Furuichi *et al.*, 2004; Kolpin *et al.*, 2002; Kuch et Ballschmiter, 2001; Matthiessen *et al.*, 2006). Nous questionnons l'efficacité de ces souches pour dégrader les estrogènes à des concentrations plus faibles. Par exemple, Yoshimoto et coll. (2004) ont mesuré une dégradation de 99 % de la concentration initiale de 100 mg/L d'E2 après 24h, mais la concentration résiduelle restante dans le milieu était de 1 mg/L, ce qui est très élevé par rapport aux concentrations réelles retrouvées dans divers types d'effluents d'eaux usées. Il n'est pas indiqué si les bactéries peuvent dégrader en-dessous de cette concentration qui demeure supérieure à ce que l'on retrouve dans les effluents de centrales de traitements des eaux usées et dans le lisier de porc (Burnison *et al.*, 2003; Snyder *et al.*, 2001).

L'hypothèse principale de ce projet est que généralement dans les bioprocédés par boues activées, ce sont les bactéries agissant par cométabolisme qui sont principalement impliquées dans la biodégradation des estrogènes. Les bactéries isolées sur des milieux contenant une faible concentration d'estrogènes (1 mg/L) seraient plus efficaces pour dégrader ces composés à une concentration de 1 mg/L comparativement à des bactéries isolées sur des milieux contenant une forte concentration d'estrogènes (100 mg/L).

Les objectifs de cette étude sont, dans un premier temps, d'effectuer un enrichissement de boues activées à une concentration de 100 mg/L d'estrogènes, d'isoler des isolats par culture sur géloses et de les identifier. Ensuite, les isolats associés à des genres différents ont été testés pour leur capacité à dégrader l'E2 à une concentration de 1 mg/L. Les isolats effectuant la dégradation de l'E2 à cette concentration étaient ensuite sélectionnés et les courbes de dégradation de l'E2 ont été déterminées. Les courbes de dégradation des isolats provenant de l'enrichissement à faible concentration (Isabelle *et al.*, 2007) ont également été déterminées. Avec le suivi de la dégradation de toutes ces souches, les cinétiques de disparition de l'E2 dans le milieu de culture étaient calculées et comparées entre elles.

Ce projet a permis d'isoler 16 souches sur de milieux contenant une concentration d'estrogènes de 100 mg/L et capable de transformer l'E2 à une concentration de 1 mg/L.

Ce mémoire présente la caractérisation de ces souches ainsi que les résultats de dégradation de l'E2 et les comparaisons entre les cinétiques d'utilisation de l'E2.



## **Chapitre 1 : Revue bibliographique**

## 1.1 Généralités sur les estrogènes

### 1.1.1 Structures et propriétés physicochimiques

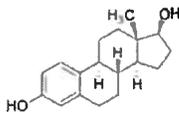
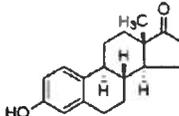
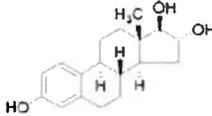
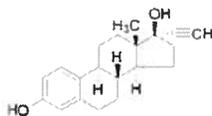
Les estrogènes font partie du grand groupe des stéroïdes. Ces substances possèdent un noyau cyclo-pentano-phénanthrénique comportant trois cycles hexagonaux A, B, C et un cycle pentagonal D. Les estrogènes peuvent être classés en deux groupes, ceux d'origine naturelle et synthétique. Les deux estrogènes naturels rencontrés en plus fortes concentrations dans les eaux usées sont le  $17\beta$ -estradiol (E2) et l'estrone (E1) et pour les synthétiques, le composé le plus abondant est le  $17\alpha$ -éthinyloestradiol (EE2) (Hanselman *et al.*, 2003). Ce dernier est l'ingrédient actif de la pilule contraceptive. Ces trois composés, E2, E1 et EE2, sont les plus étudiés dans la littérature, en ce qui a trait aux estrogènes retrouvés dans les eaux usées. Deux autres composés sont également beaucoup étudiés, soit le  $17\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ E2), qui est un épimère de l'E2, et l'estriol (E3) qui sont aussi observés dans l'environnement, mais en moindre quantité que l'E2 et l'E1, et présentent un potentiel estrogénique moindre que ces deux dernières substances (Gomes *et al.*, 2003; Ying *et al.*, 2002). Les estrogènes naturels peuvent aussi être présents dans les eaux usées sous une forme inactive, conjugués à un groupement glucuronide, sulfate ou méthyle (Zhu et Conney, 1998).

Le tableau 1 présente les structures moléculaires et les propriétés physicochimiques de l'E2, l'E1, l'E3 et l'EE2 qui sont les quatre principales hormones qui seront passées en revue ici. Les estrogènes naturels, dont font partis l'E2, l'E1 et l'E3, se distinguent des autres stéroïdes par un cycle aromatique au niveau du cycle A (Hanselman *et al.*, 2003). Le cycle A de l'EE2 est aromatique et son cycle D comporte une fonction éthyne (Combalbert et Hernandez-Raquet, 2010; Pacakova *et al.*, 2009). Ces quatre composés ainsi que les hormones de la famille des stéroïdes en général sont chimiquement très stables. L'E2 et l'E1 sont thermostables, et possèdent des points de fusion de 175 et 252 °C, respectivement. Ils sont lipophiles et peu solubles dans l'eau sous leur forme active (Shore et Shemesh, 2003). La conjugaison des estrogènes augmente leur solubilité dans l'eau afin de faciliter leur excrétion (Zhu et Conney, 1998).

### 1.1.2 Solubilité dans l'eau

Les valeurs de solubilité présentées dans le tableau 1 montrent une certaine variabilité puisqu'elles ont été étudiées dans des conditions expérimentales variables (température, pH et force ionique). Shareef et coll. (2006) ont testé l'influence du pH et de la force ionique sur la solubilité de l'E2 et de l'E1 dans l'eau à une température de 25 °C. La solubilité de l'E1 était réduite de 50 % en présence de 0,1 M de KNO<sub>3</sub> et une diminution moindre mais significative a été également observée pour l'E2. À des valeurs de pH variant de 4 à 7, la solubilité n'était pas affectée, mais elle augmentait à pH 10, valeur à laquelle ces composés sont ionisés. Finalement, la solubilité de l'E1 et de l'E2 dans l'eau à 25 °C et à pH 7 était de  $1,30 \pm 0,08$  et de  $1,51 \pm 0,04$  mg/L, respectivement.

Tableau 1. Propriétés physicochimiques des estrogènes (Hanselman et al., 2003)

Propriétés	E2	E1	E3	EE2
Formule	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> <sup>b</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> <sup>c</sup>
Structure moléculaire <sup>a</sup>				
PM (g*mol <sup>-1</sup> )	272,4	270,4	288,4 <sup>b</sup>	296,4 <sup>d</sup>
S <sub>e</sub> (mg*L <sup>-1</sup> )	3,9-13,3	0,8-12,4	3,2-13,3 <sup>b</sup>	4,8 <sup>d</sup>
PV (Pa)	3 x 10 <sup>-8</sup>	3 x 10 <sup>-8</sup>	9 x 10 <sup>-13</sup> <sup>b</sup>	6 x 10 <sup>-9</sup> <sup>c</sup>
log K <sub>ow</sub>	3,1-4,0	3,1-3,4	2,6-2,8 <sup>b</sup>	4,15 <sup>d</sup>
pK <sub>a</sub>	10,5-10,7	10,3-10,8	10,4 <sup>b</sup>	10,4 <sup>e</sup>

PM - poids moléculaire, S<sub>e</sub> – solubilité dans l'eau, PV – pression de vapeur, K<sub>ow</sub> – coefficient de partition octanol – eau, K<sub>a</sub> – constante d'ionisation acide. <sup>a</sup> (Pacakova *et al.*, 2009) <sup>b</sup> (Wang *et al.*, 2008) <sup>c</sup> (Clouzot *et al.*, 2008) <sup>d</sup> (Ying et Kookana, 2005) <sup>e</sup> (Ning *et al.*, 2007)

### 1.1.3 Biosynthèse et rôle

La biosynthèse des estrogènes a été étudiée chez les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères (Simpson, 2003). Il a été démontré que les estrogènes agissent sur le système endocrinien de tous les vertébrés mais la différence se situe dans les fonctions physiologiques associées qui sont moins conservées (Tyler *et al.*, 1998). Les estrogènes jouent un rôle important dans l'organisme. En général chez toutes les espèces, la fonction première des estrogènes est le contrôle de l'ovulation et ensuite, la détermination du genre, le développement des caractéristiques sexuelles secondaires, la régulation des comportements d'accouplement et la régulation de l'homéostasie de l'eau et du calcium (Fairbrother, 2000). Plus précisément, chez les femelles, ils sont responsables des changements métaboliques, comportementaux et morphologiques durant les stades de reproduction (Tyler *et al.*, 1998). Pour les mâles, ils affectent notamment la production de fluide testiculaire, le transport du sperme intratesticulaire et la concentration du sperme dans l'épididyme (Tyler *et al.*, 1998).

L'E2 est synthétisé à partir de la testostérone par une cytochrome P450 aromatasase et sa synthèse a lieu dans les ovaires, le placenta et certains tissus tels que le cerveau, la prostate, l'utérus et les glandes mammaires qui sont visés par les estrogènes (Zhu et Conney, 1998). L'E2 peut être métabolisé en de multiples produits par des enzymes de la famille des cytochromes P450, par exemple il peut être oxydé en E1, hydroxylé en E3, épimérisé sous sa forme alpha ( $\alpha$ E2) ou transformé sous forme mono- ou biconjuguée (Zhu et Conney, 1998).

Il existe une grande variété de métabolites d'estrogènes sécrétés et ce même entre les individus d'une même espèce, mais des tendances générales peuvent être observées entre différentes espèces. Par exemple, l'E3 est le principal produit excrété chez les primates, tandis qu'il s'agit de l'E2 chez les chevaux, les porcs et les bovidés (Hanselman *et al.*, 2003). Chez l'humain, c'est également la forme E2 qui est principalement excrétée (Ying *et al.*, 2002).

## 1.2. Présence dans l'environnement

Les estrogènes sécrétés par les animaux et les humains se retrouvent éventuellement dans l'environnement par le biais des eaux usées et de l'écoulement de surface. La concentration des estrogènes a été mesurée dans des rivières et des effluents d'usines de traitement des eaux usées de différents pays d'Europe, d'Amérique et d'Asie. Dans la littérature, ce sont principalement l'E1, l'E2 et l'EE2 qui ont été étudiés. La présence de l'EE2 peut indiquer que la contamination des estrogènes peut être d'origine humaine, puisque ce composé synthétique n'est pas sécrété par les animaux. Les tableaux 2 et 3 présentent les plages des concentrations de ces trois estrogènes mesurées dans des effluents d'usines de traitements des eaux usées et en rivière lors de différentes études. Les valeurs maximales mesurées dans les effluents sont de 82.1, 64 et 15 ng/L pour l'E1, l'E2 et l'EE2, respectivement. En rivières, les concentrations maximales d'E1, d'E2 et d'EE2 mesurées sont de 122, 93 et 831 ng/L, respectivement. Ces trois dernières valeurs proviennent de la même étude menée aux États-Unis où 139 rivières réparties dans 30 états ont été échantillonnées en 1999-2000 (Kolpin *et al.*, 2002). Les auteurs ont volontairement biaisé leur échantillonnage pour sélectionner des cours d'eau susceptibles d'être contaminés, par exemple en aval d'une zone d'urbanisation intense ou d'un élevage de bétail important. Les valeurs mesurées dans les autres études sont beaucoup plus faibles, excepté pour l'E1 dans une rivière du Japon, où une valeur de 107,6 ng/L a été mesurée à la hauteur d'un effluent d'une usine de traitement des eaux usées (Furuichi *et al.*, 2004).

Kuch et Ballschmiter (2001) ont observé que les effluents de trois usines de traitements des eaux usées étaient dilués environ 100 fois dans les eaux des rivières dans lesquelles ils se déversaient. Par contre, la dilution observée des estrogènes variait entre un facteur de deux et de six. Les auteurs posent l'hypothèse que cette augmentation serait causée par une présence d'estrogènes venant de l'amont. Les résultats d'une autre étude montrent que les eaux usées provenant de fermes porcines peuvent être une source de contamination estrogénique dans l'environnement (Furuichi *et al.*, 2006). Khanal et coll. (2006) ont estimé que le fumier provenant de l'élevage de bétail contribuait au moins à 90 % aux estrogènes présents dans l'environnement. Matthiessen et coll. (2006) ont mesuré

les concentrations d'E1, d'E2 et d'EE2 dans des cours d'eau passant sur des fermes laitières mais également sur des élevages de bœufs, de moutons et de porcs. Dans 60 % des cas, la concentration des estrogènes était plus élevée en aval des fermes et l'EE2 n'a pas été détecté dans aucun des échantillons avec une limite de détection de 0,1 ng/L.

Il est important de noter que les variations entre les concentrations d'estrogènes ne sont pas nécessairement dues à une différence de contamination par les estrogènes. En effet, les conditions météorologiques lors de l'échantillonnage en rivière, telles que l'ensoleillement, la dilution par des précipitations et la température peuvent avoir influencé les valeurs (Kuch et Ballschmiter, 2001). Pour les effluents des usines de traitements des eaux usées, le moment de l'échantillonnage dans la journée peut avoir une influence. Par exemple, la « toilette du matin » serait plus concentrée en estrogènes. Le type de système de traitements des eaux usées utilisé peut aussi apporter une variation (Kuch et Ballschmiter, 2001).

Tableau 2. Plages de concentrations de trois estrogènes mesurés dans des effluents d'usines de traitements des eaux usées de différents pays.

Pays	Plage de concentrations (ng/L)			Références
	E1	E2	EE2	
Allemagne	<1 – 70	<1 – 3	<1 – 15	(Ternes <i>et al.</i> , 1999)
Allemagne	0,35 – 18	0,15 – 5,2	0,1 – 8,9	(Kuch et Ballschmiter, 2001)
Canada	<1 – 48	<1 – 64	<1 – 42	(Ternes <i>et al.</i> , 1999)
États-Unis	-	0,477 – 3,66	< 0,759	(Snyder <i>et al.</i> , 2001)
Italie	2,5 – 82,1	0,44 – 3,3	<0,3 – 1,7	(Baronti <i>et al.</i> , 2000)
Pays-Bas	<0,4 – 47	0,1 – 12	<0,2 – 7,5	(Belfroid <i>et al.</i> , 1999)
Royaume-Uni	1,4 – 76	2,7 – 48	<0,2 – 15	(Desbrow <i>et al.</i> , 1998)

Tableau 3. Plages de concentrations de trois estrogènes mesurés dans des rivières de différents pays

Pays	Plage de concentration (ng/L)			Références
	E1	E2	EE2	
Allemagne	0,1 – 4,1	0,15 – 3,6	0,1 – 5,1	(Kuch et Ballschmiter, 2001)
États-Unis	<5 – 112	<5 – 93	<5 – 831	(Kolpin <i>et al.</i> , 2002)
Italie	<0,008 – 1,5	<0,02 – 0,11	<0,03 – 0,04	(Baronti <i>et al.</i> , 2000)
Japon	17,1 – 107,6	2,6 – 14,7	<0,2	(Furuichi <i>et al.</i> , 2004)
Pays-Bas	<0,1 – 3,4	<0,3 – 5,5	<0,1 – 4,3	(Belfroid <i>et al.</i> , 1999)
Royaume-Uni	0,1 – 9,31	0,0 – 0,89	0,0	(Matthiessen <i>et al.</i> , 2006)

### 1.3. Modulateurs endocriniens et potentiel estrogénique

Plusieurs composés chimiques de sources naturelles et industrielles présentent une activité endocrinienne et sont considérés comme modulateurs endocriniens. Ils peuvent être classés dans quatre catégories différentes : les estrogènes naturels et synthétiques, les phytoestrogènes et différents produits chimiques industriels (Auriol *et al.*, 2006). Depuis les 20 dernières années, les effets négatifs des modulateurs endocriniens sur les invertébrés, les poissons, la faune sauvage et domestique de même que les humains ont été démontrés (Hotchkiss *et al.*, 2008). Les estrogènes naturels et synthétiques sont les composés ayant le potentiel estrogénique le plus élevé parmi ceux retrouvés dans les eaux usées municipales (Racz et Goel, 2010). Plusieurs effets des estrogènes naturels ont été rapportés dans la littérature, notamment la féminisation et la présence d'intersexualité chez plusieurs espèces de poissons ainsi qu'un changement de sexe chez les grenouilles (Tyler *et al.*, 1998). Certaines recherches controversées ont même suggéré un lien entre les modulateurs endocriniens présents dans l'environnement et la qualité du sperme des hommes, ainsi que dans les cancers du sein, des testicules et de la prostate (Racz et Goel, 2010). D'autres scientifiques ont exprimé des inquiétudes à propos des modulateurs endocriniens et la tendance grandissante de la puberté précoce chez les filles, l'obésité et le diabète de type II aux États-Unis et chez d'autres populations (Hotchkiss *et al.*, 2008). Plus de 100 molécules ont été identifiées comme étant des modulateurs endocriniens et leur potentiel estrogénique a été évalué.

Le potentiel estrogénique correspond à la capacité d'une molécule à interagir avec le système endocrinien d'un organisme. Plusieurs méthodes ont été développées afin d'évaluer si certains composés chimiques affectent la régulation et la réponse des hormones sexuelles et comment ils peuvent interagir avec le système endocrinien. Par contre, les tests utilisés pour mesurer l'effet sur les mammifères ne sont peut-être pas applicables pour les espèces ovipares et vice-versa (Fairbrother, 2000). Malgré que les structures des estrogènes soient similaires à travers les espèces, ils existent des différences dans les récepteurs d'estrogènes ce qui affecte l'affinité de la liaison du récepteur pour son substrat et l'activation des gènes correspondants. Les méthodes de

mesure du potentiel estrogénique analysent l'expression des produits de certains gènes, des tests de prolifération cellulaire, des réponses tissulaires, l'induction de la vitellogénine (VTG), des tests hormonaux, des études de fertilité et de production d'œufs et le développement de caractéristiques sexuelles secondaires (Fairbrother, 2000).

L'évaluation de la production de VTG est une méthode très utilisée pour l'évaluation du potentiel estrogénique d'un cours d'eau ou d'un effluent d'une usine de traitement des eaux usées (Sumpter, 2005). Le gène responsable de la production de la VTG est présent chez les mâles et les femelles (Rotchell et Ostrander, 2003). La VTG est une lipoglycophosphoprotéine qui est normalement sécrétée par le foie des poissons femelles en réponse à des estrogènes endogènes (Chen et Hillen, 1983). Les estrogènes sont transportés dans le sang jusqu'au foie, diffusent passivement dans les hépatocytes et se lient aux récepteurs d'estrogènes, stimulant la transcription de VTG (Thorpe *et al.*, 2001). Celle-ci est ensuite transportée dans le sang jusqu'aux ovaires où elle est séquestrée sélectivement par les oocytes en développement (Tyler *et al.*, 1988). Par la suite, la VTG forme le constituant principal du vitellus qui est éventuellement utilisé comme source de nourriture par l'embryon en croissance (Jobling et Sumpter, 1993). L'induction de la VTG est un processus dépendant spécifiquement des estrogènes et elle peut être induite chez les poissons mâles et femelles exposés à des concentrations extrêmement faibles de composés chimiques estrogéniques (Zhang *et al.*, 2009).

Le test YES (*Yeast Estrogens Screen*) consiste en un système d'expression inductible avec des composés estrogéniques dans une cellule de levure (*Saccharomyces cerevisiae*). La séquence d'ADN du récepteur humain des estrogènes est intégrée de façon stable dans le génome de la levure. Celle-ci contient également un plasmide d'expression incluant des séquences répondant aux estrogènes et contrôlant le gène rapporteur *lac-Z*. Lorsque lié à un ligand actif, ce récepteur module la transcription du gène et le rapporteur *lac-Z* est exprimé, produisant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase qui est sécrétée dans le milieu. L'enzyme métabolise ensuite le substrat chromogénique, chlorophénol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG), normalement jaune en un produit rouge, qui peut être mesuré à une absorbance de 540 nm (Routledge et Sumpter, 1996).

Les tests *in vitro*, tel que le test YES, ou *in vivo* comme la mesure de l'activité utérotrrophique ou la synthèse de vitellogénine peuvent être utilisés. Des études ont utilisé ces tests pour comparer le potentiel estrogénique de différentes molécules et les résultats varient selon le type de test. Par exemple, l'E2 est considéré dix fois plus estrogénique que l'E1, selon des tests standards mesurant l'activité utérotrrophique de souris (Shore et Shemesh, 2003). Par contre, l'E1 a une activité estrogénique seulement 5 fois moins élevée que l'E2 pour l'induction de la synthèse de la vitellogénine chez la truite (Routledge *et al.*, 1998). Les deux composés ont la même activité dans des tests de mutagénèse et dans la mesure de l'augmentation de la masse corporelle chez les bovins (Shore et Shemesh, 2003). Il est aussi possible de vérifier le potentiel estrogénique global d'un échantillon provenant d'un effluent, par exemple à l'aide du test YES (Matthiessen *et al.*, 2006).

Pour quantifier l'effet estrogénique d'un effluent ou d'une rivière sur la faune, la mesure de la synthèse de vitellogénine chez les poissons est une des techniques utilisées (Jones *et al.*, 2000). La vitellogénine est une protéine majoritaire de l'œuf qui est une source de nutriments pour l'embryon. La vitellogénine est synthétisée par le foie, sa production est dépendante des estrogènes et elle se retrouve chez les femelles. Très peu de vitellogénine est détectée chez les mâles mais ces derniers portent le gène codant pour celle-ci et l'exposition aux estrogènes naturels et synthétiques peut déclencher son expression (Harries *et al.*, 1996).

Une étude réalisée au Royaume-Uni a exposé des truites (*Oncorhynchus mykiss*) mâles à des concentrations d'estrogènes correspondant à celles retrouvées dans des effluents d'usines de traitement des eaux, soit de l'ordre de 1, 10 et 100 ng/L d'E2 (Routledge *et al.*, 1998). Une induction significative de la synthèse de vitellogénine a été observée chez un groupe de 10 individus. Ces résultats indiquent que les concentrations environnementales d'estrogènes sont suffisantes pour expliquer le niveau de vitellogénine synthétisé observé chez des poissons mâles placés dans des cages en aval de certains effluents de usines de traitements des eaux usées dans des rivières anglaises (Harries *et al.*, 1997).

Dans les mêmes rivières, la présence d'intersexualité et la synthèse de vitellogénine chez une espèce de cyprinidés, (*Rutilus rutilus*, poisson d'eau douce) ont été étudiées et associées à la présence d'estrogènes naturels et synthétiques dans les effluents qui s'y déversent (Jobling *et al.*, 1998). L'effet des estrogènes sur la concentration de vitellogénine dans le plasma sanguin a été étudié chez une autre espèce de cyprinidés (*Primephales promelas*) en laboratoire (Panter *et al.*, 1998). Une augmentation significative de la concentration de vitellogénine a été observée à des concentrations égale et supérieure à 100 ng/L pour l'E2 et à 31,8 ng/L pour l'E1. L'E2 entraînait une production de vitellogénine significative à une concentration plus élevée que l'E1 mais la concentration de vitellogénine produite par l'E2 était beaucoup plus élevée que celle produite par l'E1. Les auteurs ont aussi observé une inhibition de la croissance des testicules avec l'augmentation du niveau de vitellogénine dans le plasma où la croissance semblait complètement inhibée pour une concentration de 1000 ng/L d'E2.

Une autre étude a mesuré le potentiel estrogénique d'effluents à l'aide de tests *in vitro* et *in vivo*, soit le YES et la synthèse de vitellogénine chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) (Aerni *et al.*, 2004). Le test YES s'est révélé positif pour tous les effluents mais seulement deux sur cinq ont montré une synthèse de vitellogénine chez les mâles. Les analyses chimiques des échantillons ont mesuré des concentrations jusqu'à 6 ng/L pour l'E2 et jusqu'à 51 ng/L pour l'E1. Une autre étude a présenté le test YES comme une bonne sentinelle pour détecter qualitativement la présence de composés estrogéniques. Ces auteurs ont également démontré que les tests *in vivo* demeuraient nécessaires pour quantifier avec exactitude l'effet des estrogènes étant donné que le type et l'intensité de la réponse durant l'exposition *in vivo* est différente entre les espèces (van den Belt *et al.*, 2004). Des observations plus directes ont également été faites lors d'une étude sur un poisson japonais (*Oryzias latipes*) démontrant la présence d'intersexualité 100 jours après l'éclosion des œufs (Metcalf *et al.*, 2001). Les poissons ont été exposés à différentes concentrations d'E2 et la concentration la plus faible, à laquelle la présence de testicules et d'ovaires était observée, était de 4 ng/L.

## 1.4 Traitements

Une grande partie de la littérature sur les traitements possibles des estrogènes dans des eaux usées porte sur leur biodégradation dans les boues activées puisqu'ils ont été retrouvés dans les effluents de usines de différents pays qui utilisent cette technologie pour le traitement des eaux usées (Caliman et Gavrilescu, 2009). Il ressort en général que les processus biologiques conventionnels des usines de traitements des eaux usées ont une efficacité réduite pour enlever les modulateurs endocriniens. Par exemple, l'E2 a été identifié comme polluant persistant dans l'environnement puisqu'il avait été retrouvé dans plusieurs sources d'eau, par exemple des lacs, des puits et des eaux usées (Shore *et al.*, 1993). Par contre, une autre étude l'a identifié comme facilement biodégradable (Ternes *et al.*, 1999). D'autres traitements, notamment abiotiques, ont également été testés pour dégrader des estrogènes. En général, il a été démontré que seulement une partie des estrogènes est dégradée par ces traitements et qu'une concentration assez élevée pour avoir un effet sur la faune reste présente dans l'effluent du traitement (Caliman et Gavrilescu, 2009).

### 1.4.1 Traitements biologiques

L'enlèvement des estrogènes des affluents d'usines de traitement des eaux usées par les boues activées dépend du type de procédé utilisé et de facteurs tels que l'âge des boues, la saison (température et rayonnement) et le facteur de dilution lors du déversement dans la rivière (Caliman et Gavrilescu, 2009). L'E1 et l'E2 ont de faibles constantes de biodégradation de pseudo-premier ordre et des valeurs moyennes de coefficient de sorption normalisé sur le carbone organique du sol ( $K_{oc}$ ). Ce dernier paramètre sert à évaluer si un composé s'adsorbe sur des matières contenant du carbone organique, ce qui inclut les solides en suspension, les gras non-polaires et lipides, les huiles minérales, les graisses et les surfactants. Une valeur élevée de ce coefficient indique que le composé s'adsorbe sur ces matières. L'E1 et l'E2 sont transformés de façon modérée, indépendamment du temps de rétention hydraulique. En résumé, les estrogènes sont enlevés en grande partie par l'adsorption sur les boues et la biodégradation qui s'en suit. Le long temps de rétention des solides améliorent

l'enlèvement des estrogènes en permettant une longue exposition aux communautés microbiennes. Malgré cela, des concentrations suffisamment élevées pour avoir un effet sur la faune restent présentes dans les effluents (Khanal *et al.*, 2006).

Le processus de dégradation de l'E2 a été grandement étudié dans la littérature. L'oxydation d'E2 en E1 a été rapportée dans la majorité des cas (Khanal *et al.*, 2006). Une étude a proposé une voie métabolique pour la dégradation de l'E2 suite à l'identification en spectrométrie de masse d'un intermédiaire de dégradation, nommé X1 et présenté à la figure 1 (Lee et Liu, 2002). Un autre facteur doit être pris en compte, en présence de bactéries d'origines fécales comme *E.coli*, les estrogènes conjugués sont hydrolysés en estrogènes libres (Khanal *et al.*, 2006).

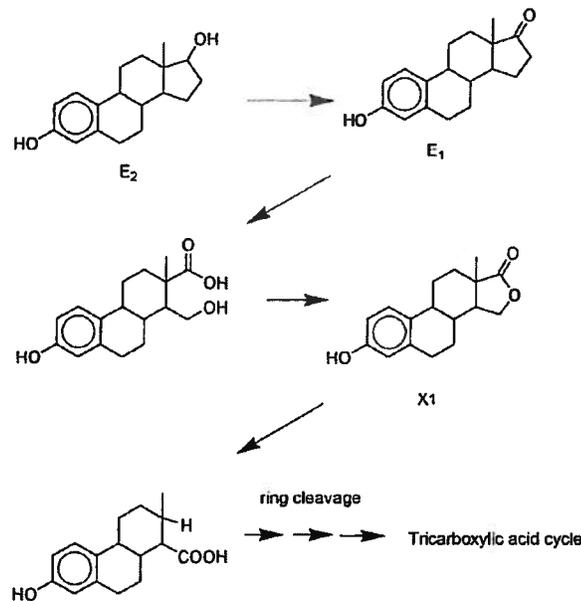


Figure 1. Voie métabolique de l'E2 par des bactéries provenant de boues activées. (Lee et Liu, 2002)

Dans un système de boues activées nitrifiantes, un taux d'enlèvement des estrogènes plus élevé a été associé à un taux de nitrification élevé, d'où l'hypothèse que la biomasse nitrifiante participerait à la biodégradation des estrogènes (Shi *et al.*, 2004). Wang et Ivanov (2009) ont mesuré la biodégradation des estrogènes à l'aide de granules microbiennes contenant des bactéries nitrifiantes. Les concentrations de départ de 100 µg/L de chaque estrogènes composant un mélange d'E1, d'E2, d'E3 et d'EE2, ont diminué à des niveaux inférieurs à 1 µg/L en 60 jours et la biodégradation a décru dans

l'ordre suivant : E2 > E3 > E1 > EE2. Ils ont aussi confirmé la présence d'une biomasse nitrifiante et ont conclu que celle-ci participait à la biodégradation des estrogènes. Ils mentionnent également que la biomasse nitrifiante sous forme granulaire est plus active que celle des systèmes conventionnels de boues activées et présente un avantage pour la dégradation des estrogènes puisque les bactéries nitrifiantes sont sensibles aux conditions environnementales, par exemple la présence de substances toxiques et la structure granulaire les protégeraient (Liu *et al.*, 2005).

Il est à noter que Shi et collaborateurs (2004) ont observé une dégradation des estrogènes en présence d'un inhibiteur de l'oxydation de l'ammoniaque. Les auteurs suggèrent que d'autres microorganismes, qui ne sont pas des bactéries oxydant l'ammoniaque, sont présents dans ces boues activées nitrifiantes et sont responsables de la dégradation des intermédiaires des estrogènes. Ceci a également été observé par Isabelle et collaborateurs (2007) où après 48 heures d'incubation, 99 % de la concentration de départ de 1 mg/L d'E2 et d'E1 était dégradée en présence et absence d'un inhibiteur de l'oxydation de l'ammoniaque. Ces deux études suggèrent que les bactéries nitrifiantes seraient peu impliquées dans la dégradation des estrogènes.

Différentes conditions ont été étudiées pour la dégradation des estrogènes. En milieu anaérobie strict, aucune dégradation notable de l'E1 et l'E2 n'a été observée à long terme et, ce, avec quatre milieux différents (Mes *et al.*, 2008). Une autre étude a conclu que la transformation biologique des estrogènes sous conditions anaérobies était limitée (Czajka et Londry, 2006). En milieu anoxique et en conditions dénitrifiantes, la conversion de l'E2 en l'E1 était plus lente qu'en milieu aérobie en conditions nitrifiantes selon une autre étude (Dytczak *et al.*, 2008).

Des microorganismes en culture pure ont été testés pour la dégradation des estrogènes. *Chlorella vulgaris*, une algue d'eau douce très étudiée, dégrade l'E2 rapidement en E1 durant les premières heures de l'incubation et par la suite une interconversion entre l'E1 et l'E2 a été observée (Lai *et al.*, 2002). Certains chercheurs ont utilisé des champignons, par exemple, *Trametes versicolor* et ont observé une dégradation de 97 % d'une concentration initiale d'E2 de 10 mg/L en 24 heures dans un bioréacteur de type cuvée (Blanquez et Guieysse, 2008). D'autres ont isolé des enzymes

ligninolytiques, comme la laccase, provenant de champignons tels que *Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor* et ont mesuré une diminution significative et rapide de l'activité estrogénique de l'E2 (Suzuki *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2009).

#### 1.4.2 Traitements abiotiques

Dans le but d'améliorer l'enlèvement des estrogènes dans les systèmes de traitements conventionnels des eaux usées, différentes approches ont été testées pour réduire le potentiel estrogénique des effluents (Khanal *et al.*, 2006). Des traitements comme l'ozonation, l'exposition aux rayons UV, les ultrasons, mais aussi la filtration sur membrane et l'adsorption par charbon activé ont été étudiés.

L'ozonation s'est révélée hautement efficace mais la dégradation est lente à des concentrations d'estrogènes inférieures à 50 ng/L et des produits dérivés de l'E2 sont formés durant le processus (Maniero *et al.*, 2008). Pour les traitements par rayons UV, aucune diminution significative d'E2 n'a été mesurée en phase aqueuse avec une concentration de départ de 10 µg/L après 120 minutes (Coleman *et al.*, 2004). Par contre, en couplant les rayons UV avec un catalyseur comme le dioxyde de titane, la concentration de départ de l'E2 a diminué en-dessous de 53 ng/L en 55 minutes (Coleman *et al.*, 2004). La dégradation des estrogènes par ultrasons a permis de réduire la concentration de départ de 10 000 à 1000 ng/L en environ une heure (Suri *et al.*, 2007). L'enlèvement des estrogènes par microfiltration et ultrafiltration sur membrane a également été testé. Étant donnée la taille des pores de 100 à 10 000 fois plus élevée que les molécules d'estrogènes, l'enlèvement se fait par adsorption sur les solides en suspension ou sur les particules colloïdales potentiellement suivit d'une dégradation biologique (Khanal *et al.*, 2006). Liu et coll. (2005) ont observé 82 % d'enlèvement en 2,5 heures avec un système d'ultrafiltration pour une concentration initiales de 600 ng/L d'un mélange d'estrogènes contenant, entre autres de l'E2 et de l'E1.

En bref, les recherches ont montré que les traitements abiotiques peuvent être efficaces pour l'enlèvement des estrogènes dans les effluents. Par contre, ces traitements avancés entraînent une augmentation des coûts d'opération, d'où l'intérêt d'améliorer les procédés biologiques (Auriol *et al.*, 2006).

## 1.5 Souches isolées

Dans la littérature, plusieurs souches ont été isolées pour leur capacité à dégrader les estrogènes, principalement l'E1 et l'E2. Ces bactéries ont été isolées à des concentrations variables d'estrogènes et elles proviennent en général de boues activées de traitements des eaux usées municipales. Le tableau 4 présente un résumé de ces bactéries.

Fujii et coll. (2002) sont parmi les premiers à avoir isolé des bactéries dégradant les estrogènes. Ils ont pris des échantillons d'eau, de sols, de boues activées et d'eaux usées pour inoculer des milieux contenant 1000 mg/L d'E2. Ils ont identifié une nouvelle souche appartenant au genre *Novosphingobium*, soit *N. tardaugens* sp. nov (Fujii et al., 2003). Cette souche est capable de dégrader l'E2 à des concentrations de départ de 166,7, 333,3 et 1000 mg/L. Par contre, elle n'a pas été testée à des concentrations plus représentatives des niveaux retrouvés dans l'environnement, soit de l'ordre du ng/L (Fujii et al., 2002).

Dans une autre étude, une culture enrichie de boues activées provenant d'une usine de traitement des eaux usées a été incubée durant dix semaines avec une concentration moyenne de 50 mg/L d'E2 (Yoshimoto et al., 2004). Ils ont trouvé quatre souches, associées au genre *Rhodococcus*, capables de dégrader efficacement et rapidement un mélange d'E2, d'E1, d'E3 et d'EE2. Trois des souches, associées à l'espèce *R. equi*, ont été capables de dégrader en 24 heures 99 % de la concentration de départ de 100 mg/L d'E2. La quatrième souche, associée à l'espèce *R. zopfii*, a complètement dégradé l'E2 à une concentration initiale de 100 mg/L en 24 heures, avec une limite de détection de 0,1 µg/L.

D'autres chercheurs ont étudié la dégradation de l'E1, l'E2 et l'E3 par une culture mixte composée de deux souches, *Achromobacter xylosoxidans* et *Ralstonia pickettii*, isolées d'un enrichissement de boues activées provenant d'un bioréacteur à membrane (Weber et al., 2005). Les trois estrogènes étaient dégradés à l'intérieur de 48 heures avec une limite de quantification de 5 µg/L. Cependant les valeurs expérimentales exactes ne sont pas présentées. Ils ont aussi observé que l'E2 était dégradé en E1. Trois concentrations de départ d'E2 ont également été testées, soit 0,1, 0,5 et 5,5 mg/L. La

concentration de départ d'E2 n'influçait pas le taux de d'gradation, donc dans les mèmes conditions exp'imentales, le taux de r'acçion 'tait le mème pour les trois concentrations initiales d'E2.

Une autre souche a 't' isol'ee en utilisant de l'E2 comme seule source de carbone, comme les autres 'tudes mentionn'ees ci-haut, mais dans des conditions anoxiques, en utilisant le nitrate comme accepteur d'electrons (Fahrbach *et al.*, 2006). Selon les donn'ees de la s'quence du g'ne de l'ARNr 16s, la souche a 't' plac'ee dans un nouveau genre, *Denitratisoma* gen. nov. et l'esp'ce est *Denitratisoma oestradiolicum* sp. nov. L'esp'ce la plus proche est une bact'erie d'gradant le cholest'rol, *Sterolibacterium denitrificans* DSM 13999T. *D. oestradiolicum* a 't' isol'ee d'un enrichissement contenant 272 mg/L d'E2 et des boues activ'ees provenant de bassins d'a'ration d'une usine de traitement des eaux us'ees. La souche a 't' test'ee en culture pure et serait capable d'oxyder compl'etement l'E2 en dioxyde de carbone et en eau, mais les auteurs n'ont pas pr'sent' les d'tails des r'sultats exp'imentaux.

Trois souches d'gradant l'E2 et associ'ees aux genres *Acinetobacter*, *Agromyces* et *Sphingomona*, ont 't' isol'ees d'un aquif'ere sablonneux artificiel contenant du sable marin et un effluent secondaire ultrafiltr' provenant d'eaux us'ees trait'ees biologiquement et qui contenait 1 mg/L d'E1, d'E2, d'E3 et d'EE2 (Ke *et al.*, 2007). Leur capacit' ' d'grader l'E2 a 't' test'ee en conditions a'robie et anoxique avec 0,5 mg/L d'E2. Les trois isolats ont 't' capables de d'grader l'E2 en E1 en conditions a'robie. En conditions anoxiques, seulement une souche 'tait capable de d'grader l'E2 et la d'gradation la plus rapide a 't' observ'ee en conditions a'robie.

Lors d'une autre 'tude, 14 bact'eries phylog'n'etiquement diff'erentes ont 't' isol'ees d'un enrichissement de boues activ'ees provenant d'une usine de traitements des eaux us'ees municipales contenant 3 mg/L d'E1, d'E2 et d' $\alpha$ E2 (Yu *et al.*, 2007). Ces isolats 'taient distribu'ees ' travers huit genres : *Aminobacter*, *Brevundimonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, et *Sphingomonas*. Les 14 isolats 'taient capables de transformer compl'etement l'E2 en E1 ' l'int'erieur d'une p'riode de 7 jours pour une concentration initiale de 3 mg/L et avec une limite de d'tection de 5  $\mu$ g/L.

Une autre étude présente l'isolement de six souches distinctes, soit *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Ralstonia pickettii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. et *Acinetobacter* sp., toutes capables de dégrader l'E2 (Pauwels *et al.*, 2008). Elles ont été isolées d'un enrichissement de compost contenant 50 mg/L d'EE2 comme seule source de carbone. Cette étude avait comme objectif principal d'isoler des bactéries capables de dégrader l'EE2 par cométabolisme en présence d'E2. Les six souches ont été testées pour leur capacité à utiliser un mélange d'E1, d'E2 et d'E3 à des concentrations initiales de 3,2, 2,3 et 3,6 mg/L, respectivement. Après 24h, l'E1 et l'E3 ont été dégradés en-dessous de la limite de détection de 10 µg/L et après 48 heures, l'E2 n'était plus détecté.

La souche TJ1 a été isolée d'un enrichissement de boues activées aérobies contenant 100 mg/L d'E2 et l'espèce la plus proche qui lui a été associée est *Pseudomonas aeruginosa* (Zeng *et al.*, 2009). La souche TJ1 a été inoculée dans un milieu contenant l'E2 comme seule source de carbone et d'énergie. En quatre jours, l'E2 a été dégradé à 99 % pour une concentration initiale de 20 mg/L.

Tableau 4. Paramètres des enrichissements qui ont servi à isoler les souches rapportées dans la littérature pour leur activité de dégradation des estrogènes.

Concentration (mg/L)	Estrogènes étudiés	Provenance de la biomasse	Genre associé	Références
0,4	E1, E2, E3, EE2	Boues activées nitrifiantes	<i>Nitrosomonas</i>	(Shi <i>et al.</i> , 2004)
1	E1, E2, EQO	Traitement biologique pour le lisier de porc	<i>Methylobacterium</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Ochrobactrum</i> <i>Pseudomonas</i>	(Isabelle <i>et al.</i> , 2007)
1	E1, E2, E3, EE2	Microcosme contenant du sable marin	<i>Acinetobacter</i> <i>Agromyces</i> <i>Sphingomonas</i>	(Ke <i>et al.</i> , 2007)
2,3 à 3,6	E1, E2, E3, EE2	Compost	<i>Phyllobacterium</i> <i>Ralstonia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i>	(Pauwels <i>et al.</i> , 2008)
3	E2	Boues activées de traitement d'eaux usées	<i>Aminobacter</i> <i>Brevundimonas</i> <i>Escherichia</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Microbacterium</i> <i>Nocardioides</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Sphingomonas</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2007)
3,5	E1, E2, EE2	Boues activées de traitement d'eaux usées	<i>Brevundimonas</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Pusillimonas</i>	(Muller <i>et al.</i> , 2010)
0,1 à 5,5	E2	Boues activées de traitement d'eaux usées	<i>Achromobacter</i> <i>Ralstonia</i>	(Weber <i>et al.</i> , 2005)
20	E2	Boues activées de traitement d'eaux usées	<i>Pseudomonas</i>	(Zeng <i>et al.</i> , 2009)
100	E1, E2, E3, EE2	Boues activées de traitement d'eaux usées	<i>Rhodococcus</i>	(Yoshimoto <i>et al.</i> , 2004)
272	E2	Boues activées de traitement d'eaux usées	<i>Denitratisoma</i> gen. nov	(Fahrbach <i>et al.</i> , 2006)
1000	E2	Boues activées de traitement d'eaux usées	<i>Novosphingobium</i>	(Fujii <i>et al.</i> , 2002)

Une autre étude a investigué la biodégradation de l'E1, l'E2 et l'EE2 en utilisant une culture mixte de bactéries (Muller *et al.*, 2010). La culture mixte dégradant l'E2 a été obtenue d'un enrichissement de boues activées aérobies provenant d'une usine de traitements des eaux usées qui contenait entre 3 et 4 mg/L d'E2 ainsi que de l'acétonitrile comme source de carbone supplémentaire. Cette culture mixte a été testée pour la dégradation de l'E2 avec une concentration de départ d'environ 3,5 mg/L avec et sans autre source de carbone (acétonitrile). En 24 heures, le consortium a dégradé complètement l'E2 avec ou sans source de carbone, avec une limite de quantification de 0,1 mg/L. La dégradation de l'E1 a aussi été testée avec ce consortium et l'E1 était complètement dégradé avec ou sans source de carbone supplémentaire pour des concentrations initiales de 1,9 et 1,2 mg/L. Par contre, une phase de latence dans la dégradation a été observée durant les 72 premières heures et la dégradation complète s'est effectuée par la suite entre 24 et 48 heures. La communauté bactérienne a été caractérisée par l'analyse du gène de l'ARNr 16S et par isolement sur milieu solide. La première méthode a révélé la présence d'un clone d'une bactérie non-cultivée (WB137) appartenant au groupe des  $\beta$ -protéobactérie rhizobiales et l'espèce apparentée la plus proche était *Alcaligenes faecalis* (souche SP03). Quatre souches distinctes ont également été identifiées par isolement : *Brevundimonas diminuta* (souche NK 2), *Alcaligenes faecalis* (souche BC2001), *Alcaligenes faecalis* (souche WM2072) et *Pusillimonas* sp. (DCY25T). Les isolats ont été testés séparément dans les mêmes conditions que la culture mixte et la seule activité qui a été observée est la conversion de l'E2 en E1 par *B. diminuta*.

Des chercheurs japonais ont mesuré la dégradation des estrogènes dans des boues activées nitrifiantes et par *Nitrosomonas europaea* une bactérie connue pour oxyder l'ammoniaque (Shi *et al.*, 2004). Elle a également été reconnue pour oxyder différents composés hydrocarbonés comme le méthane, le méthanol, le phénol et le benzène mais aussi des hydrocarbures halogénés comme le trichloréthylène (TCE). Après 187 heures d'exposition à l'E2, l'E1, l'E3 et l'EE2 séparément, *N. europaea* a été capable de diminuer les concentrations initiales de 0,4 mg/L en dessous de 0,1 mg/L pour les quatre composés. Par contre, *N. europaea* ne dégrade pas les produits de transformation de ces quatre estrogènes. Normalement, les boues activées nitrifiantes transforment l'E2 en E1

mais l'E1 n'était pas détecté dans cette étude lors de la dégradation de l'E2 par les boues activées nitrifiantes et *N. europaea*. Cela suggère une nouvelle voie de dégradation de l'E2 dans ces conditions. Rappelons qu'en présence d'un inhibiteur de l'oxydation de l'ammoniaque, deux études ont rapporté une dégradation des estrogènes en suggérant que d'autres microorganismes sont responsables de la dégradation des intermédiaires des estrogènes (Isabelle *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2004).

Il est également à noter que Shi et collaborateurs (2004) ont observé une dégradation des estrogènes en présence d'un inhibiteur de l'oxydation de l'ammoniaque. Les auteurs suggèrent que d'autres microorganismes, qui ne sont pas des bactéries oxydant l'ammoniaque, sont présents dans ces boues activées nitrifiantes et sont responsables de la dégradation des intermédiaires des estrogènes. Ceci a également été observé par Isabelle et collaborateurs (2007) où après 48 heures d'incubation, 99 % de la concentration de départ de 1 mg/L d'E2 et d'E1 était dégradée en présence et absence d'un inhibiteur de l'oxydation de l'ammoniaque. Ces deux études suggèrent que les bactéries nitrifiantes seraient peu impliquées dans la dégradation des estrogènes.

Dans notre laboratoire, cinq souches (MI- pour Martine Isabelle) dégradant l'E2 et l'E1 ont été isolées d'un enrichissement de boues activées provenant d'un système de traitements du lisier de porc (Isabelle *et al.*, 2007). L'enrichissement contenait trois estrogènes, l'E1 et l'E2 mais aussi de l'EQO, un phyto-estrogène provenant du soya donné aux porcs pour leur alimentation. Les concentrations initiales de ces estrogènes dans l'enrichissement étaient de 1 mg/L et représentaient la seule source de carbone. Plusieurs isolats ont été isolés de l'enrichissement et testés pour leur dégradation dans des milieux minimal (ESM) et riche (TSB). Le tableau 5 présente les cinq souches qui ont montré une activité de dégradation estrogénique. Toutes les souches dégradent l'E2 en E1 en milieu riche exceptée la souche MI-6.1R qui fait la réaction inverse, soit réduire l'E1 en E2. Aussi, MI-21.2 dégrade l'E1 en plus de dégrader l'E2, en milieu riche. En milieu pauvre, trois souches, MI-9.3, MI-14.1 et MI-21.2, dégradent l'E2. La formation d'E1 lors de la dégradation d'E2 a seulement été observée chez MI-21.2. Il a aussi été démontré que les enzymes dégradant les estrogènes étaient produites de façon constitutive

ce qui, conjointement avec d'autres résultats, pourrait suggérer que la dégradation s'effectuerait par co-métabolisme.

Tableau 5. Transformation des estrogènes par les souches isolées à une faible concentration d'estrogènes. Variations en pourcentage d'E1 et d'E2 en milieu minimal (ESM) et milieu riche (TSB) pour une période d'incubation de 96 heures avec une concentration initiale de 1mg/L. (N/S =Non-significatif) (Isabelle et al., 2007)

Souches	Genre associé	Milieu ESM		Milieu TSB	
		E2	E1	E2	E1
MI-6,1R	<i>Methylobacterium</i>	67 ± 4	-71 ± 10	62 ± 1	-63 ± 1
MI-6,1B	<i>Ochrobactrum</i>	N/S	N/S	-39 ± 3	30 ± 9
MI-9,3	<i>Ochrobactrum</i>	-24 ± 11	N/S	-86 ± 15	43 ± 10
MI-14,1	<i>Pseudomonas</i>	-21 ± 9	N/S	-70 ± 12	38 ± 3
MI-21,2	<i>Mycobacterium</i>	-94 ± 2	91 ± 12	-36 ± 12	-19 ± 5

## 1.6 Les estrogènes dans le lisier porc

L'excrétion annuelle d'estrogènes par les animaux d'élevage, incluant les vaches, les porcs, les moutons et les poulets, a été estimée à 39 tonnes en Europe et 41 tonnes aux États-Unis (Lange *et al.*, 2002). Le porc (*Sus scrofa*) excrète principalement de l'E2, de l'E1 et de l'E3 en plus de leurs formes conjuguées et la principale (96 %) voie d'excrétion est l'urine (Hanselman *et al.*, 2003). Aux États-Unis, l'excrétion d'estrogènes de plusieurs espèces de bétail a été évaluée et le porc contribuerait à 800 kg d'estrogènes par année (Lange *et al.*, 2002). D'autres chercheurs des États-Unis qui ont mesuré l'excrétion journalière de l'E1 et de l'E2 provenant des porcs et vaches, ont plutôt rapporté des valeurs variant entre 10 et 30 kg pour l'E2 et 20 et 80 kg pour l'E1 (Raman *et al.*, 2004). Ces valeurs calculées sont beaucoup plus élevées que les quantités d'estrogènes provenant des usines de traitement des eaux usées municipales.

Les concentrations exactes d'estrogènes dans le lisier de porc peuvent varier pour une même ferme dépendamment du type d'élevage (Raman *et al.*, 2004) mais également selon la quantité d'eau dans le lisier de porc (Johnson *et al.*, 2006). Le tableau 6 présente

les plages de concentrations d'E2 et d'E1 qui ont été mesurées dans le lisier de porc lors de quelques études. Des transformations peuvent avoir lieu durant l'entreposage du lisier dans les lagunes. Par exemple, l'E2 peut être oxydé en E1 par des bactéries fécales (Fine *et al.*, 2003) et les estrogènes conjugués avec un groupement glucuronide peuvent être transformés en forme libre (Johnson *et al.*, 2006).

Dans le but d'étudier le taux d'enlèvement des estrogènes dans un traitement anaérobie par un réacteur UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) pour le lisier de porc, une étude a comparé les concentrations de l'E2 et de l'E1 présentes dans les eaux usées à l'entrée et à la sortie du traitement (Furuichi *et al.*, 2006). Les concentrations passaient de 1000 à 470 ng/L pour l'E2 et de 5200 à 3800 ng/L pour l'E1. D'autres études avaient aussi conclu que les traitements en condition anaérobie étaient peu efficaces pour l'enlèvement des estrogènes (Czajka et Londry, 2006; Dytczak *et al.*, 2008; Mes *et al.*, 2008). Ils ont donc ajouté un traitement par lit microbien en condition aérobie et mesuré le taux d'enlèvement des estrogènes restants dans l'effluent du réacteur UASB. La concentration de l'E2 a diminué en-dessous de la limite de détection de 0.3 ng/L et celle de l'E1 est passée à 6.9 ng/L (Furuichi *et al.*, 2006).

Tableau 6. Concentrations des estrogènes dans le lisier de porc.

Estrogènes	Concentrations (ng/L)	Références
E1	392 – 74 700	(Fine <i>et al.</i> , 2003)
	5200 – 5400	(Furuichi <i>et al.</i> , 2006)
	5900 – 150 000	(Raman <i>et al.</i> , 2004)
	9940 – 17 400	(Hutchins <i>et al.</i> , 2007)
E2	48 – 3000	(Fine <i>et al.</i> , 2003)
	194 – 2460	(Hutchins <i>et al.</i> , 2007)
	1000 – 1500	(Furuichi <i>et al.</i> , 2006)
	1800 - 49 000	(Raman <i>et al.</i> , 2004)

## 1.7 Cinétique de dégradation

Pour comparer différentes conditions, les notions de cinétique, plus précisément les taux de dégradation correspondant à un taux de réaction, ont été utilisés dans plusieurs études (Gaulke *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2009). Un taux de réaction est normalement décrit par la décroissance de la concentration du composé et peut être représenté par la variation de la concentration du composé en fonction du temps. Ces cinétiques chimiques peuvent être classées selon l'ordre de la réaction et les plus communes sont d'ordre zéro, un et deux (Benefield *et al.*, 1982). Seulement les deux premières seront présentées ici puisque la cinétique d'ordre 2 n'a pas été utilisée pour la présente étude.

### 1.7.1 Ordre Zéro

Pour une cinétique d'ordre zéro, le taux de réaction est indépendant de la concentration où il est le même à n'importe quelle concentration de substrat (Benefield *et al.*, 1982). Quelques études ont mesuré la dégradation de l'E2 en utilisant une cinétique d'ordre zéro (Lee et Liu, 2002; Muller *et al.*, 2010; Ternes *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2005). L'équation d'une réaction d'ordre zéro utilisée pour décrire la biodégradation de l'E2 est :

$$-\frac{dC}{dt} = k$$

où C est la concentration résiduelle d'E2 dans le milieu, t est le temps de réaction et k est la constante d'ordre zéro. Une cinétique d'ordre zéro a été utilisée pour décrire la dégradation de l'E2 par une souche isolée, ARI-1 (Lee et Liu, 2002), par une culture mixte (Weber *et al.*, 2005), par un enrichissement de boues activées (Muller *et al.*, 2010) et par des boues activées (Ternes *et al.*, 1999). Ils n'ont pas servi à comparer différentes conditions mais seulement à caractériser la dégradation.

### 1.7.2 Ordre Un

Pour une cinétique de premier ordre, le taux de réaction est directement proportionnel à la concentration du substrat (Benefield *et al.*, 1982). Plusieurs études ont montré que la biodégradation de l'E2 par des boues activées pouvait suivre une cinétique de premier ordre (Gaulke *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2009). L'équation de la réaction de premier ordre utilisée pour décrire la biodégradation de l'E2 est :

$$-\frac{dC}{dt} = k \cdot C$$

où C est la concentration résiduelle d'E2 dans le milieu, t est le temps de réaction et k est la constante de premier ordre.

Les taux de dégradation de premier ordre ont été utilisés pour comparer différentes conditions de dégradation des estrogènes. Par exemple, Li et coll. (2005) ont comparé les taux de dégradation de l'E2 sous trois différentes températures, trois différentes concentrations de matières en suspension (MLVSS pour *mixed liquor volatile suspended solids*) et trois concentrations initiales différentes. Ils ont utilisé une réaction de premier ordre pour expliquer la dégradation de l'E2 et ont obtenu les résultats présentés à la figure 2. Ces résultats montrent que le taux de dégradation de l'E2 est indépendant de la concentration initiale dans ces conditions. Une autre étude a testé une grande plage de concentrations allant du nanogramme par litre jusqu'au milligramme par litre (Xu *et al.*, 2009). Ils ont également observé que la concentration initiale ajoutée au départ n'affecte pas le taux de dégradation pour des concentrations entre le nanogramme par litre et des concentrations faibles de microgramme par litre dans les boues activées. Ceci est en accord avec l'étude de Li et coll. (2005) où ils ont utilisé des concentrations de 10, 30 et 50 µg/L d'E2. Xu et coll. (2009) montrent cependant que le taux de réaction ralentit grandement lorsque la concentration de départ est de 100 µg/L. Les auteurs supposent qu'à des concentrations de 100 µg/L et plus d'estrogènes, la disponibilité de cométabolites clés vient limiter l'enlèvement des estrogènes.

Li et coll. (2005) ont également montré que le taux de réaction augmente avec l'augmentation de la température. Zeng et coll. (2009) ont aussi observé ce phénomène. Finalement, Li et coll. (2005) ont observé qu'en augmentant les MLVSS (correspondant à la densité de la population microbienne), le taux de réaction augmentait. Une autre étude a mesuré l'effet de l'addition d'une source de carbone supplémentaire, le glucose, sur le taux de dégradation de l'E2 par des boues activées dans des réacteurs en mode semi-continu (Li *et al.*, 2008). Ils ont démontré que la présence du glucose venait ralentir la dégradation de l'E2 et ils ont observé le même effet avec l'E1. Ils supposent que les bactéries responsables de la dégradation de l'E2 et l'E1 auraient une préférence pour une source de carbone facilement biodégradable. Ce comportement a également été observé par Urase et Kikuta (2005).

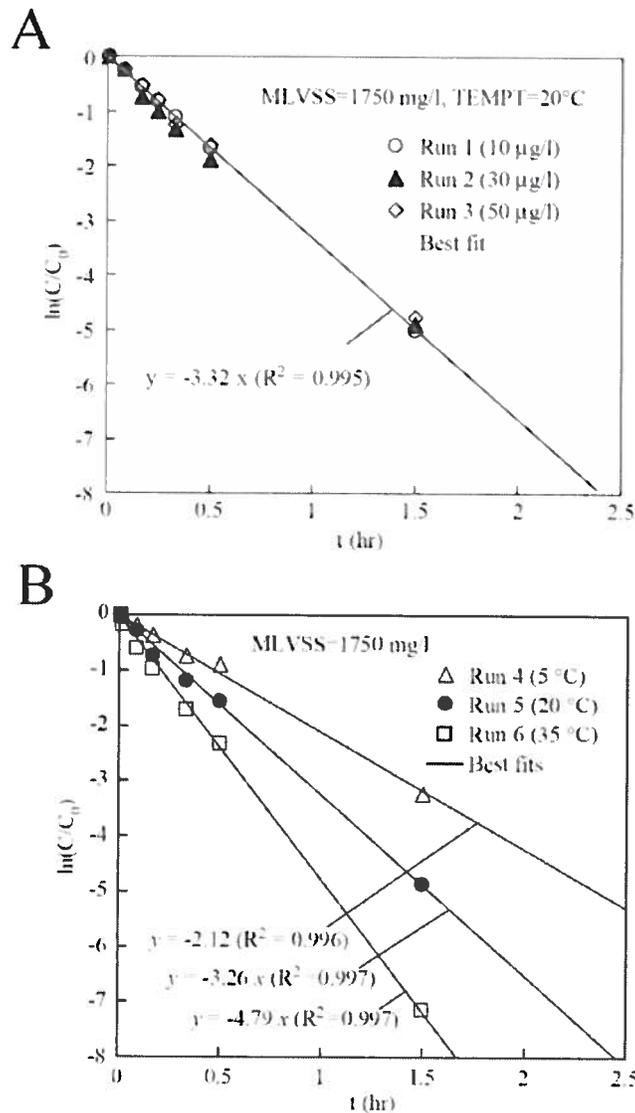


Figure 2. Description du comportement de dégradation de l'E2 à (A) différentes concentrations initiales et (B) différentes températures en utilisant une réaction de premier ordre (Li et al., 2005)

### 1.8 Analyse instrumentales des estrogènes

Les estrogènes doivent être initialement concentrés puisque les concentrations environnementales sont de l'ordre du ng/L et les équipements de détection ne sont pas assez sensibles en général pour pouvoir les détecter à de telles concentrations. Puisque les estrogènes étudiés sont dans une phase aqueuse, les extractions liquide-liquide (ELL) et en phase solide (EPS) sont généralement utilisées pour concentrer les échantillons. La

méthode la plus utilisée est l'EPS puisqu'elle permet une grande économie de solvant par rapport à l'ELL (Pacakova *et al.*, 2009). Aussi, le protocole expérimental est simple et facile à automatiser. Une fois que les estrogènes sont extraits, leur concentration peut être déterminée par plusieurs techniques. La séparation par chromatographie, en phase gazeuse (CG) ou liquide (CL), couplée à la spectrométrie de masse (SM) est souvent utilisée. La chromatographie permet de séparer les estrogènes des autres composés présents dans les échantillons environnementaux qui sont souvent formés d'une matrice complexe. La spectrométrie de masse permet d'analyser les composés sous forme d'ion en fonction de leur masse, plus précisément en fonction de leur rapport  $m/z$  où  $m$  est la masse de l'ion et  $z$  sa charge. Il existe une grande variété dans l'instrumentation, notamment les techniques d'ionisation (électronébulisation (ESI) ou ionisation à pression atmosphérique (API)), le type d'ion suivis (ions négatif ou positifs) et le type de balayage (balayage simple, suivi sélectif d'un ion, suivi de réactions multiples de fragmentation) (Diaz-Cruz *et al.*, 2003).

Il y a quelques années, les estrogènes présents dans l'environnement étaient principalement analysés par CG-SM alors que maintenant c'est surtout la CLHP-SM/SM qui est utilisée (Pacakova *et al.*, 2009). L'analyse par CG comporte plusieurs avantages, notamment, une séparation hautement efficace, une analyse rapide, une disponibilité de détecteurs hautement sensibles et un impact réduit sur l'environnement étant donné les gaz inertes qui composent la phase mobile (Pacakova *et al.*, 2009). Par contre, cette méthode comporte un inconvénient non négligeable. La majorité des contaminants environnementaux sont polaires, peu volatiles et thermolabiles et une étape de dérivation doit être ajoutée avant l'injection afin de modifier ces caractéristiques (Vanderford *et al.*, 2003). Malgré cela, plusieurs études portant sur les estrogènes ont utilisé l'EPS couplée à l'analyse par CG-SM, tel que résumé au tableau 7. Dans ce tableau, une étude sur la présence d'estrogènes dans l'environnement effectuée par CL-MS/MS est également présentée à titre de comparaison.

Tableau 7. Méthodes d'analyses des estrogènes et leur limite de détection pour différents types d'échantillons environnementaux.

Méthodes	Composés	LOD <sup>a</sup> (ng/L)	Échantillon	Références
EPS-CG-SM	E2 E1 EE2	0.2	20 L Effluent	(Desbrow <i>et al.</i> , 1998)
EPS-CG-SM	E2 E1 EE2	0.2-0.3 0.3-0.6 0.1-0.3	1 L Eau de surface	(Belfroid <i>et al.</i> , 1999)
EPS-CG-SM	E2 E1 EE2	0.5 0.5 2.0	15 L Eau de surface	(Larsson <i>et al.</i> , 1999)
EPS-CG-SM/SM	E2 E1 EE2	0.5	1 L Eau de surface	(Ternes <i>et al.</i> , 1999)
EPS-CG-SM	E2 E1 EE2	0.4 0.7 0.4	10 L Effluent	(Spengler <i>et al.</i> , 2001)
EPS-CG-SM	E2 E1 EE2 E3	0.2	2.5 L Eau sous-terrain	(Xiao <i>et al.</i> , 2001)
EPS-CG-SM	E2 EE2 E3	10	2 L Effluent et Eau de surface	(Cargouët <i>et al.</i> , 2004)
EPS-CG-SM	E2 E1 EE2	0.005-1.0	3 L Eau de source	(Gibson <i>et al.</i> , 2007)
CL-MS/MS	E2 E1 EE2 E3	7.4 2.7 10.5 11.7	1 mL Eau de surface	(Mitani <i>et al.</i> , 2005)

<sup>a</sup> Limite de détection



## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

## **2.1 Enrichissement et isolement de souches**

### **2.1.1 Enrichissement**

La biomasse de départ provenait de deux sources différentes afin d'augmenter la diversité et le nombre d'isolat. La première était une biomasse provenant d'un réacteur biologique séquentiel (RBS-2) développé dans notre laboratoire pour le traitement du lisier de porc. La deuxième était un échantillon de boues activées provenant de l'usine d'épuration des eaux usées de Vaudreuil (Qc). Les deux enrichissements ont été initiés en parallèle dans des Erlenmeyers de 250 mL, en inoculant 5 mL de la biomasse dans 45 mL de milieu minéral ESM (Teske *et al.*, 2007) contenant des estrogènes et supplémenté d'une solution de vitamines stérilisée par filtration. Le milieu ESM a été préparé comme suit : les estrogènes E2, E1 et EQO, préalablement solubilisés dans du méthanol, ont été ajoutés afin de donner une concentration finale de 100 mg/L. Le méthanol a été évaporé à sec sous jet d'azote et les estrogènes ont été resuspendus dans le milieu ESM. Le pH a été ajusté à 7,1 et le milieu a été stérilisé à 121 °C durant 15 minutes où une solubilisation maximale des estrogènes a pu être obtenue. Une fois le milieu refroidi entre 45 et 56°C, une solution de NaHCO<sub>3</sub>, préalablement stérilisé par filtration a été ajoutée à une concentration finale de 0,5 g/L. Les cultures ont ensuite été incubées à 25 °C et 250 rpm. La biomasse a été enrichie durant 35 jours et à tous les 7 jours, 1 mL de l'enrichissement a été transféré dans 49 mL de milieu ESM stérile contenant les estrogènes. À chaque transfert, 5 échantillons de 1 mL étaient prélevés : 2 étaient conservés à -20 °C pour les analyses d'ADN, 1 mL d'une solution de glycérol 50 % (v/v) stérile était ajouté à 2 autres échantillons qui étaient placés à -80 °C pour conserver la biomasse et finalement un échantillon de la culture de 1 mL était conservés à -20 °C pour le suivi de la dégradation.

### **2.1.2 Isolement des souches**

Pour l'isolement de souches sur géloses, trois milieux de culture différents ont été utilisés afin d'augmenter la variété phénotypique des isolats et les chances de trouver une grande variété de souches dégradant les estrogènes : le milieu ESM contenant de l'agar et 100 mg/L d'estrogènes (provenant d'une solution stock de 1000 mg/L d'E2 où 5 mg d'E2

ont été dilués dans 5 mL de méthanol), le milieu R2A (BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, MO., É.U.) et le milieu TSA (Tryptic Soy Agar; BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, MO., É.U.). Le milieu ESM avec agar a été préparé comme le milieu liquide et 1,5 % (p/v) d'agar (Fisher Science Education, IL., É.U.) a été ajouté. Les cultures des cinquièmes semaines des deux enrichissements ont été utilisées pour les isolements. Une série de dilutions a été effectuée dans le milieu ESM liquide (sans estrogènes), soit 0, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>. Les géloses ont été incubées à 25 °C durant 3 jours ou jusqu'à l'apparition de colonies. Chaque colonie distincte a été repiquée sur une nouvelle gélose et les colonies qui survivaient jusqu'au troisième repiquage étaient conservées dans 25 % (v/v) de glycérol à -80°C. Pour conserver les souches, une colonie était ensemencée dans un milieu TSB (Tryptic Soy Broth; BD, Becton, Dickinson and Company, Difco Laboratories, MO., É.U.) et incubée une nuit. Un millilitre de la culture était prélevé auquel un millilitre de glycérol 50 % (v/v) était ajouté et le tout était conservé dans des tubes cryogéniques (Fisher Scientific, ON, CA) à -80 °C.

## **2.2 Évaluation de la diversité microbienne par électrophorèse**

Afin d'observer la variation de la diversité microbienne dans les enrichissements durant les cinq semaines, une électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE pour Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) a été effectuée.

### **2.2.1 Extraction d'ADN génomique par billes de verre**

Une extraction de l'ADN total par broyage avec des billes de verre avec un mélange phénol/chloroforme a été faite sur les échantillons de biomasse conservés à -80°C dans du glycérol. Toutes les étapes suivantes ont été faites sur glace. Les 2 mL de biomasse ont été centrifugés à 13 000 rpm durant 15 minutes pour enlever le surnageant. Le culot a été resuspendu dans 500 µL de tampon TEN (Tris HCl 50mM, EDTA 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0), transféré dans un tube de 1,5 mL à bouchon contenant 250 mg de billes de verre stériles et 500 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) ont été ajoutés. Les cellules ont été broyées avec les billes de verre et un homogénéisateur FastPrep modèle FP120-115 (Thermo Savant, GMI, Ramsey, MN.,

É.U.) durant 40 secondes à vitesse 4 (2 fois 20 secondes avec 5 min d'attente sur glace entre chaque traitement). Les débris cellulaires, les billes de verres et le mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique ont été éliminés par centrifugation à 13 000 rpm durant 15 minutes. Le surnageant contenant l'ADN a été transféré dans un tube stérile contenant 500  $\mu$ L de chloroforme/ alcool isoamylique (49/1) et le tout a été agité doucement par inversion. Afin de séparer les deux phases, les tubes ont été centrifugés 1 minute à 13 000 rpm. Un volume de 300  $\mu$ L du surnageant a été transféré dans un autre tube contenant 600  $\mu$ L d'éthanol (100 %) et 75  $\mu$ L d'acétate de sodium (10 M). Les tubes ont été placés à -20°C durant 30 minutes puis centrifugés à 13 000 rpm durant 15 minutes. Le culot a été lavé à l'éthanol 70 % (v/v) et séché à l'air stérilement. Le culot d'ADN a été resuspendu dans de l'eau milli-Q stérile et conservé à -20°C.

La présence d'ADN a été vérifiée sur gel d'agarose UltraPure™ 1 % (p/v) (Invitrogen, Carlsbad, CA, É.U.) dans du TAE 1X (2.42 g de Tris-hydroxyméthylaminoéthane, 0.571 mL d'acide acétique glacial, 50 mL d'EDTA 0.5 M pH 8.0 dans un volume complété à 500 mL avec de l'eau milli-Q). À un volume de 5  $\mu$ L d'échantillon d'ADN, 2  $\mu$ L de tampon de chargement, contenant un marqueur de poids moléculaire constitué de l'ADN total du phage lambda (Amersham biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, Angleterre), ont été ajoutés. L'ADN a migré durant 60 minutes à 90 Volts. Afin de rendre l'ADN visible aux rayons U.V., le gel a été placé dans une solution de bromure d'éthidium (6 mg/L dans du TAE 1 X) sous agitation durant 10 minutes. Ensuite, le gel a été rincé sous agitation avec de l'eau du robinet. Une photo du gel a été obtenue à l'aide d'un système AlphaImager™ 3400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA., É.U.) comprenant une caméra au-dessus d'un plateau transilluminateur de rayons U.V. de type « GelDoc » modèle 1000 (Bio-Rad, Hercules, CA., É.U.).

### **2.2.2 Amplification de l'ADNr 16s**

Une amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de l'ADNr 16S a été effectuée pour chaque échantillon en utilisant la méthode développée par Bruce et coll. (1992). Le mélange réactionnel était composé de 2  $\mu$ L d'échantillon, de 38.5  $\mu$ L d'eau

milli-Q filtrée sur 0.22 µm et stérilisée à l'autoclave deux fois, 5 µL de tampon 10X (GE Healthcare), 1 µL de dNTPs 10X (GE Healthcare), 1 µL de l'amorce 341f-pince GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3') (100 picomoles/µL), 1 µL de l'amorce 534r (5'- A TTA CCG CGG CTG CTG G -3') (100 picomoles/µL), 1 µL d'albumine de sérum bovin (BSA, 25 µg/µL) et 0.5 µl de Taq polymérase (5 U/µL, GE Healthcare). Pour procéder à l'amplification de l'ADN, l'appareil GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Foster, CA, É.U.) a été utilisé avec le programme présenté à la figure 3. Le résultat de l'amplification a été vérifié sur gel d'agarose 1 % (p/v) tel que décrit à la section 2.2.1.

Figure 3. Programme de l'appareil PCR GeneAmp PCR system 2700

	1 cycle			30 cycles			1 cycle
80 °C	94 °C	55 °C	72 °C	94 °C	55 °C	72 °C	
2 min	5 min	5 min	1 min	40 sec	1 min	10 min	

### 2.2.3 Criblage par DGGE

L'ADN des consortiums bactériens issus des enrichissements a été séparé par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant qui consiste à faire migrer l'ADN sur un gel d'acrylamide 8 % (p/v) dont le gradient dénaturant de formamide et d'urée est croissant du sommet à la base. L'ADN a été amplifié par PCR tel que présenté à la section 2.2.2 à l'aide des amorces 534r et 341f et cette dernière portait une pince riche en nucléotides G et C, très résistante à la dénaturation. Le principe du DGGE est la séparation des amplicons selon leur contenu en GC. La pince GC permet aux deux brins d'ADN de ne pas se séparer durant la migration. Au fur et à mesure que les amplicons avancent dans le gradient dénaturant, le brin d'ADN s'ouvre et ralentit la migration, ce qui permet la séparation des brins selon leur séquence en nucléotides. Deux solutions dénaturantes de formamide et d'urée, une faible (0 %) et une forte (80 %; p/v), ont servi à créer le gradient dénaturant. La solution faible était composée de 10 mL d'une solution d'acrylamide:bis (37.5:1) 40 % (p/v), 1 ml TAE 50X et 39 ml d'eau milli-Q. La solution

forte était composée d'une solution de 10 mL d'acrylamide:bis (37.5:1) 40 % (p/v), 1 ml TAE 50X, 16 mL de formamide déionisée, 16,8 g d'urée, le tout complété à 50 mL avec de l'eau milli-Q. Les deux solutions ont été filtrées sur un filtre de 0.45 µm, dégazées dans une chambre anaérobie puis placées sur glace. Deux autres solutions conservées sur glace, soit 100 µL de persulfate d'ammonium à 10 % (p/v), composée de 0.1g de persulfate d'ammonium et 1 mL d'eau milli-Q ainsi que 10 µL de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine; Bio-Rad) ont été ajoutées aux solutions dénaturantes. Les solutions étant froides, la polymérisation s'effectue plus lentement. Le gel a été coulé de façon à obtenir un gradient dénaturant allant de 0 à 80 % et a polymérisé durant 2 heures. Ensuite, le gel a été placé dans la cuve à électrophorèse contenant du tampon TAE 1X à une température de 60°C. Afin de déterminer la quantité minimale de chaque échantillon à charger dans les puits pour bien distinguer les bandes des différentes bactéries, l'intensité de chaque bande des produits PCR ayant migrés sur un gel d'agarose (voir section 2.2.2) a été calculé avec l'option Spot Denso du logiciel Alpha Ease FC 3.1.2 (Alpha Innotech Corporation, CA., É.U) afin de charger une quantité minimale de 300 ng d'ADN. Un tampon de chargement 100 % glycérol (colorant, xylène cyanol et bleu bromophénol) était également chargé avec les échantillons pour un volume correspondant à 0.5 fois celui de l'échantillon. Les échantillons ont migré pendant 16 heures à 100 Volts et à 0.1 Ampère. À la fin de la migration, le gel a été coloré selon la méthode décrite à la section 2.2.1.

## **2.3 Identification des isolats provenant de l'enrichissement**

Les isolats provenant des enrichissements ont été identifiés par le séquençage de leur ADNr 16S, extrait à l'aide de billes de verre et amplifié par PCR.

### **2.3.1 Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN a été faite avec la même méthode que celle présentée à la section 2.2.1 pour l'extraction d'ADN du consortium bactérien. Seulement une étape était différente, lors du broyage cellulaire à l'aide de l'homogénéisateur FastPrep, les cellules ont été broyées une fois durant 20 secondes à vitesse 4. La présence d'ADN a aussi été

vérifiée sur gel d'agarose 1 % (p/v) tel que présenté à la section 2.2.1. De plus, la concentration d'ADN extrait a été déterminée par densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies Inc., DE., É.U) à une longueur d'onde de 260 nm avec le module Nucleic Acids du logiciel Nanodrop ND-1000 3.1.2 (Nanodrop Technologies Inc., DE., É.U). La concentration en acides nucléiques va permettre de déterminer la dilution à effectuer pour obtenir une concentration de 25 ng/μL nécessaire à l'amplification par PCR.

### **2.3.2 Amplification de l'ADNr 16S**

Le même protocole que la section 2.2.2 a été utilisé pour l'amplification de l'ADNr 16S des isolats. Le mélange réactionnel était composé des mêmes quantités de produits, mais les amorces utilisées étaient pA-2f-YM (5'- AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG -3') et pH (5'- AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3'). Aussi, les 2 μL d'échantillon ajoutés étaient une dilution du produit de l'amplification par PCR afin d'avoir 50 ng d'ADN dans le mélange réactionnel. Le programme utilisé avec l'appareil GeneAmp PCR est le même que celui présenté à la figure 3.

### **2.3.3 Séquençage de l'ADNr 16S des isolats**

L'ADNr 16S des isolats a été séquençé avec les amplicons provenant de l'amplification par PCR effectuée avec les amorces pA-2f-YM et pH selon la méthode décrite dans la section précédente. Le séquençage a été fait au Centre d'Innovation Génome Québec et de l'Université McGill. Les deux extrémités, pA-2f-YM et pH, ont été utilisés. Le logiciel Chromas 2.0 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) a été utilisé pour corriger les séquences. Ensuite, les séquences des deux extrémités, pA-2f-YM et pH, ont été assemblées en un seul contig à l'aide du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). L'outil de recherche d'alignement local de bases (BLASTN; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) a servi à comparer les séquences contig des isolats à la base de données GenBank. L'application BLASTN génère une liste de 100 séquences répertoriées les plus rapprochées de la séquence analysée avec un pourcentage d'appariement. L'espèce la plus proche de chaque séquence a été compilée avec le pourcentage d'identité et les isolats

appartenant à des espèces différentes ont été sélectionnées pour les tests de dégradation décrits dans les sections suivantes.

### **2.3.4 Classification phylogénétique des isolats**

Les contigs de la section 2.3.3 ont été analysés à l'aide du logiciel ARB (www.arb-home.de). Pour commencer, une classification grossière a été faite afin de déterminer les grands groupes dans lesquels les séquences se situent. Pour ce faire, les séquences ont été alignées avec une séquence d'*E.coli* et ont été insérées dans l'alignement global. Une fois les séquences distribuées dans les groupes, une incorporation fine des séquences à chacun des groupes a été faite. Les séquences associées à un même groupe ont été comparées à toutes les séquences de ce groupe et un alignement optimal a été fait avec les dix séquences les plus proches. Une fois les séquences des isolats réparties dans le groupe, les espèces références les plus rapprochées ont été sélectionnées et un arbre a été bâti avec celles-ci.

## **2.4 Méthode de dosage des estrogènes par CG-SM**

### **2.4.1 Extraction liquide-liquide**

**Test de dégradation** La méthode d'extraction liquide-liquide a été retenue pour récupérer l'E2 des milieux de culture. Pour commencer, un volume de 10 mL est transféré dans des éprouvettes en verre à bouchon vissable équipé d'une membrane de téflon. Un volume de 100 µL d'une solution-mère à 100 mg/L de standard interne, soit le 17β-estradiol-D4 (E2-D4; C/D/N Isotopes Inc., QC, CA), a ensuite été ajouté à une concentration finale de 1 mg/L. L'extraction a ensuite été effectuée avec 2.5 mL d'acétate d'éthyle de qualité ACS (Fisher Scientific, NJ, E.U.) en agitant doucement par inversion dix fois. Afin de bien séparer les phases, le mélange a été centrifugé 10 minutes à 1200 rpm. Le surnageant, composé de l'acétate d'éthyle et de l'E2, a été transféré dans une fiole à fond plat (Labsphere Inc, QC, CA) où du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fisher Scientific, NJ, É.U.) a préalablement été ajouté pour enlever toute trace d'eau. L'acétate d'éthyle a été par la suite retransféré dans une fiole à fond conique et évaporé à sec sous jet d'azote.

**Test de cinétique** Pour chaque culture, un volume de 30 mL a été transféré dans des éprouvettes en verre à bouchon vissable et équipé d'une membrane de téflon. Un volume de 300 µL d'une solution stock à 100 mg/L de standard interne, E2-D4, a ensuite été ajouté à une concentration finale de 1 mg/L. L'extraction a ensuite été réalisée avec 20 mL d'acétate d'éthyle en agitant doucement par inversion dix fois. Afin de maximiser la séparation des phases, le mélange a été laissé sans agitation pendant 10 min. Le surnageant a été transféré dans un Erlenmeyer de 50 mL contenant du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et a été agité doucement durant 1 min. L'acétate d'éthyle a ensuite été transféré dans un ballon de 50 mL à col en verre rodé et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur Rotavapor-R (BÜCHI Labortechnik, AG, Suisse). L'E2 a ensuite été resuspendu dans 2 mL d'acétate d'éthyle, transféré dans une fiole à fond conique et réévalué à sec sous jet d'azote.

#### 2.4.2 Dérivation des estrogènes

Pour analyser les estrogènes au CG-SM, ceux-ci doivent avoir été dérivés afin de les rendre plus volatiles et moins thermolabiles. La méthode par silylation a été retenue. Les échantillons évaporés à sec dans les fioles à fond conique (voir section 2.4.1) ont été resuspendus dans 100 µL de mélange de silylation, composé de 50 % (v/v) de pyridine (Fisher Scientific, NJ, É.U.), 45 % (v/v) de BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; Supelco, PA, É.U.) et 5 % (v/v) de TMCS (Trimethylchlorosilane; Aldrich Chemical CO Inc., WI, É.U.). Les échantillons ont été agités au vortex et chauffés durant 3 heures à 70 °C. Avant d'être analysés, les échantillons ont reposé à la température de la pièce.

#### 2.4.3 Paramètres d'analyse du CG-SM

L'instrument utilisé pour analyser les estrogènes est un chromatographe en phase gazeuse GC Ultra Trace (Thermo Scientific, ON, CA) avec une colonne DB-5 (30 m x 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm; J&W, ON, CA) et couplé à un spectromètre de masse MS Polaris-Q (Thermo Scientific, ON, CA). Le gaz vecteur était l'hélium à un débit constant de 1 mL/min. Le mode d'injection *splitless* avec une température de vaporisation programmable a été choisi pour injecter 1 µL de l'échantillon à une température de 290°C. Pour l'analyse des composés, le four du CG a été programmé

comme suit : 100°C durant 7 min, 20°C/min jusqu'à 300°C et 300°C durant 2 min. La température d'interface était de 300°C et la température de la source d'impact électronique de 300°C. L'analyse a été effectuée en mode d'ionisation positive. L'analyse a été effectuée en mode de balayage pour des rapports m/z variant entre 100-600. Le tableau 8 présente la masse des deux molécules analysées ainsi que la masse des molécules dérivées qui sont de 416 et 420, pour l'E2 et l'E2-D4, respectivement. La masse de l'E1 avant et après dérivatisation est également présentée afin de pouvoir déterminer sa présence durant les tests. La sensibilité de la méthode a été vérifiée à l'aide de solution standard d'E2 allant de 0.05 à 10 mg/L.

Tableau 8. Masse des composés analysés au CG-SM

Composé	Masse moléculaire avant dérivatisation	Masse molécule après dérivatisation
E2	272	416
E2-D4	276	420
E1	270	342

## 2.5 Détermination de la biodégradation estrogénique

### 2.5.1 Biodégradation par le consortium

Les échantillons pris lors de l'enrichissement (voir section 2.1.1) ont été analysés au CG-SM pour suivre la dégradation de l'E2. Les échantillons de 1 mL conservés à -20°C ont été amenés à température pièce. Le volume exact a été mesuré pour chaque échantillon et transféré dans une fiole de 3 mL à bouchon en téflon. Un volume de 90 µL d'une solution d'E2-D4 à 1000 mg/L a été ajouté. Ensuite, 1.5 mL d'acétate d'éthyle a été ajouté et le mélange a été agité doucement par inversion dix fois. Les échantillons ont reposé quelques minutes afin d'obtenir une bonne séparation des deux phases. L'acétate d'éthyle a été transféré dans une fiole de 1.5 mL à fond plat contenant du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et agité doucement. L'acétate d'éthyle a ensuite été retransféré dans une fiole à fond conique et

éaporé à sec sous un jet d'azote. Les échantillons ont par la suite été dérivés tel que présenté à la section 2.4.2.

### **2.5.2 Biodégradation par les isolats**

Les souches sélectionnées (voir section 2.3.3) ont été testées pour leur capacité à biodégrader l'E2 individuellement dans un milieu de culture minéral (ESM) ou riche (TSB). Chacune des souches, conservées à -80°C, a étéensemencée sur géloses R2A et TSA, afin de favoriser la croissance. Les géloses étaient incubées à 25 °C dans le noir durant 3 jours. Les étapes suivantes ont été effectuées en triplicata. Une colonie était sélectionnée pour ensemencer 12 mL de milieu ESM et une autre pour 12 mL de milieu TSB contenus dans des éprouvettes. Les deux milieux de culture contenaient une concentration de 1 mg/L d'E2. Un échantillon stérile de chacun des milieux était conservé à 4 °C à titre de temps zéro. Un autre échantillon stérilisé contenant seulement le milieu de culture et les estrogènes était incubé avec les souches à titre de contrôle négatif. La souche MI-9.3 a servi de contrôle positif, puisqu'elle a déjà été testée pour son activité de dégradation des estrogènes (Isabelle *et al.*, 2007). Les souches étaient incubées à 25°C et 250 rpm, durant 96 heures. Ensuite, les estrogènes ont été extraits, tel que décrit pour les tests de dégradation à la section 2.4.1. Les souches pour les tests de cinétique de dégradation ont été sélectionnées afin d'obtenir une grande variation dans les patrons de dégradation de l'E2.

## **2.6 Détermination de la cinétique de dégradation**

### **2.6.1 Courbe de croissance**

Des courbes de croissance ont été faites pour les souches sélectionnées à la section 2.5.2 dans un milieu riche (TSB). Pour commencer, une préculture de 100 mL de TSB contenus dans un Erlenmeyer de 1 L, a étéensemencée avec un inoculum de la souche conservée à -80°C et incubée à 25°C et 250 rpm durant 36 heures pour obtenir une densité optique supérieure à 3. La densité optique a été mesurée avec un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies Inc., DE., É.U.) à une longueur d'onde de 600 nm avec le module *Cell Cultures* du logiciel Nanodrop ND-1000

3.1.2 (Nanodrop Technologies Inc., DE., É.U.). Ensuite, 600 mL de milieu TSB contenus dans un Erlenmeyer de 4 L ont étéensemencés avec la préculture afin d'obtenir une densité optique de 0.2. La culture a ensuite été incubée à 25°C et 250 rpm et la densité optique a été mesurée aux 2 heures jusqu'à l'atteinte de la phase stationnaire. Pour chacune des souches, le milieu de la phase exponentielle a été déterminé avec la courbe de croissance.

### 2.6.2 Cinétique de dégradation des isolats

Les cinétiques de dégradation ont été déterminées pour chacune des souches sélectionnées à la section 2.5.2. Une préculture de chacune des souches dans 100 mL de TSB a été faite, tel que décrit à la section 2.6.1 et a servi à ensemencer 600 mL de TSB. Par contre, pour chaque souche, la culture de 600 mL a été arrêtée au milieu de la phase exponentielle. Pour enlever le milieu TSB, les bactéries ont été centrifugées trois fois dans des bouteilles de 500 mL (Beckman Coulter, On, Cnd) à 5000 x G durant 15 min, avec 2 lavages dans du milieu ESM. Ensuite, la biomasse était resuspendue dans 600 mL de milieu ESM contenant une concentration de 1 mg/L d'E2. Afin de tester l'effet de la présence d'une autre source de carbone, la dégradation de l'E2 par chaque souche a également été mesurée dans 600 mL de milieu de culture composé de 540 mL de milieu ESM et de 60 mL de milieu TSB. De plus, afin de tester l'effet du milieu de culture, la dégradation a également été mesurée dans 600 mL de tampon phosphate salin (PBS pour *phosphate buffered saline*) et dans 540 mL de PBS plus 60 mL TSB. Pour les tests avec le milieu PBS, la biomasse des précultures a été lavée avec du milieu PBS à la place du milieu ESM. Le PBS était composé de 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14.2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre et de 2.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dissous dans 1 L d'eau milli-Q.

Les cultures ont été incubées à 25°C et 250 rpm durant 24 heures et des échantillons de 30 mL ont été prélevés au temps zéro et à 2,4, 7.5, 10, 20 et 24 heures. Le standard interne, E2-D4, a été ajouté immédiatement après le prélèvement de chaque échantillon à une concentration de 1 mg/L. Les échantillons ont été placés à 4°C et les estrogènes ont été extraits selon le protocole présenté à la section 2.4.1 pour le test de cinétique. Afin de quantifier la biomasse, des échantillons de 30 mL ont également été prélevés et placés dans des tubes de type Falcon™ de 50 mL (Sarstedt, NC, É.U.) en

même temps que les échantillons utilisés pour le suivi de la biodégradation. Afin de laver la biomasse, chaque échantillon a été centrifugé trois fois pendant 10 min à 7000 x G en resuspendant dans de l'eau milli-Q. Les bactéries resuspendues étaient ensuite transférées dans une cupule en aluminium préalablement pesée et le tout chauffé 24 heures à 107°C dans un four Isotemp (Fisher Scientific, NJ, É.U.). La biomasse de chaque échantillon était déterminée gravimétriquement par la suite.

### **2.6.3 Cinétique de dégradation de cultures mixtes**

Le même protocole que celui présenté à la section 2.6.2 a été utilisé pour tester la cinétique de dégradation de cultures mixtes contenant 4 souches bactériennes. Par contre, la préparation des précultures a été effectuée de façon différente. Initialement, des précultures de 50 mL de TSB ont été démarrées à partir des souches congelées et incubées 36 heures à 25°C et 250 rpm. Ces précultures ont servi à ensemercer 200 mL de TSB afin d'obtenir une densité optique de 0.2. Les cultures ont été incubées à 25°C et 250 rpm, jusqu'à l'atteinte du milieu de la phase exponentielle. Le milieu TSB a été enlevé par centrifugation à 5000 x G, trois fois durant 10 min en resuspendant dans du milieu ESM. Chaque souche était ensuite resuspendue dans 150 mL de milieu de culture contenant 135 mL de milieu ESM et 15 mL de TSB. Un échantillon de 30 mL a ensuite été prélevé pour chaque souche afin de déterminer la biomasse de départ. Ensuite, les 4 souches ont été combinées pour donner un volume de départ de 450 mL auquel 450 µL d'une solution d'E2 à 1000 mg/L ont été ajoutés pour donner une concentration de départ d'E2 de 1 mg/L. Le prélèvement d'échantillons pour le suivi de la biodégradation et de la biomasse a été fait tel que présenté à la section 2.6.2.



## **Chapitre 3 : Résultats**

### **3.1 Enrichissement et isolement**

Le premier objectif visait à isoler des souches provenant d'un enrichissement contenant une forte concentration d'E2 (100 mg/L). Les enrichissements ont été effectués dans un milieu minéral (ESM) durant 5 semaines et la diversité du consortium et la disparition de l'E2 ont été suivis.

#### **3.1.1 Suivi de la diversité du consortium**

L'amplification PCR de l'ADN du consortium avec les amorces 341f et 532r a été analysée à l'aide d'une électrophorèse sur gel à gradient dénaturant afin d'évaluer la diversité microbienne des enrichissements. Les résultats des cinq semaines pour les deux enrichissements sont présentés à la figure 4. Pour l'usine d'épuration de Vaudreuil, la diversité du consortium pour les semaines 3, 4 et 5 est la même, tandis que les semaines 1 et 2 présentent un profil de diversité différent. Le consortium provenant de l'enrichissement du traitement biologique pour le lisier de porc présente cinq différents profils de diversité. Le consortium de la semaine 5 présente une bonne diversité avec les nombreuses bandes présentes. Les consortia des semaines 5 des deux enrichissements ont été sélectionnés pour l'isolement de souches. Les consortia des semaines 1 à 4 pour les deux enrichissements ont été mis en réserve pour obtenir plus d'isolats si aucune souche dégradant l'E2 n'était isolée des consortia des semaines 5.

#### **3.1.2 Suivi de la dégradation**

L'E2 a été extrait des échantillons prélevés à chaque semaine par ELL et analysé par CG-SM. La figure 5 présente les concentrations d'E2 au début et à la fin de chacune des 5 semaines pour les deux enrichissements. La dégradation a été supérieure à 88 % après chaque semaine, sauf une avec la biomasse de l'usine d'épuration de Vaudreuil, et elle a atteint 99 % à la fin des semaines 5 pour les deux enrichissements. Tel que mentionné précédemment, les consortia des semaines 5 ont été utilisés pour l'isolement des souches et les consortia des semaines 1 à 4 ont été conservés afin d'être utilisés, si nécessaire, pour isoler d'autres souches dégradant l'E2. Tel que montré à la figure 5, l'E2

a été dégradé durant les premières semaines, ce qui indique la possibilité de trouver des bactéries dégradant l'E2.

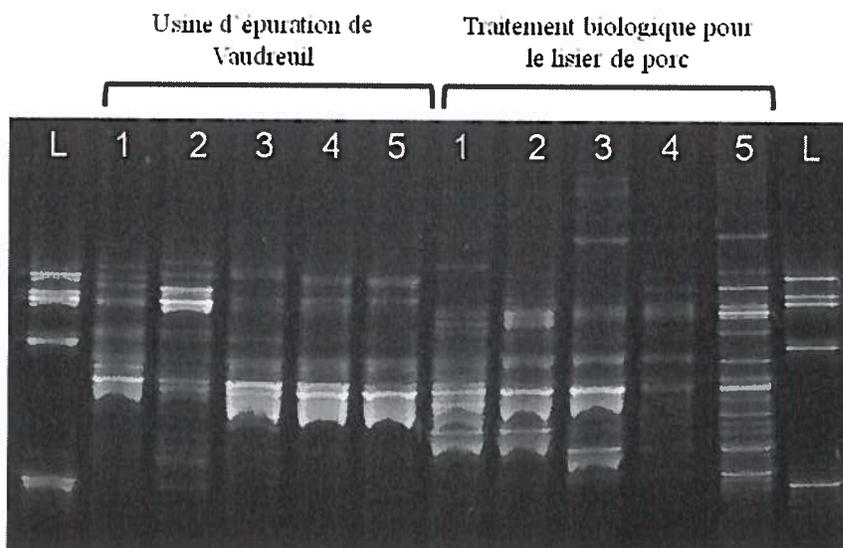


Figure 4. Migration de l'ADN des consortiums des 5 semaines pour les deux enrichissements sur un gel d'électrophorèse à gradient dénaturant. (L= Échelle de poids moléculaire)

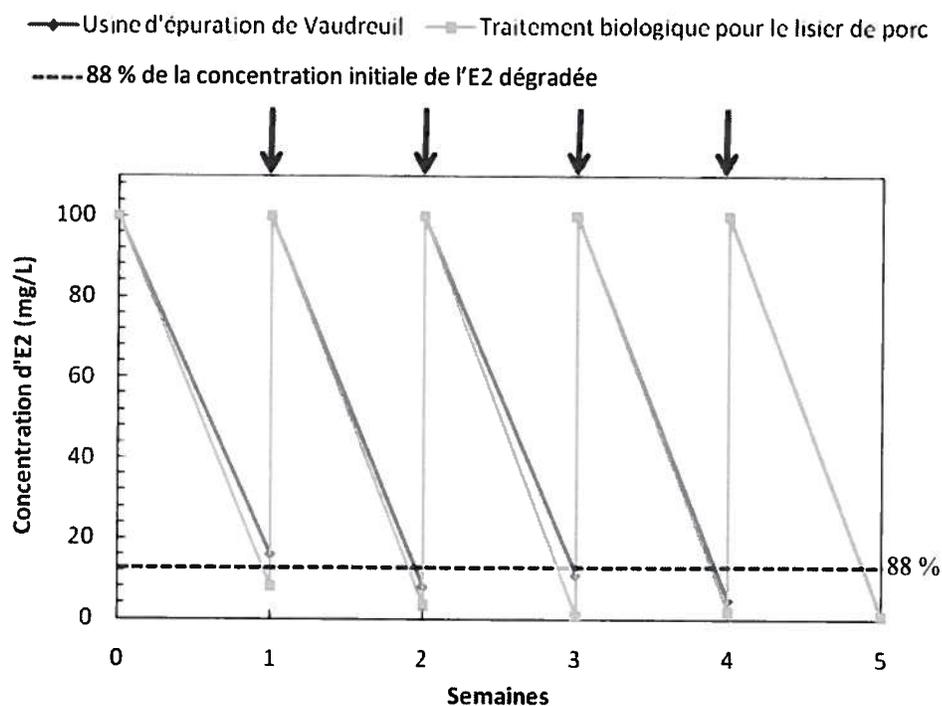


Figure 5. Profil de dégradation des consortiums durant les 5 semaines pour les deux enrichissements. Les changements de milieu de culture sont indiqués par les flèches.

### 3.1.3 Isolats identifiés par BLASTN

Afin d'augmenter la diversité des isolats, trois milieux de culture solide ont été utilisés pour l'isolement, soit un milieu riche, TSB, un milieu minimal, R2A, et un milieu minéral, ESM. Une source de carbone, 100 mg/L d'E2, a été ajoutée au milieu minéral pour favoriser la croissance des bactéries. L'ADN des isolats qui survivaient à trois repiquages, était extrait, amplifié par PCR avec les amorces pA-YM et pH et envoyé à séquencer chez Génomes Québec. Au total, 39 isolats ont été séquencés et sont présentés au tableau 9 avec le pourcentage d'appariement à l'espèce la plus proche selon l'analyse BLASTN. Les isolats ont été associés, avec des pourcentages d'appariement de plus de 98% dans tous les cas sauf deux, à 15 genres différents : *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aminobacter*, *Delftia*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Gelidibacter*, *Hydrogenophaga*, *Methylobacteriaceae*, *Microbacterium*, *Pimelobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis* et *Stenotrophomonas*. Les 16 isolats surlignés dans le tableau 9 ont été sélectionnés pour les tests de dégradation d'E2. La sélection a été effectuée dans le but d'obtenir une diversité de genres. Il est à noter que les isolats ont été séquencés une première fois d'un seul côté, c'est-à-dire avec l'amorce pH seulement et ceci dans le but d'accélérer les analyses. Certains isolats sélectionnés au départ et apparemment associés à des genres différents, se sont révélés être associés au même genre lors de l'analyse du gène 16S complet. Ceci est le cas pour les isolats CL-10.3a, CL-10.7b et CL-10.8b associés à *Alcaligenes*, CL-9.08 et CL-10.19 associés à *Aminobacter* et pour CL-10.14 et CL-9.02 associés à *Stenotrophomonas*. Aussi, certains isolats ont été séquencés après que les tests de dégradation eurent débuté. Donc, ceux associés à de nouveaux genres n'ont pas été testés pour leur dégradation d'E2. C'est le cas pour les isolats CL-9.09b, CL-9.15a et CL-10.7a associés aux genres *Flavobacterium*, *Sphingomonas* et *Sphingopyxis*, respectivement. Puisque les résultats des tests de dégradation et de cinétique se sont révélés satisfaisants avec les 16 isolats, ces trois isolats n'ont pas été testés.

Les séquences de nucléotides des souches ont été soumises à la base de données GenBank et les numéros d'accès de 21 des 39 souches sont présentés à l'annexe 1. Plusieurs souches, soient 18, étaient associées à la même espèce et n'ont pas été soumis à la base de données GenBank. Quelques-unes de ces 18 souches avaient été testés malgré cela pour leur capacité de dégradation de l'estradiol puisqu'au début des expériences,

seulement un côté du gène de l'ARNr 16S avait été séquencé et elles étaient associées à des souches différentes. Pour ces raisons, les 18 souches ont tout de même été présentées au tableau 9.

### 3.1.4 Analyses phylogénétiques des isolats

La classification phylogénétique des 39 isolats a également été effectuée à l'aide du logiciel ARB. Compte tenu de la diversité observée, les isolats ont été séparés en sept arbres qui sont présentés aux figures 6 à 12. Cinq isolats ont été placés dans la classe des Actinobacteria et associés au genre *Microbacterium*: CL-11.6b, CL-4.2, CL-9.11a, CL-10.9 et CL-9.11b (figure 6).

Cinq autres isolats, CL-9.08, CL-10.19, CL-11.4a, CL-9.15a et CL-10.7a, ont été mis dans la classe des Alphaproteobacteria et les genres les plus proches de ces isolats sont *Pseudoaminobacter*, *Aminobacter*, *Methylobacterium* pour les trois premiers et *Sphingopyxis* pour les deux derniers (figure 7).

Dans la classe des Betaproteobacteria, dix isolats ont été placés : CL-9.07, CL-9.06, CL-10.3a, CL-10.7b, CL-10.7b1, CL-10.12, CL-10.8b, CL-11.4b, CL-2.3 et CL-10.6a (figure 8). Pour les deux premiers isolats, les genres les plus proches sont *Delfia* et *Hydrogenophaga*, respectivement. Les isolats CL-10.3a, CL-10.7b, CL-10.7b1 et CL-10.12 sont associés au genre *Alcaligenes*, CL-10.8b au genre *Castellaniella* et CL-11.4b, CL-2.3 et 10.6a au genre *Achromobacter*.

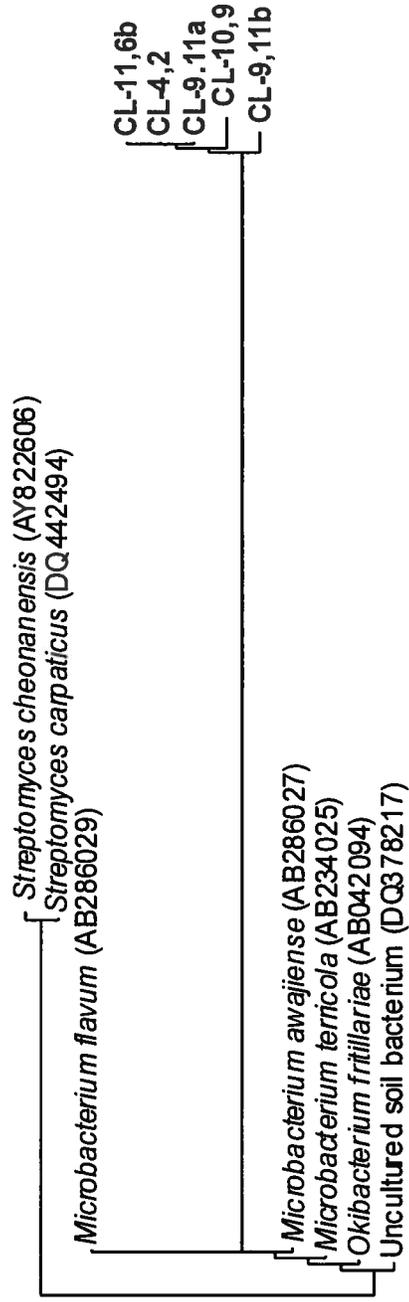
L'isolat CL-9.04 était le seul classé dans le phylum des Firmicutes et le genre le plus rapproché est *Bacillus* (figure 9). Treize isolats ont été placés dans la classe des Gammaproteobacteria et ils sont tous associés au genre *Pseudomonas*: CL-10.13, CL-10.4, CL-10.17b, CL-10.6b, CL-2.2, CL-10.5, CL-10.1b, CL-11.3, CL-9.09a, CL-9.13c, CL-4.3 CL-4.1, CL-9.13b (figure 10).

Deux isolats, CL-2.1 et CL-9.09b, étaient classés dans le phylum des Bacteroidetes et les genres les plus rapprochés sont *Gelidibacter* et *Terrimonas*, respectivement (figure 11). Finalement, trois isolats, CL-10.14, CL-9.02 et CL-9.14 ont

été classés dans l'ordre des Xanthomonadales et associés au genre *Stenotrophomonas* (figure 12).

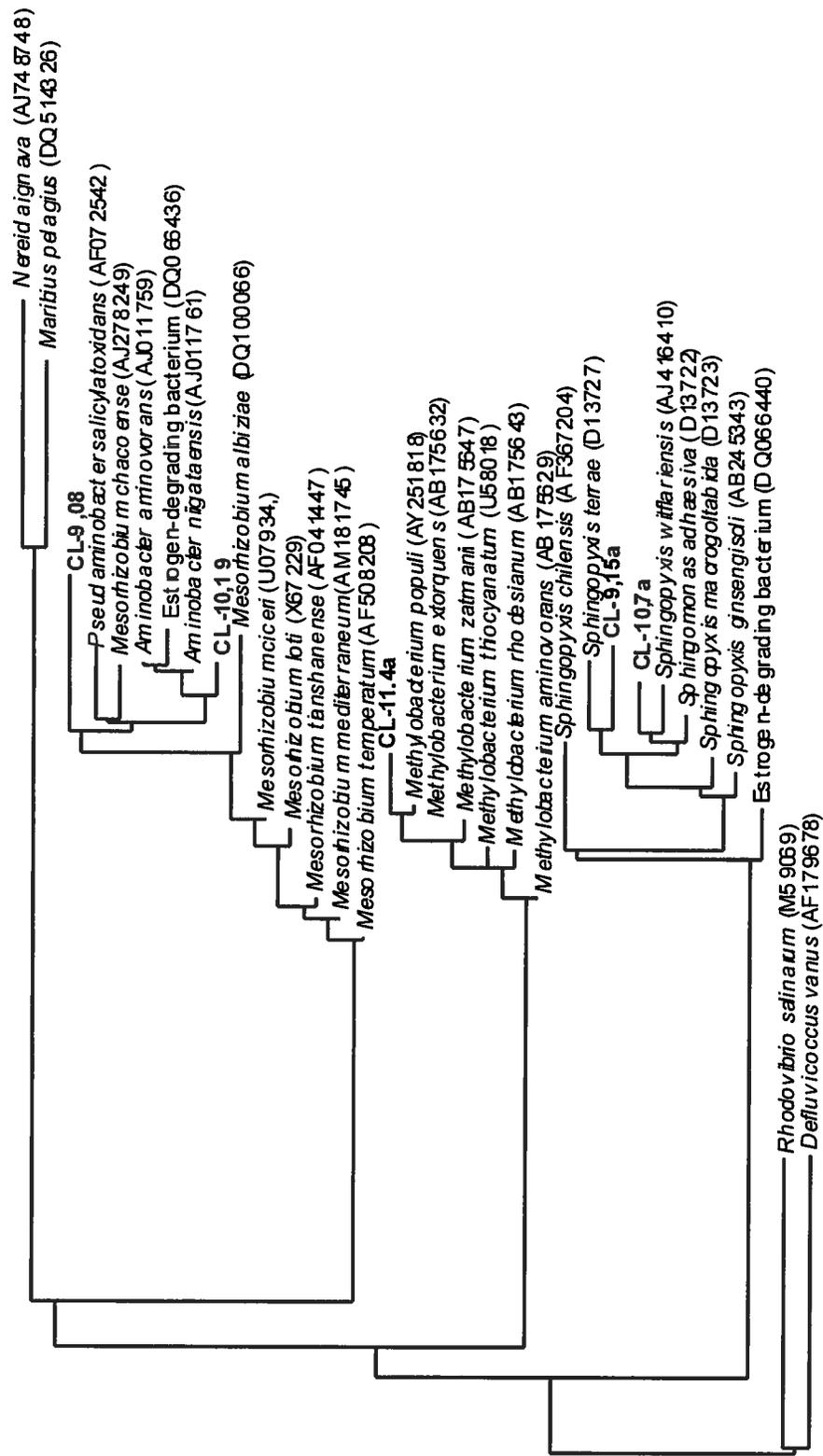
Tableau 9. Résultat de l'analyse des séquences avec BLASTN présentant l'espèce la plus proche de chaque isolat avec le pourcentage d'appariement (%).

Isolat	Espèce la plus proche (no. de séquence Genebank)	%	Isolat	Espèce la plus proche	%
CL-11.4b	<i>Achromobacter</i> sp. (EU727196)	99	<b>CL-9.11b</b>	<b><i>Pimelobacter simplex</i></b> (AY509240)	<b>99</b>
<b>CL-10.6a</b>	<b><i>Achromobacter xylosoxidans</i></b> (FJ169468)	<b>99</b>	CL-9.09a	<i>Pseudomonas denitrificans</i> (AB021419)	98
CL-2.3	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (DQ659433)	98	CL-4.1	<i>Pseudomonas denitrificans</i> (AB021419)	99
<b>CL-10.3a</b>	<b><i>Alcaligenes faecalis</i></b> (AF155147)	<b>99</b>	CL-4.3	<i>Pseudomonas denitrificans</i> (AB021419)	97
CL-10.7b1	<i>Alcaligenes</i> sp. (AY346138)	99	CL-9.13c	<i>Pseudomonas denitrificans</i> (AB021419)	98
<b>CL-10.7b</b>	<b><i>Alcaligenes</i> sp.</b> (AY346138)	<b>99</b>	CL-9.13b	<i>Pseudomonas denitrificans</i> (AB021419)	99
CL-10.12	<i>Alcaligenes</i> sp. (AY346138)	99	CL-11.3	<i>Pseudomonas denitrificans</i> (AB021419)	98
<b>CL-10.8b</b>	<b><i>Alcaligenes</i> sp.</b> (EU308116)	<b>99</b>	<b>CL-10.4</b>	<b><i>Pseudomonas mendocina</i></b> (FJ840535)	<b>99</b>
<b>CL-9.08</b>	<b><i>Aminobacter</i> sp.</b> (FJ711220)	<b>99</b>	CL-10.13	<i>Pseudomonas mendocina</i> (FJ840535)	99
<b>CL-10.19</b>	<b><i>Aminobacter</i> sp.</b> (DQ401867)	<b>98</b>	CL-2.2	<i>Pseudomonas</i> sp. (AF385547)	99
<b>CL-9.07</b>	<b><i>Delftia acidovorans</i></b> (CP000884)	<b>99</b>	CL-10.1b	<i>Pseudomonas</i> sp. (AF385547)	98
<b>CL-9.04</b>	<b><i>Bacillus</i> sp.</b> (FR667182)	<b>96</b>	CL-10.6b	<i>Pseudomonas</i> sp. (AF385547)	98
CL-9.09b	<i>Flavobacterium ferrugineum</i> (AM230484)	96	CL-10.17b	<i>Pseudomonas</i> sp. (AF385547)	99
<b>CL-2.1</b>	<b><i>Gelidibacter gilvus</i></b> (GSAF001369)	<b>96</b>	CL-10.5	<i>Pseudomonas</i> sp. (EF151240)	99
<b>CL-9.06</b>	<b><i>Hydrogenophaga</i> sp.</b> (EU580699)	<b>99</b>	CL-9.15a	<i>Sphingomonas</i> sp. (EU591707)	99
<b>CL-11.4a</b>	<b><i>Methylobacterium rhodesianum</i></b> (AB175643)	<b>99</b>	CL-10.7a	<i>Sphingopyxis granuli</i> (AY563034)	99
CL-4.2	<i>Microbacterium oxydans</i> (FJ169470)	99	<b>CL-10.14</b>	<b><i>Stenotrophomonas</i> sp.</b> (AY654621)	<b>99</b>
CL-9.11a	<i>Microbacterium paraoxydans</i> (EU714373)	99	CL-9.14	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AJ300772)	99
CL-11.6b	<i>Microbacterium oxydans</i> (GQ279110)	99	<b>CL-9.02</b>	<b><i>Stenotrophomonas</i> sp.</b> (AB180662)	<b>98</b>
<b>CL-10.9</b>	<b><i>Microbacterium</i> sp.</b> (GQ246683)	<b>99</b>			



0.10

Figure 6. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant à la classe des Actinobacteria. L'analyse est basée sur les séquences de l'ADNr 16S. Les espèces *Streptomyces cheonanensis* et *S. carpaticus* ont servi de groupe externe pour l'arbre.



0.10

Figure 7. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant à la classe des Alphaproteobacteria. L'analyse est basée sur les séquences de l'ADNr 16S. Les espèces *Rhodovibrio salinarum* et *Defluvicoccus vanus* ont servi de groupe externe pour l'arbre.

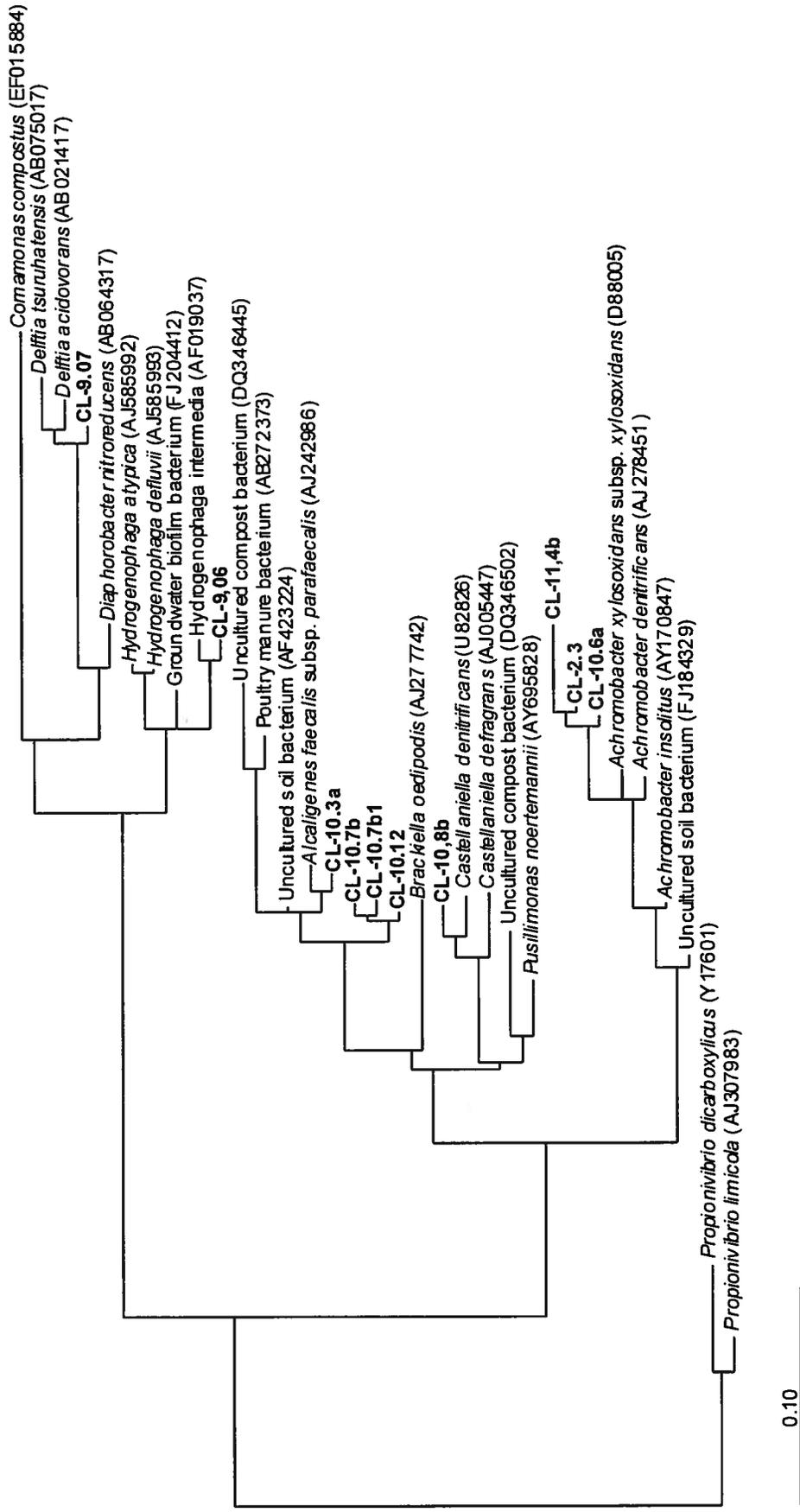


Figure 8. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant à la classe des Betaproteobacteria. L'analyse est basée sur les séquences de l'ADNr 16S. Les espèces *Propionivibrio dicarboxylicus* et *P. limicola* ont servi de groupe externe pour l'arbre.

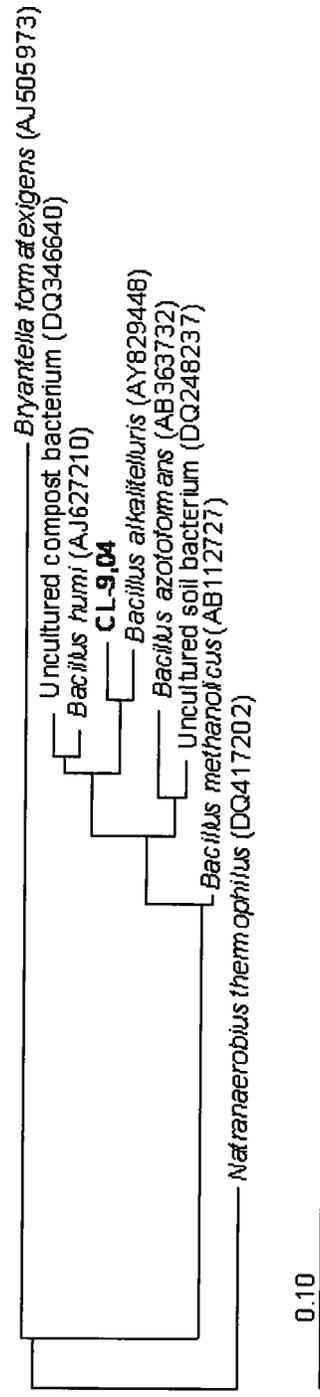
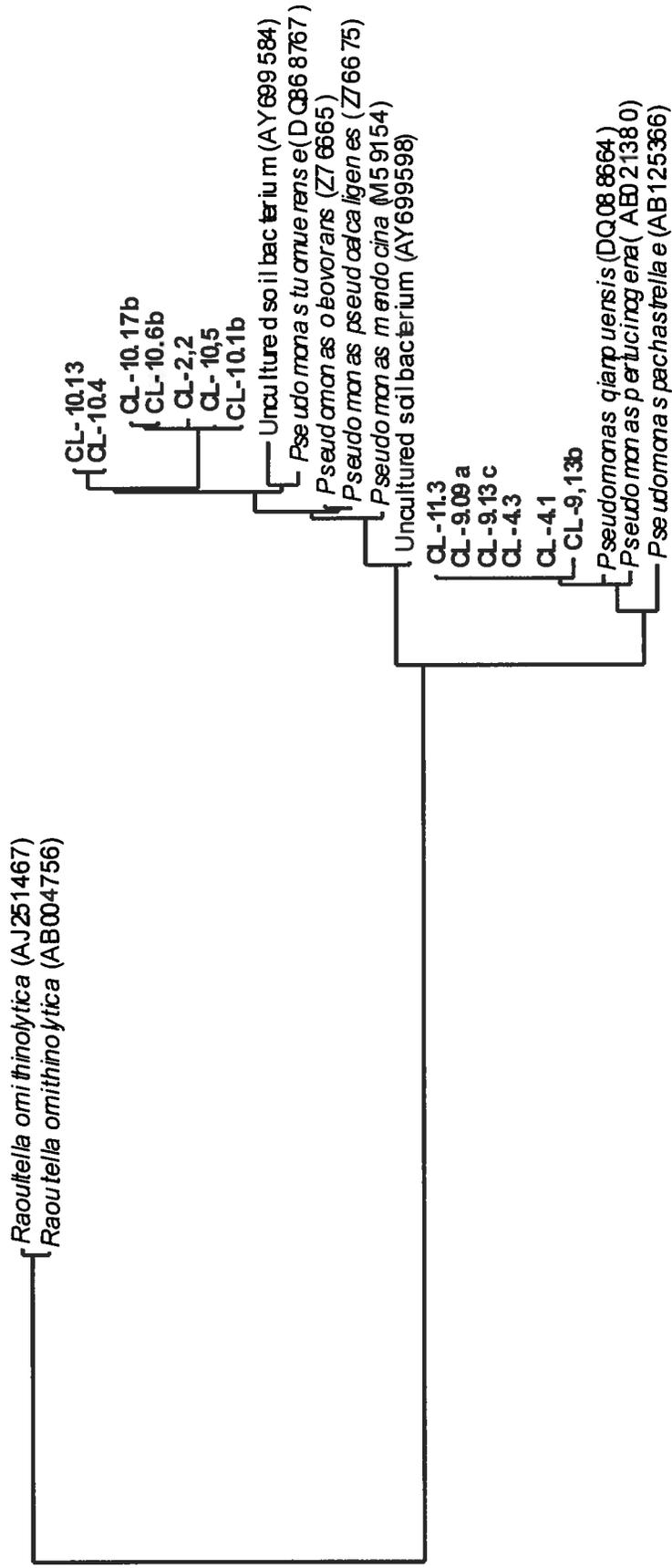


Figure 9. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant au phylum des Firmicutes. L'analyse est basée sur les séquences de l'ADNr 16S. Les espèces *Bryantella formatexigens* et *Natranaerobius thermophilus* ont servi de groupe externe pour l'arbre.



0.10

Figure 10. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant à la classe des Gammaproteobacteria. L'analyse est basée sur les séquences de l'ADNr 16S. L'espèce *Raoultella omithinolytica* a servi de groupe externe pour l'arbre.

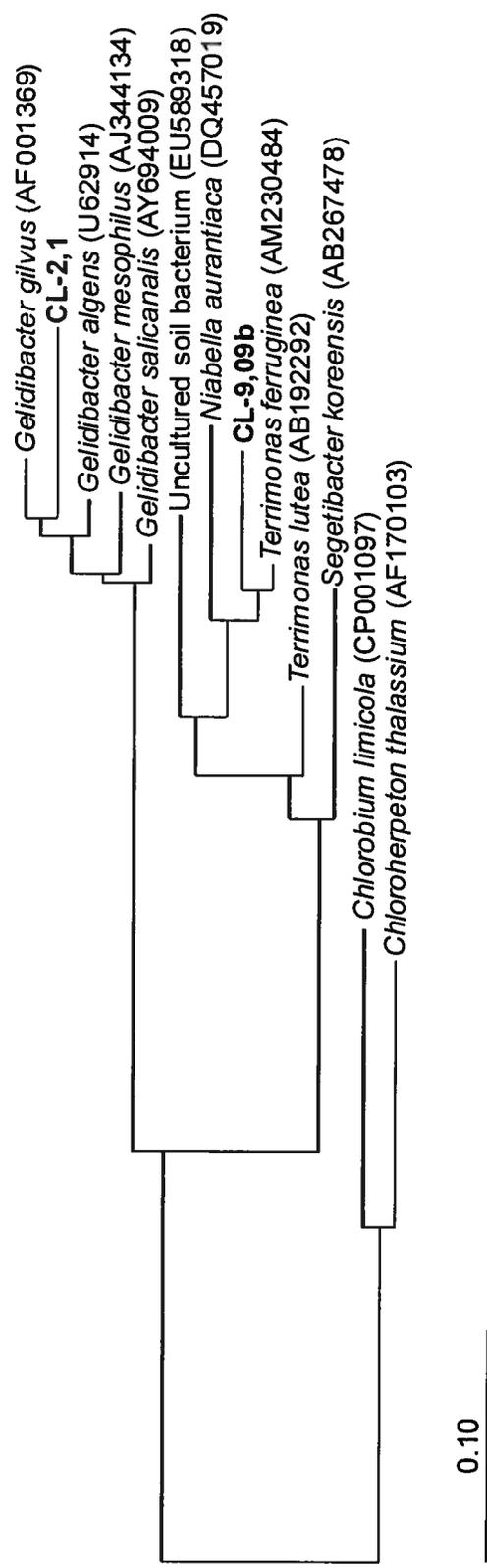
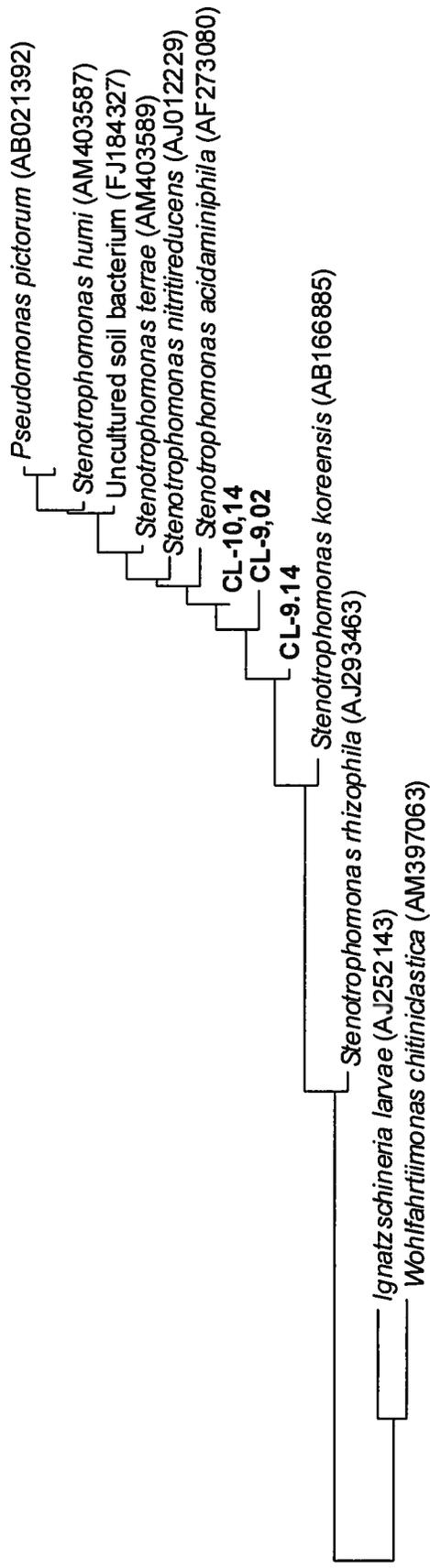


Figure 11. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant au phylum des Bacteroidetes. L'analyse est basée sur les séquences de l'ADNr 16S. Les espèces *Chlorobium limicola* et *Chloroherpeton thalassium* ont servi de groupe externe pour l'arbre.



0.10

Figure 12. Distribution phylogénique des bactéries isolées des enrichissements avec les estrogènes comme seule source de carbone appartenant à l'ordre des Xanthomonadales. L'analyse est basée sur les séquences de l'ADNr 16S. Les espèces *Ignatzschineria larvae* et *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* ont servi de groupe externe pour l'arbre.

### 3.2. Extraction et analyse de l'E2 par CG-SM

Afin de pouvoir quantifier l'E2 présent dans les milieux de culture, une méthode d'extraction liquide-liquide a été utilisée et couplée à une analyse par CG-SM. La méthode d'extraction de l'E2 présent dans les échantillons de 30 mL des tests de cinétiques permettait de concentrer l'E2 par un facteur de 200. De plus, selon les courbes standards obtenues au CG-SM, la limite de quantification a été placée à 50 µg/L, ce qui donne une limite de détection de 250 ng/L pour la méthode d'analyse au complet. Deux exemples de chromatogramme pour l'E2 et l'E2-D4 sont présentés aux figures 13 et 14 et les temps de rétention sont de 17,65 et 17,62 min, respectivement. Pour le calcul de la concentration d'E2 dans les échantillons, un quotient était calculé comme suit :

$$\text{Quotient} = \frac{\text{Aire sous la courbe d'E2} \times \text{Concentration d'E2 - D4}}{\text{Aire sous la courbe d'E2 - D4}}$$

Puisque le standard interne correspondait à la même molécule que l'E2 avec 4 deutériums en plus, le même comportement lors de l'extraction a été assumé pour l'E2 et l'E2-D4. De plus, puisque le standard interne était ajouté dès le début de l'extraction, le facteur de concentration était tenu en compte dans cette équation et aucune correction n'était nécessaire. Des courbes standards ont donc seulement été faites pour la mise au point de la méthode. La figure 15 présente une de ces courbes standards, faite avec des solutions ayant des concentrations de 0,05 à 10 mg/L. Aussi, le temps de rétention de l'E1 a été évalué afin de déterminer sa présence dans les échantillons. La figure 16 présente un chromatogramme de l'E1 injecté seul.

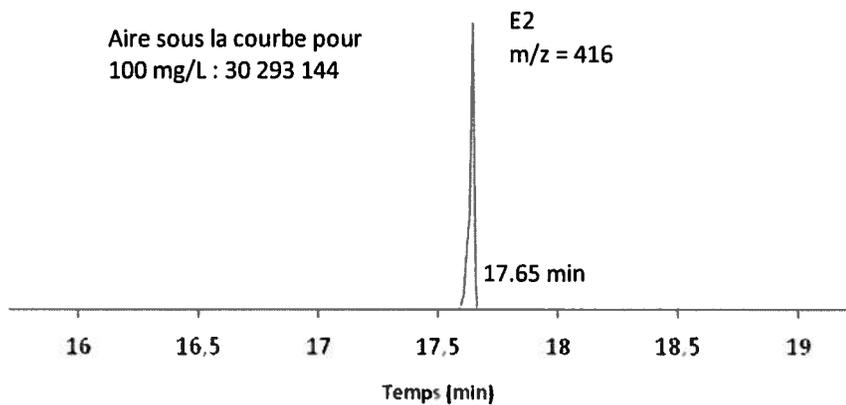


Figure 13. Chromatogramme de l'E2 avec l'aire sous la courbe et le temps de rétention indiqué.

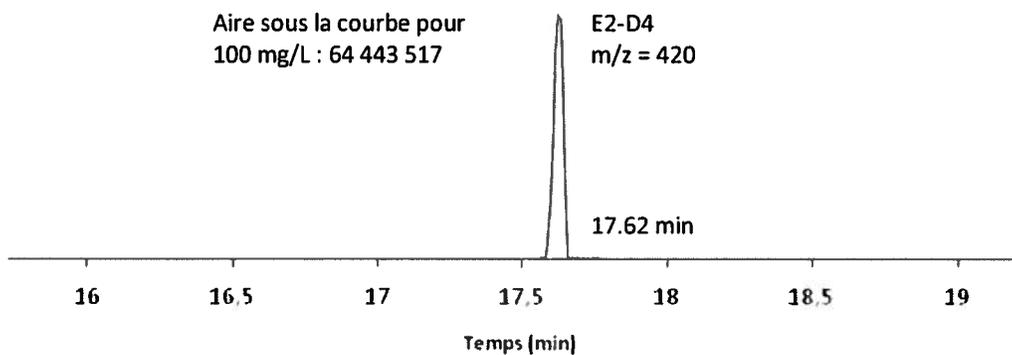


Figure 14. Chromatogramme de l'E2-D4 avec l'aire sous la courbe et le temps de rétention indiqué.

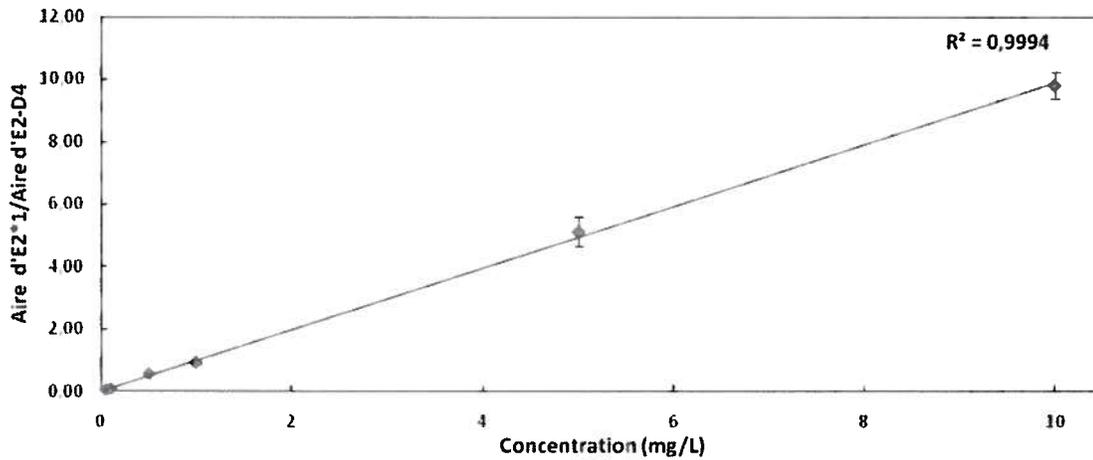


Figure 15. Courbe standard d'E2 présentant le quotient de l'aire d'E2 sur l'aire d'E2-D4 en fonction de la concentration de la solution standard.

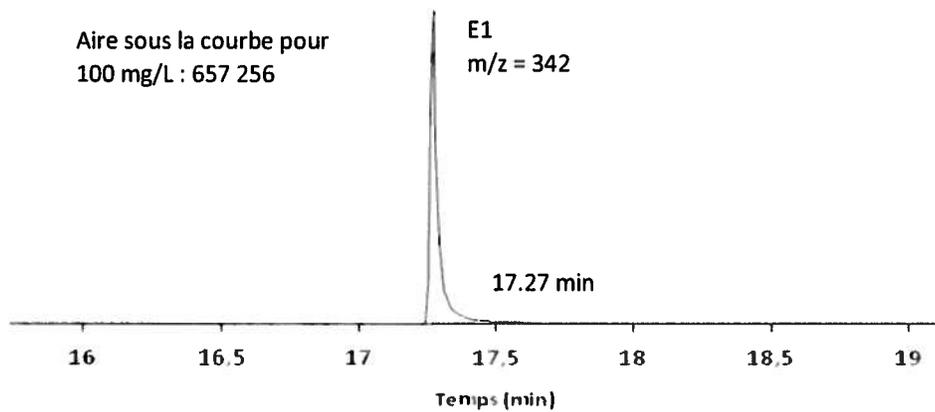


Figure 16. Chromatogramme de l'E1 avec l'aire sous la courbe et le temps de rétention indiqué.

### 3.3 Dégradation de l'E2

Suite au séquençage et à la classification des 39 isolats, 16 souches ont été choisies afin d'évaluer leur capacité à dégrader l'E2 dans deux milieux de culture, un minéral (ESM) et un riche (TSB). Ensuite, de ces 16 souches, 6 ont été sélectionnées selon leur patron de dégradation d'E2 pour mesurer leur cinétique d'utilisation de ce composé.

#### 3.3.1 Détermination du potentiel de dégradation

Les tests de dégradation ont été effectués dans deux milieux de culture, en triplicata avec une concentration initiale de 1 mg/L d'E2, durant 4 jours. La figure 17 présente les concentrations d'E2 restant dans le milieu de culture après 4 jours d'incubation pour les 16 souches. Les souches présentent différents patrons de dégradation et peuvent être regroupées. Pour les souches CL-10.3a et CL-10.7b, aucune diminution des concentrations d'E2 n'a été observée en milieu minimal et une dégradation de 35 %  $\pm$ 8 et 26 %  $\pm$ 11, respectivement, était observée en milieu riche. Une diminution de 19 %  $\pm$ 5 et 26 %  $\pm$ 7 en milieu minimal et de 50 %  $\pm$ 7 et 46 %  $\pm$ 9 en milieu riche a été mesurée pour les souches CL-9.07 et CL-9.08, respectivement. Les souches CL-10.4 et CL10.6a ont respectivement diminué la concentration initiale d'E2 de 21 %  $\pm$ 7 et 14 %  $\pm$ 5 en milieu minimal et 78 %  $\pm$ 15 et 82 %  $\pm$ 7 en milieu riche. Une diminution de 46 %  $\pm$ 16, 65 %  $\pm$ 7 et 55 %  $\pm$ 15 a été enregistrée, de manière respective, pour les souches CL-10.19, CL-10.14 et CL-10.8b en milieu minéral et de 50 %  $\pm$ 4, 37 %  $\pm$  19 et 41 %  $\pm$ 3 en milieu riche. Les souches CL-9.02, CL-2.1 et CL-9.11b ont tous les trois diminué la concentration d'E2 de plus de 98 %  $\pm$ 0 en milieu minéral et, suivant l'ordre, de 56 %  $\pm$ 6, 41 %  $\pm$ 4 et 65 %  $\pm$ 4 en milieu riche. La souche CL-9.06 est la seule à présenter un patron de dégradation d'E2 de 71 %  $\pm$ 16 en milieu minéral et de 68 %  $\pm$ 14 en milieu riche. Une diminution de 66 %  $\pm$ 6 et 64 %  $\pm$ 7 en milieu minéral et 93 %  $\pm$ 2 et 92 %  $\pm$ 1 en milieu riche a été mesurée pour les souches CL-10.9 et CL-11.4a, respectivement. Finalement, la souche CL-9.04 a diminué la concentration d'E2 de 98 %  $\pm$ 1 en milieu minéral et 92 %  $\pm$ 0 en milieu riche.

Afin de comparer les cinétiques d'utilisation d'E2 des souches « CL » avec celles des souches isolées « MI » à faible concentration (1 mg/L), des souches « CL » ont été sélectionnées afin d'avoir une variété de patron de dégradation. Rappelons que « MI » fait référence à une étudiante du laboratoire, Martine Isabelle, qui a isolé cinq souches à une faible concentration d'estrogènes (voir section 1.5). Sur la figure 17, les flèches indiquent les 6 souches pour lesquelles les cinétiques de dégradation ont été déterminées. La sélection a été effectuée de façon à obtenir différents patrons de dégradation de l'E2. À la figure 17, les six patrons sont identifiés par les lignes horizontales bleues. Une souche dans chacun de ces six patrons a été sélectionnée, soit CL-10.3a, CL-10.4, CL-10.14, CL-9.02, CL-10.9 et CL-9.04.

### **3.3.2 Caractérisation de la dégradation**

Les cinétiques d'utilisation d'E2 des six souches « CL » sélectionnées ont été déterminées ainsi que les quatre souches « MI » qui dégradent l'E2, soient MI-9.3, MI21.2, MI-6.1B et MI-14.1. Les souches « MI » proviennent d'un enrichissement des boues activées d'un traitement biologique pour le lisier de porc, contenant une concentration de 1 mg/L d'E2. Ces quatre souches avaient déjà été testées positivement pour leur capacité à dégrader l'E2. Alors, la dégradation de l'E2 pour ces dix souches a été évaluée avec une cinétique d'ordre zéro et un et les constantes de dégradation ont été déterminées. Ensuite, les cinétiques de dégradation des souches « CL » combinées ont été comparées aux cinétiques des souches « MI » combinées, afin de voir si le fait de combiner les souches modifiait la dégradation.

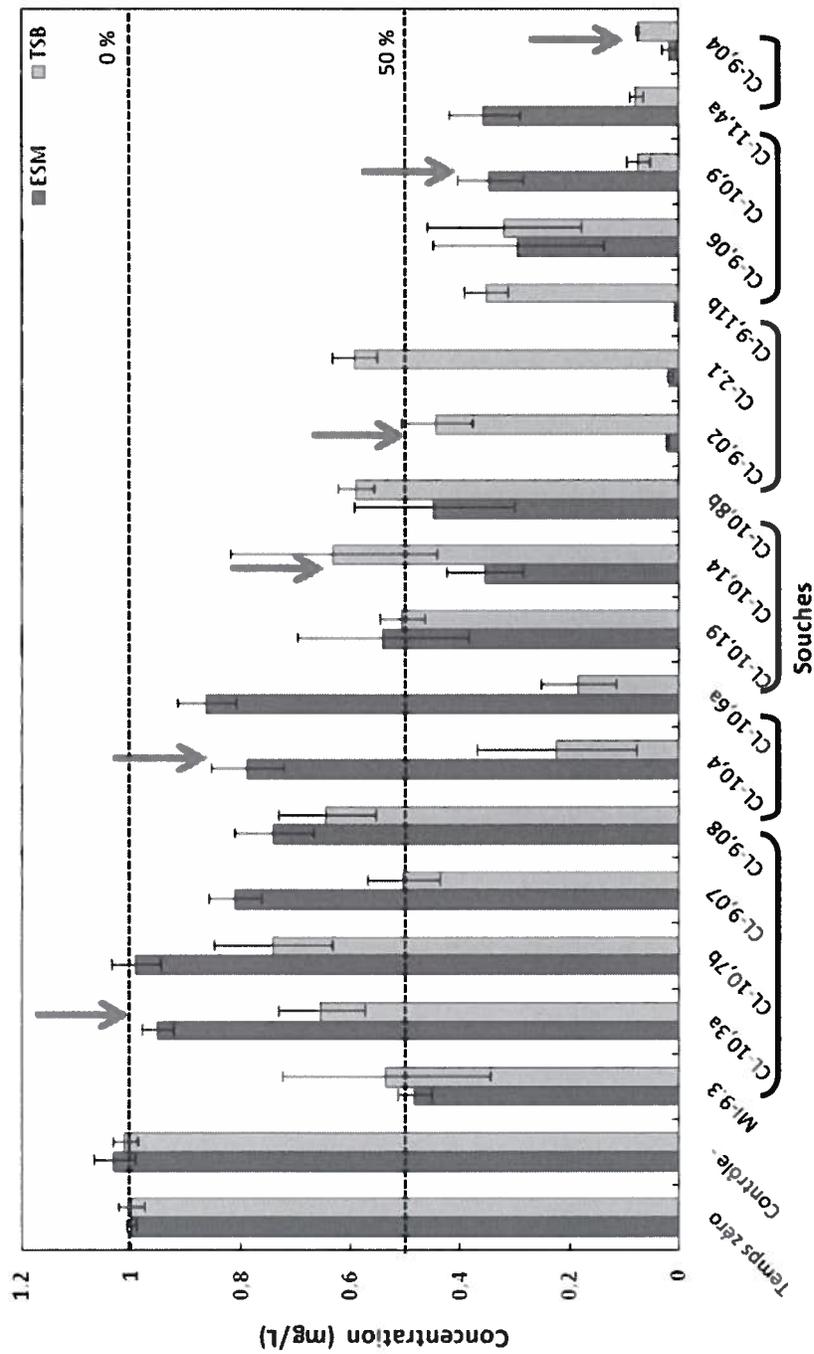


Figure 17. Concentration d'E2 présent dans le milieu de culture (ESM et TSB) après 4 jours d'incubation pour les 16 souches. Le temps zéro et le contrôle négatif correspondent respectivement au milieu de culture stérile conservé à 4 °C et incubé à 25 °C. La souche MI-9.3 sert de contrôle positif. Les 2 lignes pointillées horizontales indiquent la diminution d'E2 par rapport à sa concentration initiale. Les flèches indiquent les six souches sélectionnées pour les tests de cinétique de dégradation d'E2. Les lignes pleines horizontales identifient les souches associées aux six différents patrons de dégradation.

Les courbes de dégradation d'E2 des six souches « CL » et des quatre souches « MI » ont été mesurées dans un milieu minéral (ESM) contenant 10 % (v/v) de TSB comme source de carbone supplémentaire sur une période de 24 heures. Une préculture de chaque souche a été faite afin que les tests débutent avec des bactéries au milieu de leur phase exponentielle de croissance (Annexe 2). Les figures 18 à 27 présentent les dix courbes de dégradation de l'E2. Pour six des souches, CL-9.04, CL-10.4, CL-10.14, MI-9.3, MI-14.1 et MI-21.1, la variation de la biomasse est aussi présentée. Dû à un manque de temps, les échantillons de biomasse des souches CL-10.3a, CL-9.02, CL-10.9 et MI-6.1B n'ont pu être repris.

La figure 18 présente la souche CL-9.04 où la concentration de l'E2 a diminué rapidement durant les cinq premières heures et s'est stabilisée à  $5,3 \pm 0,5$  µg/L (moyenne des deux derniers échantillons) durant les 4 dernières heures. La biomasse a augmenté durant les cinq premières heures et s'est stabilisée par la suite à  $2,4 \pm 0,4$  g/L. Le profil de dégradation de la souche CL-10.4 est présenté à la figure 19. La concentration de l'E2 dans le milieu de culture a diminué de 10 % après 24 heures et la biomasse a augmenté durant la première heure et demi pour atteindre un maximum de  $1,42 \pm 0,02$  g/L.

La figure 20 montre la variation de l'E2 en fonction du temps pour la souche CL-10.14. Une diminution constante d'E2 a été observée tout au long du test et une concentration de 30 µg/L a été atteinte à 24 heures. Il y a eu croissance de la biomasse lors des cinq premières heures et stabilisation à près de  $2,4 \pm 0,2$  g/L pour le temps restant. La souche MI-9.3 est présentée à la figure 21 où la dégradation de l'E2 est constante pour atteindre 320 µg/L à la fin des 24 heures d'analyse. La biomasse a augmenté durant la première heure et demi et s'est stabilisée à  $2,3 \pm 0,4$  g/L.

La figure 22 présente la souche MI-14.1 où la concentration de l'E2 est restée stable à  $1,00 \pm 0,01$  mg/L durant les trois premières heures de l'analyse et a diminué constamment par la suite pour atteindre 360 µg/L. La concentration de bactéries a augmenté durant les trois premières heures et s'est stabilisée à  $1,78 \pm 0,08$  g/L, par la suite. Le profil de dégradation de la souche MI-21.2 est montré à la figure 23. La diminution de l'E2 est constante durant les 24 heures et atteint un minimum de 120 µg/L.

La biomasse augmente durant les dix premières heures et se stabilise ensuite à  $1,81 \pm 0,04$  g/L.

Les figures 24 à 27 présentent les courbes de dégradation d'E2 pour les souches CL-9.02, CL-10.3a, CL-10.9 et MI-6.1B. Pour ces quatre souches, les courbes de croissance de la biomasse ne sont pas disponibles, dû à un manque de temps pour reprendre les échantillons. La figure 24 présente le profil de dégradation de la souche CL-9.02 où la concentration diminue de façon constante durant les 20 premières heures et se stabilise autour de  $20 \pm 10$   $\mu\text{g/L}$  (moyenne des deux derniers échantillons). La souche CL-10.3a est présentée à la figure 25 où la concentration de l'E2 reste stable ( $1,06 \pm 0,05$  mg/L) durant les 24 heures. Le profil de dégradation de la souche CL-10.9 est présenté à la figure 26 où la concentration d'E2 diminue rapidement à  $80$   $\mu\text{g/L}$  durant les sept premières heures et atteint  $7 \pm 1$   $\mu\text{g/L}$  au bout de 24 heures. Finalement, la souche MI-6.1B, présentée à la figure 27, diminue la concentration de l'E2 à  $0,81 \pm 0,04$  mg/L (moyenne des 4 derniers échantillons) en 24 heures.

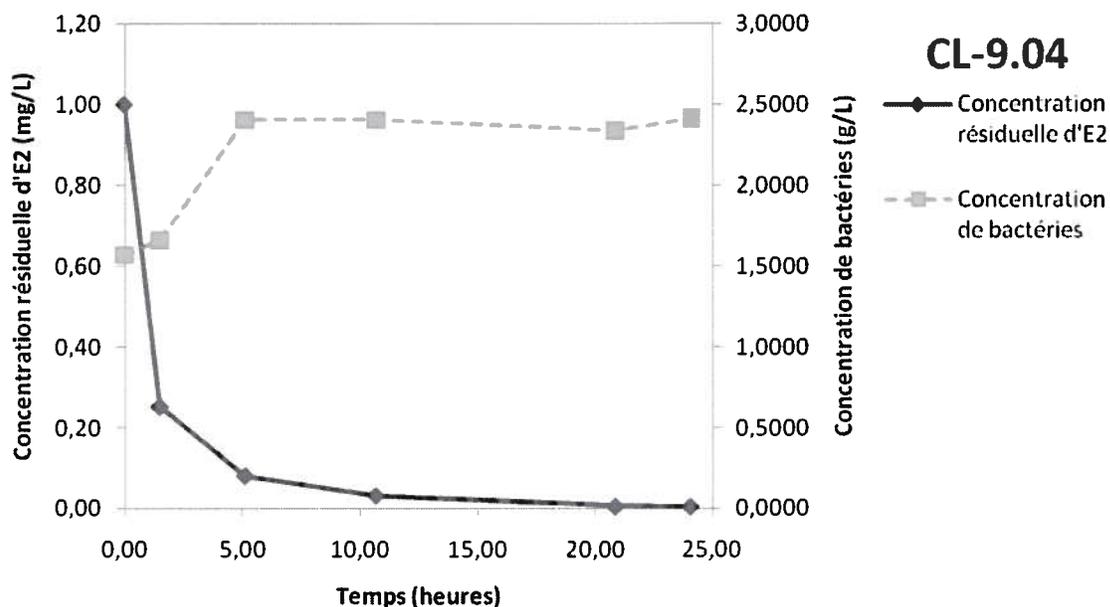


Figure 18. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-9.04 avec la variation de la concentration de bactéries (poids sec) dans le temps.

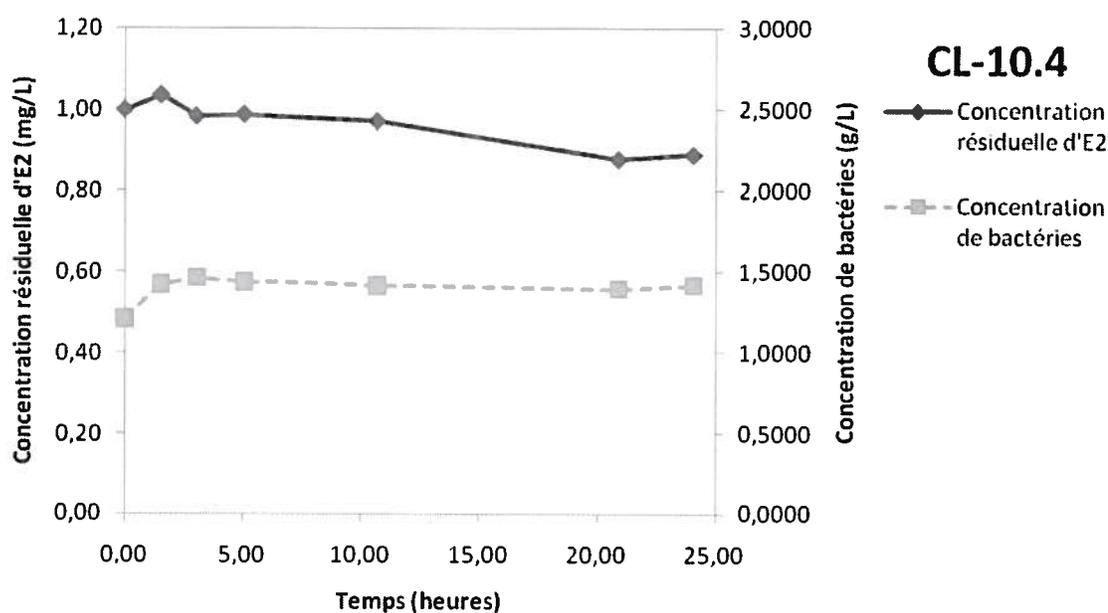


Figure 19. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.4 avec la variation de la concentration de bactéries (poids sec) dans le temps.

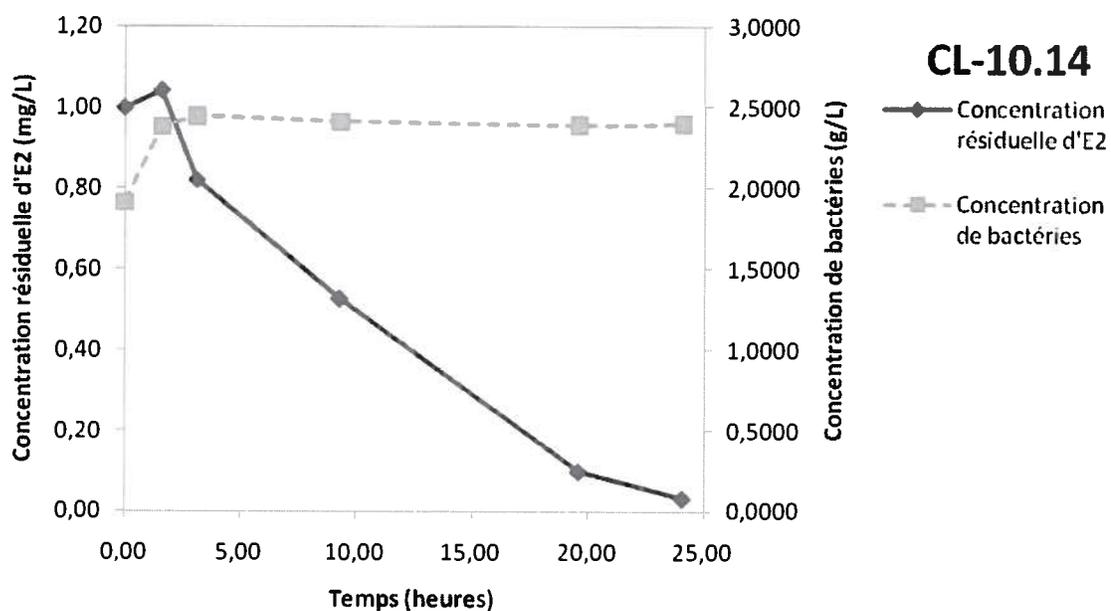


Figure 20. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.14 avec la variation de la concentration de bactéries (poids sec) dans le temps.

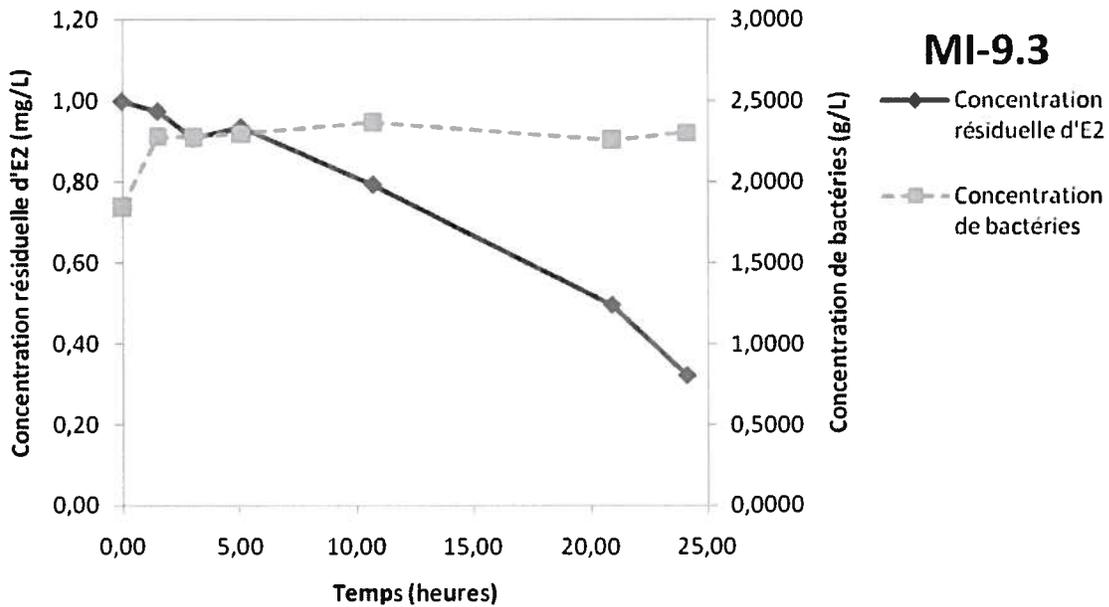


Figure 21. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-9.3 avec la variation de la concentration de bactéries (poids sec) dans le temps.

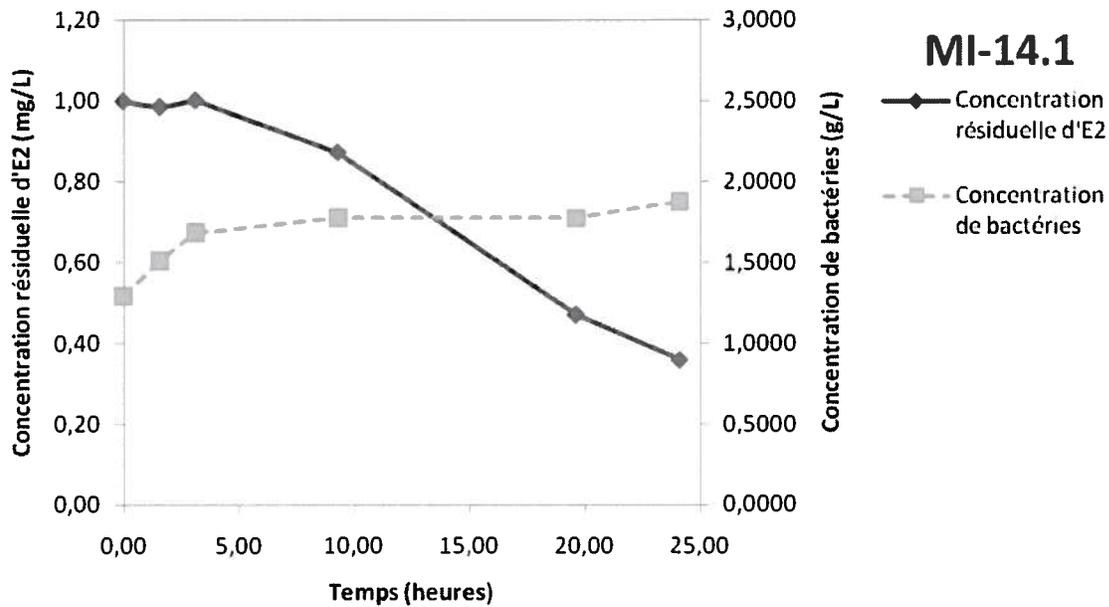


Figure 22. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-14.1 avec la variation de la concentration de bactéries (poids sec) dans le temps.

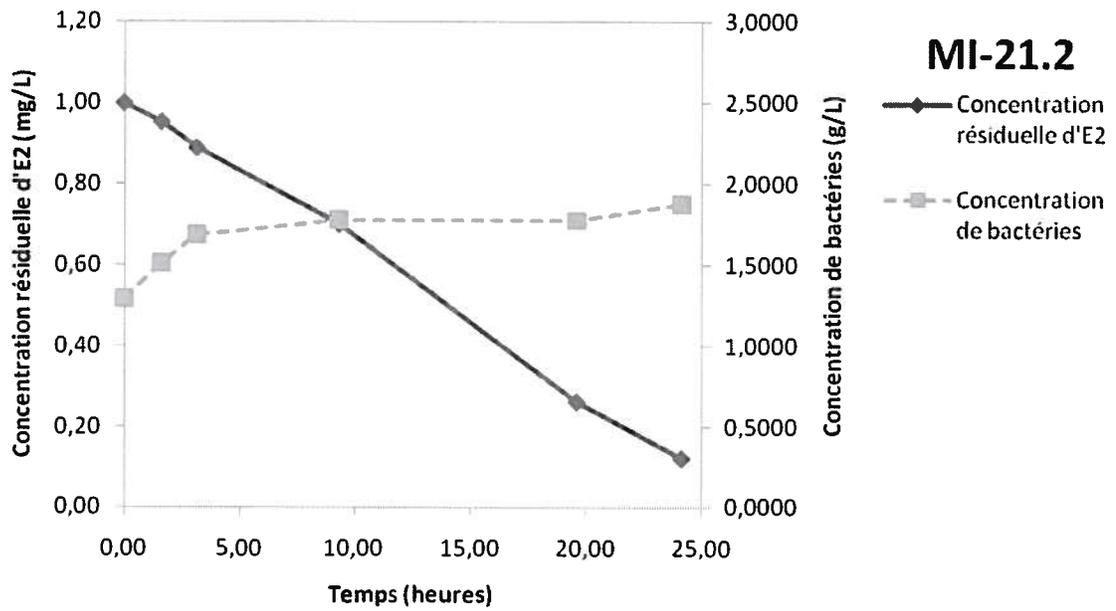


Figure 23. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-21.2 avec la variation de la concentration de bactéries (poids sec) dans le temps.

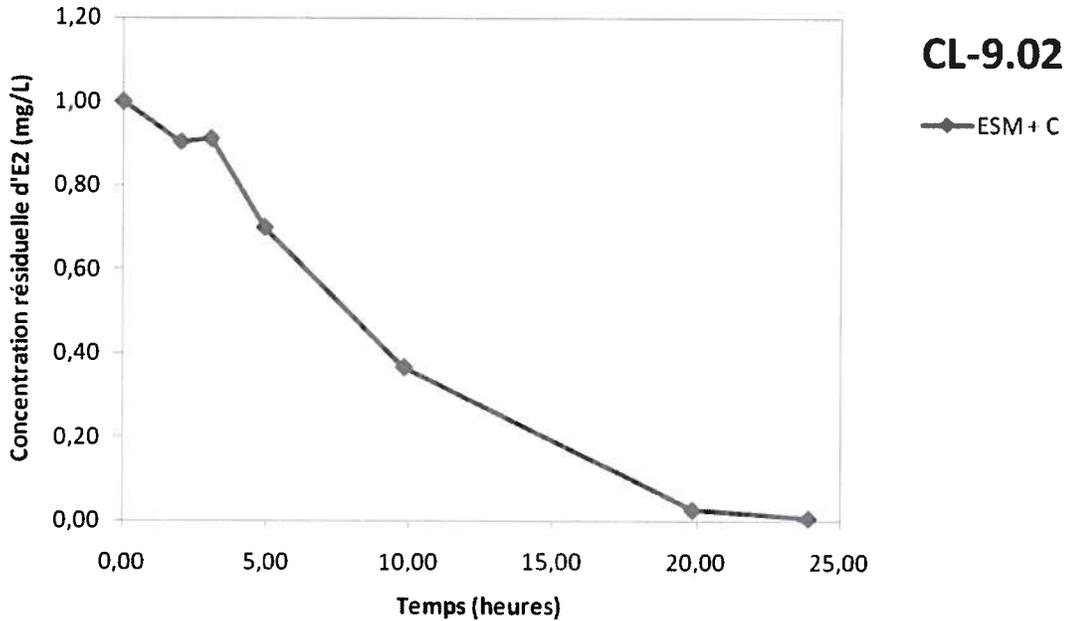


Figure 24. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-9.02.

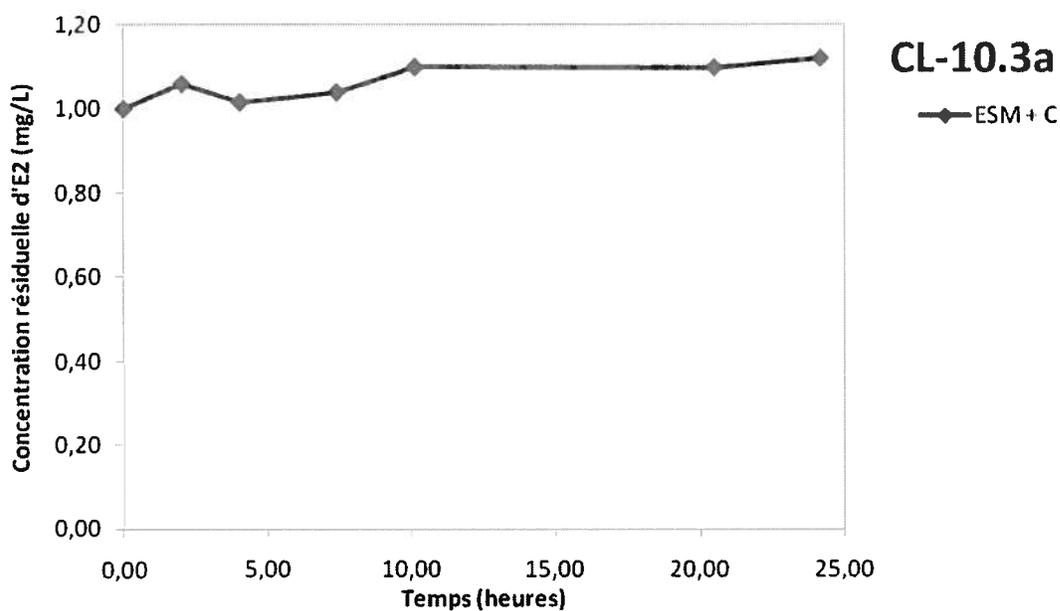


Figure 25. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.3a.

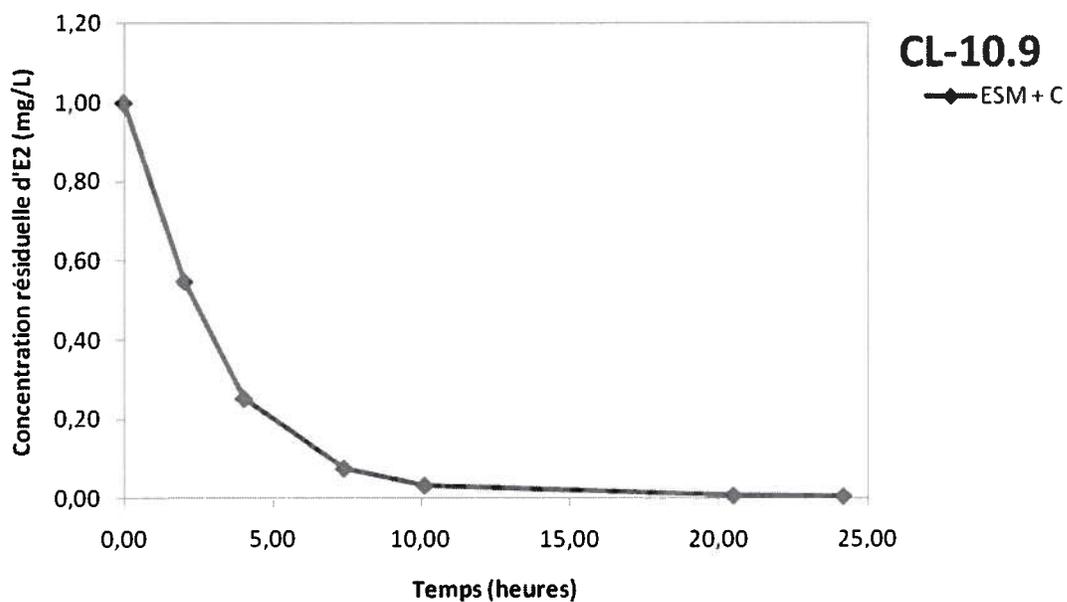


Figure 26. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.9.

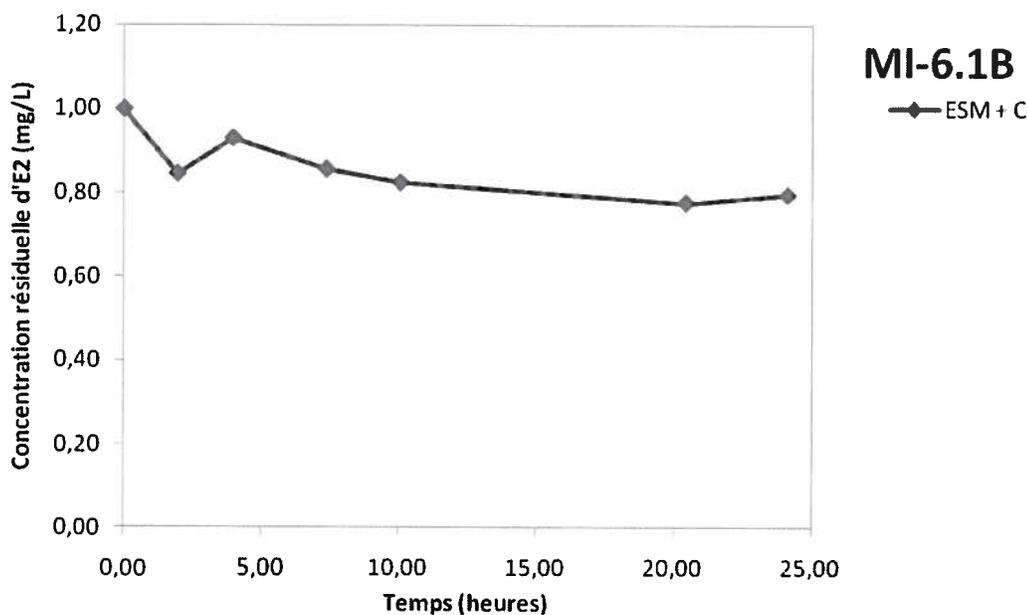


Figure 27. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-6.1B.

### 3.3.3 Effet du milieu de culture

Le profil de dégradation d'E2 a été évalué dans d'autres milieux de culture, pour neuf des dix souches. La souche CL-10.9 a été testée dans un seul milieu, ESM + C, puisque celui-ci avait été choisi comme milieu optimal pour la comparaison de la dégradation de l'E2. Les trois autres milieux de culture sont un milieu minéral (ESM) sans source de carbone supplémentaire et un tampon phosphate salin (PBS) avec et sans source de carbone ajoutée (10 % (v/v) de milieu riche, TSB). Les échantillons étaient pris à des intervalles réguliers sur une période de 24 heures. Pour les milieux sans carbone ajouté (ESM et PBS), la biomasse était quantifiée au début seulement. Pour quelques souches, certains des trois milieux n'ont pas été testés, puisqu'il s'agissait d'essais afin de trouver le milieu le plus satisfaisant pour comparer la dégradation d'E2 entre les souches.

Les figures 28 à 36 présentent la dégradation d'E2 pour les neuf souches mesurées dans les différents milieux de culture, soit PBS, PBS + C, ESM et ESM + C. La figure 28

présente trois courbes de dégradation de l'E2 pour la souche CL-9.02 en milieu PBS, PBS + C et ESM + C. Il y a diminution de l'E2 dans les trois milieux et les profils de dégradation sont semblables où l'E2 diminue de façon constante durant les 20 premières heures. La diminution semble un peu plus lente dans Le milieu ESM + C. La concentration finale atteinte durant les 4 dernières heures est autour de 20 µg/L dans les trois milieux.

La figure 29 présente la figure CL-9.04 qui a été testée dans les quatre milieux. Les profils de dégradation sont très semblables entre les 4 milieux où il y a une dégradation rapide de l'E2 durant les cinq premières heures et une dégradation plus lente pour le temps restant. La souche CL-10.3a a été testée en milieu PBS en plus du milieu ESM + C et ces profils sont présentés à la figure 30. Dans le milieu PBS, la concentration d'E2 est demeurée stable à une valeur de 0,95 ±0,05 mg/L (moyenne de tous les échantillons).

La souche CL-10.4 a été testée dans les quatre milieux et les courbes de dégradation sont présentées à la figure 31. Les profils de dégradation sont semblables et la concentration de l'E2 ne diminue pas en-dessous de 0,80 mg/L, excepté au dernier échantillon pris en milieu ESM et PBS. La figure 32 présente la dégradation d'E2 par la souche CL-10.14 dans les milieux PBS, ESM et ESM + C. Les trois profils de dégradation sont semblables où il y a une diminution constante d'E2 durant les 24 heures du test.

La souche MI-6.1B a été testée dans un autre milieu de culture, soit le milieu PBS, et le profil de dégradation est présenté à la figure 33. La concentration de l'E2 demeure stable à une valeur de 1,0 ± 0,1 mg/L. La souche MI-9.3 a été en milieu PBS et ESM en plus d'ESM + C et les profils sont présentés à la figure 34. Les profils sont différents où une dégradation constante de l'E2 a été observée en PBS et une phase de latence (1,04 ±0,4 mg/L) durant les sept premières heures a été notée en milieu ESM. La concentration minimale d'E2 atteinte en PBS est de 20 µg/L et de 610 µg/L en ESM.

La figure 35 montre les profils de dégradation de l'E2 en milieux PBS, PBS + C et ESM + C pour la souche MI-14.1. Les trois profils sont distincts où en PBS la

dégradation d'E2 est constante, contrairement à une dégradation rapide durant les trois premières heures en PBS + C suivi d'une dégradation plus lente. Les concentrations finales atteintes en PBS et PBS + C sont, respectivement de 230 et 160 µg/L d'E2. Finalement, la figure 36 présente les profils de dégradation dans les quatre milieux pour la souche MI-21.2. Les profils sont pratiquement les même en milieu PBS et ESM + C, où il y a une dégradation constante d'E2 durant les 24 heures. En milieu ESM, la dégradation est rapide durant les 12 premières heures et il y a une stabilisation à  $1.8 \pm 0.1$  µg/L après 20 heures. Une dégradation rapide a été observée en milieu PBS + C durant les trois premières heures et la concentration s'est stabilisée à  $5,1 \pm 0,8$  µg/L par la suite.

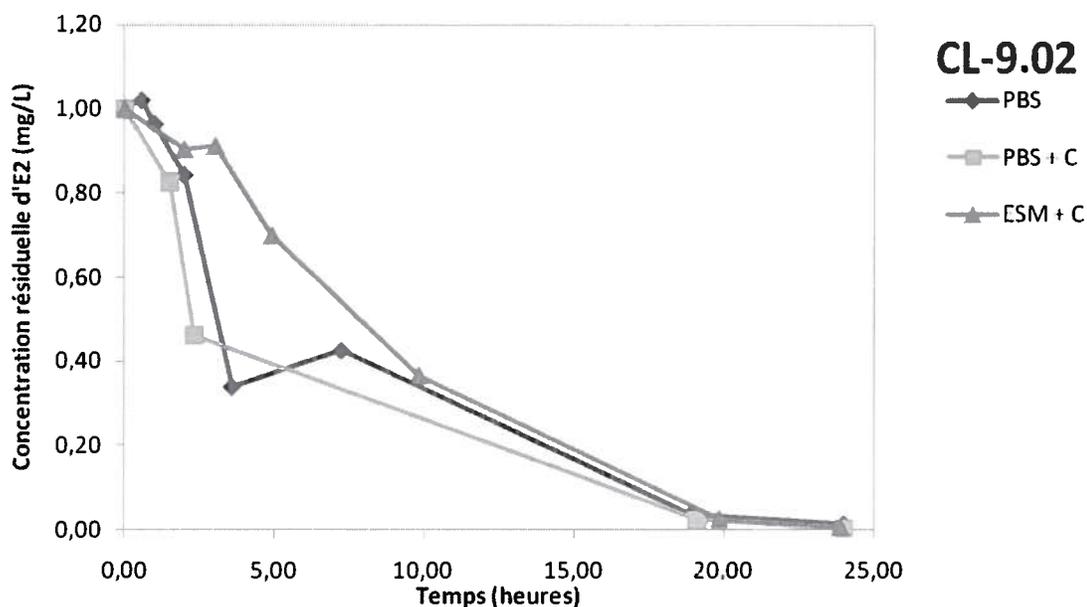


Figure 28. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, PBS + C et ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-9.02.

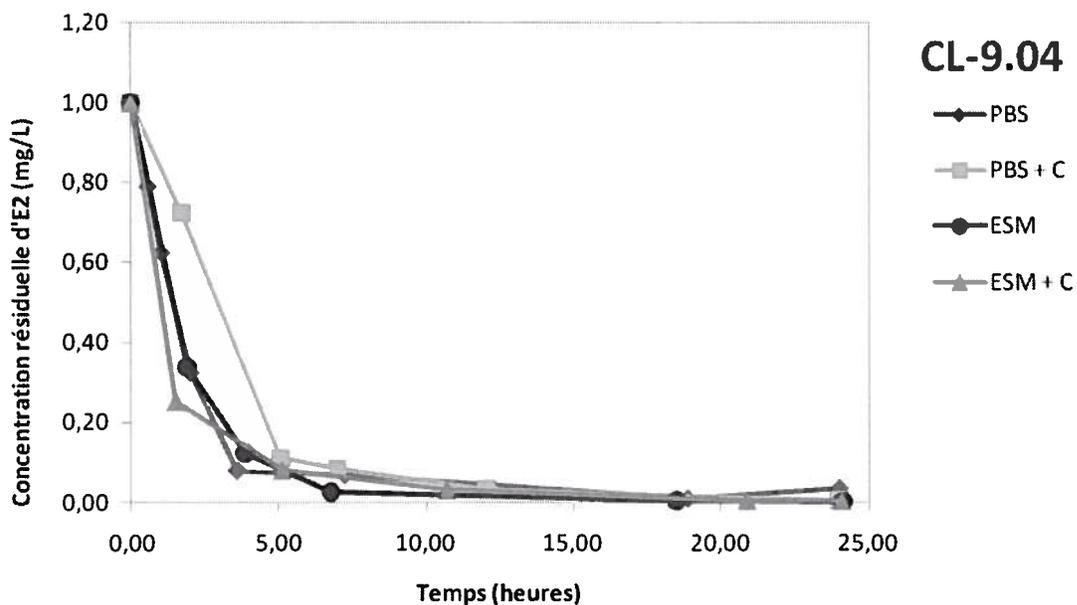


Figure 29. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, PBS + C, ESM et ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-9.04.

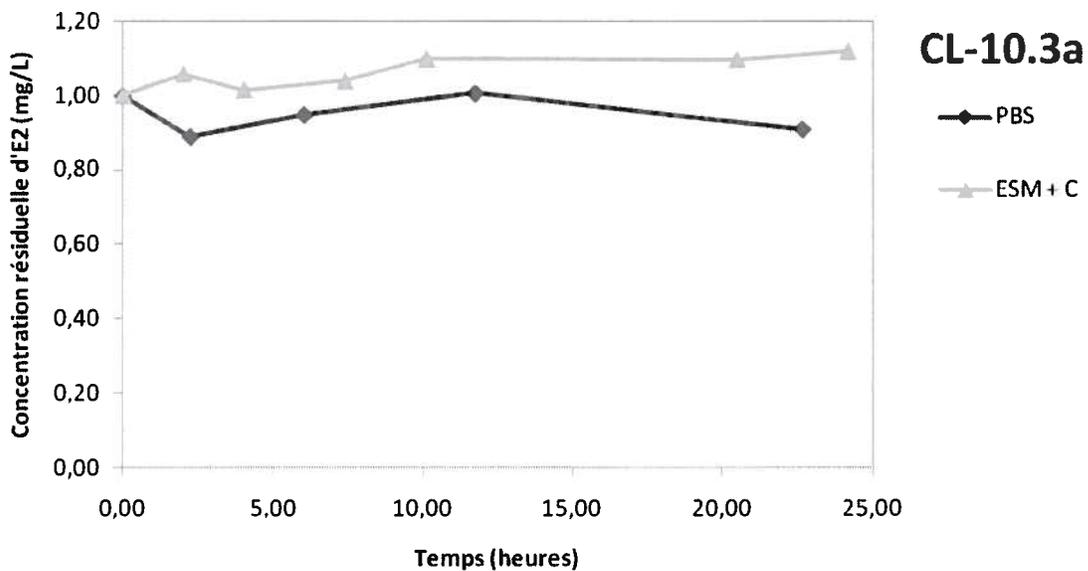


Figure 30. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS et ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.3a.

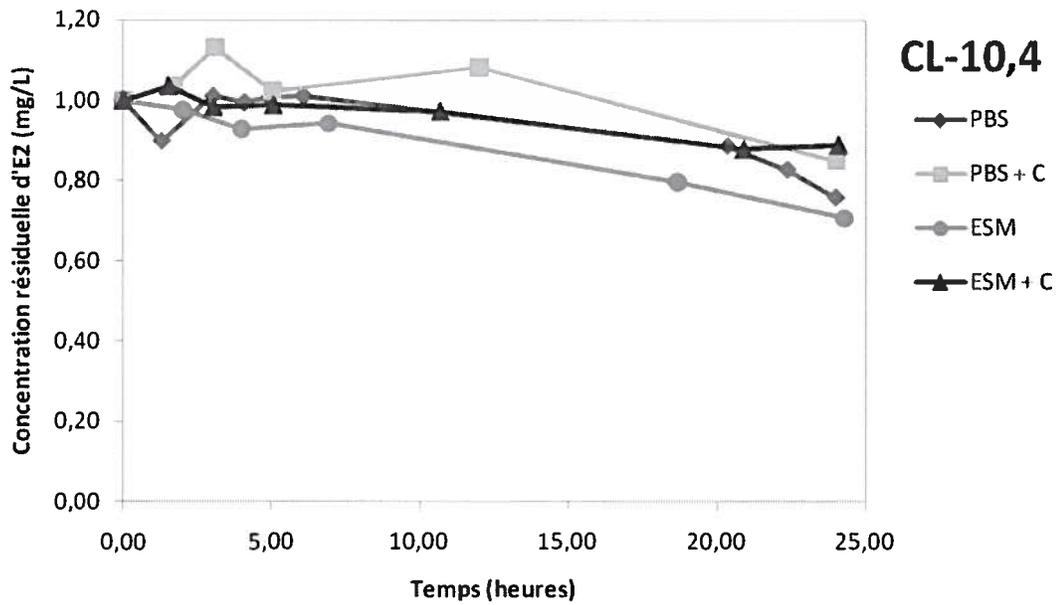


Figure 31. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, PBS + C, ESM et ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.4.

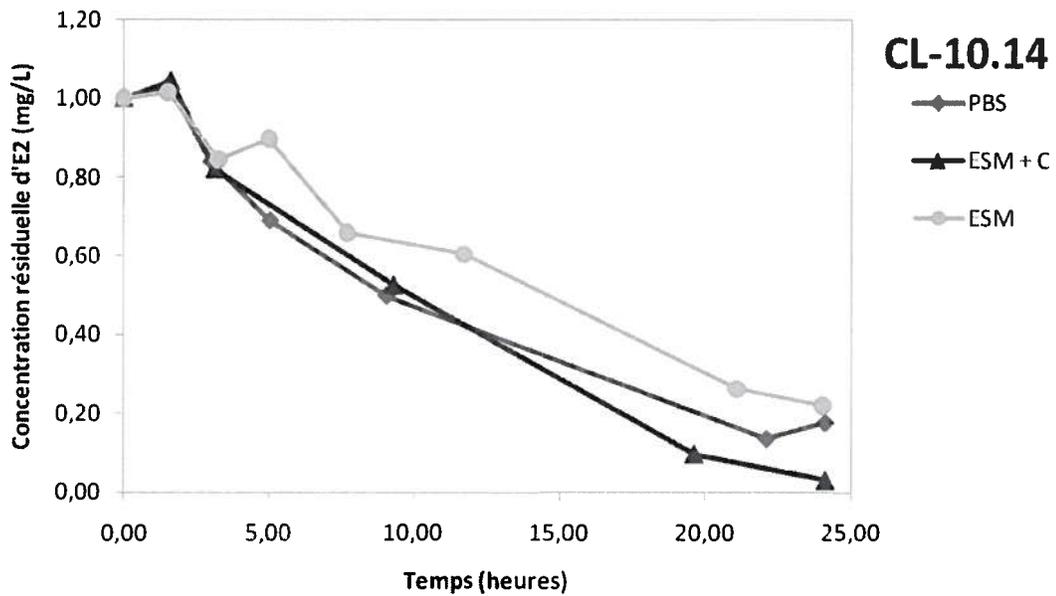


Figure 32. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, ESM et ESM + C en fonction du temps pour la souche CL-10.14.

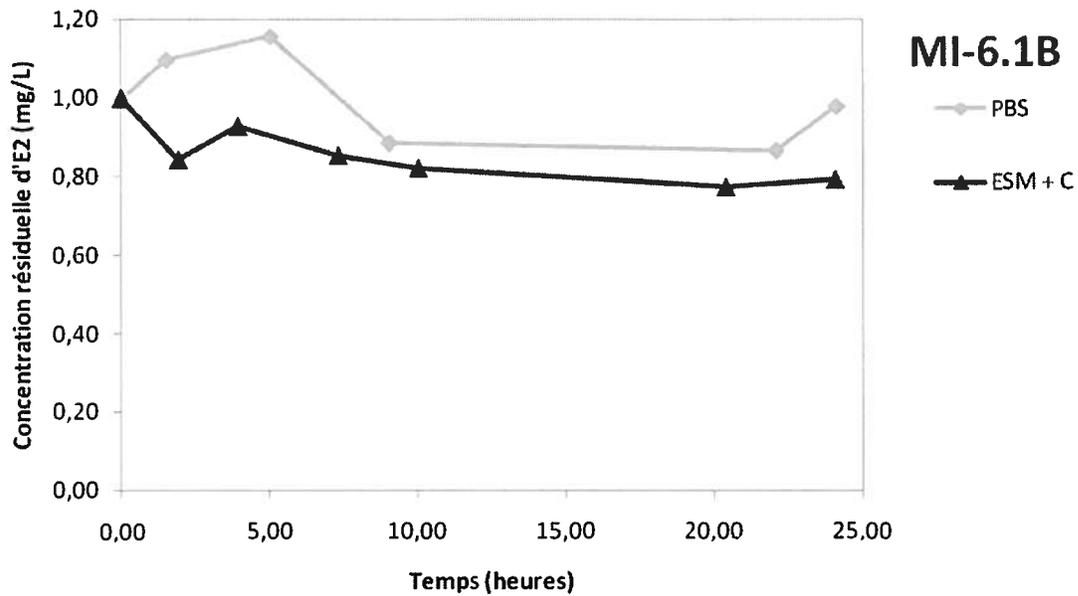


Figure 33. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS et ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-6.1B.

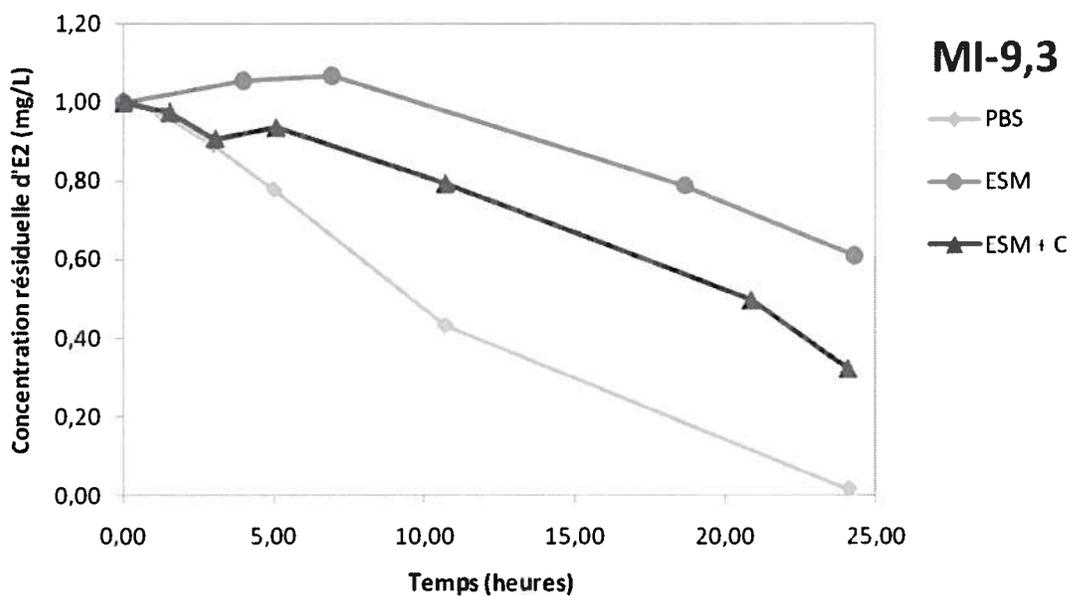


Figure 34. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, ESM et ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-9.3.

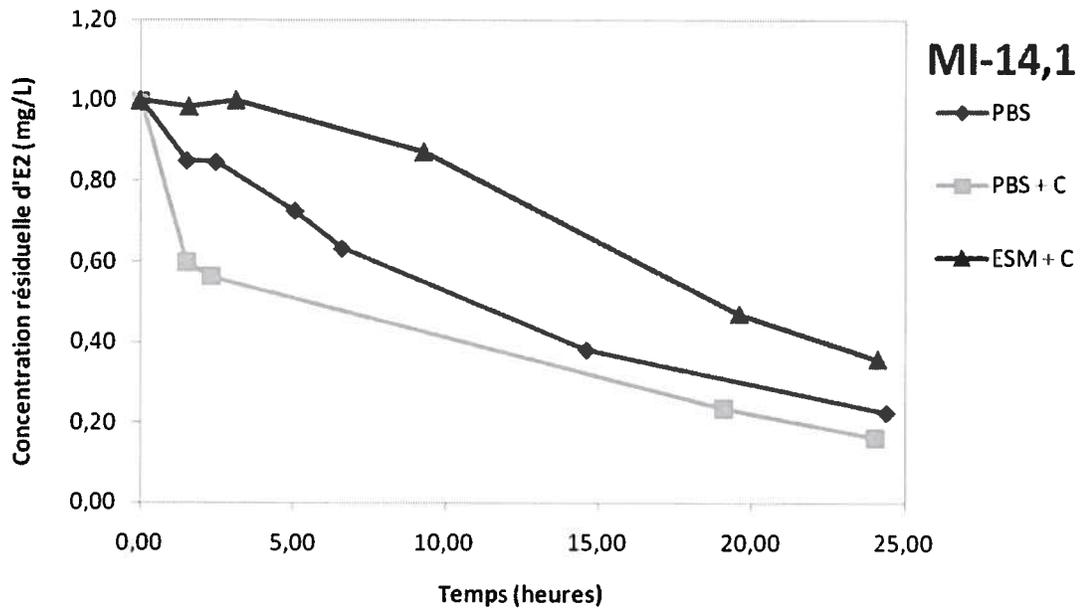


Figure 35. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, PBS + C et ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-14.1.

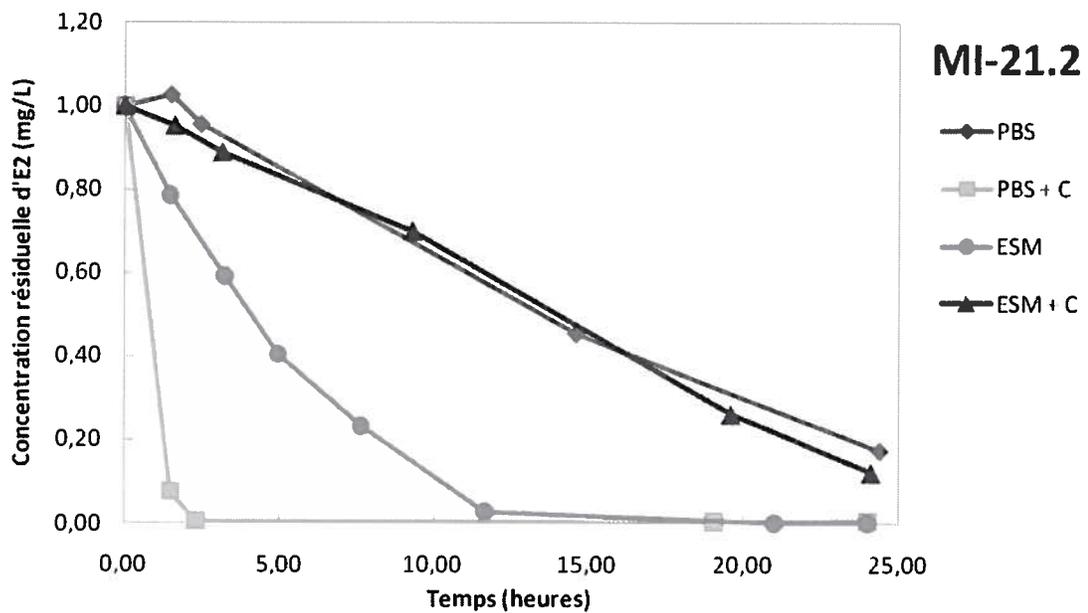


Figure 36. Concentration résiduelle d'E2 dans les milieux de culture PBS, PBS + C, ESM et ESM + C en fonction du temps pour la souche MI-21.2.

### 3.3.4 Cinétique de dégradation

Le tableau 10 présente les constantes d'ordre zéro et un pour chaque souche, calculées à partir des courbes de dégradation présentées aux figures 28 à 36. Les courbes de cinétique ont été bâties en suivant la relation suivante pour les cinétiques d'ordre 0 :

$$C_t - C_i = -k_0 * t$$

et pour les cinétiques d'ordre 1 :

$$- \ln \left( \frac{C_t}{C_i} \right) = k_1 * t$$

où  $C_t$  correspond à la concentration d'E2 au temps  $t$ ,  $C_i$  à la concentration initiale d'E2,  $k_0$  et  $k_1$  aux pentes des relations et  $t$  au temps. Avec les constantes  $k_0$  et  $k_1$ , qui sont les constantes d'ordre zéro et un respectivement, des vitesses spécifiques de dégradation peuvent être calculées afin de comparer la dégradation de l'E2 dans différentes conditions ou entre différentes souches. Pour ce faire, les constantes  $k$  ont été divisées par la concentration en biomasse ( $X$ ) et multipliées par la concentration d'E2. Alors les équations de cinétique présentées à la section 1.7 pourraient être réécrites de la façon suivante pour une cinétique d'ordre zéro :

$$- \frac{dC}{dt} = k'_0 * X$$

et pour une cinétique d'ordre 1 :

$$- \frac{dC}{dt} = k'_1 * X * C$$

Ces vitesses sont comparables entre les réactions de même ordre et dans le cas présent, les tests de cinétique ont présenté des réactions d'ordre 0 et 1. Il faut établir une base de comparaison pour ces différentes réactions et le calcul du temps nécessaire pour diminuer la concentration initiale à une valeur définie a été sélectionné. Donc, pour chaque souche dans chaque milieu testé, le temps nécessaire pour diminuer la concentration initiale de 1 mg/L à 0,1 mg/L a été calculé à l'aide de l'équation de

cinétique obtenue. Le temps calculé a été corrigé avec la concentration en bactérie mesurée pour chaque souche. Puisque la concentration de bactéries variait lorsqu'il y avait une source de carbone supplémentaire dans le milieu, la moyenne pondérée des valeurs a été effectuée. Les constantes d'ordre 0 et 1, les coefficients de régression des relations de cinétique, les valeurs de biomasse et les temps calculés sont présentés au tableau 10. Le temps pour diminuer la concentration d'E2 de 90 % est la variable utilisée pour comparer les différents milieux et les souches entre elles.

Au total, 22 cinétiques de dégradation ont été mesurées et les constantes de cinétique de dégradation des souches CL-10.3a, CL-10.4 et MI-6.1B n'ont pas été calculées puisque la diminution de l'E2 en présence de ces souches était faible ou nulle, peu importe le milieu de culture (voir figures 30, 31 et 33). Les cinétiques de dégradation de l'E2 calculées pour les sept autres souches étaient d'ordre 0 et 1. Ces deux cinétiques ont été calculées pour chacune des souches dans chaque milieu et la relation obtenant le coefficient de régression ( $R^2$ ) le plus élevé était sélectionnée. Pour certaines souches, l'ordre de la réaction cinétique changeait avec le milieu de culture. C'est le cas de la souche MI-14.1 qui a une cinétique de dégradation d'E2 d'ordre 1 en milieu PBS et PBS + C mais d'ordre 0 en milieu ESM + C. La souche MI-21.2 présente aussi cette variation, où la cinétique est d'ordre 0 pour les milieux PBS et ESM + C et d'ordre 1 pour les milieux PBS + C et ESM. L'ordre de la cinétique demeurait le même dans les différents milieux pour les autres souches exceptée la souche CL-10.9 qui a été testée dans un milieu seulement.

**Influence du milieu de culture** Le temps pour diminuer la concentration de l'E2 de 90 % était le plus rapide en milieu PBS + C comparativement aux milieux PBS et ESM + C pour la souche CL-9.02. La souche CL-9.04 a obtenu le temps le plus rapide en milieu ESM par rapport aux milieux PBS, PBS + C et ESM + C. La souche CL-10.9 a été testée dans un seul milieu, ESM + C, et les valeurs de concentrations de biomasse ne sont pas disponibles. Pour la souche CL-10.14, la diminution de la concentration de l'E2 de 90 % a été la plus efficace dans les milieux ESM et ESM + C en comparaison avec le milieu PBS. La diminution de l'E2 en présence de la souche MI-9.3 a été deux fois plus efficace en milieu PBS qu'en milieu ESM + C et environ trois fois plus efficace qu'en milieu et

ESM. La dégradation de l'E2 avec la souche MI-14.1 a été plus rapide en milieu ESM + C qu'en milieux PBS et PBS + C. Finalement, la souche MI-21.2 a obtenu quatre temps différents pour les quatre milieux. Le temps calculé le plus rapide a été, de loin, en milieu PBS + C, ensuite en milieu ESM, ESM + C et PBS.

**Comparaison des souches** L'efficacité la plus élevée a été mesurée pour la souche MI-21.2 dans le milieu PBS + C, avec un temps de moins d'une heure pour diminuer la concentration initiale de 90 % pour 1 g/L de bactéries. Par contre, la concentration atteignait un plateau à  $5,1 \pm 0,8 \mu\text{g/L}$  d'E2 et la concentration est demeurée stable durant 22,50 heures restantes. Il aurait aussi un plateau de dégradation pour les souches CL-9.02 et CL-9.04 à une concentration de  $7 \pm 5 \mu\text{g/L}$  et  $5 \pm 2 \mu\text{g/L}$ , respectivement. La souche CL-10.9 semble également atteindre un plateau à une concentration de  $7 \pm 1 \mu\text{g/L}$ . Aucun plateau n'a été atteint pour les autres souches. La souche CL-9.04, suivie de CL-9.02 étaient les plus efficaces, après MI-21.2, peu importe le milieu utilisé avec des temps de 2,64 à 3,66 heures et 6,41 à 6,50 heures, respectivement. Un temps d'environ 7,50 heures, mesuré pour les souches MI-9.3 dans le milieu PBS et MI-21.2 en milieu ESM, était le plus rapide par la suite. La souche suivante la plus rapide était CL-10.14 en milieu ESM et ESM + C avec un temps d'environ 11,50 heures. Les souches MI-21.2 et MI-9.3 dans le milieu ESM + C étaient les suivantes avec un temps de 14,00 et 15,00 heures, respectivement. Par la suite, les souches CL-10.14 en milieu PBS, MI-14.1 en milieu ESM + C et MI-21.2 en milieu PBS, étaient les plus rapides avec un temps de 18,78, 19,34 et 21,08 heures, respectivement. Pour terminer, les temps les plus lents ont été mesurés pour la souche MI-9.3 dans le milieu ESM avec 25,51 heures et la souche MI-14.1 en milieux PBS + C et PBS avec 31,19 et 35,62 heures.

Tableau 10. Constantes de cinétique d'ordre 0 et 1 pour les sept souches sélectionnées. Les coefficients de régression ( $R^2$ ), la concentration de la biomasse ([B]) et le temps pour atteindre une concentration de 0.1 mg/L (Temps 90 %) sont également présentés.

Souches	Milieux	Ordre de la cinétique	Constante $k^a$	$R^2$	[B] (g/L)	Temps 90 % ( $h * L * g_B^{-1}$ ) <sup>b</sup>
CL-9.02	PBS	1	0.1815	0.9778	2,0183	6.50
	PBS + C	1	0.1774	0.8956	2,0183	5.71
	ESM + C	1	0.2156	0.9645	2,0183	6.41
CL-9.04	PBS	1	0.2363	0.8707	2.2957	3.24
	PBS + C	1	0.2141	0.9238	2.2957	3.66
	ESM	1	0.2326	0.9057	2.2809	2.64
	ESM + C	1	0.2010	0.9321	2.2809	3.10
CL-10.9	ESM + C	1	0.2062	0.9376	N/D	N/D
CL-10.14	PBS	0	0.0359	0.9362	1.2707	18.78
	ESM	0	0.0342	0.9720	1.7557	11.86
	ESM + C	0	0.0434	0.9716	2.3919	11.07
MI-9.3	PBS	0	0.0423	0.9792	2.7543	7.66
	ESM	0	0.0179	0.8556	2.1862	25.51
	ESM + C	0	0.0269	0.9724	2.2955	15.02
MI-14.1	PBS	1	0.0605	0.9963	1.053	35.62
	PBS + C	1	0.0615	0.9674	1.053	31.19
	ESM + C	0	0.0284	0.9704	1.7380	19.34
MI-21.2	PBS	0	0.0363	0.9889	1.2213	21.08
	PBS + C	1	2.2027	0.9710	1.2213	0.93
	ESM	1	0.2930	0.9781	1.2127	7.28
	ESM + C	0	0.0371	0.9973	1.7510	14.04

<sup>a</sup> Unité :  $k_0 = mg \cdot E2 \cdot h^{-1}$ ;  $k_1 = h^{-1}$  <sup>b</sup>  $g_B$  : gramme de bactéries

### 3.3.5 Cultures mixtes

Après avoir testées les souches séparément, elles ont été combinées afin de vérifier si leur comportement de dégradation changeait. Le groupement des souches s'est fait selon la concentration de l'E2 à laquelle elles ont été isolées. Aussi, les deux souches, CL-10.3a et CL-10.4, ont été écartées du test puisqu'elles n'avaient pas dégradé l'E2 en milieu minéral contenant 10 % (v/v) de milieu riche. Les souches MI-6.1B, MI-9.3, MI-14.1 et MI-21.2 ont été combinées ensemble et les souches CL-10.14, CL-9.02, CL-10.9 et CL-9.04 formaient l'autre groupe. La souche MI-6.1B a été incluse afin d'obtenir un nombre de souche égal dans chacun des groupes. Le test a été effectué dans un milieu minéral contenant 10 % (v/v) de milieu riche (TSB) sur une période de 24 heures. La concentration d'E2 résiduelle dans le milieu de culture a été suivie ainsi que la concentration des bactéries.

Les figures 37 et 38 présentent les courbes de dégradation et la variation de la biomasse pour les souches « CL » et « MI », respectivement. Les courbes de dégradation sont relativement semblables avec une diminution rapide de l'E2 durant les 5 premières heures pour « CL » et pour les 10 premières heures pour « MI ». La biomasse a augmenté durant les 6 premières heures pour les souches « CL » et a atteint une concentration de  $2,8 \pm 0,2$  g/L. Pour les souches « MI », il y a eu croissance des bactéries durant les 2 premières heures et la biomasse s'est stabilisée à  $2,21 \pm 0,03$  g/L.

Les cinétiques de dégradation ont été évaluées pour les deux groupes et elles suivaient une dégradation d'ordre 1. Les constantes de premier ordre sont présentées au tableau 11 avec les coefficients de régression des relations, les concentrations de la biomasse et les temps pour diminuer la concentration initiale d'E2 de 90 %. Les souches « CL » ont diminué la concentration de l'E2 à 0.1 mg/L plus rapidement que les souches « MI » avec un temps 1.53 heure comparativement à 2.44 heures. La combinaison des souches a augmenté l'efficacité de dégradation de celles-ci. Généralement, les temps calculés des souches combinées sont plus rapides que toutes les souches testées seules dans les différents milieux, à une exception, la souche MI-21.2 en milieu PBS + C. Les

concentrations d'E2 minimales atteintes après 24 heures d'incubation sont de 3 et 22 µg/L pour les souches « CL » et « MI », respectivement.

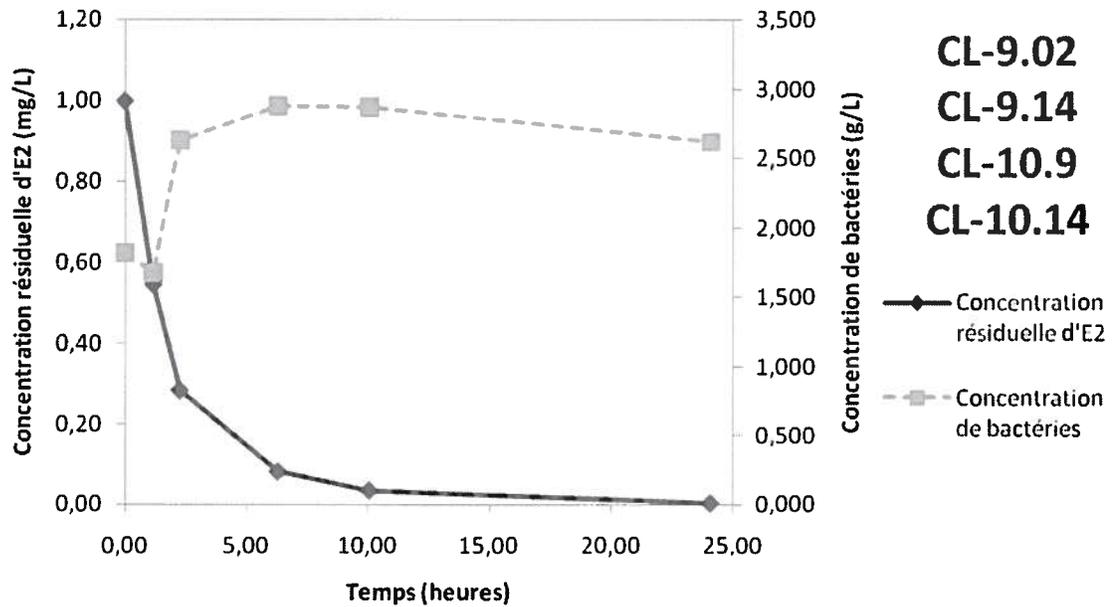


Figure 37. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour les souches « CL » groupées (CL-9.02, CL-9.04, CL-10.9 et CL-10.14) avec la variation de la concentration de bactéries (poids sec) dans le temps.

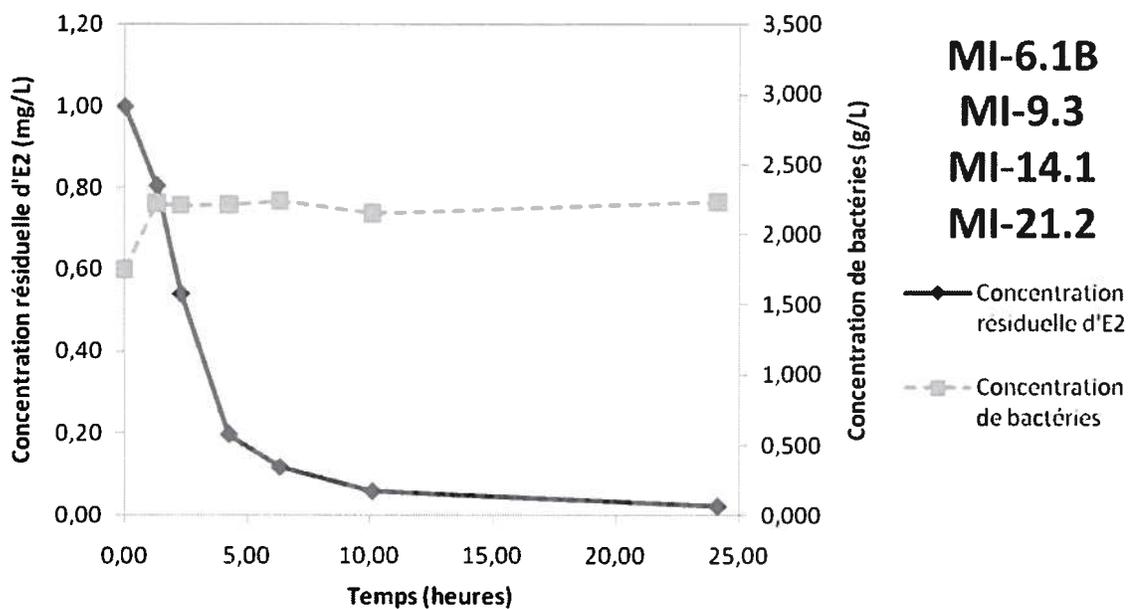


Figure 38. Concentration résiduelle d'E2 dans le milieu de culture ESM + C en fonction du temps pour les souches « MI » groupées (MI-6.1B, MI-9.3, MI-14.1 et MI-21.2) avec la variation de la concentration de bactéries (poids sec) dans le temps.

Tableau 11. Constantes de cinétique d'ordre 1 pour les souches « CL » groupées et les souches « MI » groupées. Les coefficients de régression (R<sup>2</sup>), la concentration de la biomasse ([Biomasse]) et le temps pour atteindre une concentration de 0.1 mg/L (Temps 90 %) sont également présentés.

Souches	Milieu	Ordre de la cinétique	Constante k (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	[B] (g/L)	Temps 90 % (h*L*g <sub>B</sub> <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
Souches CL	ESM + C	1	0.3261	0.9720	2.7078	1.53
Souches MI	ESM + C	1	0.3007	0.9612	2.1885	2.44

<sup>a</sup> g<sub>B</sub> : gramme de bactéries

## **Chapitre 4 : Discussion**

## 4.1 Diversité bactérienne

Deux enrichissements de boues activées, un provenant d'un traitement biologique pour le lisier de porc et l'autre d'une usine de traitements d'eaux usées municipales, ont été effectués dans un milieu minéral contenant une concentration de 100 mg/L d'E2 comme seule source de carbone. De ces enrichissements, 39 souches ont été isolées et identifiées par le séquençage du gène 16S. Les isolats ont été associés à 14 genres différents répartis dans sept grands groupes. Des isolats ont été sélectionnés afin de tester leur capacité à dégrader l'E2 à une concentration de 1 mg/L en milieu minéral et en milieu riche. Une diversité de genre a été favorisée pour la sélection et un total de 16 isolats associés à 12 genres différents ont été testés. Une dégradation de l'E2 a été observée pour ces 12 isolats dans au moins un des deux milieux (minéral ou riche). Cette diversité de genres bactériens dégradant l'E2 est comparable à celle observée dans l'étude de Yu *et al.* (2007). Ils ont isolé 14 souches phylogénétiquement différentes, dégradant l'E2 et elles étaient associées à huit genres différents. Une bonne diversité bactérienne a été trouvée dans l'étude présentée ici puisque les bactéries étaient réparties dans 4 classes (Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria) et 2 phylums (Firmicutes, Bacteroidetes).

### 4.1.1 Description des genres

Deux isolats (CL-9.11b et CL-10.9) ont été associés au genre *Microbacterium*, deux autres (CL-9.08 et CL-10.19) au genre *Aminobacter* et un autre (CL-11.4a) au genre *Methylobacterium*. Ces trois genres avaient été associés à des bactéries dégradant l'E2 à des concentrations de 3 mg/L (Yu *et al.*, 2007). Un autre des isolats (CL-10.6a), associé au genre *Achromobacter*, a aussi été identifié comme capable de dégrader l'E2 dans une autre étude à des concentrations allant de 0.1 à 5.5 mg/L (Weber *et al.*, 2005). Trois isolats (CL-10.3a, CL-10.7b et CL-10.8b) ont été associés au genre *Alcaligenes*. La présence de ce genre a été notée dans un enrichissement de boues activées provenant d'une usine de traitements des eaux dégradant l'E2 à une concentration de 3.5 mg/L (Muller *et al.*, 2010). Ce genre est également bien connu pour dégrader les composés

aromatiques, en particulier le phénol (Essam *et al.*, 2010). Un isolat (CL-10.4) a été associé au genre *Pseudomonas*, auquel des isolats de d'autres études avaient déjà été associés pour dégrader l'E2 à des concentrations de 5 mg/L (Pauwels *et al.*, 2008) et de 20 mg/L (Zeng *et al.*, 2009).

Six isolats (CL-9.04, CL-9.07, CL-2.1, CL-9.06, CL-9.02 et CL-10.14) ont été associés, respectivement, aux genres, *Bacillus*, *Delftia*, *Gelidibacter*, *Hydrogenophaga* et *Stenotrophomonas*, pour les deux derniers. Ces cinq genres n'ont pas été mentionnés dans la littérature comme ayant la capacité de dégrader les estrogènes. Par contre, des bactéries du genre *Bacillus* sont capables de dégrader les hydrocarbure pétrolier (Das et Mukherjee, 2007) ainsi que le bisphénol A (Matsumura *et al.*, 2009) et des bactéries du genre *Stenotrophomonas* peuvent dégrader le phénanthrène (Kim *et al.*, 2009). Les genres *Delftia*, *Gelidibacter* et *Hydrogenophaga* n'ont pas été reconnus pour la dégradation de composés aromatiques.

Trois isolats supplémentaires (CL-9.09b, CL-9.15a et CL-10.7a) ont été isolés de l'enrichissement mais n'ont pas été testés pour leur capacité de dégrader l'E2. Ils ont été associés aux genres *Flavobacterium*, *Sphingomonas* et *Sphingopyxis*. Les deux premiers genres ont déjà été associés à des bactéries dégradant les estrogènes (2007; Yu *et al.*, 2007). Le genre *Sphingopyxis* n'a pas été reconnu dans la littérature pour dégrader les composés aromatiques. Il est à noter que l'isolat CL-9.11b, associé à *Microbacterium* durant l'analyse phylogénétique, a été associé au genre *Pimelobacter* lors de l'analyse BLASTN. Il s'agit d'un autre genre de la classe des Actinobacteria et il a déjà été associé à une souche capable de dégrader le méthyltestostérone (Homklin *et al.*, 2009).

#### **4.1.2 Influence de l'enrichissement**

L'enrichissement sert à créer une pression de sélection sur le consortium afin de favoriser certaines souches. L'enrichissement réalisé à une forte concentration d'estrogènes (100 mg/L) a permis d'isoler des souches différentes de l'autre enrichissement effectué dans notre laboratoire à une faible concentration d'estrogènes (1 mg/L). Les enrichissements effectués lors d'études précédentes dans la littérature ont utilisé des conditions différentes et une grande variété de genres a été identifiée pour leur

dégradation des estrogènes (voir le tableau 4). En comparant les genres identifiés, il est possible de remarquer que la redondance est peu fréquente. Les genres *Pseudomonas* et *Sphingomonas* ont été identifiés lors de 4 et 3 études, respectivement et 9 autres genres ont été identifiés lors de 2 études seulement. Un total de 17 genres a été identifié une seule fois pour leur capacité à dégrader les estrogènes (incluant la présente étude). Les facteurs variant entre les enrichissements étaient la concentration initiale (entre 0.4 et 1000 mg/L d'E2), la présence d'autres estrogènes (E1, E2, E3, EQO, EE2) et la provenance de la biomasse (principalement des boues activées d'usines de traitements d'eaux usées municipales). Cette diversité de genres associée aux conditions de culture permet de voir l'importance de l'enrichissement dans la recherche de souches dégradant les estrogènes et cultivables en laboratoire.

En plus des conditions de l'enrichissement qui jouent un rôle important dans l'isolement de souches, la méthode d'isolement vient également influencer les isolats identifiés. Muller et coll. (2010), ont obtenus cinq isolats d'un enrichissement capable de dégrader complètement l'E2 et l'E1 et ils ont été testés séparément dans les mêmes conditions. La seule activité qui a été observée est la conversion de l'E2 en l'E1 par *Bacillus diminuta*. De plus, ils ont utilisé deux méthodes pour caractériser la structure de la communauté bactérienne, une méthode par culture et une approche de biologie moléculaire. Ils ont conclu que chacune des méthodes pourrait être la seule façon d'identifier certaines espèces et que ces méthodes donnent des informations différentes et complémentaires. La méthode par culture permet l'isolement de souches adaptées à la croissance en laboratoire tandis que la méthode de biologie moléculaire permet d'identifier des souches présentes à de faibles quantités ou non-cultivables.

## **4.2 Dégradation de l'E2**

Suite à l'isolement et au séquençage des 39 isolats, 16 ont été sélectionnés pour déterminer leur capacité à dégrader l'E2. Ils ont tous diminué la concentration initiale d'E2 dans au moins un des deux milieux testés (minéral ou riche). Ensuite, les cinétiques d'utilisation de l'E2 de six de ces souches et de quatre autres souches isolées dans notre laboratoire et provenant d'un enrichissement de boues activées contenant 1 mg/L d'E2

ont été déterminées. Les cinétiques ont été testées dans différents milieux et comparées entre elles. L'hypothèse principale que nous avons émise était que les souches isolées à une faible concentration d'estrogènes (1 mg/L) seraient celles impliquées dans la dégradation de l'E2 à cette concentration comparativement aux souches isolées à une forte concentration d'estrogènes (100 mg/L).

#### 4.2.1 Comparaison de l'efficacité

Les résultats obtenus ont montré que deux souches isolées à une forte concentration d'E2 ont été plus efficaces que les quatre souches isolées à une faible concentration d'E2 pour dégrader ce composé et ce, même à une faible concentration de 1 mg/L. En effet, les souches CL-9.02 et CL-9.04 ont été, en général, les plus rapides pour diminuer la concentration de l'E2 de 90 % dans tous les milieux testés. La souche MI-21.2 a été plus rapide dans un seul des quatre milieux testés. Par contre, la vitesse de disparition de l'E2 est 3 fois supérieure en présence de la souche MI-21.2 comparativement à la plus rapide des souches « CL ».

À notre connaissance, aucune autre étude n'a tenté de comparer l'efficacité de dégradation des estrogènes de souches isolées à différentes concentrations de ces composés. Il est également difficile de comparer entre elles les différentes valeurs de la littérature. Pour les souches isolées et testées individuellement pour la dégradation des estrogènes, seulement les courbes de dégradation étaient présentées (Fujii *et al.*, 2002; Ke *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2004; Yoshimoto *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2007). Une seule étude a présenté les valeurs de cinétique de dégradation de l'E2 pour une souche seule et ces valeurs étaient en lien avec le ratio E2-EE2 présent dans le milieu de culture (Pauwels *et al.*, 2008). Comme l'EE2 n'était pas présent dans cette étude-ci et que selon les résultats de leur étude, la présence d'EE2 influence la dégradation de l'E2, les valeurs de cinétique ne peuvent être utilisées à titre de comparaison.

De plus, d'autres facteurs variant entre les études empêchent de les comparer avec nos valeurs puisqu'ils peuvent influencer les courbes de dégradation, notamment les concentrations initiales d'estrogènes, les concentrations en biomasse et les conditions de culture (température, volume, agitation). Aussi, Cao et coll. (2008) ont montré que des

constantes de dégradation plus élevées étaient en lien avec l'augmentation de la concentration en biomasse et certaines études ne précisait pas la concentration de bactéries utilisées (Ke *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2010). Une autre étude a mesuré l'effet de la concentration du substrat (E1, E2 et E3) sur la vitesse de dégradation et celle-ci augmentait avec la concentration initiale (50 à 2000  $\mu\text{g/L}$ ) pour les souches qu'ils avaient isolé (Ke *et al.*, 2007).

Dans un autre ordre d'idée, il est possible d'estimer l'ordre de la réaction en analysant les courbes de dégradation de l'E2 par des souches seules telles que présentées dans la littérature. Certaines suivaient une cinétique de premier ordre, où la vitesse de dégradation varie selon la concentration du substrat. Ce facteur conjointement avec la concentration initiale, est important pour une estimation de l'efficacité de dégradation puisque dans certains cas, l'estimation ne peut être utilisée. Par exemple, dans l'étude de Yoshimoto et coll. (2004), une concentration initiale de 100 mg/L d'E2 est utilisée et la dégradation semble suivre une cinétique de premier ordre (figure 39). Ils ont mesuré une dégradation de l'E2 de 99 % après 10 heures mais comme la vitesse de dégradation change avec la concentration, l'estimation de l'efficacité ne peut être faite pour une concentration en-dessous de 1 mg/L, qui est la concentration d'E2 utilisée dans l'étude ci-présente. Pour toutes ces raisons mentionnées, les comparaisons des cinétiques de dégradation présentées dans la littérature ne peuvent être faites entre elles et avec notre étude.

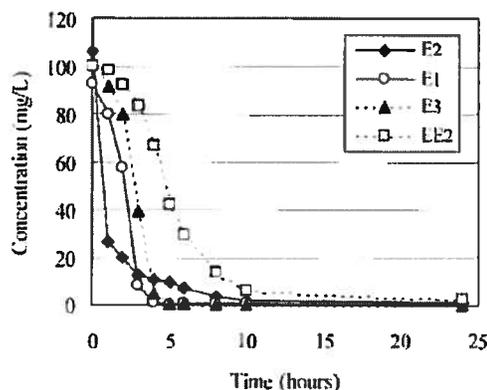


Figure 39. Courbes de dégradation d'E2, d'E2, d'E3 et d'EE2 par l'isolat Y 50158 (Yoshimoto et al., 2004)

Les résultats des tests de cinétique des souches testées seules montrent que la pression de sélection appliquée par l'enrichissement dans cette étude n'est pas venue influencer la capacité des souches à dégrader l'E2 à une concentration 100 fois plus faible. L'hypothèse de départ n'est donc pas vérifiée. Il est à noter que pour quatre des sept souches testées pour leur efficacité de dégradation, un plateau a été atteint à 5 µg/L d'E2. La dégradation en-dessous de ces valeurs est à vérifier afin de savoir si les souches sont capables d'utiliser l'E2, si oui, à quelle vitesse et si les souches isolées à une faible concentration sont plus efficaces.

À ce point-ci, il est important de nuancer la conclusion comme quoi l'hypothèse de départ est infirmée. Tout d'abord, la concentration de l'enrichissement à 1 mg/L d'E2 demeure beaucoup plus élevée que la concentration réelle dans les procédés de traitement, autant des eaux usées que du lisier de porc, qui sont de l'ordre du ng/L et de 0,15 mg/L, respectivement (voir section 1.2 et 1.6). Un autre enrichissement devrait être effectué à une concentration encore plus faible, soit 0,1 mg/L d'E2, afin d'isoler des souches pour évaluer leur comportement de dégradation. De plus, l'enrichissement à 100 mg/L d'E2 n'exposait pas les bactéries à cette concentration puisque la solubilité maximale de l'E2 varie entre 3,3 et 13,3 mg/L selon la température. Cette condition servait plutôt à maintenir la concentration à son maximum durant tout le temps de l'enrichissement. Ceci pourrait expliquer pourquoi une séparation évidente n'a pas été observé entre les vitesses de dégradation des souches isolées à 1 et 100 mg/L d'E2. Finalement, comme il a été mentionné précédemment, il reste la possibilité que la dégradation de l'E2 soit effectuée par cométabolisme (Isabelle *et al.*, 2007). D'autres enrichissements sur milieux complexes sans estrogènes pourraient être effectués afin d'isoler un grand nombre de souches et d'évaluer leur comportement de dégradation.

#### **4.2.2 Consortium versus souches seules**

Afin de vérifier si la combinaison des souches changeait l'efficacité de dégradation, deux cultures mixtes, soit les quatre souches « MI » et quatre souches « CL » ont été testées pour la dégradation de l'E2. Dans les deux cas, le temps de dégradation était plus faible pour les cultures mixtes que pour les souches testées isolément, donc l'efficacité était augmentée. Par contre, malgré une diminution du temps des souches

« MI » pour dégrader 90 % de la concentration initiale en milieu minéral supplémenté, les souches « CL » dégradaient plus rapidement l'E2. Ces résultats contredisent, pour une deuxième fois, l'hypothèse de départ. L'amélioration de la dégradation par la combinaison des souches, comparativement aux souches individuelles, pourrait être due à une augmentation de l'adsorption du composé sur la biomasse. En effet, l'adsorption serait le facteur clé de la dégradation des estrogènes (Chen et Hu, 2010). Les estrogènes ont une tendance naturelle à s'adsorber sur la biomasse étant donné leur  $K_{ow}$  élevé (Combalbert et Hernandez-Raquet, 2010). Chen et Hu (2010) ont identifié le pH comme un paramètre important qui affecte la capacité d'adsorption des estrogènes. Le pH a déjà été identifié comme facteur clé dans la biodégradation de polluants dans d'autres études (Diaz, 2004; Hamer, 1992).

À notre connaissance, aucune étude n'a tenté de comparer l'efficacité de dégradation de cultures mixtes provenant de deux enrichissements à des concentrations initiales d'estrogènes différentes. Par contre, pour l'effet du regroupement de souches, Ke et coll. (Ke *et al.*, 2007) ont obtenu des résultats similaires, en testant la dégradation de l'E1 et de l'E2 par trois souches (CYH, LHJ1 et LHJ3) séparées et dans une culture mixte. La dégradation aérobie de l'E1 et de l'E2 était plus rapide par le consortium formé des trois souches que celle par ces trois mêmes souches testées individuellement.

Pour les souches combinées, aucun plateau n'a semblé être atteint et les concentrations d'E2 après 24 heures étaient de 3  $\mu\text{g/L}$  et 22  $\mu\text{g/L}$  pour les souches « CL » et « MI », respectivement. Même si l'hypothèse de départ est contredite, il reste à déterminer si la dégradation est possible en-dessous de ces valeurs et si oui, à quelle vitesse l'E2 diminue, est-ce qu'un autre plateau est atteint à de très faibles concentrations et est-ce les souches isolées à une faible concentration deviennent plus efficaces que celles isolées à de fortes concentrations.

#### **4.2.3 Facteurs influençant la dégradation**

Les cinétiques de dégradation ont été testées dans quatre milieux de culture différents et les résultats ont montré que le milieu de culture avait un effet sur la dégradation de l'E2 pour certaines souches seulement. Les conditions de culture ont donc

un effet sur la dégradation des estrogènes. Alors, est-ce que d'autres facteurs peuvent venir influencer la dégradation et est-ce que la conclusion pourrait être différente sous d'autres conditions? L'analyse de quelques facteurs, tels que le milieu de culture, la concentration initiale, le temps de contact, l'état des bactéries et la présence d'autres estrogènes, doit être effectuée puisqu'ils ont peut-être eu un impact sur la dégradation des estrogènes.

**Milieu de culture** Pour certaines souches (MI-21.2 et MI-9.3) le milieu de culture a eu un effet sur la dégradation de l'E2, mais pour d'autres souches (CL-9.02, CL-9.04) la dégradation était semblable dans les quatre milieux de culture. Les quatre milieux testés étaient un tampon phosphate (PBS) et un milieu minéral (ESM), chacun avec ou sans source de carbone supplémentaire (milieu TSB). Le milieu minéral contenait une solution d'éléments minéraux en traces et une solution de vitamines que le tampon phosphate n'avait pas. Le fait que la présence/absence d'éléments minéraux en traces et de vitamines a entraîné une dégradation différente chez les souches MI-21.2 et MI-9.3 et qu'elle n'a aucun effet pour les souches CL-9.02 et CL-9.04 suggère l'implication d'enzymes différentes pour la dégradation des estrogènes pour ces souches. Par contre, puisque la présence d'estrone a été notée dans tous les milieux pour toutes les souches, la voie de transformation de l'E2 serait possiblement la même pour toutes les souches.

L'effet de la présence d'une source de carbone supplémentaire sur la dégradation de l'E2 a déjà été évalué dans la littérature. Les taux de dégradation spécifique de l'E2 étaient similaires avec et sans acétonitrile comme source de carbone additionnelle (Muller *et al.*, 2010). De plus, Yoshimoto et coll. (2004) ont remarqué qu'une souche isolée dégradait sélectivement l'E2 durant un processus de fermentation en présence de glucose. Par contre, Li et coll. (2008) ont observé une tendance générale entre la diminution du taux de disparition de l'E2 et l'augmentation de la concentration initiale de glucose comme source de carbone supplémentaire. Ils ont aussi remarqué que le rapport de conversion d'E2 en E1 était également diminué.

Il est important de discuter du comportement de dégradation étrange de la souche MI-21.2 dans les quatre milieux testés. La souche est nettement plus efficace sur PBS+C que sur PBS sans C mais elle présente le comportement contraire dans le milieu ESM, où

elle est plus efficace sur ESM sans C sur ESM+C. De primes abords, ces résultats semblent incohérents et aucune explication logique ne peut être apportée. Comme il s'agissait de tests préliminaires pour déterminer le milieu de culture optimal pour représenter la dégradation des estrogènes dans un système de traitement de lisier de porc, la souche n'a pas été testée en triplicata. Il faudrait que l'expérience soit répétée au minimum en duplicata.

De plus, dans cette étude en général, le milieu riche de type TSB a été utilisé puisque les souches avaient toutes eu une croissance positive dans ce milieu. La complexité de ce milieu rend difficile l'interprétation afin de savoir quel élément du milieu a eu un effet sur la dégradation de l'E2. Une source de carbone simple, tel que le glucose, devra être testée avec chacune des souches afin de vérifier si les effets sur la dégradation sont les mêmes qu'avec une source de carbone complexe.

**Concentration initiale** Sur les 22 cinétiques de dégradation de l'E2 mesurées, 12 étaient d'ordre 1 et pour une cinétique d'ordre 1, la constante  $k$  est directement proportionnelle à la concentration du substrat, dans ce cas-ci l'E2. Le taux de la réaction diminue donc avec la diminution de la concentration de l'E2 et ceci était visible pour les 12 cinétiques avec le changement de pente des courbes de dégradation. Pour plusieurs souches un changement dans la pente de la courbe de dégradation, donc un changement de vitesse de dégradation, était visible lorsque la concentration était inférieure à 0,1 mg/L. Ce changement a été observé chez les souches CL-9.04 dans les quatre milieux, CL-9.02 dans trois milieux, CL-10.9 en milieu ESM+C et MI-21.2 dans les milieux ESM et PBS +C. La concentration d'E2 n'avait pas diminué en-dessous de 0.1 mg/L en présence des autres souches. Ces souches devraient être testées une autre fois sur une période plus longue afin de voir si leur vitesse change également en-dessous de 0.1 mg/L.

Aussi, toutes les souches devraient être testées avec une concentration initiale de 0.1 mg/L afin de voir si la dégradation est différente et si l'efficacité des souches change. Ke et coll. (2007) ont remarqué que les vitesses de dégradation variaient selon la concentration initiale d'E2, ce qui indique une cinétique de premier ordre. Aussi, en mesurant la dégradation de l'E3, ils ont observé qu'aucune dégradation ne se produisait en-dessous d'un plateau d'environ 80 µg/L. Alors, pour les souches suivant une cinétique

d'ordre zéro, il reste à déterminer si elles atteignent un plateau à 5 µg/L et pour les souches suivant une cinétique d'ordre un, il faut déterminer si une concentration initiale en-dessous de 0.1 mg/L a un effet sur la vitesse de dégradation.

**Autres facteurs** Les figures 18 à 23 présentent les courbes de dégradation en milieu ESM + C avec la croissance de la biomasse pour les sept souches testées. La croissance des bactéries ne semble pas avoir une influence sur la dégradation de l'E2. Par contre, la souche CL-10.3a, lors du test de détermination de la dégradation, n'avait dégradé l'E2 qu'en milieu TSB seulement (voir figure 17) et elle n'a pas été retenue pour les cinétiques de dégradation puisqu'elle n'avait pas diminué la concentration de l'E2 dans les milieux ESM+C et PBS. Pour cette souche, il semble que la transformation de l'E2 ne se produise seulement que lorsqu'il y a une forte croissance. Le même comportement a été observé pour la souche CL-10.4 (voir figures 17-19 et 39).

De plus, pour la souche CL-10.4, la diminution de l'E2 a débuté après environ dix heures d'incubation. Il s'agit d'une longue phase de latence et il faudrait vérifier si la présence d'estrogènes dans la préculture éliminerait cette période. Ke et coll. (2007) ont également observé une phase de latence pour la dégradation de l'E2 pour une souche isolée (figure 40). Plusieurs études ont été effectuées sur plusieurs jours (Ke *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2005) et peut-être certaines souches, par exemple CL-10.4, auraient montré un comportement de dégradation intéressante de l'E2 avec un temps de contact supérieur à 24 heures. La figure 40 montre que la vitesse de dégradation augmente avec la diminution de la concentration pour la souche LHJ3 isolée par Ke et coll. (2007). Une phase de latence a également été observée pour la souche MI-9.3 durant les sept premières heures du test dégradation en milieu ESM+C (voir figure 21). Alors, il reste à vérifier si les courbes de cinétique seraient modifiées en augmentant le temps d'incubation et en utilisant des précultures contenant des estrogènes.

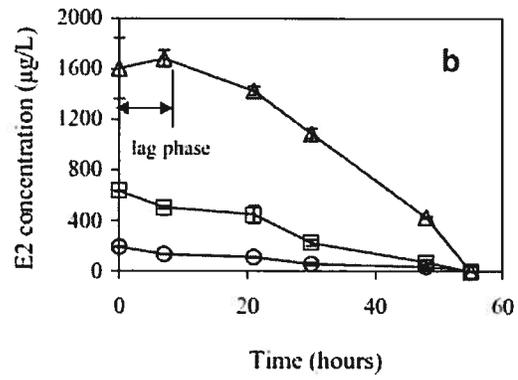


Figure 40. Dégradation aérobie d'E2 par la souche LHJ3 avec différentes concentrations initiales (Ke et al., 2007).

## Conclusion et perspectives

Ce projet a permis d'isoler 16 souches dégradant les estrogènes d'un enrichissement de boues activées contenant une concentration d'estrogènes de 100 mg/L comme seule source de carbone. Ces souches ont servi à tester notre hypothèse principale à l'effet que les souches isolées sur un milieu contenant une faible concentration d'estrogènes seraient plus efficaces pour dégrader les estrogènes à cette concentration que des souches isolées sur un milieu contenant une forte concentration d'estrogènes. Pour ce faire, les cinétiques de dégradation de quatre des souches issues de la présente étude ont été évaluées et comparées à celles de trois souches provenant d'un enrichissement contenant une concentration d'estrogènes de 1 mg/L. Les résultats ont montré que la sélection faite par la concentration d'estrogènes dans l'enrichissement ne vient pas influencer la capacité des souches à dégrader l'E2 à une concentration 100 fois plus faible. L'efficacité augmentait mais le résultat était le même en combinant les souches isolées à de fortes concentrations et celles isolées à de faibles concentrations. Rappelons que cette conclusion doit être nuancée. Même si une seule souche « MI » était plus rapide que les souches « CL », la vitesse de disparition de l'E2 était 3 fois supérieure en présence de celle-ci. Donc, en général, les souches isolées sur un milieu contenant de fortes concentrations demeurent plus efficace pour dégrader l'E2 mais une souche isolée à faible concentration demeure la plus efficace de toutes les souches testées dans toutes les conditions.

Pour les prochains travaux, toutes les souches « CL » et « MI » devraient être testées avec une concentration de départ de 0,1 mg/L sur une période assez longue pour atteindre un plateau ou une limite de détection permettant de confirmer une dégradation substantielle. De plus, d'autres enrichissements devraient être effectués à cette concentration, soit 0,1 mg/L d'E2, afin d'isoler des souches pour évaluer leur comportement de dégradation. Ceci est dans le but d'obtenir des souches pouvant utiliser l'E2 en-dessous de 5 µg/L et de mesurer les vitesses de dégradation à de telles concentrations. Rappelons qu'un plateau semblait être atteint par les souches de la présente étude à une concentration de 5 µg/L, même lorsqu'elles étaient en culture mixte.

Il serait également intéressant de tester les deux consortia des enrichissements à une concentration de 1 mg/L d'E2 sur une longue période, afin de voir si les bactéries présentes dans les enrichissements seraient capables de dégrader les estrogènes à de très faibles concentrations, de l'ordre du ng/L. De plus, puisque la diversité bactérienne était grande dans les enrichissements faits dans notre laboratoire ainsi que dans ceux mentionnés dans la littérature et que, selon les résultats obtenus, la concentration n'aurait pas d'effet sur la capacité de dégradation des souches à de faibles concentrations, il serait intéressant de faire un enrichissement avec une concentration intermédiaire. Par exemple, une concentration de 50 mg/L d'E2 pourrait être testée afin de comparer la diversité bactérienne obtenue et de vérifier la présence de souches capables de dégrader les estrogènes. D'autres enrichissements sur milieux complexes sans estrogènes devraient également être effectués afin d'isoler un grand nombre de souches, d'évaluer leur comportement de dégradation et de vérifier l'hypothèse selon laquelle la dégradation de l'E2 s'effectuerait par cométabolisme. Finalement, la présence d'E1 ayant été observée pour toutes les souches, il serait intéressant de vérifier les cinétiques d'utilisation de ce composé par les souches isolées.

## **Annexe 1. Numéros d'accès GenBank**

Tableau 12. Numéros d'accès GenBank des séquences des souches «CL» isolées dans la présente étude.

Souches «CL»	Numéro de séquences dans GenBank
CL-9,07	HQ113205
CL-4,2	HQ113206
CL-9,08	HQ113207
CL-9,09b	HQ113208
CL-9,11b	HQ113209
CL-9,15a	HQ113210
CL-10,7a	HQ113211
CL-10,9	HQ113212
CL-10,14	HQ113213
CL-9,04	HQ113214
CL-11,4b	HQ113215
CL-9,06	HQ113216
CL-9.11a	HQ113217
CL-10.3a	HQ113218
CL-10.4	HQ113219
CL-10.6a	HQ113220
CL-10.7b	HQ113221
CL-11.3	HQ113222
CL-11.4a	HQ113223
CL-2,1	HQ113224
CL-10,5	HQ113225

## **Annexe 2. Courbe de croissance des souches**

Avant d'effectuer les tests de cinétique de dégradation de l'E2, une préculture des souches était faite pour obtenir une biomasse de départ. Les courbes de croissances des dix souches dont le profil de dégradation de l'E2 a été mesuré ont été déterminées. Le but visé était que les tests de cinétique débutent avec une biomasse située en milieu de phase exponentielle. La figure 41 présente un exemple de courbe de croissance pour la souche CL-10.3a où la densité optique a été mesurée jusqu'à l'atteinte de la phase stationnaire. La phase exponentielle a été délimitée et le milieu de cette phase était estimé graphiquement. Ainsi, la préculture était arrêtée au temps estimé et la mesure de la densité optique servait de confirmation.

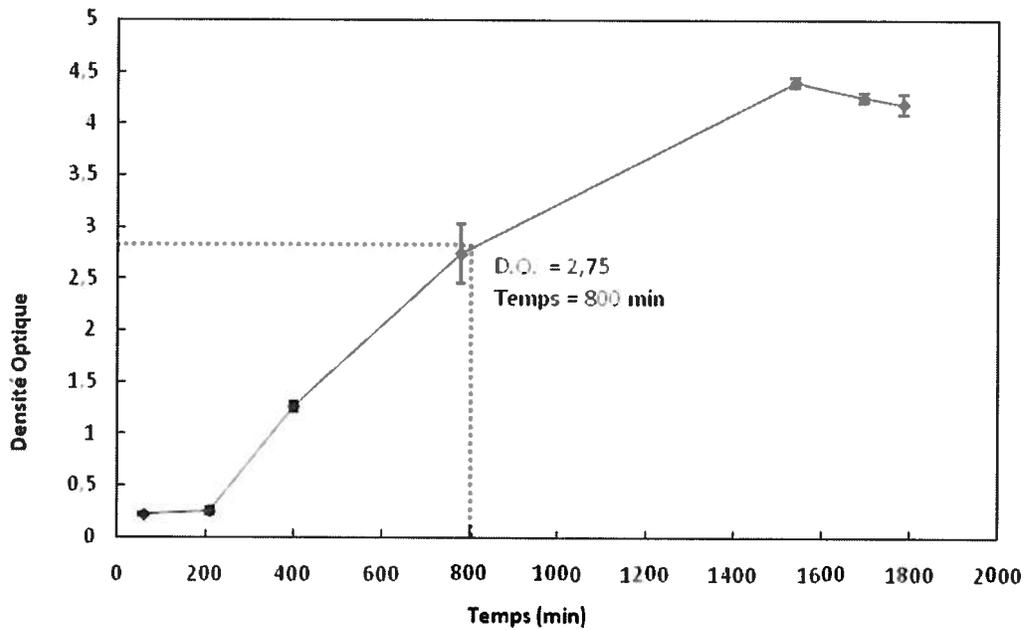


Figure 41. Courbe de croissance de la densité optique en fonction du temps pour la souche CL-10.3a

## Références

- Aerni, H. R., B. Kobler, B. V. Rutishauser, F. E. Wettstein, R. Fischer, W. Giger, A. Hungerbuhler, M. D. Marazuela, A. Peter, R. Schonenberger, A. C. Vogeli, M. J. F. Suter et R. I. L. Eggen (2004). Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378**(7): 688-696.
- Auriol, M., Y. Filali-Meknassi, R. D. Tyagi, C. D. Adams et R. Y. Surampalli (2006). Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry* **41**(3): 525-539.
- Baronti, C., R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili et R. Samperi (2000). Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology* **34**(24): 5059-5066.
- Belfroid, A. C., A. Van der Horst, A. D. Vethaak, A. J. Schafer, G. B. J. Rijs, J. Wegener et W. P. Cofino (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Science of the Total Environment* **225**(1-2): 101-108.
- Benfield, L. D., J. F. Judkins et B. L. Weand (1982). *Process chemistry for water and wastewater treatment*. New Jersey, Prentice-Hall, Inc.
- Blanquez, P. et B. Guieysse (2008). Continuous biodegradation of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials* **150**(2): 459-462.
- Bruce, K. D., W. D. Hiorns, J. L. Hobman, A. M. Osborn, P. Strike et D. A. Ritchie (1992). Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain-reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(10): 3413-3416.
- Burnison, B. K., A. Hartmann, A. Lister, M. R. Servos, T. Ternes et G. Van Der Kraak (2003). A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural runoff. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(10): 2243-2250.
- Caliman, F. A. et M. Gavrilescu (2009). Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment - A Review. *Clean-Soil Air Water* **37**(4-5): 277-303.
- Cao, Q., Q. Yu et D. W. Connell (2008). Degradation rate constants of steroids in sewage treatment works and receiving water. *Environmental Technology* **29**(12): 1321-1330.
- Cargouët, M., D. Perdiz, A. Moutassim-Souali, S. Tamisier-Karolak et Y. Levi (2004). Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment* **324**(1-3): 55-66.
- Chen, T. T. et L. J. Hillen (1983). Expression of the vitellogenin genes in insects. *Gamete Research* **7**(2): 179-196.
- Chen, X. et J. Y. Hu (2010). Adsorption of Natural Estrogens and Their Conjugates by Activated Sludge. *Water Air and Soil Pollution* **206**(1-4): 251-261.

- Clouzot, L., B. Marrot, P. Doumenq et N. Roche (2008). 17 $\alpha$ -ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. Environmental Progress 27(3): 383-396.
- Coleman, H. M., E. J. Routledge, J. P. Sumpter, B. R. Eggins et J. A. Byrne (2004). Rapid loss of estrogenicity of steroid estrogens by UVA photolysis and photocatalysis over an immobilised titanium dioxide catalyst. Water Research 38(14-15): 3233-3240.
- Combalbert, S. et G. Hernandez-Raquet (2010). Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. Applied Microbiology and Biotechnology 86(6): 1671-1692.
- Czajka, C. P. et K. L. Londry (2006). Anaerobic biotransformation of estrogens. Science of the Total Environment 367(2-3): 932-941.
- Das, K. et A. K. Mukherjee (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology 98(7): 1339-1345.
- Desbrow, C., E. J. Routledge, G. C. Brighty, J. P. Sumpter et M. Waldock (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. Environmental Science & Technology 32(11): 1549-1558.
- Diaz-Cruz, M. S., M. J. L. de Alda, R. Lopez et D. Barcelo (2003). Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). Journal of Mass Spectrometry 38(9): 917-923.
- Diaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. International Microbiology 7(3): 173-180.
- Dytczak, M. A., K. L. Londry et J. A. Oleszkiewicz (2008). Biotransformation of estrogens in nitrifying activated sludge under aerobic and alternating anoxic/aerobic conditions. Water Environment Research 80(1): 47-52.
- Essam, T., M. A. Amin, O. El Tayeb, B. Mattiasson et B. Guieysse (2010). Kinetics and metabolic versatility of highly tolerant phenol degrading *Alcaligenes* strain TW1. Journal of Hazardous Materials 173(1-3): 783-788.
- Fahrbach, M., J. Kuever, R. Meinke, P. Kämpfer et J. Hollender (2006). *Denitratissoma oestradiolicum* gen. nov., sp nov., a 17 $\beta$ -oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 1547-1552.
- Fairbrother, A. (2000). Comparative aspects of estrogen functions and measurements in oviparous and viviparous vertebrates. Human and Ecological Risk Assessment 6(1): 73-102.
- Fine, D. D., G. P. Breidenbach, T. L. Price et S. R. Hutchins (2003). Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1017(1-2): 167-185.
- FPPQ (2009). Rapport Annuel 2008-2009. Longueuil, Fédération des producteurs de porcs du Québec: 37p.

- Fujii, K., S. Kikuchi, M. Satomi, N. Ushio-Sata et N. Morita (2002). Degradation of 17 $\beta$ -estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. Applied and Environmental Microbiology **68**(4): 2057-2060.
- Fujii, K., M. Satomi, N. Morita, T. Motomura, T. Tanaka et S. Kikuchi (2003). *Novosphingobium tardaugens* sp nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **53**: 47-52.
- Furuichi, T., K. Kannan, J. P. Giesy et S. Masunaga (2004). Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and in vitro reporter gene assay. Water Research **38**(20): 4491-4501.
- Furuichi, T., K. Kannan, K. Suzuki, S. Tanaka, J. P. Giesy et S. Masunaga (2006). Occurrence of estrogenic compounds in and removal by a swine farm waste treatment plant. Environmental Science & Technology **40**(24): 7896-7902.
- Gaulke, L. S., S. E. Strand, T. F. Kalhorn et H. D. Stensel (2009). Estrogen Biodegradation Kinetics and Estrogenic Activity Reduction for Two Biological Wastewater Treatment Methods. Environmental Science & Technology **43**(18): 7111-7116.
- Gibson, R., E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro et B. Jimenez (2007). Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine, disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A **1169**(1-2): 31-39.
- Gomes, R. L., M. D. Scrimshaw et J. N. Lester (2003). Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. Trac-Trends in Analytical Chemistry **22**(10): 697-707.
- Hamer, G. (1992). The functioning of a microbial consortium for bioremediation - methanotrophy revisited. Annals of the New York Academy of Sciences **665**: 435-448.
- Hanselman, T. A., D. A. Graetz et A. C. Wilkie (2003). Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: A review. Environmental Science & Technology **37**(24): 5471-5478.
- Harries, J. E., D. A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, M. Neall, J. P. Sumpter, T. Taylor et N. Zaman (1997). Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. Environmental Toxicology and Chemistry **16**(3): 534-542.
- Harries, J. E., D. A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, P. Neall, E. J. Routledge, R. Rycroft, J. P. Sumpter et T. Tylor (1996). A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. Environmental Toxicology and Chemistry **15**(11): 1993-2002.
- Homklin, S., T. Wattanodorn, S. K. Ong et T. Limpiyakorn (2009). Biodegradation of 17 $\alpha$ -methyltestosterone and isolation of MT-degrading bacterium from sediment of Nile tilapia masculinization pond. Water Science and Technology **59**(2): 261-265.

- Hotchkiss, A. K., C. V. Rider, C. R. Blystone, V. S. Wilson, P. C. Hartig, G. T. Ankley, P. M. Foster, C. L. Gray et L. E. Gray (2008). Fifteen years after "Wingspread" - Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go. Toxicological Sciences **105**(2): 235-259.
- Hutchins, S. R., M. V. White, F. M. Hudson et D. D. Fine (2007). Analysis of lagoon samples from different concentrated animal feeding operations for estrogens and estrogen conjugates. Environmental Science & Technology **41**(3): 738-744.
- Isabelle, M., F. Lépine et P. Juteau (2007). Isolation of Estrogens-Degrading Bacteria from an Activated Sludge Bioreactor Treating Swine Waste. 57th Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists, June 2007, Quebec (QC).
- Jobling, S., M. Nolan, C. R. Tyler, G. Brighty et J. P. Sumpter (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science & Technology **32**(17): 2498-2506.
- Jobling, S. et J. P. Sumpter (1993). Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Aquatic Toxicology **27**(3-4): 361-372.
- Johnson, A. C., R. J. Williams et P. Matthiessen (2006). The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. Science of the Total Environment **362**(1-3): 166-178.
- Jones, P. D., W. M. De Coen, L. Tremblay et J. P. Giesy (2000). Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Water Science and Technology **42**(7-8): 1-14.
- Ke, J., W. Zhuang, K. Gin, M. Reinhard, L. Hoon et J.-H. Tay (2007). Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium. Applied Microbiology and Biotechnology **75**(5): 1163-1171.
- Khanal, S. K., B. Xie, M. L. Thompson, S. W. Sung, S. K. Ong et J. Van Leeuwen (2006). Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. Environmental Science & Technology **40**(21): 6537-6546.
- Kim, Y. M., C. K. Ahn, S. H. Woo, G. Y. Jung et J. M. Park (2009). Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. Journal of Biotechnology **144**(4): 293-298.
- Kolpin, D. W., E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber et H. T. Buxton (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. Environmental Science & Technology **36**(6): 1202-1211.
- Kuch, H. M. et K. Ballschmiter (2001). Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. Environmental Science & Technology **35**(15): 3201-3206.
- Lai, K. M., M. D. Scrimshaw et J. N. Lester (2002). Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. Applied and Environmental Microbiology **68**(2): 859-864.
- Lange, I. G., A. Daxenberger, B. Schiffer, H. Witters, D. Ibarreta et H. H. D. Meyer (2002). Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. Analytica Chimica Acta **473**(1-2): 27-37.

- Larsson, D. G. J., M. Adolfsson-Erici, J. Parkkonen, M. Pettersson, A. H. Berg, P. E. Olsson et L. Forlin (1999). Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? Aquatic Toxicology **45**(2-3): 91-97.
- Lee, H. B. et D. Liu (2002). Degradation of 17 $\beta$ -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. Water Air and Soil Pollution **134**(1-4): 353-368.
- Li, F., R. Desmiarti, A. Yuasa et A. Horio (2008). Behavior of natural estrogens in semicontinuous activated sludge biodegradation reactors. Bioresource Technology **99**(8): 2964-2971.
- Li, F., A. Yuasa, A. Obara et A. P. Mathews (2005). Aerobic batch degradation of 17- $\beta$  estradiol (E2) by activated sludge: Effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures. Water Research **39**(10): 2065-2075.
- Liu, R. X., A. Wilding, A. Hibberd et J. L. Zhou (2005). Partition of endocrine-disrupting chemicals between colloids and dissolved phase as determined by cross-flow ultrafiltration. Environmental Science & Technology **39**(8): 2753-2761.
- Liu, Y. Q., J. H. Tay, V. Ivanov, B. Y. P. Moy, L. Yu et S. T. L. Tay (2005). Influence of phenol on nitrification by microbial granules. Process Biochemistry **40**(10): 3285-3289.
- Maniero, M. G., D. M. Bila et M. Dezotti (2008). Degradation and estrogenic activity removal of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by ozonation and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Science of the Total Environment **407**(1): 105-115.
- Matsumura, Y., C. Hosokawa, M. Sasaki-Mori, A. Akahira, K. Fukunaga, T. Ikeuchi, K. I. Oshiman et T. Tsuchido (2009). Isolation and Characterization of Novel Bisphenol - A-Degrading Bacteria from Soils. Biocontrol Science **14**(4): 161-169.
- Matthiessen, P., D. Arnold, A. C. Johnson, T. J. Pepper, T. G. Pottinger et K. G. T. Pulman (2006). Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. Science of the Total Environment **367**(2-3): 616-630.
- Mes, T., K. Kujawa-Roeleveld, G. Zeeman et G. Lettinga (2008). Anaerobic biodegradation of estrogens - hard to digest. Water Science and Technology **57**(8): 1177-1182.
- Metcalf, C. D., T. L. Metcalfe, Y. Kiparissis, B. G. Koenig, C. Khan, R. J. Hughes, T. R. Croley, R. E. March et T. Potter (2001). Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry **20**(2): 297-308.
- Mitani, K., A. Fujioka et H. Kataoka (2005). Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A **1081**(2): 218-224.
- Muller, M., D. Patureau, J. J. Godon, J. P. Delgenes et G. Hernandez-Raquet (2010). Molecular and kinetic characterization of mixed cultures degrading natural and synthetic estrogens. Applied Microbiology and Biotechnology **85**(3): 691-701.
- Ning, B., N. Graham, Y. P. Zhang, M. Nakonechny et M. G. El-Din (2007). Degradation of endocrine disrupting chemicals by ozone/AOPs. Ozone-Science & Engineering **29**(3): 153-176.

- Pacakova, V., L. Loukotkova, Z. Bosakova et K. Stulik (2009). Analysis for estrogens as environmental pollutants - A review. Journal of Separation Science **32**(5-6): 867-882.
- Panter, G. H., R. S. Thompson et J. P. Sumpter (1998). Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. Aquatic Toxicology **42**(4): 243-253.
- Pauwels, B., K. Wille, H. Noppe, H. De Brabander, T. van de Wiele, W. Verstraete et N. Boon (2008). 17 $\alpha$ -ethynylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 $\beta$ -estradiol and estriol. Biodegradation **19**(5): 683-693.
- Racz, L. et R. K. Goel (2010). Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. Journal of Environmental Monitoring **12**(1): 58-70.
- Raman, D. R., E. L. Williams, A. C. Layton, R. T. Burns, J. P. Easter, A. S. Daugherty, M. D. Mullen et G. S. Sayler (2004). Estrogen content of dairy and swine wastes. Environmental Science & Technology **38**(13): 3567-3573.
- Rotchell, J. M. et G. K. Ostrander (2003). Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews **6**(5): 453-495.
- Routledge, E. J., D. Sheahan, C. Desbrow, G. C. Brighty, M. Waldock et J. P. Sumpter (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. Environmental Science & Technology **32**(11): 1559-1565.
- Routledge, E. J. et J. P. Sumpter (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environmental Toxicology and Chemistry **15**(3): 241-248.
- Shareef, A., M. J. Angove, J. D. Wells et B. B. Johnson (2006). Aqueous solubilities of estrone, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, and bisphenol A. Journal of Chemical and Engineering Data **51**(3): 879-881.
- Shi, J., S. Fujisawa, S. Nakai et M. Hosomi (2004). Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Water Research **38**(9): 2323-2330.
- Shore, L. S., M. Gurevitz et M. Shemesh (1993). Estrogen as an Environmental-Pollutant. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **51**(3): 361-366.
- Shore, L. S. et M. Shemesh (2003). Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. Pure and Applied Chemistry **75**(11-12): 1859-1871.
- Simpson, E. R. (2003). Sources of estrogen and their importance. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **86**(3-5): 225-230.
- Snyder, S. A., D. L. Villeneuve, E. M. Snyder et J. P. Giesy (2001). Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents. Environmental Science & Technology **35**(18): 3620-3625.
- Spengler, P., W. Korner et J. W. Metzger (2001). Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. Environmental Toxicology and Chemistry **20**(10): 2133-2141.
- Sumpter, J. P. (2005). Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica **33**(1): 9-16.

- Suri, R. P. S., M. Nayak, U. Devaiah et E. Helmig (2007). Ultrasound assisted destruction of estrogen hormones in aqueous solution: Effect of power density, power intensity and reactor configuration. Journal of Hazardous Materials **146**(3): 472-478.
- Suzuki, K., H. Hirai, H. Murata et T. Nishida (2003). Removal of estrogenic activities of 17 $\beta$ -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. Water Research **37**(8): 1972-1975.
- Tanaka, T., T. Tamura, Y. Ishizaki, A. Kawasaki, T. Kawase, M. Teraguchi et M. Taniguchi (2009). Enzymatic treatment of estrogens and estrogen glucuronide. Journal of Environmental Sciences-China **21**(6): 731-735.
- Ternes, T. A., P. Kreckel et J. Mueller (1999). Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Science of the Total Environment **225**(1-2): 91-99.
- Ternes, T. A., M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R. D. Wilken et M. Servos (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. Science of the Total Environment **225**(1-2): 81-90.
- Teske, A., H. Cypionka, J. G. Holt et N. R. Krieg (2007). Enrichment and Isolation. Methods for General and Molecular Microbiology. Washington, DC, American Society of Microbiology: 215-269.
- Thorpe, K. L., T. H. Hutchinson, M. J. Hetheridge, M. Scholze, J. P. Sumpter et C. R. Tyler (2001). Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Science & Technology **35**(12): 2476-2481.
- Tyler, C. R., S. Jobling et J. P. Sumpter (1998). Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. Critical Reviews in Toxicology **28**(4): 319-361.
- Tyler, C. R., J. P. Sumpter et N. R. Bromage (1988). *In vivo* ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Journal of Experimental Zoology **246**(2): 171-179.
- Urase, T. et T. Kikuta (2005). Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. Water Research **39**(7): 1289-1300.
- van den Belt, K., P. Berckmans, C. Vangenechten, R. Verheyen et H. Witters (2004). Comparative study on the *in vitro/in vivo* estrogenic potencies of 17 $\beta$ -estradiol, estrone, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and nonylphenol. Aquatic Toxicology **66**(2): 183-195.
- Vanderford, B. J., R. A. Pearson, D. J. Rexing et S. A. Snyder (2003). Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Analytical Chemistry **75**(22): 6265-6274.
- Wang, S., W. Huang, G. Z. Fang, Y. Zhang et H. Qiao (2008). Analysis of steroidal estrogen residues in food and environmental samples. International Journal of Environmental Analytical Chemistry **88**(1): 1-25.

- Wang, X. H. et V. Ivanov (2009). Microbial structure of nitrifying granules and their estrogens degradation properties. Water Science and Technology **59**(9): 1855-1862.
- Weber, S., P. Leuschner, P. Kampfer, W. Dott et J. Hollender (2005). Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. Applied Microbiology and Biotechnology **67**(1): 106-112.
- Xiao, X. Y., D. V. McCalley et J. McEvoy (2001). Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. Journal of Chromatography A **923**(1-2): 195-204.
- Xu, N., A. C. Johnson, M. D. Jurgens, N. R. Llewellyn, N. P. Hankins et R. C. Darton (2009). Estrogen Concentration Affects Its Biodegradation Rate in Activated Sludge. Environmental Toxicology and Chemistry **28**(11): 2263-2270.
- Ying, G. G. et R. S. Kookana (2005). Sorption and degradation of estrogen-like-endocrine disrupting chemicals in soil. Environmental Toxicology and Chemistry **24**(10): 2640-2645.
- Ying, G. G., R. S. Kookana et Y. J. Ru (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. Environment International **28**(6): 545-551.
- Yoshimoto, T., F. Nagai, J. Fujimoto, K. Watanabe, H. Mizukoshi, T. Makino, K. Kimura, H. Saino, H. Sawada et H. Omura (2004). Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. Applied and Environmental Microbiology **70**(9): 5283-5289.
- Yu, C.-P., H. Roh et K.-H. Chu (2007). 17 $\beta$ -Estradiol-Degrading Bacteria Isolated from Activated Sludge. Environmental Science & Technology **41**(2): 486-492.
- Zeng, Q. L., Y. M. Li, G. W. Gu, J. M. Zhao, C. J. Zhang et J. F. Luan (2009). Sorption and Biodegradation of 17 $\beta$ -Estradiol by Acclimated Aerobic Activated Sludge and Isolation of the Bacterial Strain. Environmental Engineering Science **26**(4): 783-790.
- Zhang, H., F. X. Kong, S. H. Wang, Y. Yu et M. Zhang (2009). Vitellogenin Induction by a Mixture of Steroidal Estrogens in Freshwater Fishes and Relevant Risk Assessment. Environmental Toxicology **24**(5): 484-491.
- Zhu, B. T. et A. H. Conney (1998). Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. Carcinogenesis **19**(1): 1-27.