

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**SUIVI DE LA SOUCHE *DESULFITOBACTERIUM FRAPPIERI* PAR
HYBRIDATION *IN SITU* ET CYTOMÉTRIE EN FLUX**

Par
MARIE-NOËL DA SILVA

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

25 mai 2000

© droits réservés de Marie-Noël da Silva, 2000

RÉSUMÉ

Plusieurs souches bactériennes impliquées dans la dégradation de contaminants ont été isolées par le groupe de microbiologie de l'environnement de l'INRS-Institut Armand-Frappier et sont présentement à l'étude afin de les incorporer dans des biotraitements d'effluents ou de sols contaminés. Parmi celles-ci, la souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, souche bactérienne de type Gram positive anaérobie, participe à la déshalogénéation du pentachlorophénol. Également, les souches *Sphingomonas* sp. 107 et *Mycobacterium* sp. J01, ayant la capacité de transformer les hydrocarbures aromatiques polycycliques en présence d'oxygène, et la souche 6, participant à la dégradation du phénol en anaérobie, ont été utilisées dans les expériences préliminaires du travail de recherche. Le suivi des micro-organismes impliqués dans la biodégradation des contaminants représente un paramètre important à considérer lors de l'application des bioprocédés. En effet, les micro-organismes sont les principaux ouvriers impliqués dans les biotraitements de dépollution. Il est donc important de s'assurer de la présence, du maintien et de l'activité des micro-organismes impliqués dans la dégradation et ainsi d'être certain que l'élimination des contaminants est reliée à l'activité biologique.

Dans ce projet de recherche, la technique d'hybridation *in situ* sera utilisée afin de détecter et d'estimer les concentrations de diverses souches bactériennes employées dans divers biotraitements. L'utilisation de sondes moléculaires d'acides nucléiques permet de détecter de façon sensible des micro-organismes spécifiques sans avoir à les cultiver. La technique d'hybridation *in situ* consiste en la pénétration d'oligonucléotides spécifiques au gène d'ARN 16S ribosomal liés à un fluorochrome à l'intérieur de cellules fixées. La détection des cellules marquées par ces sondes peut s'effectuer par microscopie ou par cytofluorométrie en flux. Au cours de ce projet de maîtrise, cette technique a été appliquée en combinaison avec la cytofluorométrie en flux qui permet des analyses automatisées, quantitatives et rapides. L'application de la technique a été réalisée avec des cultures pures de quelques souches bactériennes et plus particulièrement avec la

souche *D. frappieri* PCP-1. Une fixation à la paraformaldéhyde suivie d'une perméabilisation à l'hexadécyltriméthyl bromure d'ammonium ont permis d'obtenir les meilleurs résultats avec la souche PCP-1 en effectuant une hybridation avec une combinaison de deux sondes spécifiques (PCP1-3 et PCP1-4). La technique d'hybridation *in situ* a été utilisée avec succès afin de suivre la souche PCP-1, en présence de trichlorophénol, en culture pure. Aussi, il a été possible de distinguer la souche PCP-1 de la microflore indigène et de suivre l'évolution et la concentration de la souche en présence d'un consortium méthanogène et en microcosmes, toujours en présence de trichlorophénol. Également, un milieu de culture solide permettant la culture de la souche pour la première fois en moins de 48 heures, a été développé. Les comptes bactériens obtenus par cytométrie se sont révélés inférieurs d'un facteur d'environ 10 par rapport aux comptes par unités formatrices de colonies. Bien que ces expériences aient permis l'estimation de la concentration de la souche PCP-1 en présence d'une microflore indigène, des efforts supplémentaires devront être fournis afin de faciliter la récupération des cellules à l'intérieur d'un microcosme et également de contourner les faibles signaux obtenus lorsque la population visée se retrouve en période de latence ou de faible croissance.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord à mon directeur de recherche, Dr Richard Villemur, pour son dévouement désintéressé à notre formation et notre recherche d'autonomie ainsi que pour son appui et sa disponibilité. Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe du Dr Villemur pour l'atmosphère agréable de travail, spécifiquement à Éric Déziel, étudiant au doctorat pour ses discussions et conseils ainsi qu'à Francine Turcotte, technicienne de laboratoire, pour ses grandes connaissances techniques. J'aimerais aussi remercier le Dr Réjean Beaudet et Mme Rita Alary pour leur aide et coopération à la réalisation de mon projet de recherche.

Il est aussi primordial de remercier Marcel Desrosiers, responsable du laboratoire de cytométrie, pour l'ensemble de ses vastes connaissances touchant au domaine de la fluorescence et des appareils de détection, également pour sa gentillesse et disponibilité.

Merci à la Fondation Armand-Frappier, pour leur appui financier au long de ces deux années de maîtrise.

Finalement, merci à Patrick pour son appui assidu et attentif.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures	x
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Introduction.....	1
Revue de littérature	4
1. Les composés xénobiotiques à l'étude	5
2. La dépollution par des procédés microbiens	7
3. Suivi microbien en microbiologie de l'environnement	9
3.1. Utilisation de milieux de culture	10
3.2. Immunodétection.....	11
3.3. Techniques de génétique moléculaire	12
3.3.1. Hybridation sur colonies	13
3.3.2. Hybridation du matériel génétique extrait d'échantillons microbiens	13
3.3.3. Amplification par PCR.....	14
4. Hybridation <i>in situ</i>	18
5. L'ARN 16S ribosomal, cible de l'hybridation <i>in situ</i>	23
6. Fluorescence et fluorochromes	25
7. Instruments d'observation des cellules fluorescentes.....	30
7.1. Microscope à épifluorescence	30
7.2. Microscopie confocal	32
7.3. Cytofluorométrie en flux	33
8. Hybridation <i>in situ</i> appliquée à la microbiologie de l'environnement ..	37
9. Souches bactériennes à l'étude	41
9.1. <i>Sphingomonas</i> sp. 107	41
9.2. <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	42
9.3. Souche 6	42
9.4. <i>Mycobacterium</i> sp Jo1	43
Matériel et méthodes.....	44
1. Les cultures bactériennes.....	45
2. Protocole d'hybridation <i>in situ</i>	47

2.1. Sondes d'ADN fluorescentes	47
2.2. <i>Sphingomonas</i> sp. 107	49
2.3. <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	50
2.4. Souche 6	51
2.5. <i>Mycobacterium</i> sp. Jo1	51
2.6. Observation et détection de la fluorescence	51
3. Comptes de la culture de <i>D. frappieri</i> PCP-1 déterminés par cytométrie et par étalement sur géloses	52
4. Intensité de la fluorescence en fonction du temps de la culture de <i>D. frappieri</i>	53
5. Suivi de la souche <i>D. frappieri</i> en consortium méthanogène.....	53
5.1. Suivi des chlorophénols	54
6. Suivi de la souche <i>D. frappieri</i> en microcosmes	55
6.1. Suivi des chlorophénols	55
6.2. Extraction des bactéries et protocole d'hybridation <i>in situ</i> ...	56
Résultats	58
1. Hybridation <i>in situ</i> en culture pure	59
1.1. <i>Sphingomonas</i> sp. 107	59
1.2. <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	61
1.3. Souche 6	63
1.4. <i>Mycobacterium</i> Jo1	63
2. Optimisation de la technique d'hybridation <i>in situ</i> avec <i>D. frappieri</i> PCP-1	67
3. Développement d'un milieu de culture solide et comparaison des comptes par cytométrie et par étalement en fonction du temps.....	71
4. Intensité de la fluorescence en fonction du temps de la culture de <i>D. frappieri</i> PCP-1	74
5. Suivi de la souche <i>D. frappieri</i> PCP-1 en consortium méthanogène	80
5.1. Comptes sur milieu solide	81
5.2. Suivi des chlorophénols.....	88
6. Suivi de la souche <i>D. frappieri</i> PCP-1 en microcosmes.....	88
6.1. Comparaison des comptes sur milieu solide et par cytométrie et suivi des chlorophénols	100
Discussion	104
1. Développement de protocoles d'hybridation <i>in situ</i>	105
2. Optimisation de la technique d'hybridation <i>in situ</i>	106
3. Comparaison des comptes de <i>D. frappieri</i> PCP-1 par cytométrie en flux et par étalement	110
4. Intensité de la fluorescence en fonction du temps de la culture de <i>D. frappieri</i> PCP-1	112
5. Suivi de la souche de <i>D. frappieri</i> PCP-1 en consortium méthanogène.....	113
6. Suivi de la souche de <i>D. frappieri</i> PCP-1 en microcosmes.....	115

7. Perspectives	119
Conclusion.....	121
Bibliographie.....	124

Liste des figures

Figure 1: Structures chimiques de différents composés xénobiotiques	6
Figure 2: Principe de l'amplification du PCR	15
Figure 3: Principe de l'hybridation <i>in situ</i>	19
Figure 4: Parois cellulaires des bactéries Gram positives et Gram négatives	21
Figure 5: Principe de l'émission de fluorescence	27
Figure 6: Structures chimiques de différents fluorochromes	29
Figure 7: Principe du microscope à épifluorescence	31
Figure 8: Principe du cytomètre en flux	33
Figure 9: Exemples d'histogrammes de profil de dispersion et de signaux de fluorescence de cytométrie en flux	36
Figure 10: Hybridation <i>in situ</i> d'une culture pure de la souche <i>Sphingomonas</i> sp. 107	60
Figure 11: Hybridation <i>in situ</i> d'une culture pure de la souche <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	62
Figure 12: Hybridation <i>in situ</i> d'une culture pure de la souche 6	64
Figure 13: Photographie de la souche 6 en culture pure après l'hybridation <i>in situ</i> avec la sonde spécifique (PHEN) et observée par microscopie à épifluorescence, (grossissement 1000X)	65
Figure 14: Hybridation <i>in situ</i> d'une culture pure de la souche <i>Mycobacterium</i> sp. Jo1	66
Figure 15: Hybridation <i>in situ</i> d'une culture pure de la souche <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1 avec les sondes spécifiques PCP1-3 et PCP1-4	70
Figure 16: Comparaison des concentrations de la souche PCP-1 obtenues par unités formatrices de colonies (UFC) et par cytométrie pendant 72 heures	73

Figure 17: Suivi par hybridation <i>in situ</i> d'une culture pure de <i>D. frappieri</i> PCP-1 aux temps 0 et 6 heures	75
Figure 18: Suivi par hybridation <i>in situ</i> d'une culture pure de <i>D. frappieri</i> PCP-1 aux temps 12 et 24 heures	76
Figure 19: Suivi par hybridation <i>in situ</i> d'une culture pure de <i>D. frappieri</i> PCP-1 aux temps 28 et 32 heures	77
Figure 20: Suivi par hybridation <i>in situ</i> d'une culture pure de <i>D. frappieri</i> PCP-1 aux temps 48 et 72 heures	78
Figure 21: Hybridation <i>in situ</i> de la souche PCP-1 en présence d'un consortium méthanogène au temps 0	82
Figure 22: Hybridation <i>in situ</i> de la souche PCP-1 en présence d'un consortium méthanogène au temps 24 heures	83
Figure 23: Hybridation <i>in situ</i> de la souche PCP-1 en présence d'un consortium méthanogène au temps 48 heures	84
Figure 24: Hybridation <i>in situ</i> de la souche PCP-1 en présence d'un consortium méthanogène au temps 72 heures	85
Figure 25: Concentrations de la souche PCP-1 et des comptes totaux par millilitre obtenues par unités formatrices de colonies (UFC) et par cytométrie dans le consortium méthanogène pendant 72 heures	86
Figure 26: Concentration du TCP dans le consortium méthanogène en présence ou en absence de la souche PCP-1	87
Figure 27: Extraction des bactéries par centrifugation à basse vitesse sur un coussin de Nycodenz	90
Figure 28: Hybridation <i>in situ</i> du microcosme #1 au temps 24 heures	91
Figure 29: Hybridation <i>in situ</i> du microcosme #1 au temps 48 heures	92
Figure 30: Hybridation <i>in situ</i> du microcosme #2 au temps 24 heures	94
Figure 31: Histogrammes bi-paramétriques des signaux de fluorescence du microcosme #2 au temps 24 heures	95
Figure 32: Hybridation <i>in situ</i> du microcosme #2 au temps 48 heures	96

Figure 33: Histogrammes bi-paramétriques des signaux de fluorescence du microcosme #2 au temps 48 heures	97
Figure 34: Hybridation <i>in situ</i> du microcosme #2 au temps 72 heures	98
Figure 35: Histogrammes bi-paramétriques des signaux de fluorescence du microcosme #2 au temps 72 heures	99
Figure 36: Concentration des comptes totaux par gramme de poids sec dans le microcosme #2, pendant 72 heures	101
Figure 37: Concentration du TCP dans les microcosmes #1 et #2 ensemencés avec la souche PCP-1	103

Liste des tableaux

Tableau 1: Séquences et positions des sondes universelle spécifiques aux souches <i>Sphingomonas</i> sp. 107, <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1, souche 6 et <i>Mycobacterium</i> sp. Jo1.	48
Tableau 2: Comparaison des concentrations de la souche PCP-1 en culture pure obtenues par unités formatrices de colonies (UFC) et par cytométrie.	72
Tableau 3: Suivi des rapports de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) de l'hybridation spécifique (sondes PCP1-3 et PCP1-4) sur l'hybridation non spécifique (sonde NON) d'une culture pure de la souche PCP-1.	79

Liste des abréviations

A	: adénine
ADN	: acide désoxyribonucléique
ARN	: acide ribonucléique
ARNr	: acide ribonucléique ribosomal
BrEt	: bromure d'éthidium
BPC	: biphényl polychloré
C	: cytosine
CP	: chlorophénol
CTAB	: hexadécyltriméthyl bromure d'ammonium
DCP	: dichlorophénol
dNTP	: désoxynucléotide
dUTP	: désoxynucléotide uridine
FISH	: fluorescent <i>in situ</i> hybridization (hybridation <i>in situ</i>)
FS	: forward scatter
G	: guanine
g	: gramme
HAP	: hydrocarbure aromatique polycyclique
HNP	: acide 2-hydroxy-3-naphtoïque-2'-phénylanilide
HNPP	: acide 2-hydroxy-3-naphtoïque-2'-phénylanilide phosphate
HPLC	: chromatographie liquide à haute performance (High performance liquid chromatography)
IMF	: intensité moyenne de fluorescence
L	: litre
M	: molaire
NPP	: nombre le plus probable
³² P	: isotope 32 du phosphore
p/v	: poids/volume
PCP	: pentachlorophénol

PCR	: réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)
rpm	: rotation par minute
sp.	: espèce
SS	: side scatter
T	: tyrosine
TCE	: trichloroéthylène
TCP	: trichlorophénol
TeCP	: tetrachlorophénol

INTRODUCTION

L'environnement a subi, au cours des dernières décennies, de nombreuses transformations. Parmi celles-ci, de nouveaux composés, créés par les humains, font surface et sont surtout utilisés pour maîtriser le milieu dans lequel ils évoluent. Il y a eu développement de nombreux insecticides, d'agents de conservation du bois, de produits de blanchiment de papier et de dérivés du pétrole. Cependant, les années ont démontré que l'accumulation dans l'environnement de ces substances s'est révélée, dans bon nombre de cas, toxique pour les humains et leur milieu. Le développement de plusieurs méthodes d'élimination de ces déchets a donc connu son essor dans ces dernières années. La biodégradation est un processus biologique qui exploite des micro-organismes ayant la capacité de dégrader des composés chimiques pour leur propre croissance. Cette technologie s'avère très utile dans la dépollution de sites contaminés.

Lors de la mise en place d'un procédé de biorestauration, il est important de s'assurer de l'implantation de la microflore qui effectuera le travail. Plusieurs facteurs sont donc à vérifier tels que la présence de nutriments adéquats et d'eau, le pH, la température, l'alimentation en oxygène et la présence continue des micro-organismes dégradeurs. Plusieurs méthodes traditionnelles, telle que la culture des micro-organismes sur des milieux de sélection, permettent effectivement de les dénombrer et de s'assurer de leur présence. Cependant, la plupart des bactéries de l'environnement ne peuvent croître sur de tels milieux et rendent donc problématique leur détection lorsqu'elles sont impliquées dans un bioprocédé. Une méthode de détection des micro-organismes dégradeurs indépendante d'une étape de culture s'avère donc essentielle pour résoudre ce problème.

La biologie moléculaire propose des moyens de contourner cette difficulté par l'utilisation de sondes moléculaires. L'hybridation *in situ* est une méthode alternative récemment développée et qui permet la détection de bactéries spécifiques. Elle consiste en l'hybridation d'une sonde d'ADN spécifique à l'ARN ribosomal de la

bactérie. La sonde est couplée à un fluorochrome afin d'être détecté par un appareil mesurant la fluorescence. L'hypothèse de recherche de ce projet consiste donc en l'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* afin de suivre et de quantifier la concentration d'une souche bactérienne à l'intérieur d'un biotraitement.

Les objectifs de ce projet de maîtrise étaient 1) de développer une méthode de perméabilisation pour quelques bactéries d'intérêt isolées par le groupe de microbiologie de l'environnement, plus particulièrement la souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1; 2) d'optimiser la technique d'hybridation *in situ* en culture pure pour la souche PCP-1; 3) d'effectuer un suivi de la souche PCP-1 en culture mixte en milieu liquide, à l'aide de la technique d'hybridation *in situ*; 4) et finalement d'effectuer le suivi de la souche PCP-1 à l'intérieur de microcosmes contenant du sol contaminé artificiellement avec des produits chlorés, en appliquant la technique d'hybridation *in situ*.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Les composés xénobiotiques

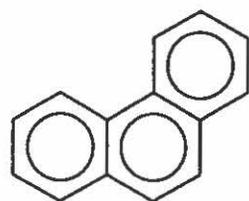
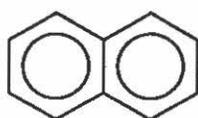
Plusieurs composés xénobiotiques de diverses origines, tels les secteurs industriels et agricoles, ont envahi notre environnement dans les dernières décennies. Parmi ceux-ci, les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les biphényles polychlorés (BPC) et autres composés phénoliques se sont accumulés dans plusieurs écosystèmes. La plupart de ces contaminants présentent un risque à long terme pour la santé humaine, animale et végétale car plusieurs sont reconnus comme étant cancérigènes et toxiques.

La présence de plusieurs HAP dans l'environnement résulte de l'industrie de l'exploitation pétrolière, des méthodes de conservation du bois, de la combustion de combustibles fossiles ainsi que des feux de forêts. Les HAP sont formés de deux cycles benzéniques ou plus et la résonance des cycles aromatiques leur confère une grande stabilité (Fig. 1). Les HAP sont très hydrophobes et récalcitrants et ceci, proportionnellement à leur poids moléculaire. Certains HAP sont connus pour être mutagènes et carcinogènes et sont reconnus parmi les polluants prioritaires par "l'U.S. Environmental Protection Agency" (Cerniglia, 1992).

Les chlorophénols, dont fait partie le pentachlorophénol (PCP), ont été utilisés depuis les années 1930 comme agent de conservation du bois ainsi que comme herbicide (Fig. 1). Ils peuvent être retrouvés également comme sous-produits lors de procédés de blanchiment de pâtes et papiers. Ces importants polluants contaminent principalement les sites de traitements et d'entreposage du bois ainsi que certains effluents industriels. Le PCP et autres chlorophénols sont également inscrits sur la liste de contaminants prioritaires par "l'U. S. Environmental Protection Agency" ainsi que par la communauté européenne (Wild *et al.*, 1993). Le PCP étant très toxique, il est souvent récalcitrant à la biodégradation en milieu naturel. En effet, son hydrophobicité lui permet de s'insérer au niveau des membranes cellulaires et d'en

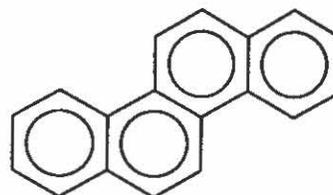
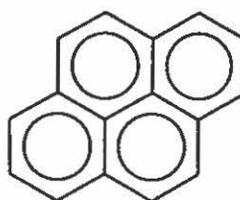
Figure 1 : Structures chimiques de différents composés xénobiotiques

Naphtalène (HAP)

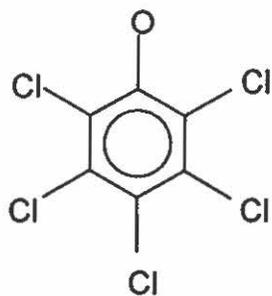


Phénanthrène (HAP)

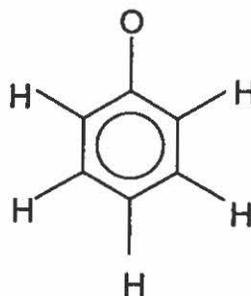
Pyrène (HAP)



Chrysène (HAP)



pentachlorophénol



phénol

altérer les fonctions (Mc Allister *et al.*, 1996). Le PCP affecte aussi le transport d'électrons le long de la chaîne respiratoire en découplant la phosphorylation oxydative (Orser et Lange, 1994).

Le phénol (Fig. 1) et ses dérivés appartiennent aux contaminants parmi les plus utilisés et les plus répandus par le secteur industriel. Également, le phénol représente un produit de transformation de nombreux produits phénoliques dont plusieurs pesticides (Boyd *et al.*, 1983).

2. La dépollution par des procédés microbiens

Les sites pollués peuvent être décontaminés par différents traitements physico-chimiques ou biologiques. Les procédés physico-chimiques sont bien établis, particulièrement l'incinération à haute température. Cependant un tel traitement, bien que la disparition du contaminant soit rapide et peu coûteuse, entraîne aussi une disparition de la matière organique du sol (Hägglom et Valo, 1995). Également, des émanations toxiques peuvent s'en dégager.

La biorestauration est un procédé qui implique l'utilisation de micro-organismes pour dégrader des composés organiques polluants en produits inoffensifs, tel que de l'eau, du dioxyde de carbone et de la biomasse. La biorestauration peut s'effectuer à l'aide de la flore indigène ou par l'ajout de micro-organismes compétents (bioaugmentation). Parmi les avantages de la biorestauration mentionnons que celle-ci peut, la plupart du temps, mener à la minéralisation complète du contaminant en des produits non polluants et entraîner des coûts d'opération moindre. Cette technologie présente donc une alternative intéressante aux procédés traditionnels et, qui plus est, respecte l'environnement. Les bioprocédés pour traiter des sols contaminés peuvent principalement s'effectuer de deux manières : *in situ* et *ex situ*. Le traitement *in situ* est effectué directement sur le site, le sol n'étant pas déplacé. Des nutriments et autres

ajouts (par exemple de l'oxygène) peuvent être fournis pour alimenter les micro-organismes. Des micro-organismes peuvent aussi être ajoutés. Le traitement *ex situ* nécessite l'excavation du sol et celui-ci peut être accumulé sous forme de biopile. Encore une fois des nutriments et micro-organismes peuvent être ajoutés. Cette méthode permet un meilleur contrôle des paramètres que le traitement *in situ*. Parmi les traitements *ex situ* mentionnons le traitement en bioréacteur qui permet de fournir les conditions optimales à la biodégradation par ajout de nutriments ou par agitation, aération et inoculation (Hägglom et Valo, 1995). Cependant, les bioréacteurs sont plus coûteux et ne permettent que de traiter une petite quantité de sol à la fois. Mentionnons toutefois que ces procédés sont de plus en plus utilisés pour décontaminer des sites pollués par divers composés aromatiques tels que les phénols, les chlorophénols et les HAP.

Plusieurs bactéries aérobies pouvant minéraliser les chlorophénols ont été isolées. Ces bactéries utilisent les chlorophénols comme source de carbone et d'énergie. Parmi les bactéries aérobies pouvant minéraliser le pentachlorophénol, certaines appartiennent aux genres *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* et *Mycobacterium* (Mc Allister *et al.*, 1996). Diverses expériences de biodégradation ont été effectuées en milieu liquide avec et sans sol et en sol seulement. Par exemple, l'utilisation de la souche *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 a pu démontrer une meilleure efficacité de minéralisation du PCP dans le sol jusqu'à un taux de 350-600 mg/kg de sol. Elle possède la capacité de dégrader d'autres produits chlorés (Mc Allister *et al.*, 1996). La minéralisation du PCP en conditions anaérobies s'effectuent principalement à l'aide de populations bactériennes mixtes, notamment par des consortium effectuant la fermentation méthanogène. La déshalogénéation réductrice est la voie métabolique empruntée par les bactéries anaérobies afin de déchlorer le PCP (Mc Allister *et al.*, 1996). Quelques bactéries pouvant effectuer la déshalogénéation réductrice des composés aromatiques ont été isolées en cultures pures. L'une des premières est la souche *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 qui peut déchlorer différents

composés aromatiques surtout à la position *mé*ta du cycle aromatique (Mohn et Kennedy, 1992). La souche *Desulfitobacterium chlororespirans* qui a été isolée par le groupe de Sanford *et al.* (1996) peut elle aussi substituer les chlore de plusieurs composés en position *ortho* seulement.

Plusieurs micro-organismes appartenant à différents genres microbiens ont la capacité d'utiliser les hydrocarbures aromatiques polycycliques comme source de carbone et d'énergie. La plupart des micro-organismes étudiés ont été utilisés en milieu liquide et en présence de HAP de faible poids moléculaire (moins de quatre cycles benzéniques). Les actinomycètes des genres *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Gordona* figurent parmi les genres les plus fréquemment retrouvés dans les sols contaminés aux hydrocarbures (Kästner *et al.* 1994). Parmi les micro-organismes pouvant croître sur les HAP de haut poids moléculaire se trouve l'espèce *Burkholderia cepacia* pouvant dégrader près de 15 mg/L de benzo[a]pyrène et 15 mg/L de coronène en 60 jours (Juhasz *et al.*, 1996). Cette souche bactérienne est une des premières souches bactériennes pouvant utiliser plusieurs HAP de haut poids moléculaire comme seule source de carbone en culture pure.

3. Suivi microbien en microbiologie de l'environnement

Les micro-organismes sont les principaux ouvriers impliqués dans les biotraitements de dépollution. Lors de la mise en application d'un biotraitement, il est important de s'assurer de la présence, du maintien et de l'activité des micro-organismes impliqués dans la dégradation des contaminants dans le traitement de biorestauration. Il est également important de s'assurer que l'élimination des contaminants est reliée à l'activité biologique des micro-organismes. Le suivi des souches impliquées dans les étapes de biodégradation permet aussi de faciliter la prévention d'une interruption de l'activité du biotraitement.

Plusieurs techniques sont présentement utilisées afin de détecter et dénombrer de manière spécifique les souches responsables de la dégradation. Parmi celles-ci, la détection de micro-organismes par l'utilisation de milieux de culture, l'immunodétection et les techniques de génétique moléculaire seront présentées dans la présente section. La technique d'hybridation *in situ*, technique principalement utilisée dans le travail de recherche présenté ici, sera détaillée à la section 4.

3.1. Utilisation de milieux de culture

Lorsqu'on veut détecter et dénombrer un micro-organisme particulier par croissance sur milieu de culture, il faut s'assurer de posséder une méthode de sélection spécifique qui ne permet que la croissance du micro-organisme ou d'un groupe de micro-organismes visé. Ainsi, il est possible de faire croître et d'estimer la présence de certaines bactéries sur milieu solide ou en milieu liquide. Sur milieu solide le paramètre étudié est alors l'unité formatrice de colonies (UFC) et se base sur l'hypothèse qu'une bactérie va se développer et former une colonie distincte tandis qu'en milieu liquide, la méthode du nombre le plus probable (NPP) est utilisée. Par exemple, sur milieu solide, un film opaque peut être obtenu en vaporisant des HAP sur la gélose et ensuite faire croître les bactéries de l'échantillon d'intérêt. Par cette méthode, il est possible de distinguer les micro-organismes pouvant dégrader les HAP du reste de la population microbienne par la formation de zones d'éclaircissement autour des colonies ayant la capacité à dégrader les HAP (Kästner *et al.*, 1994). Dans le cas de la méthode NPP, l'extrait bactérien impliqué dans la dégradation d'un polluant est dilué plusieurs fois. Après croissance, la dilution la plus élevée ayant encore l'activité de dégradation peut être délimitée. Une méthode statistique de probabilité est alors employée afin de déterminer le nombre probable de bactéries dans l'échantillon de départ (Prescott *et al.*, 1995).

Ces méthodes d'unités formatrices de colonies et du nombre le plus probable ont été et

sont toujours fréquemment utilisées afin d'estimer les quantités de cellules actives dans des échantillons environnementaux (Brockman, 1995). Cependant, ces méthodes sont souvent inadéquates pour quantifier les cellules car les milieux sélectionnent certains micro-organismes seulement. Il est d'ailleurs fréquemment mentionné dans de nombreuses études scientifiques que les comptes cellulaires effectués par microscopie excèdent par plusieurs ordres de magnitude les comptes obtenus par unités formatrices de colonies (Amann *et al.*, 1995). Par exemple, il a été observé qu'une proportion de 0,01% à 12% de la communauté microbienne totale d'environnements aquatiques et terrestres sont effectivement cultivables (Brockman, 1995). Deux différents types de micro-organismes sont principalement responsables du mutisme de la majorité des micro-organismes en milieu naturel. Premièrement, il peut s'agir d'espèces connues pour lesquelles les conditions de culture ne sont pas adéquates ou qui sont entrées dans un état non cultivable ou latence. Certaines bactéries entrent en latence lors d'exposition à des conditions particulières telles qu'une variation de la concentration de sels ou de variations de température. Plusieurs espèces peuvent aussi croître très lentement et être dissimulées ou inhibées par la croissance rapide d'autres espèces de micro-organismes. Deuxièmement, il peut également être question d'espèces inconnues qui n'ont jamais pu être cultivées par un manque de milieu approprié (Amann *et al.*, 1995). L'utilisation de milieux sélectifs de culture a largement été pratiquée pour obtenir des informations sur la présence et l'abondance des micro-organismes d'intérêt cependant, il est clair que la connaissance de la diversité des micro-organismes en milieu naturel par cette méthode demeure incomplète.

3.2. Immunodétection

Les techniques d'immunodétection impliquent l'utilisation d'anticorps fluorescents, spécifiques à des protéines particulières de la souche bactérienne cible. Les anticorps employés sont marqués avec des fluorochromes qui permettent la visualisation par microscopie à épifluorescence ou par cytométrie en flux (van der Waaij *et al.*, 1994).

L'immunodétection présente l'avantage que les cellules peuvent être, selon l'antigène visé, conservées vivantes. Conséquemment, il peut être possible de sélectionner la population visée présente dans une communauté bactérienne mixte en effectuant une sélection des cellules marquées par cytométrie. La culture de ces cellules peut par la suite être tentée. Cependant, la préparation des anticorps nécessite une bonne connaissance des antigènes de la bactérie et l'antigène visé doit toujours être présent (Porter *et al.*, 1996). Ceci implique, le plus souvent, l'isolement et la culture de la souche en culture pure. Cette technique n'est donc pas adéquate pour la détection de micro-organismes non cultivables (Wallner *et al.*, 1996). De plus, une partie des anticorps se lie inévitablement aux diverses particules de l'environnement (Porter *et al.*, 1996). Des études par immunodétection se pratiquent le plus souvent pour des bactéries pathogènes, plus connues, qui se retrouvent dans des milieux dans lesquels la possibilité de liaisons non spécifiques est diminuée (par exemple l'eau et le plasma) (Porter *et al.*, 1996, Dietrich *et al.*, 1991). La technique d'immunodétection est donc peu utilisée pour la détection de bactéries de l'environnement étant donné le faible pourcentage de bactéries cultivables et la présence de débris organiques et de particules interférentes comme le sol.

3.3. Techniques de génétique moléculaire

Les techniques moléculaires utilisent comme sondes des séquences d'ADN ou d'ARN pour révéler la présence de certains groupes spécifiques de micro-organismes (Brockman, 1995). Ces techniques sont très utiles lorsqu'il est nécessaire de détecter un micro-organisme spécifique, ou simplement les micro-organismes présents, qui ne peut encore être isolé et cultivé. C'est donc un outil précieux pour le suivi microbien dans l'environnement. Les sondes peuvent viser des activités métaboliques recherchées tel un gène impliqué dans la transformation de composés aromatiques ou une séquence spécifique du gène de l'ARN 16S ribosomal (voir section 5). Parmi les techniques qui tirent profit de l'utilisation de sondes moléculaires, figurent

l'hybridation sur colonies, l'hybridation d'ARN ou d'ADN extrait, la technique d'amplification par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ainsi que l'hybridation *in situ*. La plupart de ces techniques ne nécessitent pas l'isolement et la culture des micro-organismes, permettant ainsi l'étude de la diversité et des variations de composition des populations microbiennes (Brockman, 1995). La revue bibliographique sera restreinte au champ de la microbiologie de l'environnement et des bioprocédés de dépollution, étant donné la grande quantité d'articles scientifiques sur l'ensemble du sujet.

3.3.1. Hybridation sur colonies

L'échantillon contenant les micro-organismes d'intérêt est cultivé sur une gélose nutritive et les colonies résultantes sont par la suite transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon. Les cellules sont lysées et les acides nucléiques relâchés sont dénaturés et fixés sur la membrane afin de permettre l'hybridation (Brockman, 1995). Cette hybridation consiste en l'utilisation de sondes complémentaires à une séquence d'ARN ou d'ADN spécifique à une souche ou une population bactérienne qui pourrait se retrouver dans l'échantillon. Ces sondes peuvent être marquées radioactivement, par exemple au ^{32}P , ou à la digoxigénine (DIG) (Brockman, 1995). Braun-Howland *et al.* (1993), en utilisant cette technique, ont pu déterminer la présence de plusieurs espèces bactériennes dans l'eau de rivièreensemencée. En utilisant des séquences de l'ARN 16S ribosomal, ils ont pu révéler la présence des espèces *Pseudomonas*, *Comamonas* et *Acinetobacter*. Cependant, cette technique ne peut s'appliquer que dans le cas de micro-organismes cultivables.

3.3.2. Hybridation du matériel génétique extrait d'échantillons microbiens

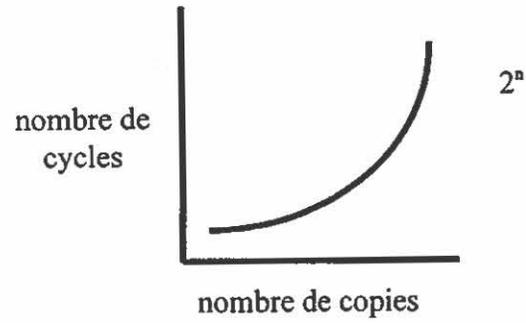
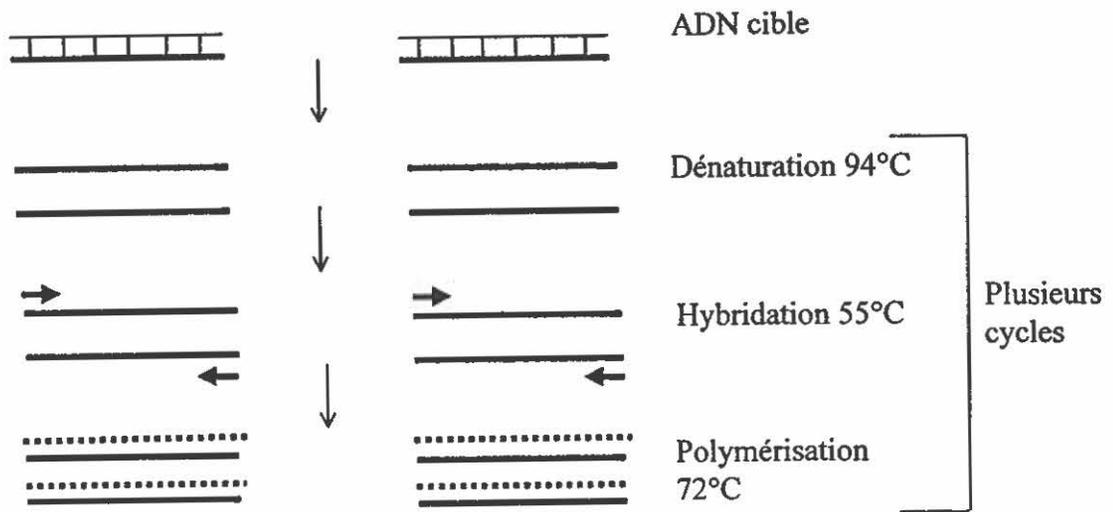
Cette méthode consiste à briser les micro-organismes présents dans les échantillons et d'en extraire le matériel génétique. L'ensemble du matériel représente l'empreinte

génétique de la diversité microbienne (Amann *et al.*, 1995). En utilisant le même type de sondes telles que décrites précédemment, il est possible de révéler la présence de micro-organismes spécifiques ou la présence de micro-organismes utilisant une voie métabolique bien spécifique. Cette technique a été utilisée par Hazen *et al.* telle que rapportée par Brockman (1995), afin de détecter la présence de gènes codant pour des enzymes métabolisant le trichloroéthylène (TCE) dans un site contaminé au TCE. Cependant, cette approche est certainement moins sensible que la technique du PCR (dont le seuil de détection s'élève à 10^2 - 10^3 copies de gènes par gramme de sol) car le seuil de détection s'élève à environ 10^5 copies de gènes par gramme de sol (Brockman, 1995).

3.3.3. Amplification par PCR

L'amplification par PCR réside dans la reproduction en multiples copies d'une portion d'un gène ou d'une région chromosomique ou plasmidique. Le fragment à amplifier est délimité par des amorces spécifiques, composées d'oligonucléotides. La séquence cible, présente en faible quantité au départ, peut donc être suffisamment abondante pour être révélée par exemple par électrophorèse sur gel d'agarose (Prescott *et al.*, 1995). Le PCR consiste en la répétition de nombreux cycles de dénaturation, d'hybridation et de polymérisation (Fig. 2). Ces cycles sont précisément définis par des changements de température déterminés. La première étape de dénaturation s'effectue à haute température (94°C) et permet la séparation des deux brins d'ADN. Par la suite, l'hybridation des amorces aux séquences complémentaires s'effectue à des températures moindres variant entre 40°C et 70°C selon la séquence des oligonucléotides et du type d'expérience réalisée. Finalement, la polymérisation enzymatique est optimale à une température de 72°C (Prescott *et al.*, 1995). Lorsque ce cycle est répété à plusieurs reprises, le produit d'amplification accroît de façon exponentielle rendant ainsi la technique des plus sensibles. Les fragments obtenus ont la possibilité d'être clonés et séquencés. Comme dans le cas précédent, le matériel

Figure 2: Principe de l'amplification par PCR



génétique d'un échantillon contenant les micro-organismes d'intérêt est extrait et celui-ci subit une amplification par PCR avec des amorces spécifiques aux micro-organismes d'intérêt ou aux gènes métaboliques d'intérêt. Une des premières applications de la technique PCR afin de détecter un micro-organisme ayant la capacité de dégrader un herbicide a été effectuée par Steffan *et al.* (1988). Dans cette étude, 100 cellules de *Pseudomonas cepacia* AC1100 ont pu être détectées après son inoculation dans 100 g de sédiments. Mentionnons aussi l'utilisation du PCR pour détecter un gène spécifique pouvant être impliqué dans la transformation d'un contaminant. Par exemple, Herrick *et al.* (1993) ont utilisé la technique d'amplification par PCR pour révéler la présence du gène impliqué dans le catabolisme du naphthalène parmi la microflore issue de site contaminé par ce composé.

Des méthodes dérivées de la technique d'amplification par PCR ont aussi été développées tels le PCR interne (nested PCR), le RT-PCR (Reverse transcriptase) et le PCR compétitif. Le PCR interne consiste à amplifier un fragment plus petit à partir des amplicons obtenus lors d'une première amplification. Cette technique permet d'augmenter la sensibilité mais aussi la spécificité. Cette technique a été appliquée entre autre par El Fantroussi *et al.* (1997) pour détecter les souches *Desulfomonile tiedjei* et *Desulfitobacterium dehalogenans* dans des sols contaminés artificiellement au chlorobenzoate. Ils ont pu détecter 1×10^3 bactéries *Desulfitobacterium dehalogenans* et 1×10^5 bactéries *Desulfomonile tiedjei* par gramme de sol.

Avec le RT-PCR, l'ARN sert de matériel génétique au lieu de l'ADN. Une première étape consiste à la transcription de l'ARN cible en ADN avec l'enzyme transcriptase inverse avant l'amplification par PCR. Cette technique offre non seulement la possibilité de révéler la présence de micro-organismes pouvant dégrader un composé mais aussi de détecter l'activité catabolique d'intérêt (Schneegurt et Kulpa, 1998).

Le PCR compétitif consiste, pour sa part, à co-amplifier l'ADN cible de l'échantillon en présence d'un fragment d'ADN standard de quantité connue (Galliland *et al.*, 1990). Ce fragment possède des séquences complémentaires aux amorces de l'ADN cible. L'amplification de l'ADN cible et de l'ADN compétiteur sera donc affectée de la même façon. L'ADN compétiteur est utilisé comme standard interne et est habituellement généré à partir de l'ADN cible, auquel on a procédé à l'insertion d'un site de restriction ou encore à une courte délétion ou insertion afin de les distinguer par la taille par électrophorèse sur gel d'agarose (Schneegurt et Kulpa, 1998). En microbiologie environnementale, le PCR compétitif a été utilisé afin d'évaluer le potentiel génétique de sols contaminés pour dégrader certains polluants en quantifiant la présence des gènes impliqués dans leur dégradation. Par exemple, Wilkström *et al.* (1996) ont appliqué le PCR compétitif pour détecter et quantifier la présence du gène codant pour la catéchol 2,3-dioxygénase, une enzyme clé dans la dégradation des composés aromatiques.

L'application de la technique du PCR au domaine de l'environnement peut s'avérer très utile dans l'étude des communautés microbiennes mixtes. Cependant, des contaminations lors des manipulations peuvent survenir et mener à l'obtention de signal faux positifs. Également, par la méthode d'amplification par PCR, l'ADN amplifié est celui retrouvé dans l'ensemble de l'échantillon et non seulement l'ADN des cellules vivantes. Ainsi, il est fréquent d'amplifier des fragments d'ADN libre provenant de cellules mortes mais dont l'ADN, molécule assez stable, n'a pas encore été détruit (Schneegurt et Kulpa, 1998). La détection de ces micro-organismes peut donc entraîner une interprétation erronée de l'identification et la présence de micro-organismes à un temps donné ainsi que pour leur quantification. Il est possible d'appliquer la technique du RT-PCR qui permet d'amplifier directement les fragments d'ARN et qui indiquerait en temps réel la composition d'une microflore précise. Cependant, l'ARN est une molécule beaucoup plus instable et la technique est plus difficile à appliquer. De plus, la présence d'inhibiteurs dans l'environnement d'où

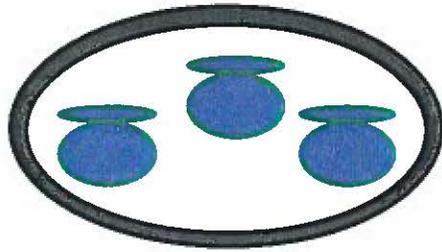
provient l'échantillon peut parfois nuire à la réaction de PCR (Schneegurt et Kulpa, 1998).

4. Hybridation *in situ*

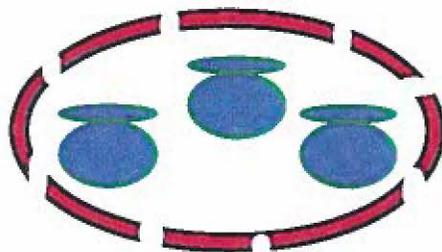
La technique d'hybridation *in situ* est la principale méthode de détection bactérienne utilisée dans le travail de recherche présenté ici. Le choix de cette technique permet de contourner l'étape de culture et également d'effectuer une détection en temps réel des micro-organismes présents. Dans cette section, les principes, les particularités techniques et les avantages et inconvénients de la méthode seront détaillés. L'hybridation *in situ* consiste à faire pénétrer, à l'intérieur d'un micro-organisme visé, une sonde constituée d'un oligonucléotide (18 à 24 nucléotides) couplée à un fluorochrome (Fig. 3). En général, l'oligonucléotide est complémentaire à une séquence spécifique à l'ARN 16S ribosomal (voir section 5). La détection des cellules ayant hybridé avec la sonde fluorescente peut ainsi se faire par un microscope à épifluorescence, un microscope confocal ou un cytofluoromètre en flux (voir section 7).

Avant d'effectuer l'hybridation *in situ*, une première étape de fixation des cellules est requise. En effet, les cellules doivent être fixées afin que les constituants de la cellule restent en place. Celles-ci doivent conserver leur structure cellulaire car dans le cas contraire, la détection par microscopie ou cytométrie peut se révéler impossible. Également, les molécules cibles tel l'ARN ribosomal, doivent rester à l'intérieur de la cellule afin de réaliser les étapes subséquentes de la technique. Des traitements qui permettent des liaisons croisées entre les molécules à l'intérieur de la cellule, comme par exemple la paraformaldéhyde et la glutéraldéhyde (Schramm *et al.*, 1998, Hess *et al.*, 1997, Wallner *et al.*, 1997) ainsi que des agents précipitants tels que l'éthanol (Schönhuber *et al.*, 1999, Amann *et al.*, 1997) sont le plus souvent utilisés. La méthode de fixation peut varier selon les espèces. Par exemple, Loge *et al.* (1999) ont

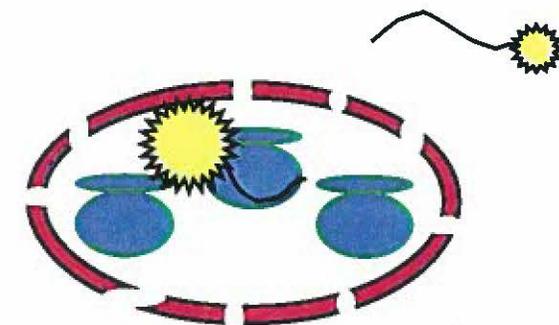
Figure 3 : Principe de l'hybridation *in situ*



Centrifugation afin de récupérer les cellules



Fixation et perméabilisation



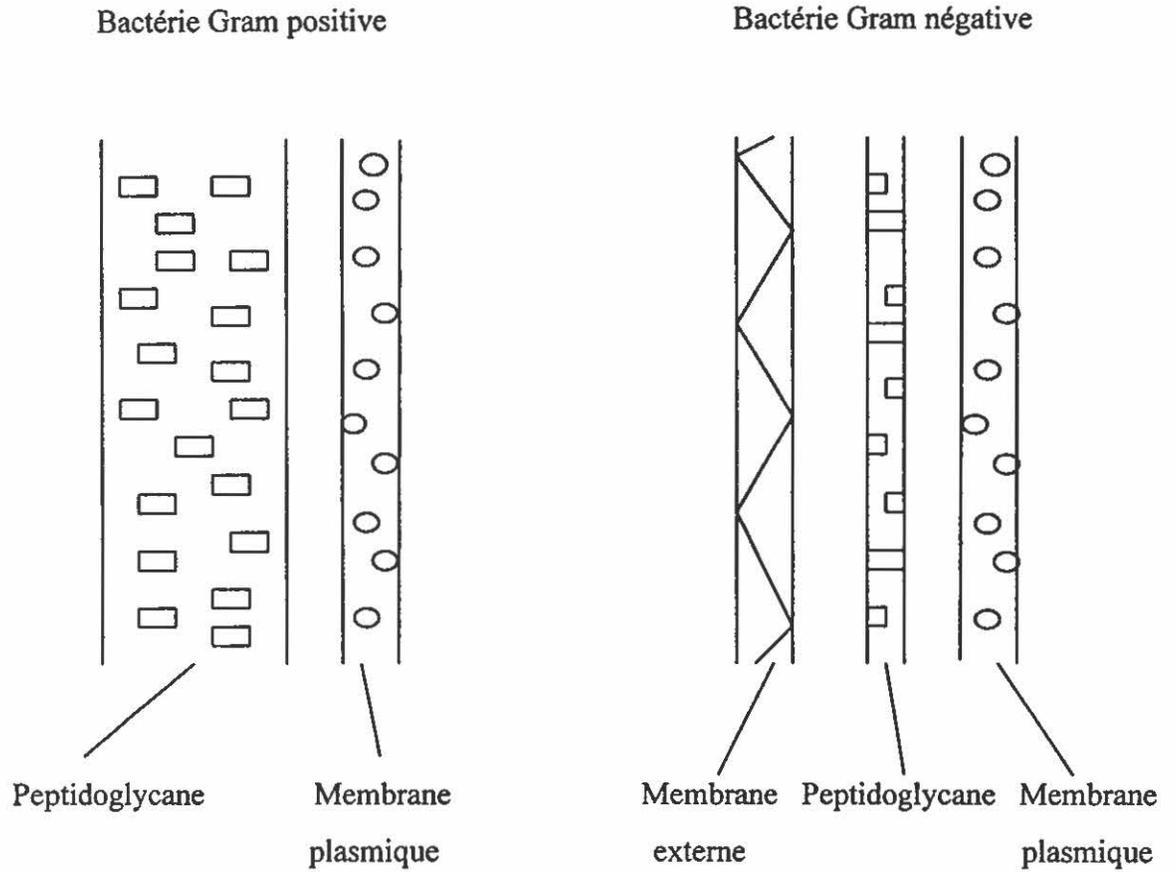
Hybridation des sondes fluorescentes
aux ribosomes

Détection des cellules fluorescentes
par cytométrie en flux ou par
microscopie

utilisé la fixation à la paraformaldéhyde pour les bactéries Gram négatives et l'éthanol pour les bactéries Gram positives.

Habituellement, l'étape de fixation entraîne aussi une perméabilisation de la paroi cellulaire (Amann *et al.*, 1995) mais quelques espèces, souvent des bactéries de type Gram positif, nécessitent un traitement supplémentaire pour achever la perméabilisation. L'accessibilité des sondes jusqu'à la cible ne peut s'effectuer que par l'établissement d'un protocole de perméabilisation efficace de la paroi cellulaire. La paroi cellulaire forme une enveloppe et détermine la morphologie distincte des bactéries. Elle sert de barrière sélective en prévenant la sortie de certains enzymes et l'entrée de substances toxiques mais laissant pénétrer les nutriments nécessaires. La paroi des bactéries Gram positives est composée presque exclusivement d'une épaisse couche de peptidoglycane (25 à 35 nm) et contient des acides teichoïques. Les chaînes de peptidoglycane des bactéries Gram positives sont reliées par des ponts interpeptidiques pour former une couche compacte. Les parois des bactéries Gram négatives sont plus complexes et plus hétérogènes. Elles possèdent une membrane externe formée de phospholipides, de lipoprotéines et de lipopolysaccharides couvrant la mince couche de peptidoglycane. Celle-ci n'est pas reliée par des pontages interpeptidiques et présente donc une couche plus lâche. La couche de peptidoglycane et la membrane externe sont séparées par l'espace périplasmique (Fig. 4). Les parois cellulaires de l'ensemble des bactéries ont cependant des structures hétérogènes dépendant des espèces et varient considérablement selon les conditions de culture (Prescott *et al.*, 1995). Ainsi, lorsqu'on veut établir des protocoles de perméabilisation, il faut tenir compte de ces différences. Parfois, la perméabilisation peut avoir été réussie mais la dimension des perforations ne sont pas assez grandes pour laisser pénétrer des molécules de plus grande taille que les oligonucléotides (Amann *et al.*, 1995). Il faut aussi conserver l'intégrité des constituants tout en effectuant une perméabilisation et cela sans provoquer une lyse cellulaire. À cette étape, de nombreuses alternatives sont pratiquées telles que l'utilisation d'enzymes tels le

Figure 4: Parois cellulaires des bactéries Gram positives et Gram négatives*.



Tiré de Prescott *et al.*, 1995

lysozyme, la protéinase K ou la mutanolysine (Schuppler *et al.*, 1998, Tani *et al.*, 1997, Tolker-Nielsen *et al.*, 1997, Hodson *et al.*, 1995); de détergents tels le SDS, le Tween ou le Nonidet P-40 (Christensen *et al.* 1999, Erhart *et al.*, 1997, Wallner *et al.*, 1996); d'HCl (Macnaughton *et al.*, 1994); de phages (Bidnenko *et al.*, 1998); d'agents antimicrobiens (Maftah *et al.*, 1993); et de mélange méthanol-formaldéhyde (Braun-Howland *et al.*, 1992). Dans le cas d'utilisation de détergent, celui-ci est fréquemment ajouté au tampon d'hybridation (Christensen *et al.*, 1999, Franks *et al.*, 1998).

L'hybridation est effectuée en présence des cellules fixées et perméabilisées et des sondes fluorescentes, à des températures variant entre 46°C et 55°C (Wagner *et al.*, 1998, Cary *et al.*, 1997) pendant 1 à 18 heures, (Hahn *et al.*, 1992, Christensen *et al.*, 1999) selon les sondes utilisées et le type d'expérience effectué.

Les avantages de cette technique sont nombreux. Principalement, elle ne nécessite pas la culture des micro-organismes à détecter. Ce facteur est important étant donné le faible nombre de bactéries cultivables, surtout dans le domaine de l'environnement où la proportion de bactéries cultivables peut se situer de 0,001% dans l'eau de mer à 15% dans des bioprocédés (Amann *et al.* 1995). Également, la méthode d'hybridation *in situ* représente une méthode de détection avantageuse des micro-organismes car elle informe en temps réel grâce à la fixation des composantes cellulaires avant d'effectuer l'hybridation. L'utilisation de l'ARN ribosomal comme cible représente aussi un élément pratique du procédé d'hybridation *in situ* (voir section 5).

La technique peut toutefois présenter quelques désagréments et problèmes techniques. Tout d'abord, l'hybridation *in situ* permet de détecter des cellules entières. Il est donc primordial de s'assurer d'avoir une quantité minimale de cellules nécessaire pour pouvoir les déceler au-delà de la limite de détection des outils disponibles tels que la microscopie et la cytométrie en flux. L'échantillon à analyser doit donc être concentré. Dans le cas des échantillons d'eau par exemple, ils peuvent être facilement filtrés.

Cependant, dans le cas des échantillons de sol, la tâche devient plus complexe en raison des particules inorganiques dont il faut se débarrasser avant de tenter une concentration des cellules. De plus, si les micro-organismes visés ne représentent qu'une petite partie de la population totale, les seuils de détection restent à nouveau problématiques.

5. L'ARN ribosomal, cible de l'hybridation *in situ*

Bien que l'ARN ribosomal peut constituer la cible d'autres techniques moléculaires présentées antérieurement, elle représente un des avantages importants de la technique d'hybridation *in situ*. Les principaux bénéfices de ce choix par rapport à l'hybridation *in situ* seront donc détaillés dans la présente section. Tout d'abord, l'ARNr entre dans la composition des ribosomes, complexes responsables de la synthèse des protéines à l'intérieur de la cellule. Étant donné leur rôle capital, ceux-ci sont toujours présents en grande quantité. On retrouve, selon les différentes espèces, des contenus en ribosomes allant de 10^3 à 10^5 ribosomes par cellule (Amann *et al.*, 1995). L'abondance de l'ARNr cellulaire peut aussi varier jusqu'à un ordre de magnitude pour une même souche en relation avec le taux de croissance. Ainsi, la quantité relative d'ARNr peut donc indiquer l'activité physiologique de la population visée (DeLong *et al.*, 1989). Lors d'une hybridation, la sonde pourra s'hybrider à une grande quantité de séquences complémentaires au lieu d'une seule si, par exemple, la cible avait été l'ADN. Il s'agit donc d'une amplification naturelle de la cible qui résultera d'une amplification du signal (Porter *et al.*, 1996).

Également, les séquences d'ARNr sont composées à la fois de fragments hautement conservés parmi les différentes espèces et de fragments hautement variables entre celles-ci. Les séquences conservées permettent la détection de l'ensemble des micro-organismes en utilisant des sondes dites universelles à toutes les espèces. On peut ainsi récupérer des informations sans discrimination du royaume, du genre ou de l'espèce.

Les séquences très variables permettent davantage de se renseigner sur une espèce ou un genre spécifique à l'intérieur d'une flore diversifiée. Les sondes utilisées ne s'hybrideront alors qu'avec la séquence complémentaire hautement spécifique. Des renseignements sur les séquences d'ARNr de plus en plus d'espèces sont disponibles sur les bases de données et ils permettent de connaître la spécificité de certaines séquences par rapport à quantité d'autres espèces connues (Porter *et al.*, 1996).

Les sondes moléculaires peuvent être déterminées sans étape de culture. En premier lieu, il est nécessaire d'extraire les acides nucléiques de l'échantillon de l'environnement. À partir de ceux-ci, le processus se poursuit par l'amplification des fragments des gènes de l'ARN ribosomal qui correspondent aux différents micro-organismes présents. Il est ensuite possible de connaître les séquences de ces gènes en clonant et séquençant ces fragments. L'amplification des fragments d'ADN ribosomal s'effectue à partir d'amorces universelles afin de récupérer l'information sur l'ensemble de la microflore présente. Les séquences obtenues peuvent alors être analysées à partir de bases de données disponibles afin de tenter d'identifier les micro-organismes. Aussi, lorsqu'une bactérie possède une séquence d'ADNr distincte, il est possible de sélectionner une séquence de 18 à 24 nucléotides afin d'en faire une sonde spécifique à la souche bactérienne intéressante. Cette séquence se retrouve souvent dans une région présentant le plus de variabilité afin d'obtenir une séquence des plus spécifiques possibles.

Le choix de la cible, l'ARNr, offre certes, de nombreux avantages, mais peut également faire survenir des inconvénients. Il a déjà été mentionné plus haut qu'il existe une corrélation entre le contenu cellulaire en ARNr et le taux de croissance (DeLong *et al.*, 1989). Par conséquent, les micro-organismes à croissance lente ainsi que ceux en état de latence ne pourront être que difficilement détectés à cause de leur faible contenu en ARNr et donc par la faible possibilité d'hybridation des sondes. Généralement, le contenu en ARNr diminue en relation avec le taux de croissance et il

peut donc s'avérer difficile de détecter des micro-organismes en fin de croissance.

Il est aussi possible d'augmenter la sensibilité de l'hybridation *in situ* en procédant à un marquage multiple. Il y a alors utilisation de plusieurs oligonucléotides marqués qui visent deux ou plusieurs sites de la même sous-unité du ribosome (par exemple 16S) ou d'une autre sous-unité (par exemple les sous-unité 16S et 23S). Ainsi, si les hybridations réussissent, davantage de fluorescence peut provenir d'une seule cellule. D'ailleurs, la fraction de micro-organismes marqués semble augmenter significativement au moyen de cette approche. L'équipe de Lee *et al.* (1993) ont employé cette technique en créant sept sondes, spécifiques et universelles, visant des sites indépendants des molécules d'ARNr. Parmi les sept sondes, cinq ont pu hybrider des bactéries planctoniques provenant d'un échantillon marin. La fluorescence a augmenté linéairement en fonction du nombre de sondes hybridées, passant d'un marquage de 20% (1 sonde) à 75% (5 sondes) de la population totale. Toutefois, le principal obstacle de cette approche consiste en l'accessibilité souvent limitée des séquences d'ARNr spécifiques et qui permettent l'identification d'une espèce bactérienne particulière.

L'utilisation de plusieurs sondes visant différentes parties de l'ARNr peut présenter un avantage dans la distinction de diverses populations. Il suffit de choisir des séquences cibles qui représentent différentes espèces par exemple, et de marquer les oligonucléotides respectifs avec des fluorochromes qui émettent à des longueurs d'onde distinctes. Ainsi, une certaine population peut être détectée par la fluorescence verte tandis que l'autre sera révélée par le détecteur de la fluorescence bleue (Amann *et al.*, 1995).

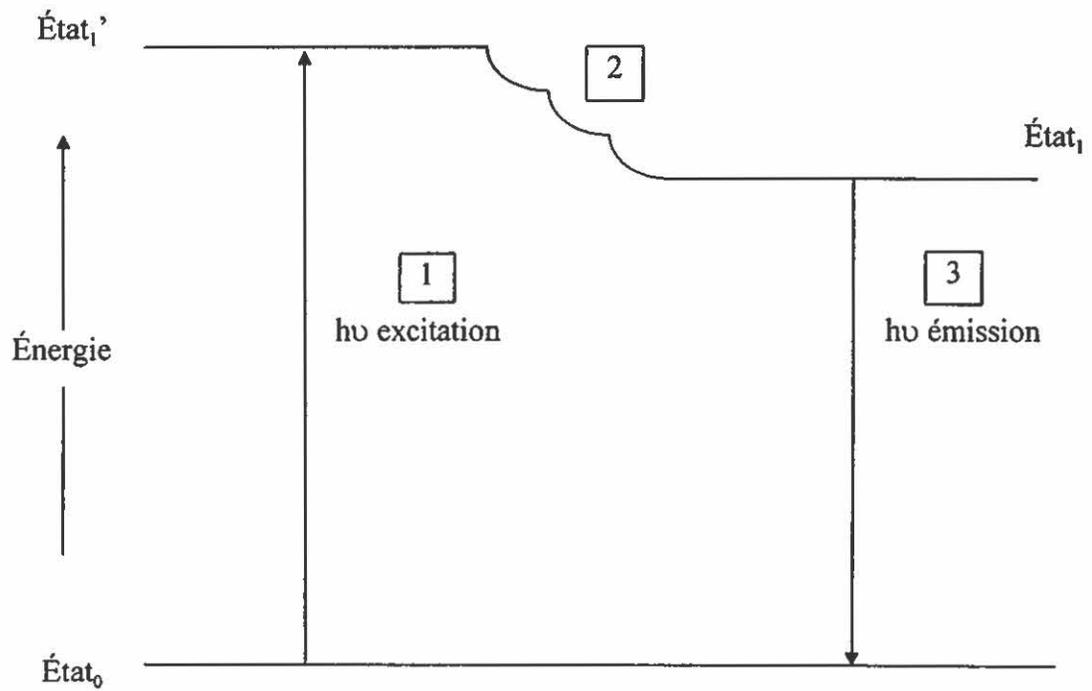
6. Fluorescence et fluorochromes

Les molécules fluorescentes, ou fluorochromes, couplées aux oligonucléotides sont

des molécules ayant la capacité d'émettre de la lumière à une longueur d'onde précise. Le principe de la fluorescence est présenté à la figure 5. Un photon d'une longueur d'onde précise, provenant d'une source d'excitation (lampe ou rayon laser) est absorbé par le fluorochrome. Celui-ci éprouve une conformation (État₁, étape 1) dans laquelle un électron est parvenu à un état d'excitation supérieur. Cet état n'existe que pendant une petite parcelle de temps, entre 1 à 10 X 10⁻⁹ seconde. Pendant ce temps, le fluorochrome change à nouveau de conformation (État₂, étape 2) et l'énergie se dissipe partiellement; l'état d'excitation est moindre. Par la suite, la molécule émet une énergie à une longueur d'onde précise et retourne à son état initial (État₀, étape 3). C'est cette énergie qui est captée par l'appareil utilisé (Johnson, 1996). L'énergie du photon d'émission étant moindre que celle d'excitation, la longueur d'onde d'émission est plus élevée que la longueur d'onde d'excitation. Cette différence de longueur d'onde entre celle d'excitation et d'émission est nommée le "Stokes shift" (Johnson, 1996).

Les fluorochromes peuvent être ajoutés librement à la suspension cellulaire ou être liés à des sondes spécifiques, oligonucléotides ou anticorps. Les fluorochromes libres peuvent se lier ou réagir avec certaines molécules telles que les protéines, l'ADN, l'ARN ou ne peuvent pénétrer ou être exclu de la cellule qu'en cas de perte d'intégrité membranaire. Certains changent de conformation qu'en fonction du pH interne de la cellule ou encore agissent comme substrat en vue de mesurer une activité enzymatique particulière (Davey et Kell, 1997). Parmi les fluorochromes non spécifiques qui peuvent s'insérer dans les molécules d'ADN, se retrouvent le bromure d'éthidium, l'iodure de propidium ainsi que le DAPI (4', 6'-diamino-2-phenylindole) (figure 6). Ce type de fluorochromes peut être utilisé lors d'application de protocoles d'hybridation *in situ* afin de distinguer les débris ou particules de sol de l'ensemble des micro-organismes présents (Thomas *et al.*, 1997).

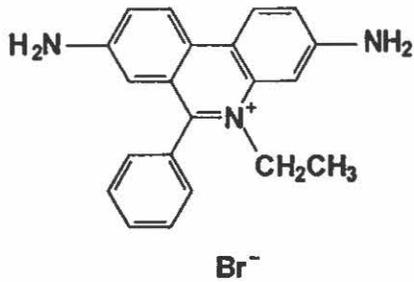
Figure 5: Principe responsable de l'émission de fluorescence par les fluorochromes
(Diagramme de Jablonski)



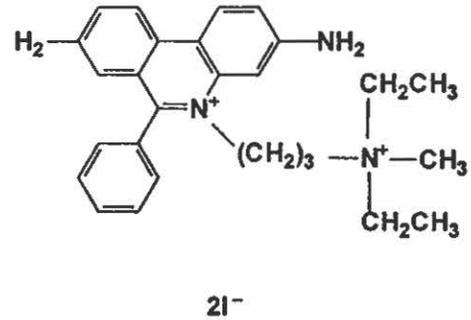
Les fluorochromes, chimiquement couplés à une macromolécule, telle qu'un anticorps ou un oligonucléotide, sont habituellement des molécules ayant une faible affinité spécifique pour les molécules biologiques. Parmi les plus utilisés, se retrouvent le FITC (fluorescéine isothiocyanate), la rhodamine 123, TRITC (tetramethylrhodamine-5-6-isiothiocyanate) ainsi que les fluorochromes CY3 et CY5 (Fig. 6). Ces molécules se distinguent entre elles par leurs spectres d'excitation et d'émission spécifiques ainsi que leur coefficient d'extinction molaire et leur rendement quantique théorique (quantum yield). Ces deux dernières caractéristiques renseignent respectivement sur leur capacité d'absorption de la lumière à une certaine longueur d'onde et la probabilité que l'absorption d'un photon mène à l'émission de fluorescence. Ainsi l'intensité de la fluorescence est proportionnelle au produit du coefficient d'extinction et du rendement théorique (Davey et Kell, 1996). Également, entre les fluorochromes diffèrent leur photostabilité, leur sensibilité au pH et leur stabilité dans différents milieux. Ainsi, le choix du fluorochrome peut s'effectuer en fonction des appareils disponibles ayant la capacité d'émettre aux longueurs d'onde d'excitation (dépendante de la source d'excitation) et de percevoir la longueur d'onde d'émission (dépendante des détecteurs). Le choix peut aussi relever de la nature du milieu de suspension des cellules (par exemple son pH), de la taille du fluorochrome ou de sa capacité à effectuer une liaison avec une autre molécule.

Les appareils qui peuvent détecter la fluorescence sont tous équipés d'une source d'illumination, donc d'excitation. Ces sources peuvent être, par exemple, des lampes au mercure projetant une série de longueurs d'onde de façon continue ou un rayon laser qui possède la capacité d'émettre certaines longueurs d'onde précises. L'appareil doit aussi posséder des filtres optiques qui permettent d'isoler les photons d'émission des photons d'excitation. Il doit également être muni de détecteurs qui enregistrent les photons d'émission et produisent des données observables, soit une image ou un signal électrique.

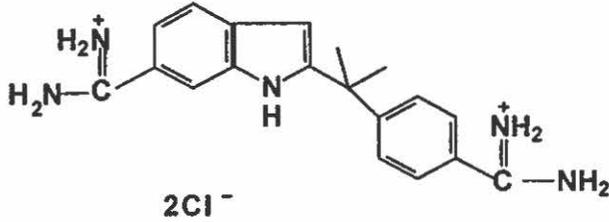
Figure 6 : Structures chimiques de différents fluorochromes



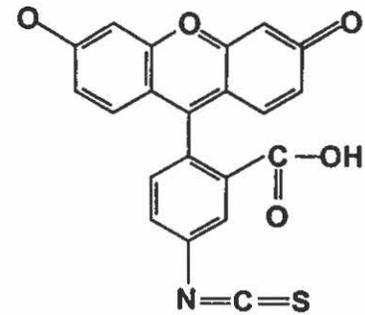
Bromure d'éthidium
(BrEt)



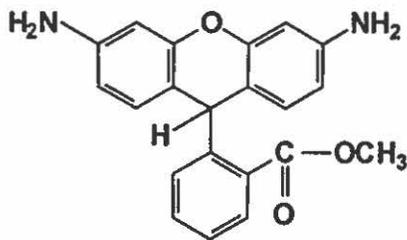
Iodure de propidium



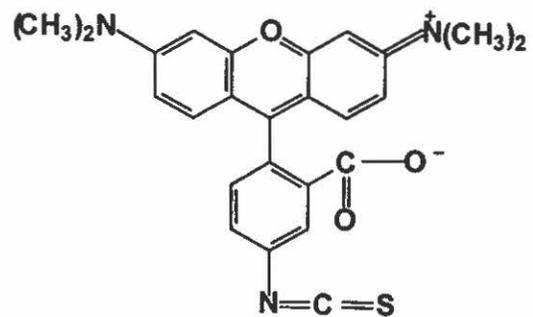
4'-6'-diamidino-2-phénylindole, dihydrochloride
(DAPI)



Fluorescéine-5-isothiocyanate
(FITC)



Dihydrhodamine 123



Tetraméthylrhodamine 5-isothiocyanate
(5-TRITC)

7. Instruments d'observation des cellules fluorescentes

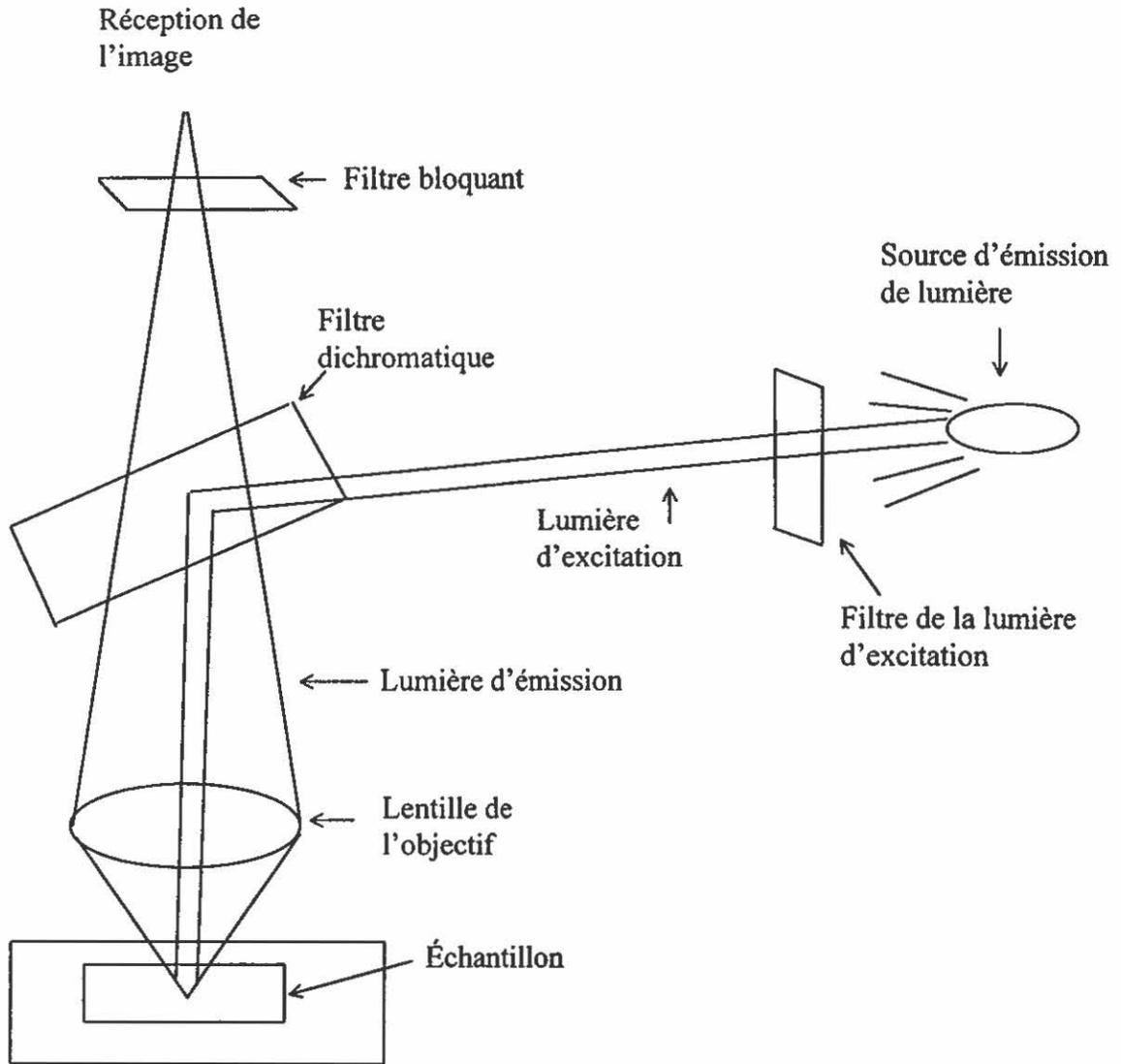
L'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes résulte en un marquage des cellules cibles. Le signal de fluorescence émis par ces cellules est détecté à l'aide d'appareils spécialisés tels que les microscopes à épifluorescence et confocal ainsi que le cytomètre en flux.

La fixation des cellules et le maintien de leur forme pendant les opérations permettent la détection par microscopie ou cytométrie en flux. Premièrement, la combinaison de la technique d'hybridation *in situ* avec les analyses par cytométrie en flux laisse envisager les avantages considérables des analyses quantitatives en découlant. Ainsi, il est possible de quantifier, par exemple, le pourcentage de la population totale marquée par la sonde utilisée, de comparer les niveaux de fluorescence de façon non subjective ou encore d'effectuer des analyses multiparamétriques, et ce à de hautes vitesses d'analyse (Davey et Kell, 1996, Porter *et al.*, 1996). Pour sa part, la combinaison de la fixation des cellules avec la microscopie, particulièrement le microscope confocal, permet de situer la ou les espèces microbiennes visées dans leur environnement immédiat. Cet avantage peut amener à approfondir les relations entre les divers micro-organismes qui se côtoient étroitement, par exemple à l'intérieur d'un biofilm.

7.1. Microscope à épifluorescence

Le microscope à épifluorescence (Fig. 7) est constitué d'une source d'émission de lumière de plusieurs longueurs d'onde. Celle-ci passe à travers un premier filtre qui ne laisse franchir que la longueur d'onde d'excitation appropriée. Ce rayon d'excitation est réfléchi par un filtre dichromatique et converge au foyer de l'échantillon par la lentille de l'objectif. Les molécules fluorescentes de l'échantillon sont donc excitées et émettent à leur tour une lumière à une longueur d'onde spécifique (Lodish *at al.*, 1995). Cette lumière est à nouveau convergée par la lentille d'objectif et passe à

Figure 7: Principe du microscope à épifluorescence



travers du filtre dichromatique pour franchir un dernier filtre qui bloque la lumière résiduelle de la source d'excitation (Lodish *et al.*, 1995). L'un des désavantages du microscope à épifluorescence réside en l'interférence de la lumière provenant du haut et du bas du plan au foyer. Ces images, provenant de l'échantillon mais hors foyer, nuisent à la clarté de l'observation de l'objet d'intérêt.

7.2. Microscope confocal

En microscopie confocale, les minuscules ouvertures placées à l'extrémité du laser et des détecteurs de fluorescence éliminent les sources d'interférence provenant de la lumière environnante. La lumière provenant d'en haut et d'en bas du plan au foyer n'est pas incluse lors de la formation d'image. Cette image peut donc être considérée comme une mince section numérisée avec une épaisseur théorique de 0,2 μm dépendant des lentilles utilisées et de l'ampleur des ouvertures (Caldwell *et al.*, 1992). Ainsi, la lumière émise d'une sonde moléculaire peut être mesurée de façon précise. Le microscope laser peut, non seulement produire des images 2-D claires et définies mais également des images 3-D. Plusieurs plans séquentiels d'images 2-D sont alors numérisés tandis qu'une analyse est performée simultanément dans la troisième dimension. La structure analysée peut être projetée en des couleurs variées ou translucide pour visualiser un objet à l'intérieur d'un autre ou peut être visualisée en rotation. Parmi les quelques limitations de l'utilisation de cet appareil réside le temps de balayage du rayon laser. Meilleure est la qualité de l'image, plus le temps d'analyse est lent. Également, l'autofluorescence du milieu peut parfois masquer la fluorescence du colorant utilisé pour visualiser la structure ou l'objet ciblé (Caldwell *et al.*, 1992).

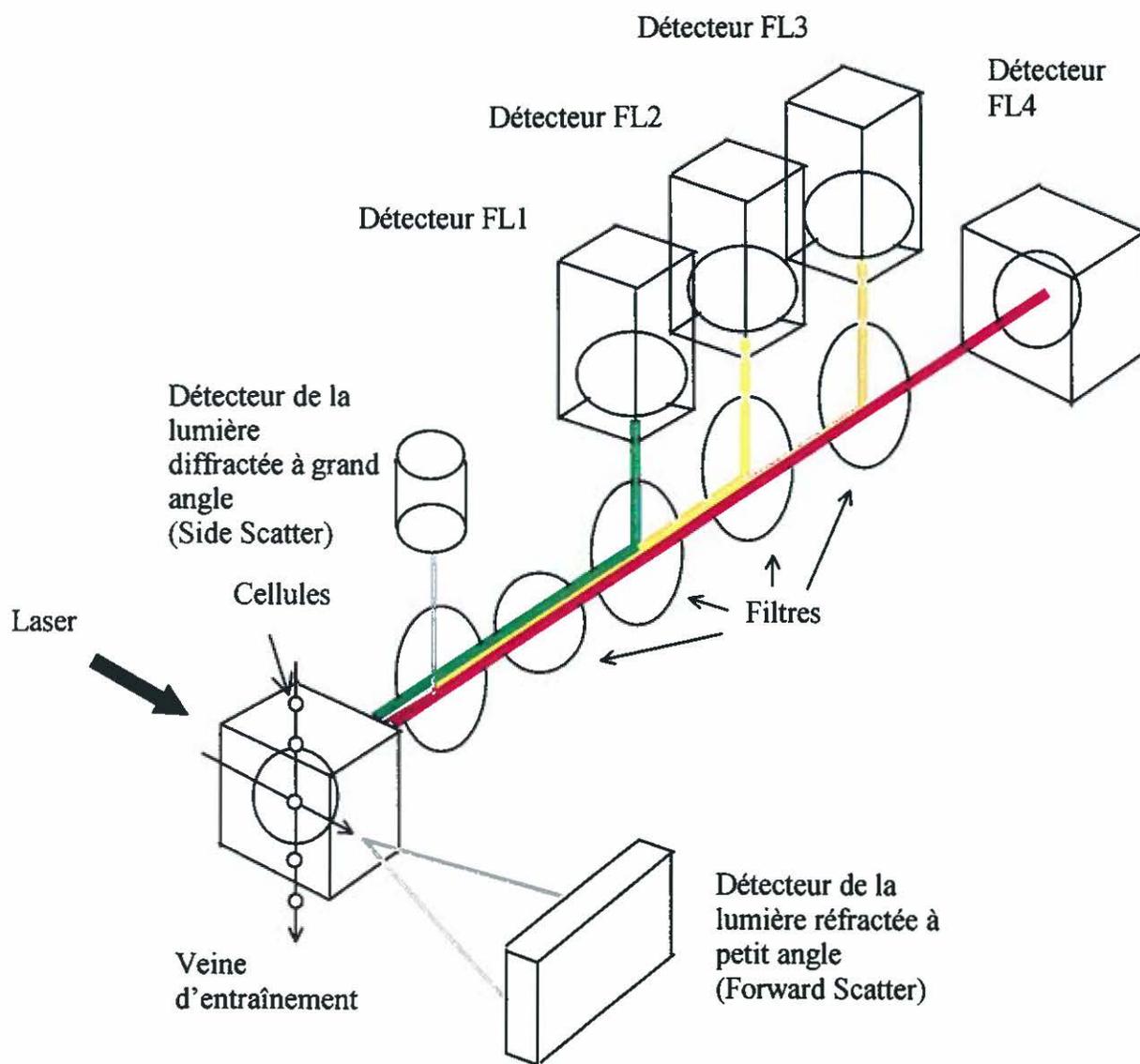
Les micro-organismes créent leur propre micro-environnement où il est difficile de s'y retrouver sans outil adéquat. Ainsi, les micro-écosystèmes comprennent biofilms, agrégats de sol, consortium anaérobies et autres communautés microbiennes organisées spatialement et à l'intérieur desquels existent nombre d'échanges internes et liaisons

physiques particuliers à chacun de ces environnements. L'introduction de la technologie du microscope confocal laser et de l'analyse d'image en trois dimensions a permis l'établissement de nouveaux standards de précision. L'analyse par ordinateur permet la création d'image numérique et ainsi d'éliminer l'interférence d'objets hors foyer pour créer des reconstructions 3-D de biofilms. Il est donc possible de visualiser non seulement les micro-organismes eux-mêmes selon un plan à deux dimensions, mais aussi leur positionnement, leur croissance et leur métabolisme dans le système en plus des environnements physico-chimiques et biochimiques encadrant chaque cellule (Caldwell *et al.*, 1992).

7.3. Cytofluoromètre en flux

L'appareil de cytométrie en flux est muni d'une pompe permettant au fluide de passer par un tube étroit par lequel l'échantillon à analyser converge. Les cellules traversent ainsi, par la pression hydrodynamique, au milieu du fluide d'entraînement, la zone d'illumination, provenant de la source d'excitation. La pression peut être modifiée afin d'obtenir des veines d'entraînement de différentes circonférences et ainsi laisser défiler différents débits de cellules par seconde. Des taux de 100 jusqu'à 1000 cellules par seconde peuvent permettre des analyses individuelles de cellules (Wallner *et al.*, 1997). Comme le cytomètre ne fait pas de différence entre les cellules et les particules non biologiques, le terme événement est plutôt employé pour décrire les mesures au cytomètre. Des filtres laissant franchir des longueurs d'onde sélectionnées sont suivis de détecteurs appropriés qui mesurent l'ampleur de l'impulsion de la dispersion de lumière. Ces mesures d'impulsions sont numérisées par différents canaux afin de présenter des histogrammes et de révéler par conséquent le nombre de cellules possédant une certaine propriété quantitative par rapport à une mesure donnée, telle que la mesure de la réfraction de lumière (Davey et Kell, 1996). Parmi les mesures pouvant être effectuées, on retrouve tout d'abord le profil de dispersion de lumière de la population analysée. Il consiste en des mesures des diffractions de lumière à grand

Figure 8: Principe du cytomètre en flux



angle et à petit angle. La première valeur est jaugée à angle droit (Side Scatter ou SS) et représente la lumière réfractée par les constituants cellulaires; elle évalue la granulosité des différents micro-organismes. La seconde valeur est mesurée à petit angle car elle évalue plutôt la lumière réfractée par la cellule elle-même (Forward Scatter ou FS); c'est donc une estimation de la dimension des cellules. De plus, le cytomètre en flux évalue la mesure de la fluorescence de certains fluorochromes ou de l'autofluorescence de l'échantillon. L'autofluorescence réfère à la contribution des constituants cellulaires dans l'émission de fluorescence lorsque les cellules subissent une excitation à une certaine longueur d'onde. L'émission de fluorescence qui peut être observée dépend des filtres et détecteurs utilisés. Ainsi, dans le cytomètre illustré à la figure 8, le détecteur FL1 récolte l'étendue des longueurs d'onde autour de 525 nm, la fluorescence verte, le détecteur FL2 récolte les longueurs d'onde variant autour de 575 nm, fluorescence jaune, FL3 collecte la fluorescence orange, les longueurs d'onde aux environs de 620 nm tandis que les longueurs d'onde près de 660 nm, la fluorescence rouge, sont détectées par FL4. Ces longueurs d'onde sont séparées par les différents filtres précédant chaque détecteur (Shapiro, 1995). De légères variations peuvent survenir d'un type de cytomètre à un autre. Par la suite, les impulsions mesurées par les détecteurs sont numérisées afin d'être traduites en données observables sur des histogrammes.

Les données enregistrées sont habituellement présentées sous forme de courbes de distribution de fréquence dans laquelle l'abscisse représente l'ampleur du paramètre (type de fluorescence ou de dispersion de lumière) mesuré tandis que l'ordonnée exprime le nombre d'événements possédant une valeur donnée du paramètre. Par exemple, dans la figure 9B, le deuxième histogramme présente le résultat du signal de fluorescence enregistré par le canal FL1 (la fluorescence verte) sur l'axe des x par rapport à la distribution d'événements pour chaque valeur de fluorescence enregistré. Des histogrammes dans lesquels les données de deux paramètres, représentés en x et y , peuvent aussi être utilisés et chaque point désigne un événement selon les mesures des

deux paramètres (Davey et Kell, 1996). Par exemple, le premier histogramme de la figure 9A présente les données enregistrées pour chacun des événements passant dans la veine d'entraînement pour les valeurs de dispersion de la lumière, c'est-à-dire la lumière réfractée par les constituants cellulaires (SS log) et diffractée par la cellule elle-même (FS log). Aussi, il est possible de présenter les données de deux signaux de fluorescence pour chacun des événements, tel que présenté dans le troisième histogramme (Fig. 9C) où la fluorescence enregistrée au canal FL1 est présentée par rapport à la fluorescence enregistrée au canal FL3.

L'application de la cytométrie en flux aux micro-organismes s'est récemment développée et semble encore en pleine expansion. Cependant, quelques ajustements techniques sont nécessaires, tels que diminuer le fort bruit de fond lors d'analyses de bactéries. En effet, les cytomètres en flux sont, pour la plupart, conçus pour effectuer l'analyse de cellules eucaryotes de taille plus volumineuse et aussi lors de diagnostics médicaux (Wallner *et al.*, 1997). Plusieurs protocoles de coloration ont donc dû être adaptés pour des applications microbiologiques. Ainsi, plusieurs mises en pratique ont été réalisées dans les domaines de la microbiologie alimentaire, marine, environnementale et clinique (Shapiro, 1995).

8. Hybridation *in situ* appliquée à la microbiologie de l'environnement

Plusieurs expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées dans le domaine de l'environnement depuis la toute première étude effectuée par Delong *et al.* (1989). Cette équipe a effectué la première expérience d'hybridation *in situ* en réussissant à visualiser par microscopie à épifluorescence, des cellules fixées d'*Escherichia coli* par l'hybridation d'une sonde spécifique à l'ARN 16S ribosomal de la souche. Ils ont aussi remarqué que l'intensité de fluorescence a varié en fonction du taux de croissance et par rapport à la quantité d'ARN présent à l'intérieur des cellules. C'est donc de cette première étude qu'ont découlé les futures applications dans le domaine

de la microbiologie de l'environnement.

Une des premières applications de l'hybridation *in situ* dans le sol a été effectuée par l'équipe de Hahn *et al.* en 1992 qui a développé deux séries d'expériences. Pour ces expériences, ils ont utilisé la sonde universelle EUB 338, qui reconnaît les gènes 16S dans toutes les eubactéries, couplé au fluorochrome tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC), et détecté celles-ci par microscopie à épifluorescence. Premièrement, les auteurs ontensemencé 10^6 cellules de *Pseudomonas aeruginosa* dans différents sols stérilisés et dans lesquels la teneur en matière organique variait entre 1% et 62%. Ils ont pu démontrer, indépendamment du sol utilisé, la présence de cette bactérie par hybridation *in situ*. L'autofluorescence était cependant plus intense dans les sols contenant le plus de matière organique (62%) car les composantes organiques émettaient elles-mêmes de la fluorescence qui camouflait la fluorescence spécifique des cellules marquées. Le dénombrement effectué a permis de visualiser entre 6% et 68% de l'ensemble des cellulesensemencées. Deuxièmement, les mêmes auteurs ont expérimenté, dans un sol sablonneux, la détection par hybridation *in situ* de la flore indigène avec la sonde EUB 338 en plus de la bactérie *Pseudomonas cepacia*ensemencée. La sonde spécifique à l'ARN 23S ribosomal de cette bactérie couplé au fluorochrome TRITC a été utilisée. Ils ont pu révéler la présence de *Pseudomonas cepacia*ensemencée dans ce sol mais n'ont pas enregistré de signal pour les bactéries de la flore indigène, par exemple *Streptomyces scabies*. Les bactéries de la flore indigène ont pu être détectées seulement lorsque la croissance a été stimulée par l'ajout de nutriments.

Mentionnons aussi une des premières combinaisons de la technique d'hybridation *in situ* avec la cytométrie en flux a été réalisée par Wallner *et al.* (1993). Leurs expériences ont principalement servi à mettre au point les conditions d'hybridation, les concentrations des sondes, l'ajout de détergent et les traitements post-hybridation à l'aide des données automatisées du cytomètre. Une culture mixte de cellules fixées

(deux bactéries Gram négatives et une levure) a été effectuée afin de pouvoir tester s'il était possible de distinguer, par cytométrie en flux, chaque espèce avec des sondes spécifiques à chacune. Cette étude, réalisée avec succès, a permis de mener à une analyse d'une culture provenant d'un traitement d'eaux usées (Wallner *et al.* 1995) par hybridation *in situ* et cytométrie en flux. Ces expériences consistaient en l'hybridation des échantillons du biotraitement, avec des sondes spécifiques à l'ARN ribosomal de différents membres des domaines *Bacteria* et *Eucarya*, ainsi que des sous-classes alpha, beta et gamma des *Proteobacteria* et le genre *Acinetobacter*. En plus des sondes spécifiques, les cellules étaient mises en contact avec le fluorochrome non spécifique Hoechst 33342, colorant de l'ADN. Par cette combinaison d'hybridation *in situ*-cytométrie, ils ont pu recueillir rapidement plusieurs indices sur la composition de la communauté bactérienne, non seulement sur son abondance relative mais aussi sur l'activité métabolique générale de chacun des groupes visés. Cependant, les agrégats ont causé des problèmes d'analyse par cytométrie, particulièrement pour les groupes formant naturellement des chaînettes ou des biofilms tels que le genre *Acinetobacter* et la sous-classe alpha des *Proteobacteria*. Les auteurs ont aussi constaté que 20% à 30% des cellules marquées avec Hoechst 33342, n'ont hybridé à aucune sonde, suggérant la possibilité du faible taux de ribosomes ou l'imperméabilité de certaines cellules.

Une autre étude, réalisée en 1997 par Thomas *et al.*, a été la première à combiner la cytométrie en flux et l'hybridation *in situ* dans un bioprocédé en sol. Cette expérience a effectivement permis la détection et le dénombrement de la souche bactérienne Gram négative, *Sphingomonas* sp. 107 dans un sol non stérile grâce à une sonde spécifique à cette dernière. Les échantillons ont aussi été colorés à l'aide d'un colorant d'ADN, le bromure d'éthidium, afin de déterminer les conditions optimales de perméabilisation et également de distinguer les micro-organismes des particules de sol, par cytométrie. Les auteurs ont pu effectuer des analyses lors d'inoculations à différentes concentrations de la souche *Sphingomonas* sp. 107 dans des microcosmes.

Ces analyses quantitatives ont concordé de manière significative avec les comptes obtenus par unités formatrices de colonies pour des concentrations allant de 3×10^4 et 3×10^6 cellules par gramme de sol (poids sec).

Plus récemment, Christensen *et al.* (1999), ont réalisé une expérience d'hybridation *in situ* associée avec des observations par microscopie à épifluorescence afin d'estimer le nombre de bactéries riches en ribosomes dans un échantillon de sol. Les auteurs ont utilisé la sonde universelle EUB 338 ciblant une séquence de l'ARN ribosomal 16S de toutes les eubactéries et liée au fluorochrome rhodamine. Les comptes de bactéries actives obtenus par l'hybridation avec la sonde universelle ont été de 5% de la population totale et représente environ 4×10^8 bactéries actives par gramme de sol (poids sec). La population totale a pour sa part été déterminée par la mise en contact avec le colorant d'acides nucléiques DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). La principale problématique a résulté dans l'extraction des bactéries du sol.

Ainsi, quelques études ont été réalisées portant sur l'hybridation *in situ* dans des milieux plus complexes tels que des boues activées et des sols. Cependant, très peu d'expériences ont porté sur la combinaison de la technique avec la cytométrie en flux dans un milieu laborieux comme le sol et aucune encore connue portant sur le suivi de bactéries Gram positives à l'intérieur d'un biotraitement.

Mentionnons aussi que les applications d'hybridation *in situ* par fluorescence a récemment pris de l'ampleur dans plusieurs secteurs diversifiés de la microbiologie. Cette technique a permis, entre autres, l'identification et la distinction de deux espèces du genre bactérien *Serpulina* dans les intestins porcins (Boye *et al.*, 1998), la détection et l'identification de bactéries lactiques dans le vin (Sohier et Lonvaud-Funel, 1998) ainsi que l'observation du dynamisme des populations bactériennes dans les excréments humains (Franks *et al.*, 1998). Cependant, la majorité des applications de cette méthode se retrouvent en microbiologie environnementale, autant pour la

détection de bactéries dans l'eau potable (Kalmbach *et al.*, 1997), les bioréacteurs (Sekiguchi *et al.*, 1999, Schuppler *et al.*, 1998, de los Reyes *et al.*, 1997) que dans le sol (Hahn *et al.*, 1992).

9. Les souches bactériennes à l'étude

Le groupe de l'environnement du Centre de microbiologie et biotechnologie de l'INRS-Institut Armand-Frappier ont isolé une grande quantité de souches bactériennes impliquées dans la minéralisation de plusieurs substances xénobiotiques telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le phénol ainsi que le pentachlorophénol (PCP). La minéralisation de ces composés peut s'effectuer en aérobiose ou en anaérobiose. La plupart des souches bactériennes sont présentement à l'étude afin d'être utilisées dans des biotraitements.

9.1. *Sphingomonas* sp. 107

La souche *Sphingomonas* sp. 107 a été isolée à partir d'un sol contaminé à la créosote. C'est une bactérie Gram négative aérobie capable de croître à partir d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), dont le pyrène (voir Fig. 1), comme seule source de carbone et d'énergie. C'est une souche qui se distingue par son efficacité et sa spécificité de substrats, et sa rapidité à dégrader les HAP. La séquence des produits de PCR a révélé que *Sphingomonas* sp. 107 possède des gènes fortement homologues aux gènes respectifs retrouvés dans les opérons *dox*, *pah* et *nah*, gènes codant pour les enzymes impliqués dans la voie catabolique des HAP et que ces gènes sont arrangés en opérons polycistroniques (Dagher *et al.*, 1997). Cette souche possède un plasmide d'environ 50 kb où résident les gènes codant pour la voie catabolique (Dagher *et al.*, 1997).

9.2. *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1

La souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 a été isolée d'un consortium méthanogène minéralisant le PCP. La température optimale de croissance est de 37°C et le pH optimal est de 7.5. La séquence du gène 16S ribosomal de la souche a révélé 95% d'homologie avec celui de la souche *Desulfitobacterium dehalogenans* (Bouchard *et al.*, 1996). La souche PCP-1 est un bacille pouvant former des spores et qui possède une paroi de type Gram positif. *D. frappieri* PCP-1 est un des seuls micro-organismes anaérobies isolés actuellement qui effectue la déshalogénéation du PCP jusqu'au 3-chlorophénol (3-CP) dont voici les étapes empruntées:



La déshalogénéation peut se faire en positions *ortho*, *meta* et *para* dans laquelle deux systèmes enzymatiques sont impliqués. Un premier système induirait la déchloration en position *ortho* et un second système en positions *para* et *meta* (Bouchard *et al.*, 1996). L'étude du spectre d'activité de la souche PCP-1 a démontré que celle-ci possède la capacité de déshalogéner une grande variété de molécules monoaromatiques substituées avec des groupements hydroxy, methoxy ou amine (Dennie *et al.*, 1998). La souche *D. frappieri* PCP-1 a été utilisée par Tartakovsky *et al.* (1999) pour augmenter une communauté mixte d'un réacteur anaérobie minéralisant le PCP. La concentration de la souche est passée de 10^6 à 10^{10} cellules / g de solides en suspension en 70 jours et la capacité du réacteur par jour est passée de 5 mg/L à 80 mg/L. Le PCP est disparu à 99% et l'efficacité de déchloration s'est maintenue à 90,5%.

9.3. Souche 6

La souche bactérienne 6 a été isolée à partir d'un consortium anaérobie impliqué dans la minéralisation du phénol. Plus particulièrement, la souche 6 serait impliquée dans la formation d'acide benzoïque par la carboxylation et la déhydroxylation du phénol. La

souche 6 est un bâtonnet Gram variable résistant à la chaleur. L'analyse du gène 16S ribosomal a permis de démontrer que la souche 6 appartient à une nouvelle espèce du genre *Clostridium* (Li *et al.*, 1996).

9.4. *Mycobacterium* sp. Jo1

La souche *Mycobacterium* sp. Jo1 est une bactérie en forme de bâtonnet, Gram positive. Elle a été isolée à partir d'un consortium aérobie, issu d'un sol contaminé à la créosote, et maintenu dans un microcosme contaminé artificiellement d'un mélange de plusieurs HAP. L'analyse du gène 16S ribosomal a révélé une affiliation à une famille de Mycobactéries à croissance rapide. Elle effectue, en culture pure, la minéralisation d'un grand nombre de HAP, dont le pyrène et le chrysène, HAP qui possèdent quatre cycles .

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Les cultures bactériennes

Le plan expérimental consiste premièrement en un travail préliminaire dans lequel quatre souches ont été utilisées afin d'expérimenter la technique d'hybridation *in situ* en culture pure. Parmi les quatre souches utilisées, la technique avait déjà été mise au point avec la souche de type Gram négatif *Sphingomonas* sp. 107 et constituait principalement en une familiarisation des manipulations. Les autres souches mises à l'essai sont les souches 6, *D. frappieri* PCP-1 et *Mycobacterium* sp. Jo1. Ces dernières sont toutes de type Gram positif avec lesquelles aucune expérience de suivi par hybridation *in situ* n'a encore été réalisée d'où leur intérêt. Lors de l'obtention des meilleurs résultats en culture pure avec la souche *D. frappieri* PCP-1, les expériences de suivi en culture pure, en consortium méthanogène et en microcosmes ont par la suite été effectuées avec cette souche seulement.

La souche bactérienne *D. frappieri* PCP-1 a été maintenue en culture à 37°C en conditions anaérobies. Le milieu de culture utilisé est un milieu minimal auquel a été additionné 0,1% (p/v) d'extraits de levure (ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio), 55 mM de pyruvate (Sigma Chemicals Co., St-Louis, Mo) ainsi que 10 mg/L de 2,4,6-TCP (Aldrich, Milwaukee, Wis.). Ce chlorophénol est employé comme agent inducteur de l'activité de déshalogénéation (Bouchard *et al.*, 1996). Le milieu minimal anaérobie est une modification du milieu de Boyd *et al.* (1983). La composition de ce milieu, pour un litre, était constituée de 0,27 g de KH_2PO_4 ; 0,35 g de K_2HPO_4 ; 0,53 g de NH_4Cl ; 0,10 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,073 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,002 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 10 mL d'une solution de minéraux contenant, par litre : 0,1 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de ZnCl_2 ; 0,1 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de H_3BO_3 ; 0,1 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Du résazurin (0,001 g/L) (Sigma Chemicals Co.) a été ajouté dans le milieu à titre d'indicateur du potentiel redox. Le pH a été ajusté à 7.5 avec du NaHCO_3 . Par la suite, le milieu a été bouilli pendant une heure sur des colonnes réfrigérantes afin de réduire le plus possible la quantité d'oxygène présent dans le milieu tout en minimisant

l'évaporation. Le milieu a été ensuite barboté dans des bouteilles sérologiques avec un mélange gazeux contenant: 10% d'H₂, 10% de CO₂ et 80% de N₂ (Praxair, Mississauga, Ontario). Les bouteilles de milieu ont été scellées avec des bouchons en butyle. Les bouteilles ont été stérilisées pendant 20 minutes à 121°C. Enfin, 0,05 g/L d'une solution de Na₂S•9H₂O a été ajoutée pour réduire davantage toute trace d'oxygène.

Le milieu développé afin de cultiver la bactérie *D. frappieri* PCP-1 sur milieu solide, a été réalisé par la même méthode que le milieu minimal liquide. Il a suffi de procéder à un ajout de 1,25% (p/v) d'agarose (ICN Biochemicals) avant de procéder à l'étape de barbotage. Le milieu a aussi été supplémenté d'extraits de levure à 0,1% (p/v) et de 55 mM de pyruvate. Le milieu gélosé contenu dans les bouteilles sérologiques a été déversé dans des vases de Pétri, à l'intérieur d'une enceinte anaérobie (Bactron II: Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius, Oreg) constituée de 10% de H₂, 10% de CO₂ et 80% de N₂. Lors de l'ensemencement, des dilutions successives ont été préalablement effectuées dans des bouteilles contenant 9 mL de milieu minimal réduit afin d'exécuter l'ensemencement dans l'enceinte anaérobie. L'énumération des colonies a été possible après une incubation de 2 à 3 jours à 37°C toujours dans l'enceinte anaérobie.

La souche 6 a été cultivée également à 37°C en conditions anaérobies. Le milieu minimal était supplémenté cette fois par 0,05% (p/v) de protéose peptone no 3 (Difco laboratories, Détroit, MI), de 10 mL/L d'une solution de vitamines (Wolin, *et al.*, 1963) et 150 mg/L de phénol (Baker Chemical Co, Philisburg, NJ). Le milieu a été produit de la même manière que celui utilisé pour la souche PCP-1, mis à part la quantité de FeCl₂•4H₂O, dix fois plus élevée ainsi que la quantité de Na₂S•9H₂O 1%, qui était, elle aussi 10 fois plus élevée

Les souches *Sphingomonas* sp. 107 et *Mycobacterium* sp. Jo1, ont été cultivées à 30°C

dans du milieu LB. Celui-ci était constitué, par litre, de 10 g de Bacto-tryptone (Difco), de 5 g d'extraits de levure (ICN Biomedicals), et de 10 g de NaCl. Le pH a été ajusté à 7.0 avec du NaOH 10N. Ces souches ont été également cultivées sur des géloses TSA. Ce milieu était constitué, par litre, de 40 g de Tryptic Soy Agar (Difco).

2. Protocole d'hybridation *in situ*

Différents protocoles ont été développés pour les divers micro-organismes à l'étude et sont présentés dans les prochaines sections ainsi que les sondes, les méthodes et les outils de détection utilisés.

2.1. Sondes d'ADN fluorescentes

Les séquences des oligonucléotides utilisées pour générer les sondes fluorescentes spécifiques (SPHIN, PCP1-1, PCP1-2, PCP1-3, PCP1-4, PHEN, JO1) étaient issues d'une étude comparative des séquences des gènes de l'ARN 16S ribosomal (gènes 16S) apparentées aux souches étudiées. Les séquences ont été alignées à l'aide du programme informatique PILEUP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin). Les séquences des oligonucléotides spécifiques aux micro-organismes *Sphingomonas* sp. 107, *D. frappieri* PCP-1, souche 6 et *Mycobacterium* sp. Jo1 ont été déterminées par le Dr Richard Villemur et moi-même, et vérifiées à l'aide du programme informatique CHECK-PROBE (Ribosomal Database Project, University of Illinois, Urbana-Champaign, Ill.) pour s'assurer qu'elles ne soient pas apparentées à des séquences autres que les cibles respectives. La sonde EUB est un oligonucléotide complémentaire à une région conservée de l'ARNr 16S chez toutes les eubactéries (Bruce *et al.*, 1992). La sonde NON est complémentaire à la sonde EUB et n'hybride à aucune séquence ribosomale. Elle a servi de témoin de l'hybridation non spécifique. Les oligonucléotides ont été synthétisés à l'aide du Gene Assembler (Pharmacia, Baie-d'Urfée, Canada). Par la suite, le fluorochrome fluorescéine amidite a été conjugué à

Tableau 1 : Séquences et positions des sondes universelles et des sondes spécifiques aux souches *Sphingomonas* 107, *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, Souche 6 et *Mycobacterium* Jo1.

Amorce	Séquence	Position
EUB:	5' CTG AGC CAG GAT CAA ACT CT 3'	8-27 ¹
NON:	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	8-27 ¹
SPHIN:	5' ATC CAG CCG AAC TGA AGG AAA GTG 3'	1019-1043 ²
PCP1-1:	5' GCT GTC ATC CAC TTA TCT GCT CC 3'	89-112 ³
PCP1-2:	5' TCG GTG TTA GAC ACT GGA 3'	63-80 ³
PCP1-3:	5' GAT GCC ACC GAT TAA GCT C 3'	272-290 ³
PCP1-4:	5' GCG GAT CCA TCT ACT AAC G 3'	327-345 ³
PHEN:	5' CCG TCA ATA GTA AAC TAC TTC CGC 3'	67-80 ⁴
JO1:	5' ACA CCA TGA AGC ATG CGG TCC T 3'	139-160 ⁵

1 position relative au gène ribosomal 16S de *E. coli*

2 position relative au gène ribosomal 16S de *S. 107*

3 position relative au gène ribosomal 16S de *D. frappieri* PCP-1

4 position relative au gène 16S de la souche 6

5 position relative au gène ribosomal de *M. Jo1*

l'extrémité 5' (FLuoroP-rime, PharmaciaBiotech). Les oligonucléotides conjugués ont été purifiés sur une colonne NAP-10 et conservés dans l'eau à -20°C. Les manipulations de synthèse de l'oligonucléotide et de conjugaison ont été effectuées dans le laboratoire du Dr François Shareck (INRS-IAF). Les séquences des sondes fluorescentes universelle et spécifiques sont décrites au tableau 1.

2.2. *Sphingomonas* sp. 107

Un échantillon d'une culture bactérienne (4 mL) a été prélevé dans 4 tubes eppendorf (4 fois 1 mL par tube) et a été centrifugé à 8000 g pendant 2 minutes. Les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de tampon phosphate (130 mM de NaCl, 10 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de Na₂HPO₄, pH 7,2) supplémenté de 10 mM de pyrophosphate. Ce tampon a été filtré avec un filtre de nitrocellulose de 0,2 µm (Sarstedt, Newton, North Carolina) afin d'éliminer les particules pouvant intervenir avec l'analyse en cytofluorométrie en flux. Une nouvelle centrifugation de 2 minutes, 8000 g, a été effectuée. Cette fois, les cellules ont été resuspendues dans 1 mL d'une solution de paraformaldéhyde 3% (p/v) (A&C American Chemicals Ltd., Montréal). Cette solution a été préparée en dissolvant la paraformaldéhyde dans une proportion d'un tiers du tampon phosphate concentré 3 fois pH 8.0 et de deux tiers d'eau déionisée à 60°C, afin de faciliter la dissolution. Le pH final a été ajusté à 7.2. La suspension des cellules dans la paraformaldéhyde a été ensuite incubée à 4°C, pendant 3 heures. Après une centrifugation de 2 minutes à 8000 g, les cellules ont été suspendues, afin d'achever la perméabilisation, dans une solution d'éthanol (50:50) pendant 5 minutes, à température ambiante. Après une centrifugation de 8000 g, 2 minutes, les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de tampon phosphate-pyrophosphate, suivie d'une centrifugation dans les mêmes conditions (2 minutes, 8000 g). Cette fois-ci, les cellules ont été resuspendues dans 50 µL de tampon d'hybridation (0,9 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCl, pH 7,2). Un premier échantillon a été utilisé pour vérifier l'autofluorescence de la réaction et de la suspension bactérienne; aucune sonde n'a été

ajoutée au tampon d'hybridation. Un deuxième échantillon a été utilisé comme témoin de l'hybridation non spécifique où la sonde NON a été ajoutée. Les deux derniers échantillons ont été utilisés respectivement avec les sondes SPHIN (spécifique à *Sphingomonas*) et EUB. Chaque sonde a été ajustée à une concentration finale de 10 ng/μL. La réaction d'hybridation a été exécutée pendant une incubation de 3 heures, à 50°C. Afin d'arrêter la réaction, une centrifugation de 2 minutes, 8000 g, a été effectuée. Finalement, les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de tampon phosphate-pyrophosphate, pH 8.0. Différentes dilutions, selon les concentrations cellulaires, ont été effectuées dans le tampon phosphate-pyrophosphate afin de réaliser les analyses par microscopie à épifluorescence ou par cytométrie en flux.

2.3. *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1

Le protocole d'hybridation *in situ* pour *D. frappieri* PCP-1 est sensiblement le même que pour *Sphingomonas* sp.107 mais comporte quelques différences dont voici les détails. Lors de la fixation à la paraformaldéhyde, l'incubation à 4°C a été effectuée pendant 16 heures. Par la suite, la perméabilisation a été complétée par une suspension des cellules dans 950 μL de tampon phosphate-pyrophosphate et 50 μL d'hexadécyltriméthyl bromure d'ammonium (CTAB) (Sigma chemicals Co.) 1% (p/v). Après une forte agitation de 30 secondes et une incubation de 5 minutes à la température ambiante, une centrifugation de 2 minutes à 8000 x g a été effectuée. La réaction d'hybridation a été exécutée de la même façon et les mêmes témoins ont été employés. Cependant, le troisième échantillon a été mis en contact avec les sondes fluorescentes spécifiques à *D. frappieri* PCP-1. Les sondes ont été ajoutées à une concentration finale de 10 ng/μL. Les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de tampon phosphate-pyrophosphate, pH 8.0.

2.4. Souche 6

Les mêmes conditions utilisées pour *D. frappieri* PCP-1 ont été maintenues pour la souche 6. Cependant, la perméabilisation a été achevée avec une solution de chlorure de benzalkonium 0,05% (Sigma) pendant 5 minutes, après forte agitation et à température ambiante. La sonde fluorescente complémentaire à l'ARN 16S ribosomal de la souche 6 a été employée pour la réaction d'hybridation pour le troisième échantillon (sonde PHEN).

2.5. *Mycobacterium* sp. Jo1

Encore une fois, la plupart des mêmes conditions ont été maintenues pour cette souche. Cependant, toutes les centrifugations ont été effectuées à 6000 g car les cellules avaient une propension à former de fortes agglutinations et étaient plus difficiles à resuspendre. La fixation à la paraformaldéhyde a été effectuée pendant 40 heures à 4°C. La perméabilisation a été complétée avec la solution de chlorure de benzalkonium 0,05% pendant 5 minutes à température ambiante et après une forte agitation. La sonde spécifique utilisée, la sonde JO1, ainsi que les sondes témoins ont été toujours utilisées à une concentration de 10 ng/μL.

2.6. Observation et détection de la fluorescence

L'observation des bactéries a d'abord été réalisée avec un microscope à épifluorescence Dialux 20 (Leitz Wetzlar, Allemagne) muni d'une lampe au mercure. Un grossissement total de 1000 X a permis l'observation à l'immersion à l'eau.

L'énumération et la détection des bactéries ont été achevées avec un cytomètre en flux Coulter XL-MCL (Coulter Electronics, Hiialeah, FL) équipé d'un rayon laser d'argon à 488 nm. La fluorescence verte émise par la fluorescéine a été récoltée par le

détecteur FL1, muni d'un filtre de 525 nm. La fluorescence rouge émise par le bromure d'éthidium complexé aux acides nucléiques a été pour sa part récoltée par le détecteur FL3, muni d'un filtre de 620 nm. La pression de la veine d'entraînement et de l'échantillon a été conservé à 10 μ L/minute. Le taux d'événements par seconde analysés a été maintenu approximativement à 200-300 événements/seconde. Les analyses quantitatives des résultats ont été réalisées par le logiciel du XL software (Coulter Electronics).

3. Comptes de la culture de *D. frappieri* PCP-1 déterminés par cytométrie et par étalement sur gélose

Du milieu de Boyd (35 mL) supplémenté de pyruvate et de 2,4,6-TCP a étéensemencé avec 1,5 mL de culture de *D. frappieri* PCP-1 en phase exponentielle. Des prélèvements de 1 mL ont été effectués à chacun des temps 0, 6, 12, 24, 30, 48 et 72 heures. Le premier prélèvement a été centrifugé à 8000 g, deux minutes, puis les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de tampon phosphate-pyrophosphate, centrifugées de nouveau à 8000 g, 2 minutes, avant d'être resuspendues dans 1 mL d'une solution de paraformaldéhyde 3%, pendant 16 heures à 4°C. Après cette incubation, les cellules ont été centrifugées 8000 g, 2 minutes, avant d'être resuspendues dans 1 mL de tampon phosphate-pyrophosphate et conservée à 4°C jusqu'aux analyses par cytométrie en flux. Les comptes d'événements ont été effectués pendant une période de 60 secondes, pendant laquelle, à pression basse, a été analysée 10 μ L de la suspension cellulaire. Des calculs appropriés ont été effectués afin de connaître les comptes par mL de la culture aux différents temps. Le deuxième prélèvement a été transféré dans 9 mL de milieu de Boyd. Des dilutions successives ont été effectuées dans 9 mL de milieu de Boyd à partir de la première dilution (1/10). À partir des dilutions appropriées 100 μ L ont étéensemencées en duplicata, dans l'enceinte anaérobie, sur les géloses tel que décrit à la section 1.

4. Intensité de la fluorescence en fonction du temps de la culture de *D. frappieri* PCP-1

Quatre inoculum de 1,5 mL de culture en phase exponentielle de PCP-1 ont été ajoutés respectivement à quatre bouteilles contenant chacune 35 mL de milieu de Boyd additionné d'extraits de levure et de pyruvate. Le milieu contenait aussi 10 mg/L de 2,4,6-TCP. Une première bouteille a été consacrée pour le temps 0. L'ensemble de la culture du temps 0 a été séparé et centrifugé à 10 000 g et les cellules ont été resuspendues dans 4 mL de tampon phosphate-pyrophosphate pour être ensuite distribuées également (1 mL) dans 4 tubes eppendorf. Pour le temps 6 heures, 4 échantillons de 1,5 mL ont été prélevés, centrifugés 8000 g, 2 minutes, puis les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de tampon phosphate-pyrophosphate. Pour les temps successifs (12, 24, 28, 32, 48 et 72 heures), le volume de prélèvement était de 4 échantillons de 1 mL. La technique d'hybridation *in situ* pour la souche PCP-1 a ensuite été appliquée telle que décrite plus haut (section 2.3).

5. Suivi de la souche *D. frappieri* en consortium méthanogène

Dans une première culture, 3 mL de culture de *D. frappieri* PCP-1 en phase exponentielle et 0,25 mL d'un consortium anaérobie méthanogène ont été mélangés à 70 mL de milieu de Boyd supplémenté d'extraits de levures et de pyruvate. Les milieux contenaient également 30 mg/L de 2,4,6-TCP. Une deuxième culture a été effectuée avec seulement 0,25 mL de consortium inoculé au même milieu. Le consortium avait la capacité de dégrader le PCP et c'est à partir de celui-ci qu'a été originellement isolé la souche PCP-1. Le consortium, appelé R4, était maintenu à 30°C dans du milieu de Boyd supplémenté de glucose et de formate par Martin Lanthier, étudiant à la maîtrise dans le laboratoire du Dr Réjean Beaudet. Les protocoles d'hybridation *in situ* tels que décrits plus haut dans la section 2.3 ont été effectués pour les temps 0, 24, 48 et 72 heures. Les prélèvements pour l'étalement sur

géluses ont été effectuées parallèlement et selon la technique décrite à la section 4.

5.1. Suivi des chlorophénols

L'analyse des chlorophénols a été effectuée aux temps 0, 24, 48 et 72 heures. De la bouteille sérologique contenant la culture mixte, a été prélevé 1 mL de milieu. Après une centrifugation de 5 minutes à 13 500 g, 0,5 mL d'acétonitrile (qualité HPLC, Anachemia, Montréal) contenant 0,33% d'acide acétique a été ajouté au surnageant. Les chlorophénols ont été dosés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC, Waters, Mississauga, Ontario). L'appareil utilisé pour les dosages de chlorophénols était équipé de pompes (modèle 510), d'un spectrophotomètre, d'un injecteur automatique (Millipore, modèle 717 Plus) et d'une colonne hydrophobe NovoPak C₁₈ (3,9 mm/150 mm). Ce système était contrôlé par ordinateur (NEC Power Mate 2, modèle APC 4) avec le logiciel Chromatography Workstation, version 3.3. Les deux phases mobiles utilisées étaient composées d'une phase A contenant de l'eau déionisée et de l'acide acétique dans une proportion de 99,9:0,1 et d'une phase B constituée d'acétonitrile et d'acide acétique dans une proportion de 50:50. Les deux phases ont été préalablement dégazées sous vide pendant 15 minutes avant chaque journée d'analyses. La colonne a été équilibrée dans un mélange de 70% de la phase A et 30% de la phase B à un débit de 2 mL/minute. Le débit a été conservé tout au long du programme. La concentration des différents chlorophénols a été mesurée par leur absorbance à 220 nm. Le programme était d'une durée de 13 minutes et consistait à appliquer un gradient linéaire pendant les 4 premières minutes afin que la concentration de la phase B atteigne 55% et que celle de la phase A atteigne 45%. Ces concentrations ont été maintenues jusqu'à la dixième minute, après quoi la colonne a été équilibrée à l'aide d'un gradient concave. Le temps de rétention et les courbes d'étalonnage étaient vérifiées périodiquement.

6. Suivi de la souche *D. frappieri* en microcosmes

Les microcosmes ont été effectués en triplicata, deux pour l'analyse des chlorophénols et un pour les tests d'hybridation *in situ* et pour les comptes sur milieu solide. Dix grammes de sol (non contaminé) ont été introduits, en enceinte anaérobie, dans des bouteilles sérologiques contenant 70 mL de milieu de Boyd supplémenté d'extrait de levures, de pyruvate et de 2,4,6-TCP. L'oxygène avait préalablement été chassé du sol par plusieurs cycles de purge du mélange gazeux $N_2/H_2/CO_2$. Les bouteilles ont été scellées dans l'enceinte anaérobie. Un ensemencement a été effectué stérilement avec 3 mL d'une culture de PCP-1 en phase exponentielle. Les microcosmes ont été incubés à 37°C jusqu'à 3 jours. Après les prélèvements pour l'hybridation *in situ* une extraction des micro-organismes a été effectuée et la méthode est décrite à la section 6.3 Les prélèvements (1 mL) pour l'ensemencement sur milieu solide en enceinte anaérobie a été effectué stérilement à partir de la même bouteille et transférés dans une bouteille contenant 9 mL de milieu de Boyd. Les bactéries ont été étalées sur géloses tel que décrit à la section 4. Les deux prélèvements, pour l'hybridation *in situ* et pour l'ensemencement, ont été exécutés aux temps 0, 24, 48 et 72 heures.

6.1. Suivi des chlorophénols

L'analyse des chlorophénols a été effectuée en duplicata à chaque jour, aux temps 0, 24, 48 et 72 heures. À chacun des microcosmes ont été ajoutés 2 mL de HCL 12N afin d'arrêter les réactions. Le contenu des bouteilles sérologiques a été séparé dans 3 tubes de 50 mL et pouvaient être entreposés à 4°C afin d'effectuer toutes les extractions en même temps. Avant l'extraction, 0,66 mL d'une solution de standard interne de 10% de N-propylparabène (Sigma Chemicals Co.) a été ajouté par tube de 50 mL. Une première extraction avec 8 mL d'éthyle d'éther (Mallinckrodt Baker Inc., Paris, Kentucky) par tube a été effectuée. Ensuite deux autres extractions de 5 mL d'éthyle d'éther ont suivi afin de récupérer davantage de chlorophénols. La phase

organique de chacune des trois extractions a été prélevée après une forte agitation des tubes pendant 30 secondes et une minute de centrifugation à basse vitesse (550 g) et mise ensemble dans une ampoule à décantation. Il a été par la suite nécessaire de se débarrasser des huiles et graisses pour effectuer les analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Une première extraction a donc été réalisée avec 5 mL de NaOH 0,3 M suivie de 2 extractions avec 5 mL de NaOH 0,003 M. Cette fois-ci, la phase aqueuse a été récupérée à chaque extraction après une agitation de 15 secondes. Cette phase aqueuse a été recueillie dans un ballon jaugé. Le volume a été complété à 25 mL avec 1,5 mL d'HCL 12N, 8,33 mL d'acétonitrile (qualité HPLC, Anachemia, Montréal), contenant 0,33% d'acide acétique, et de l'eau. Après 5 minutes de centrifugation à 13 500 g, les chlorophénols récupérés du surnageant ont été dosés HPLC (Waters, Mississauga, Ontario). Le système et le programme utilisés étaient les mêmes que ceux détaillés à la section 5.1.

6.2. Extraction des bactéries et hybridation *in situ*

Aux temps 24, 48 et 72 heures, 4 mL du microcosme ont été prélevées, centrifugées et resuspendues dans du tampon phosphate-pyrophosphate supplémenté avec 0,1 % de Tween 80 (Sigma Chemicals Co) et ayant une concentration de 4 M de NaCl, pH 8.0 afin de rompre les interactions avec le sol et de dégager les micro-organismes. Le tout a été déposé sur un coussin de 4 mL d'une solution de Nycodenz, 1,3 g/mL (Sigma Chemicals Co.). Ce mélange a été centrifugé à 10 000 g dans un rotor SW 40.1 pendant 5 minutes sans frein d'arrêt dans une ultracentrifugeuse (Beckman, modèle L5-65). Par la suite, l'interface, où la densité correspondait à celle des bactéries, a été récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur. L'ensemble de cette phase, environ 1,5 mL, a été dilué avec 1,5 mL de tampon phosphate-pyrophosphate. La solution bactérienne a été centrifugée, 2 minutes à 8000 x g resuspendue dans 4 mL de tampon phosphate par tube et divisée également en 4 (1 mL/échantillon). Les bactéries ont été centrifugées 2 minutes, 8000 g, avant de subir les étapes de fixation et de perméabilisation ainsi que

de l'hybridation *in situ*, telles que décrites aux sections 2.2 et 2.3. Les particules de sol qui se sont accumulées dans le fond du tube lors de la centrifugation avec la solution de Nycodenz ont été récupérées afin de connaître le poids sec correspondant au nombre de bactéries détectées par gramme de poids sec. La terre a été séchée au four à 105°C pendant au moins 18 heures. La différence entre le poids avant et après séchage du sol a permis de calculer le poids sec. Les sondes utilisées pour l'hybridation spécifique avec *D. frappieri* PCP-1 sont les sondes PCP1-3 et PCP1-4, en concentration finale de 5 ng/μL pour chacune des sondes.

RÉSULTATS

1. Hybridation *in situ* en culture pure

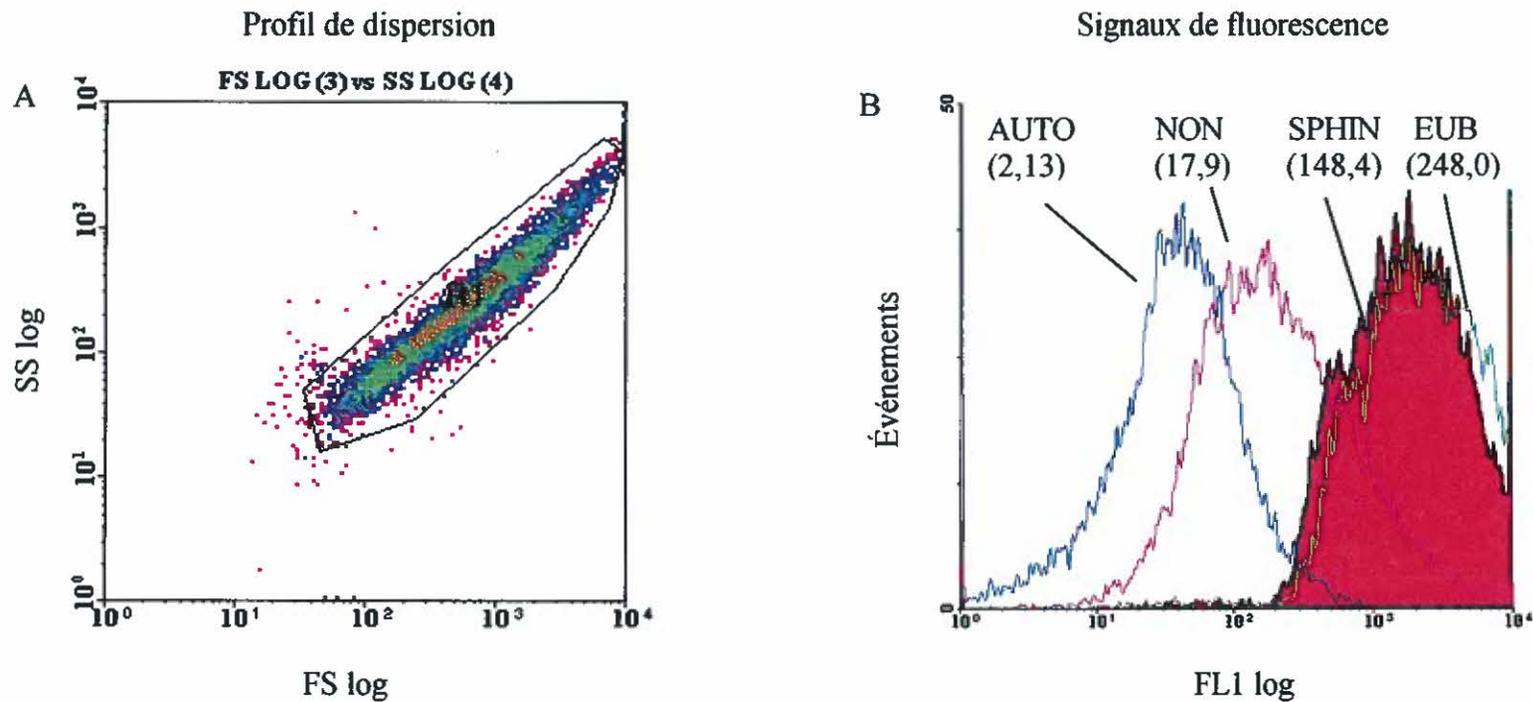
La première partie de ce projet consistait à appliquer la technique d'hybridation *in situ* chez plusieurs espèces bactériennes ayant été isolées dans le groupe de microbiologie de l'environnement de l'INRS-Institut Armand-Frappier et ayant la capacité de participer à une ou plusieurs étapes de transformation de différents contaminants. Le premier protocole a été développé et mis au point à partir d'une espèce bactérienne de type Gram négatif *Sphingomonas* sp. 107. Par la suite, le protocole a été testé avec des bactéries de type Gram positif puis adapté pour chacune des espèces mises à l'essai, dont *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, la souche 6 et *Mycobacterium* Jo1.

1.1. *Sphingomonas* sp. 107

La technique d'hybridation *in situ* avec la souche *Sphingomonas* sp. 107 avait déjà été mise au point dans le laboratoire du Dr Villemur par Jean-Christophe Thomas (Thomas *et al.*, 1997). La technique a donc été appliquée sur une population *Sphingomonas* sp. 107 en culture pure. Les conditions de fixation et de perméabilisation avaient déjà été définies et consistaient en un traitement consécutif à la paraformaldéhyde puis à l'éthanol. Les histogrammes du profil de dispersion (A) et de fluorescence (B) obtenus à l'aide du cytomètre en flux sont présentés à la figure 10. Par l'histogramme du profil de dispersion, il est possible d'observer les événements analysés distribués selon la morphologie des événements (Forward Scatter ou FS) et leur granulosité (Side Scatter ou SS). Le profil de dispersion présente à la figure 10A un profil en forme de comète qui représenterait des cellules individuelles mais aussi des cellules qui auraient tendance à s'agglutiner entre elles car elles forment une longue traînée d'événements. L'histogramme des signaux de fluorescence présente pour sa part la distribution des événements analysés selon l'émission de fluorescence enregistrée pour chacun des événements. Le détecteur approprié a été choisi selon le fluorochrome utilisé. Dans ce cas-ci, la fluorescéine,

Figure 10 : Hybridation *in situ* d'une culture pure de la souche *Sphingomonas* sp. 107

Histogrammes du profil de dispersion (A) et des signaux de fluorescence des sondes spécifique (SPHIN), universelle (EUB), non spécifique (NON) et de l'autofluorescence des cellules (B). Les signaux de fluorescence ont été mesurés à partir de la région d'acquisition R1. Les nombres entre parenthèses représentent les intensités moyennes de fluorescence (IMF)



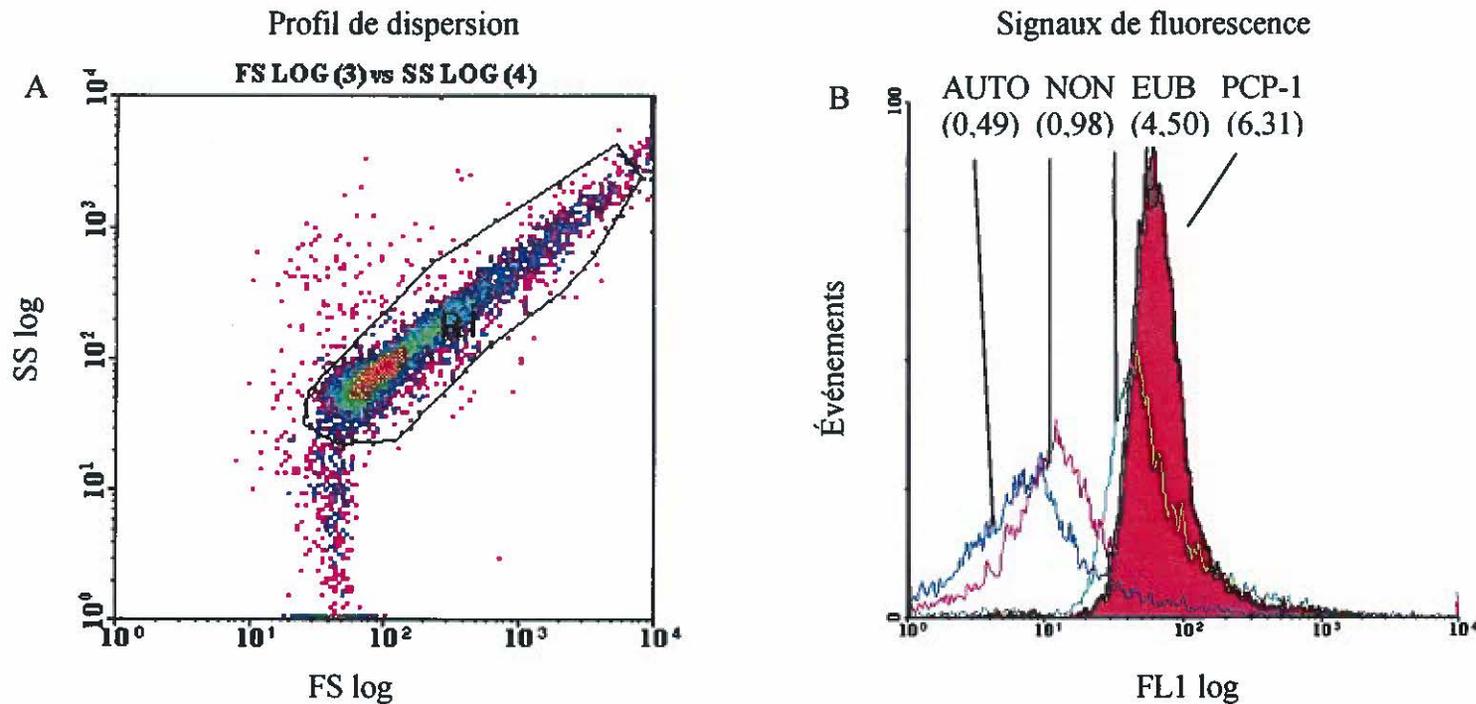
fluorochrome conjugué à l'oligonucléotide, émet une fluorescence verte et a été détectée par le détecteur FL1. Pour chaque mesure des hybridations ou de l'autofluorescence, l'intensité moyenne de la fluorescence (IMF) était enregistrée. Les signaux de fluorescence étaient enregistrés à partir de la région définie lors de l'acquisition au cytomètre et pour cette expérience, elle est représentée par la région R1. L'hybridation *in situ* avec la sonde spécifique SPHIN sur la culture pure de *Sphingomonas* sp. 107 a résulté en un déplacement du signal de la fluorescence verte de l'ensemble de la population d'environ une décade par rapport à l'hybridation non spécifique (Fig. 10), l'IMF est passé effectivement de 17,9 pour l'hybridation non spécifique à 148,4 pour l'hybridation spécifique. L'autofluorescence présente une intensité moyenne de fluorescence de 2,13. Cette valeur est présentée dans tous les graphiques suivants afin d'indiquer le niveau de fluorescence de base de la suspension cellulaire après les manipulations nécessaires à la technique et ainsi démontrer l'effet du contact avec les sondes fluorescentes. L'intensité moyenne de fluorescence de l'hybridation *in situ* avec la sonde EUB est de 248,0.

1.2. *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1

L'application du même protocole de fixation/perméabilisation n'ayant pas résulté en un accroissement significatif de la fluorescence à partir de l'hybridation *in situ* avec une sonde spécifique à la souche PCP-1 (sonde PCP1-1) par rapport à la sonde non spécifique (NON), une modification au protocole original a été apportée. Les meilleurs résultats lors de l'application du protocole d'hybridation *in situ* avec une culture de *D. frappieri* PCP-1 ont été obtenus toujours avec une fixation à la paraformaldéhyde mais avec une perméabilisation à l'hexadécyltriméthyl bromure d'ammonium (CTAB). Ces résultats (Fig. 11) révèlent un déplacement significatif de la population lors de la mise en contact avec la sonde spécifique PCP1-1 (IMF=6,31) par rapport à l'hybridation non spécifique (IMF=0,98 avec la sonde NON). L'IMF de l'autofluorescence est de 0,49 tandis que l'IMF de l'hybridation avec la sonde EUB est

Figure 11 : Hybridation *in situ* d'une culture pure de la souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1

Histogrammes du profil de dispersion (A) et des signaux de fluorescence des sondes spécifique (PCP1-1), universelle (EUB), non spécifique (NON) et de l'autofluorescence des cellules (B). Les signaux de fluorescence ont été mesurés à partir de la région d'acquisition R1. Les nombres entre parenthèses représentent les IMF.



de 4,50. Le profil de dispersion de la culture de la souche PCP-1 montre encore des bactéries qui s'agglutinaient entre elles en formant une longue traînée d'événements. Le rapport de l'IMF de l'hybridation spécifique sur celui de l'hybridation non spécifique est de 6,4. Cependant ce résultat n'a été obtenu qu'une seule fois et le rapport des IMF de l'hybridation spécifique sur non spécifique se maintenait plus régulièrement autour des valeurs 2 ou 3.

1.3. Souche 6

Le protocole d'hybridation *in situ* a également été appliqué sur une culture pure de souche 6. Les résultats présentés ont été obtenus par des conditions de fixation à la paraformaldéhyde et de perméabilisation au chlorure de benzalkonium. Les histogrammes de profil de dispersion (A) et de fluorescence (B) obtenus par cytométrie sont présentés à la figure 12. Le profil de dispersion est plus compact que ceux des deux souches précédentes et indiquerait une moins forte agglutination. Les signaux de fluorescence présentés démontrent une augmentation de la fluorescence spécifique (IMF=1,65) par rapport à la fluorescence non spécifique (IMF=0,56) mais reste quand même faible. Également, une photographie prise à partir du microscope à fluorescence révèle la souche (grossissement de 1000X) après l'application du protocole en utilisant la sonde spécifique PHEN et est présentée à la figure 13.

1.4. *Mycobacterium* Jo1

L'application du protocole d'hybridation *in situ* a été essayée sur une espèce du genre *Mycobacterium*. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une fixation de 40 heures à la paraformaldéhyde suivi d'une perméabilisation avec une solution de chlorure de benzalkonium. Il est possible d'observer (Fig. 14) à peine un léger déplacement du signal de fluorescence provenant de la population lors de l'hybridation avec la sonde spécifique JO1 (IMF=1,64) par rapport à l'hybridation non spécifique (IMF=0,52).

Figure 12: Hybridation *in situ* d'une culture pure de la souche 6.

Histogrammes du profil de dispersion (A) et des signaux de fluorescence des sondes spécifique PHEN, et non spécifique NON (B). Les signaux de fluorescence ont été mesurés dans la région d'acquisition A. Les nombres entre parenthèses représentent les IMF.

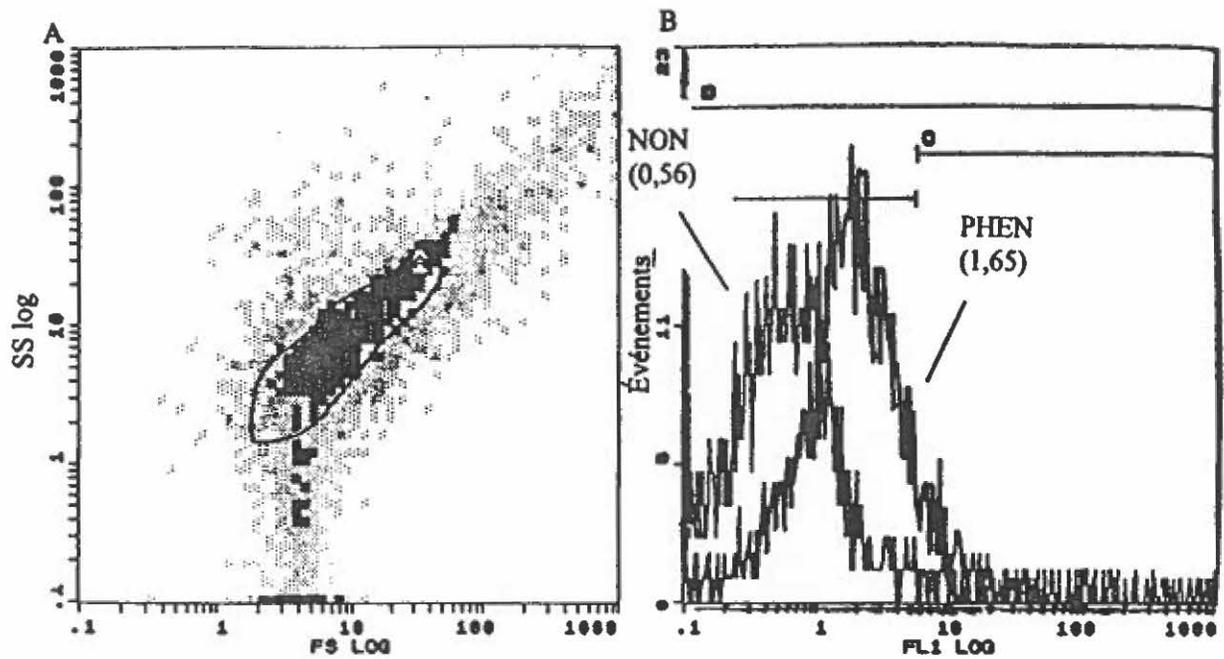
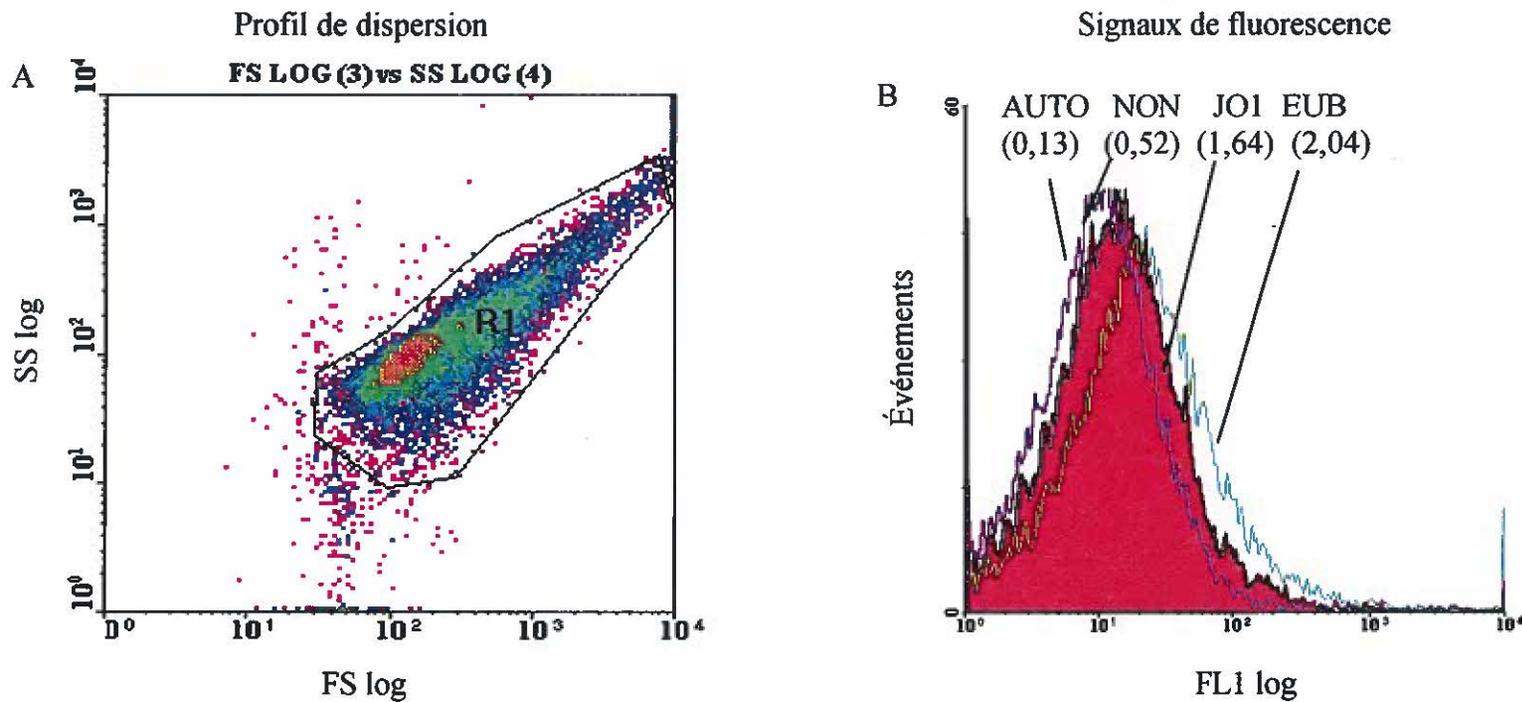


Figure 13 : Photographie de la souche 6 en culture pure après l'hybridation *in situ* avec la sonde spécifique PHEN et observée par microscopie à épifluorescence (grossissement 1000X).



Figure 14 : Hybridation *in situ* d'une culture pure de la souche de *Mycobacterium* sp. Jo1.

Histogrammes du profil de dispersion (A) et des signaux de fluorescence des sondes spécifique (JO1), universelle (EUB), non spécifique (NON) et de l'autofluorescence des cellules (B). Les signaux de fluorescence ont été mesurés à partir de la région d'acquisition R1. Les nombres entre parenthèses représentent les IMF.



L'IMF de l'autofluorescence est de 0,13 tandis que celle de l'hybridation avec la sonde EUB est de 2,04. Encore une fois, le profil de dispersion est assez étendu, suggérant une forte agglutination des cellules.

Les expériences d'hybridation *in situ* sur les quatre souches bactériennes en culture pure ont permis d'orienter les recherches futures. Celles-ci se sont donc portées sur le développement et la mise au point de la technique d'hybridation *in situ* afin d'effectuer le suivi de la souche *D. frappieri* PCP-1 dans différents biotraitement et ce, particulièrement à cause des résultats encourageants obtenus pendant la première partie du projet et des caractéristiques uniques de la souche. Parmi ces propriétés, rappelons, entre autres, qu'elle est de type Gram positif et anaérobie et qu'aucun suivi et expériences d'hybridation *in situ* n'ont été effectués dans la littérature. De plus, elle est une des seules souches isolées actuellement ayant la capacité d'effectuer la déshalogénéation du pentachlorophénol en positions *ortho*, *meta* et *para* (Bouchard *et al.*, 1996).

2. Optimisation de la technique d'hybridation *in situ* avec *D. frappieri* PCP-1

Afin d'optimiser la technique d'hybridation *in situ* avec la souche *D. frappieri* PCP-1, différentes modifications de la méthode de départ ont été effectuées dans les étapes de fixation, de perméabilisation et d'hybridation ainsi que des oligonucléotides et fluorochromes utilisés, de même que des variations de pH. Ces modifications sont développées dans la présente section.

D'abord, des modifications aux protocoles de fixation et de perméabilisation détaillées à la section 2.3 de la partie Matériel et méthodes ont été réalisées. Parmi ces modifications se trouvent des fixations à l'éthanol 50% ou 95%, à la glutaraldéhyde 10%, à la formaline (éthanol et formaldéhyde en proportion 90:10). Également, différents temps et températures de fixation ont été essayés, tels que 3 heures, 16

heures, 30 heures, à 4°C et à -20°C. D'autres procédés de perméabilisation ont aussi été testés en combinaison avec une fixation à la paraformaldéhyde 3% ou à l'éthanol 50%. Parmi ceux-ci, un traitement au lysozyme, en concentration finale de 5 µL/mL dans du Tris-EDTA, pH 8.0, des traitements au HCl concentré (12N), à l'eau de javel ainsi qu'au détergent chlorure de benzalkonium (Pinder *et al.*, 1990) ont été testés. Toutes ces tentatives n'ont cependant pas amélioré significativement l'intensité de fluorescence de l'hybridation spécifique par rapport à l'hybridation non spécifique.

Dans l'étape d'hybridation, des incubations de 16 et 30 heures ont été essayées (Thomas, *et al.*, 1997) ainsi que l'ajout de 0,1% de SDS au tampon d'hybridation, tel que conseillé et pratiqué dans bon nombre d'études (Christensen *et al.*, 1999, Franks *et al.*, 1998). Encore une fois, ces tentatives n'ont pas engendré une augmentation significative du signal de fluorescence de l'hybridation spécifique par rapport à l'hybridation non spécifique.

Un essai d'ajout de chloramphénicol à l'échantillon de culture de *D. frappieri* PCP-1 en concentration finale de 100 µL/mL a été testé lors de la première resuspension des cellules. Cette tentative a été entreprise grâce aux expériences rapportées par Ouverney et Fuhrman, 1997. Cette étude indique que l'ajout de chloramphénicol dans l'échantillon à l'étude pourrait permettre d'amplifier le signal de fluorescence lors de l'application d'un protocole d'hybridation *in situ*. En effet, cet antibiotique interférerait avec les protéines responsables de la dégradation des molécules d'ARNr. La cible des oligonucléotides serait donc présente en plus grande quantité et augmenterait le signal de fluorescence détecté. Cet essai n'a cependant pas provoqué l'augmentation du signal désiré.

Des changements au niveau des oligonucléotides ont aussi été effectués. Une première sonde spécifique (PCP1-1) avait d'abord été retenue avec laquelle les premières expériences ont toutes été effectuées. Par la suite, trois autres sondes, toujours

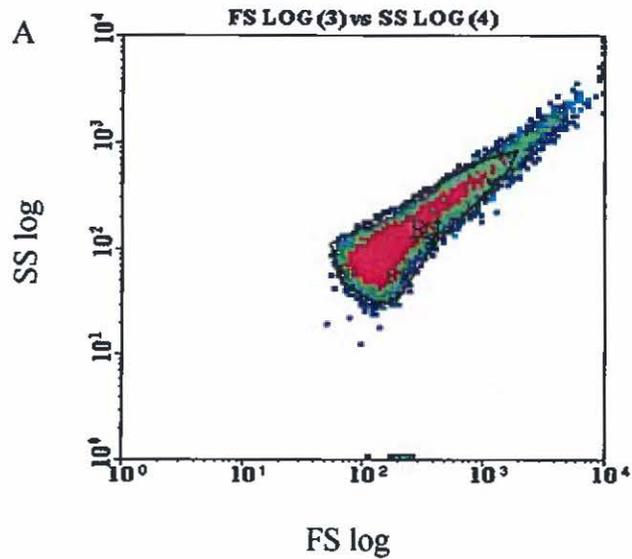
spécifiques à l'espèce *D. frappieri* PCP-1, ont été sélectionnées (PCP1-2, PCP1-3 et PCP1-4, Tableau 1, Matériel et méthodes). Ces sondes ont été testées tour à tour lors de la réaction d'hybridation à une concentration totale de 10 ng/μL. Elles ont également été testées en combinaison les unes avec les autres et avec celle déjà existante. Même si les quatre sondes ont été utilisées ensemble, la concentration totale des oligonucléotides a été conservée à 10 ng/μL, répartie également entre chacune d'entre elles. Cette expérience se rapporte à l'étude relatée par Lee *et al.*, 1993 dans laquelle plusieurs sondes visant l'ARN 16S ribosomal ont été utilisées. La combinaison des nouvelles sondes PCP1-3 et PCP1-4 a permis d'obtenir les meilleurs résultats lors de l'application du protocole d'hybridation *in situ* sur une culture pure de *D. frappieri* PCP-1. L'IMF de l'hybridation spécifique s'est retrouvé à 27,1 par rapport à 5,5 lors de l'hybridation non spécifique. Ces résultats ont pu être obtenus à plusieurs reprises. Le profil de dispersion présente le même type de traînée observée lors de la première expérience (Fig. 11) avec la souche PCP-1. Tous ces résultats sont présentés à la figure 15.

Plusieurs fluorochromes sont dépendants du pH. La sensibilité de ces molécules est due à la reconfiguration du système d'électron lors de la protonation. La fluorescéine, le fluorochrome conjugué aux oligonucléotides utilisés dans ces expériences, est effectivement sensible au pH. Des changements apportés par les variations de pH du tampon ont donc été vérifiés à la dernière resuspension ainsi que dans les dilutions effectuées pour les analyses en cytométrie. Le tampon phosphate-pyrophosphate a été ajusté à pH 7.2, 8.0, 8.5 et 9.0. Le changement de pH du tampon phosphate pour un pH de 8.0, lors de la resuspension des cellules après l'étape d'hybridation, a permis d'obtenir des signaux de fluorescence spécifiques légèrement plus élevés. Ce tampon a donc été utilisé dans l'ensemble des futures expériences.

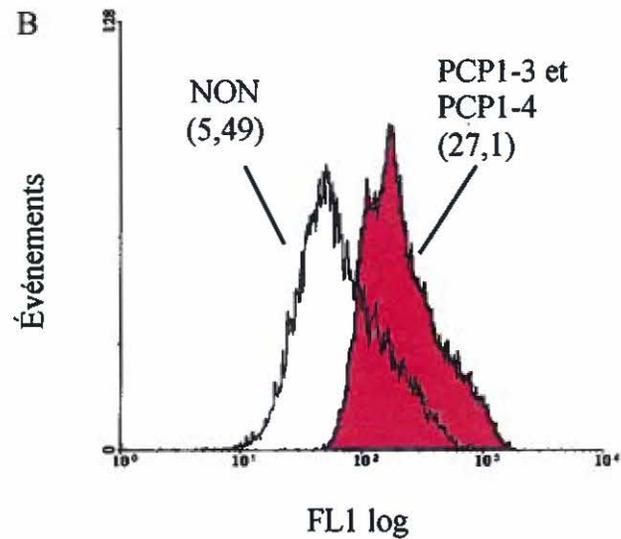
Figure 15 : Hybridation *in situ* sur une culture pure de la souche PCP-1 avec les sondes spécifiques PCP1-3 et PCP1-4.

Histogrammes du profil de dispersion (A) et des signaux de fluorescence des sondes spécifiques PCP1-3 et PCP1-4 et non spécifique NON (B). Les signaux de fluorescence ont été mesurés à partir de la région d'acquisition R1. Les nombres entre parenthèses représentent les IMF.

Profil de dispersion



Signaux de fluorescence



En résumé, les conditions optimales pour l'application de l'hybridation *in situ* avec la souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 ont consisté en une fixation à la paraformaldéhyde 3% suivi d'une perméabilisation à l'hexadécyltriméthyl bromure d'ammonium (0,05%) puis d'une hybridation simultanée avec les sondes PCP1-3 et PCP1-4 spécifiques à l'ARNr 16S. L'ensemble des expériences ont été effectuées dans un tampon au pH de 8.0. Les expériences qui suivent ont donc toutes été effectuées en respectant ce protocole.

3. Développement d'un milieu de culture solide et comparaison des comptes par cytométrie et par étalement en fonction du temps

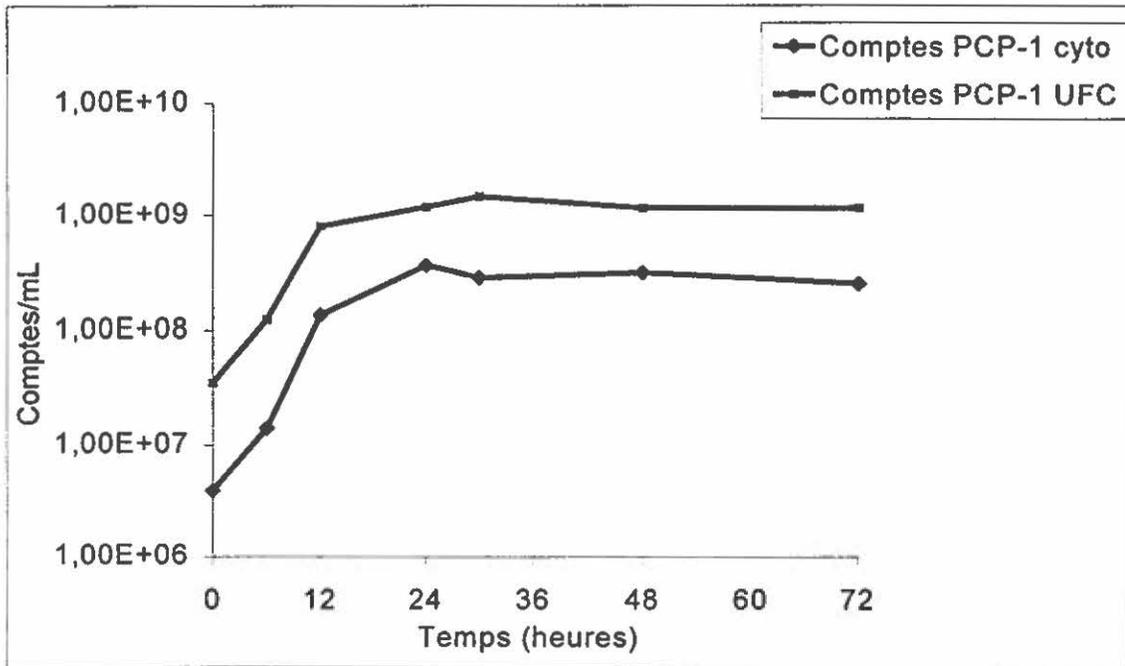
Le développement d'un milieu de culture solide constitue une étape importante dans l'étude de la souche *D. frappieri* PCP-1 car celle-ci ne pouvait croître que sur une gélose disponible commercialement. L'ajout d'agarose au milieu de Boyd modifié a permis d'obtenir un milieu de culture sur lequel peut croître *D. frappieri* PCP-1 dans l'enceinte anaérobie. Les colonies sont apparues après 48 heures comparativement à 10 à 15 jours avec les autres géloses. Les comptes obtenus sur milieu solide, pour ce premier essai, ont été comparés avec les comptes obtenus par cytométrie en flux (Tableau 2). Les concentrations de la souche PCP-1 obtenues par cytométrie pour les premiers essais sont de $1,54 \times 10^8$ et $2,51 \times 10^8$ tandis que les concentrations obtenues par unités formatrices de colonies sont respectivement de $1,69 \times 10^9$ et de $1,23 \times 10^9$. Les comptes observés par cytométrie en flux ont été de 5 à 10 fois inférieurs par rapport aux comptes obtenus par unités formatrices de colonies.

Afin d'établir des comparaisons des comptes obtenus par unités formatrices de colonies et par cytométrie au cours du stade de culture, des étalements périodiques (0, 6, 12, 24, 30, 48, 72 heures) ont été effectués sur le nouveau milieu solide ainsi que des suspensions correspondantes pour le cytomètre en flux. Les résultats obtenus sont exposés dans le graphique à la figure 16 et présentent les moyennes calculées à partir

Tableau 2: Comparaison des concentrations de la souche PCP-1 en culture pure obtenues par unités formatrices de colonies (UFC) et par cytométrie.

Essai (duplicata)	Bacteries/mL	
	UFC	cytométrie
1 ^{er}	1.69×10^9	1.54×10^8
2 ^e	1.23×10^9	2.51×10^8

Figure 16: Comparaison des concentrations de la souche PCP-1 obtenues par unités formatrices de colonies (UFC) et par cytométrie pendant 72 heures.



des essais effectués en duplicata. Encore une fois, les comptes observés par cytométrie en flux ont été inférieurs d'un facteur d'environ 10 par rapport aux comptes obtenus par unités formatrices de colonies. Cependant, les deux courbes suivent sensiblement la même tendance, l'écart est donc resté constant. Les concentrations de la souche PCP-1 obtenues par cytométrie respectivement pour les temps 0, 6, 12, 24, 30, 48 et 72 heures sont de $3,9 \times 10^6$, $1,4 \times 10^7$, $1,4 \times 10^8$, $3,6 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $3,1 \times 10^8$ et $2,5 \times 10^8$ tandis que pour les mêmes temps ceux obtenus par unités formatrices de colonies sont de $3,5 \times 10^7$, $1,2 \times 10^8$, 8×10^8 , $1,2 \times 10^9$, $1,5 \times 10^9$, $1,2 \times 10^9$ et $1,2 \times 10^9$.

4. Intensité de la fluorescence en fonction du temps de la culture de *D. frappieri* PCP-1

Plusieurs hybridations successives dans le temps (0, 6, 12, 24, 28, 32, 48 et 72 heures) ont été effectuées sur une culture pure de *D. frappieri* afin d'observer l'évolution du signal de fluorescence spécifique lors de l'application du protocole d'hybridation *in situ*. Également, l'ajout de bromure d'éthidium à un échantillon de chaque heure a permis d'observer la variation globale des acides nucléiques puisque le bromure d'éthidium s'intercale à l'intérieur de ceux-ci de manière non spécifique. La fluorescence émise par le bromure d'éthidium a pu être mesurée par le détecteur FL3 du cytomètre en flux. Les résultats sont présentés aux figures 17, 18, 19 et 20. De plus, le rapport de l'IMF des hybridations spécifiques sur celui des hybridations non spécifiques sont présentés au tableau 3 et résume les données illustrées aux figures 17 à 20. Les résultats obtenus montrent que l'intensité du signal de fluorescence pour l'hybridation spécifique avec les sondes PCP1-3 et PCP1-4 était à son maximum aux temps 6 et 12 heures avec des rapports respectifs de 3,6 et 4,3. Ce sont dans ces temps où le signal de fluorescence spécifique de la population a divergé le plus du signal de fluorescence de l'hybridation non spécifique. Par la suite, les signaux d'hybridation spécifique ont conservé sensiblement les mêmes proportions de fluorescence par

Figure 17 : Suivi par hybridation *in situ* d'une culture pure de *D. frappieri* PCP-1 aux temps 0 et 6 heures.

Histogrammes des profils de dispersion (A, D) et des signaux de fluorescence du bromure d'éthidium (B, E) et des sondes spécifiques (PCP1-3 et PCP1-4), de la sonde NON et de l'autofluorescence (C, F). Temps 0 (A,B,C,) et 6 heures (D,E,F). R2 et R3 sont les régions d'acquisition utilisées. Les chiffres entre parenthèses représentent les IMF.

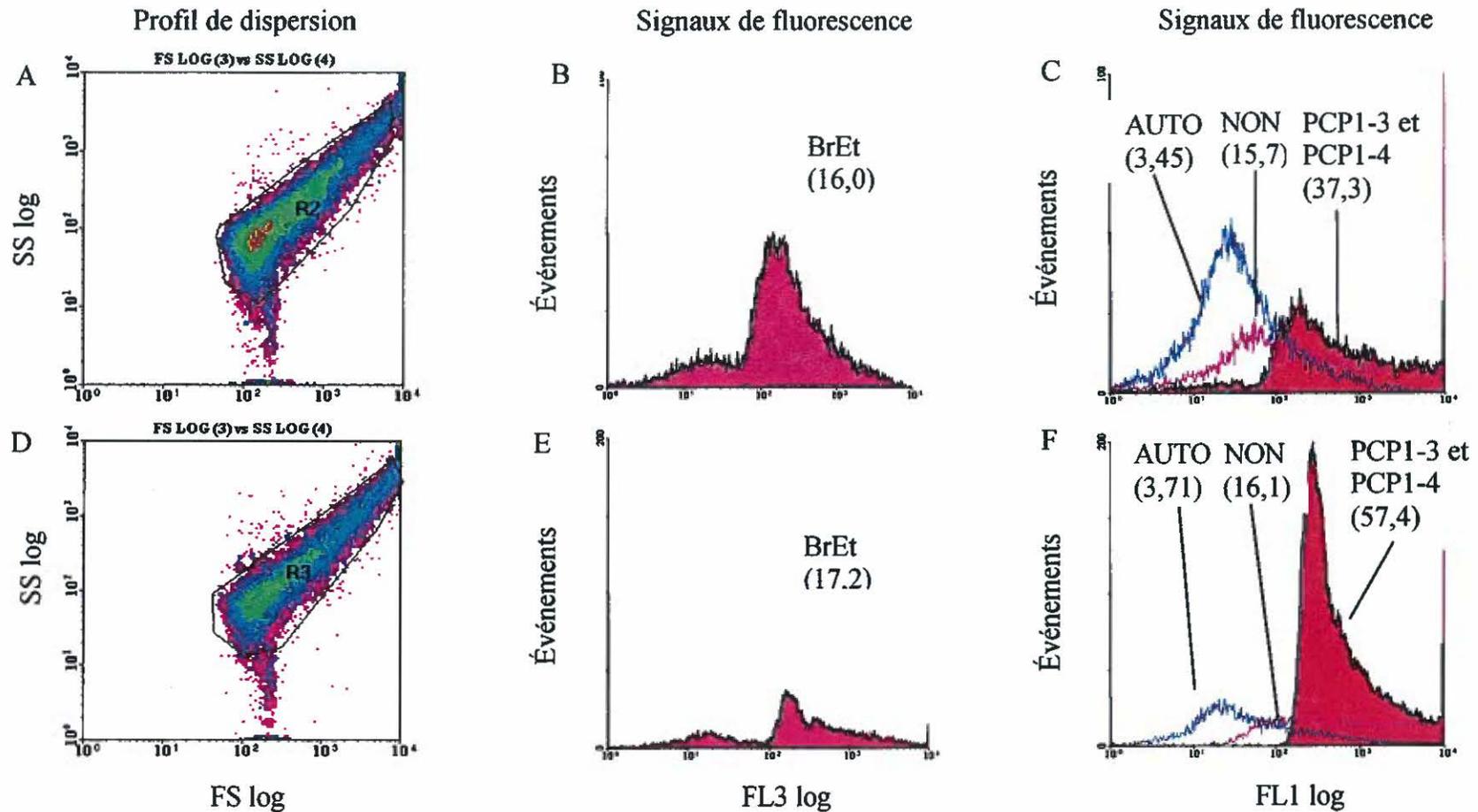


Figure 18 : Suivi par hybridation *in situ* d'une culture pure de *D. frappieri* PCP-1 aux temps 12 et 24 heures.

Voir la légende figure 17. Temps 12 (A,B,C) et 24 heures (D,E,F). R4 et R5 sont les régions d'acquisition utilisées.

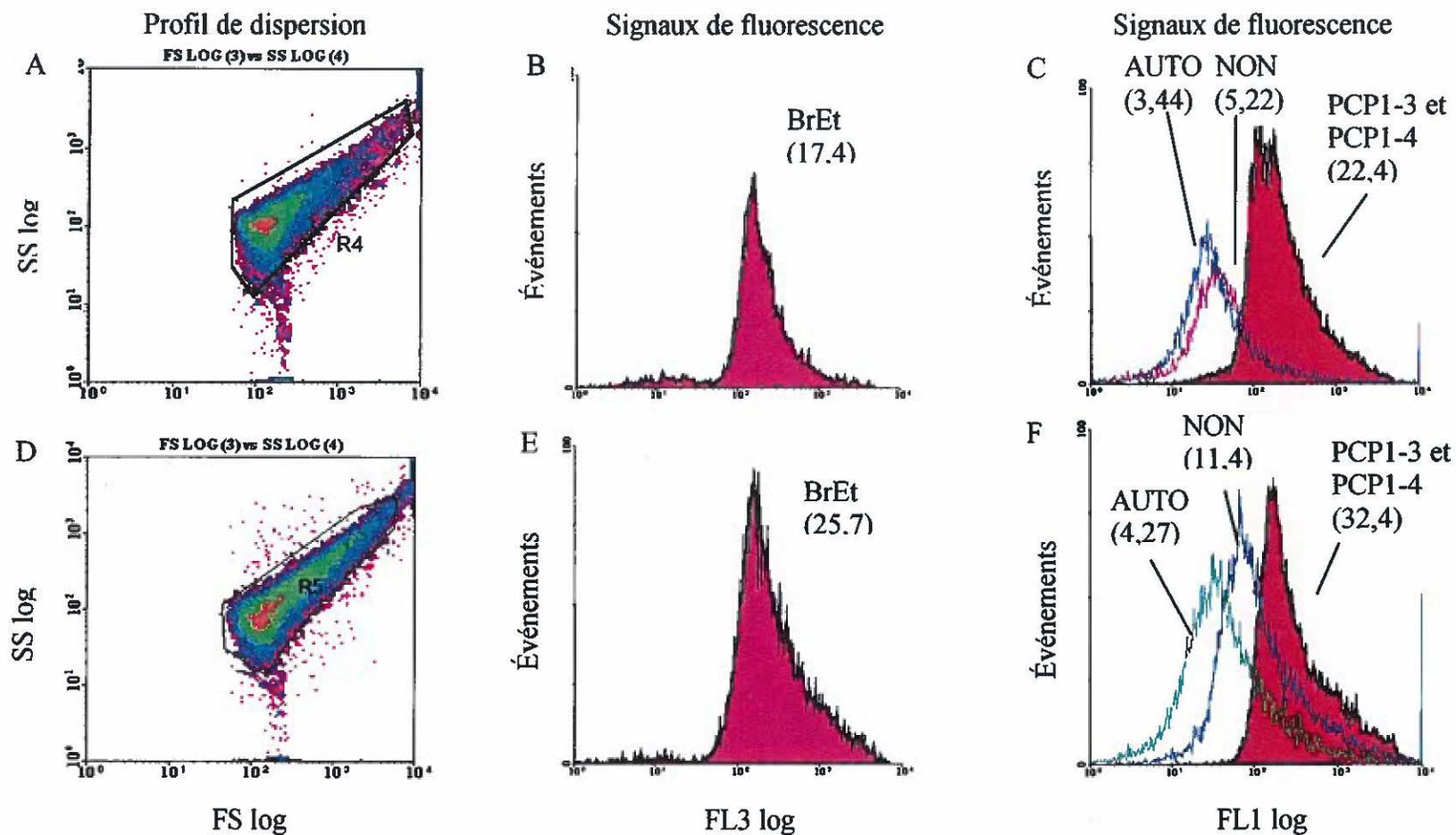


Figure 19 : Suivi par hybridation *in situ* d'une culture pure de *D. frappieri* PCP-1 aux temps 28 et 32 heures.

Voir la légende figure 17. Temps 28 (A,B,C) et 32 heures (D,E,F). R6 et R7 sont les régions d'acquisition utilisées.

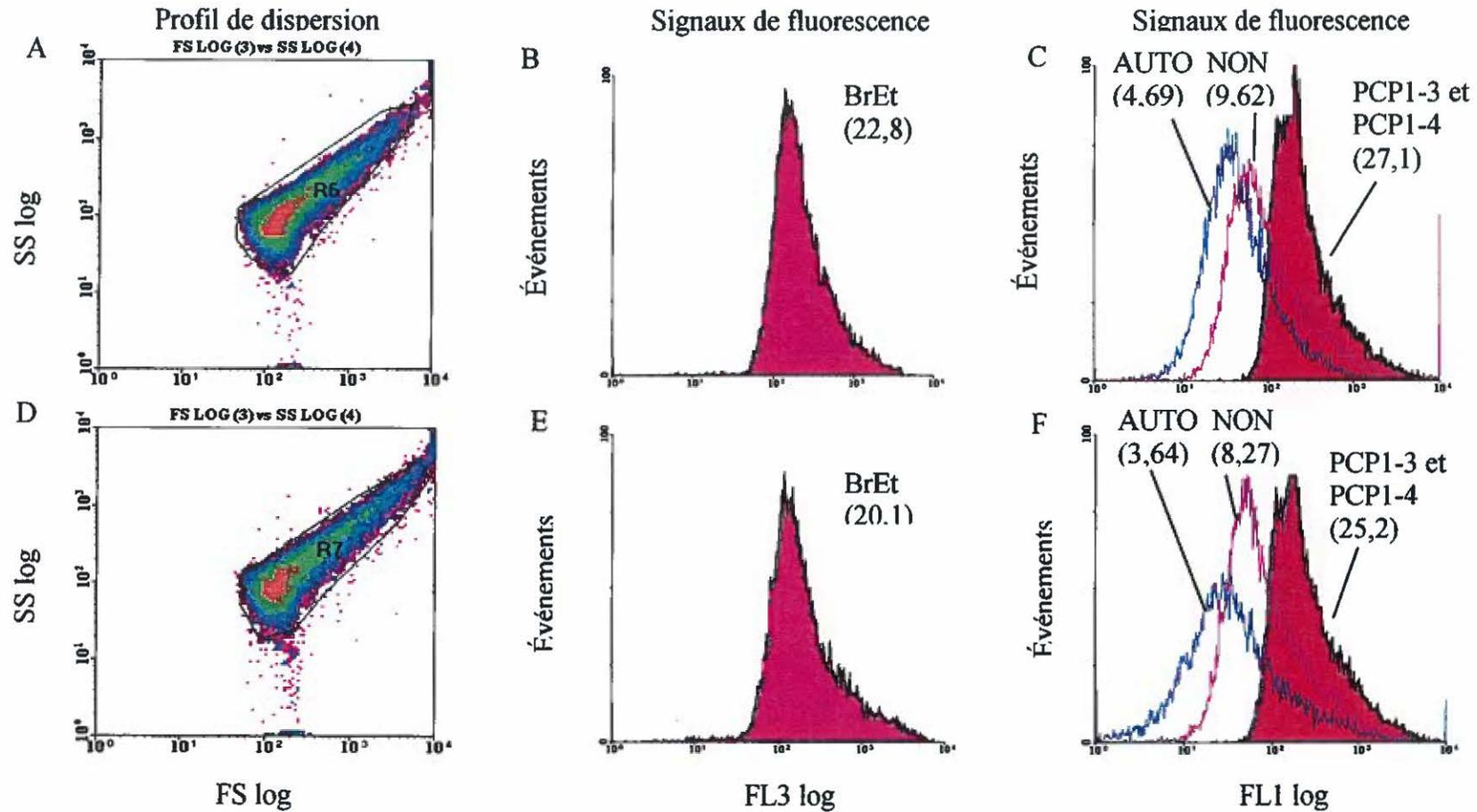


Figure 20 : Suivi par hybridation *in situ* d'une culture pure de *D. frappieri* PCP-1 aux temps 48 et 72 heures.

Voir la légende figure 17. Temps 48 (A,B,C) et 72 heures (D,E,F). R8 et R1 sont les régions d'acquisition utilisées

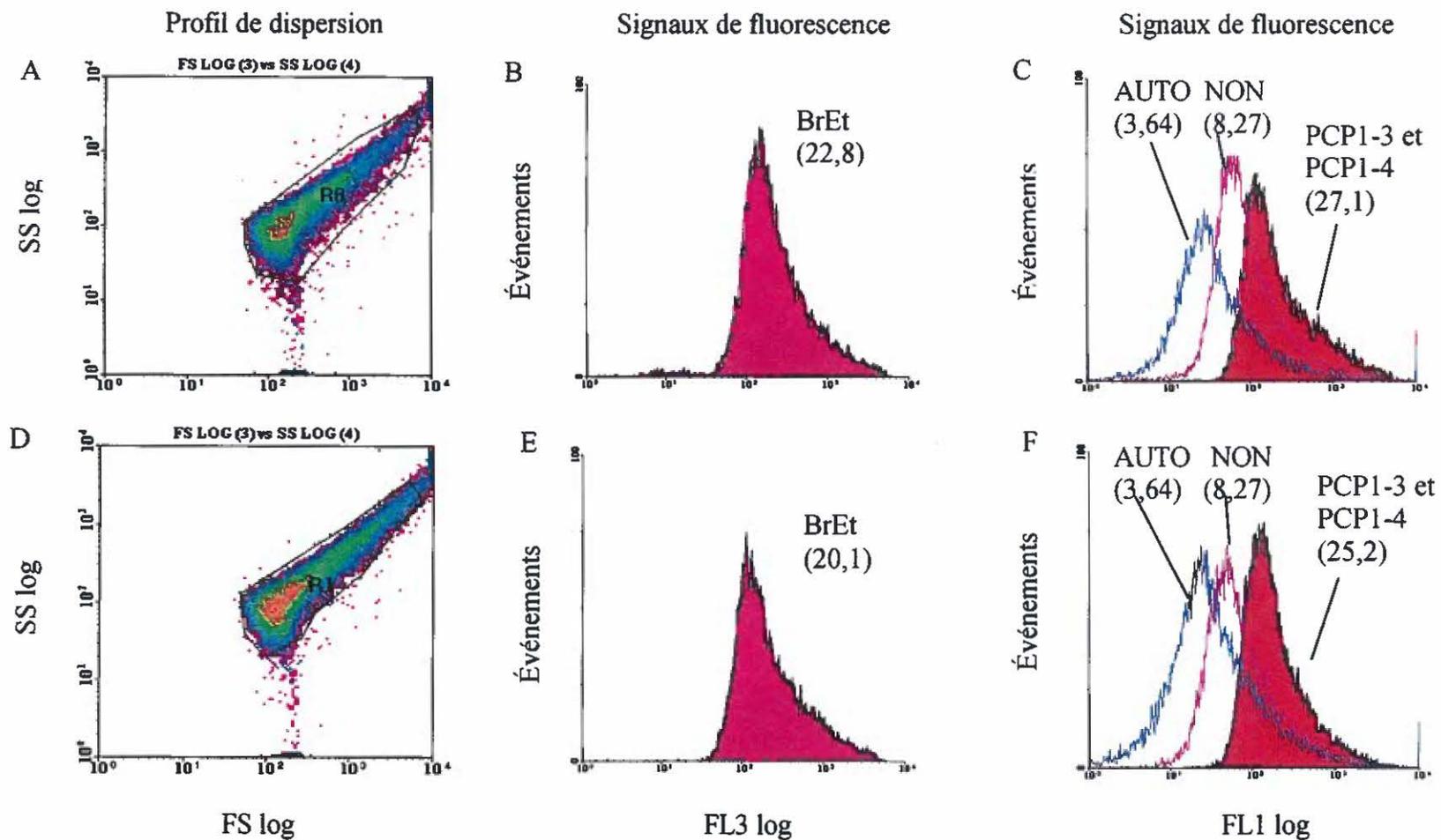


Tableau 3: Suivi des rapports des signaux de fluorescence moyens (MFI) de l'hybridation spécifique (sondes PCP1-3 et PCP1-4) sur l'hybridation non spécifique (sonde NON) d'une culture pure de la souche PCP-1.

Temps (heure)	Rapport spécifique/ non spécifique
0	2,4
6	3,6
12	4,3
24	2,8
28	2,8
32	3
48	2,6
72	2,6

rapport aux signaux d'hybridations non spécifiques. L'intensité moyenne de fluorescence de l'autofluorescence s'est située entre les valeurs de 3,44 à 4,69 tout au long de l'expérience. Au niveau des signaux de fluorescence du bromure d'éthidium enregistrés au détecteur FL3, très peu de particules non biologiques ont été observées puisque l'ensemble des événements comptés ont été fortement marqués. Aussi, les signaux du bromure d'éthidium ont été relativement constants tout au long de ce suivi, avec un maximum obtenu au temps 24 heures. Les IMF des signaux du bromure d'éthidium sont, pour les temps 0, 6, 12, 24, 28, 32, 48, et 72 respectivement de 16,0, 17,2, 17,4, 25,7, 22,8, 20,1, 22,8 et 20,1. Cependant, les résultats de l'autofluorescence n'étant pas fournis pour chacun des échantillons la comparaison ne peut être effectuée entre chacun de ceux-ci. Mentionnons aussi que les profils de dispersion tout au long de ce suivi sont restés constants ce qui implique que la population de la souche PCP-1 est demeurée constante quant à sa forme, sa taille et sa granulosité.

5. Suivi de la souche *D. frappieri* PCP-1 en consortium méthanogène

Après avoir étudié la technique d'hybridation *in situ* avec la culture pure de *D. frappieri* PCP-1, la prochaine étape de l'étude consistait à procéder à un essai de détection de celle-ci à l'intérieur d'une culture mixte en présence du contaminant 2,4,6-TCP. Ainsi, la présence de la souche PCP-1 a été étudiée en présence d'un consortium méthanogène sur une période de 3 jours. Au temps 0 (Fig. 21), la quasi-totalité de la population était constituée par la souche PCP-1 (95,2%). Cette observation s'explique par l'ensemencement de départ qui s'était effectué en proportion de 12:1 en faveur de la souche PCP-1. Le signal de fluorescence de la population de PCP-1 (IMF=24,9) est bien défini par rapport à l'hybridation non spécifique (IMF=10,7). Au temps 24 heures (Fig. 22), la population de la souche PCP-1 était encore présente en plus grande quantité puisqu'elle représentait 68,7% de la culture mixte. Deux pics ont été observés lors de l'hybridation avec les sondes

spécifiques (Fig. 22B et C) dans l'histogramme de fluorescence et ceux-ci représentent respectivement la population provenant du consortium qui superpose la fluorescence non spécifique (sonde NON) et la population de la souche PCP-1 qui se démarque par l'intensité de son signal de fluorescence d'environ une décade. Au temps 48 heures (Fig. 23), un renversement de situation dans la dynamique des populations a été observé. La population de la souche PCP-1 ne représentait plus que 24,8% de l'ensemble des micro-organismes (Fig. 23C). La démarcation des deux populations était cependant encore clairement observée. Par la suite, les résultats obtenus au temps 72 heures (Fig. 24), montrent que les deux populations tendraient vers un équilibre (39,4% de la population PCP-1 et 60,4% de la population du consortium). Cependant la séparation des signaux de fluorescence des deux populations était moins définie (Fig. 24 B) causé par l'augmentation de l'hybridation non spécifique de la population du consortium lors du contact avec les sondes PCP1-3 et PCP1-4.

5.1. Comptes sur milieu solide

Les comptes totaux de la culture mixte ont été déterminés par cytométrie en flux et par étalement des micro-organismes sur gélose nutritive non sélective (Fig. 25). Les comptes totaux obtenus par cytométrie sont inférieurs d'un facteur de 10 par rapport à ceux obtenus par unités formatrices de colonies. Tout d'abord, au temps 0, les comptes semblent plus concordants alors que le compte obtenu par cytométrie est de $6,7 \times 10^6$ et que le compte par unité formatrice de colonies est de $5,7 \times 10^6$. Par la suite, les comptes obtenus par cytométrie sont de $2,7 \times 10^7$, 8×10^7 et 4×10^7 et par unités formatrices de colonies sont de $2,6 \times 10^8$, $5,1 \times 10^8$ et de 3×10^8 respectivement pour les temps 24, 48 et 72 heures. Également, d'après ces résultats, la proportion de la souche *D. frappieri* PCP-1 par rapport à la population totale, varierait dans le temps. La concentration de la souche PCP-1 obtenue par cytométrie sont de $6,4 \times 10^6$, $1,8 \times 10^7$, $2,2 \times 10^7$, et $1,6 \times 10^7$ respectivement pour les temps 0, 24, 48 et 72 heures.

Figure 22: Hybridation *in situ* de la souche PCP-1 en présence d'un consortium méthanogène au temps 24 heures.

Voir la légende de la figure 21. Les signaux de fluorescence sont mesurés dans la région d'acquisition R2.

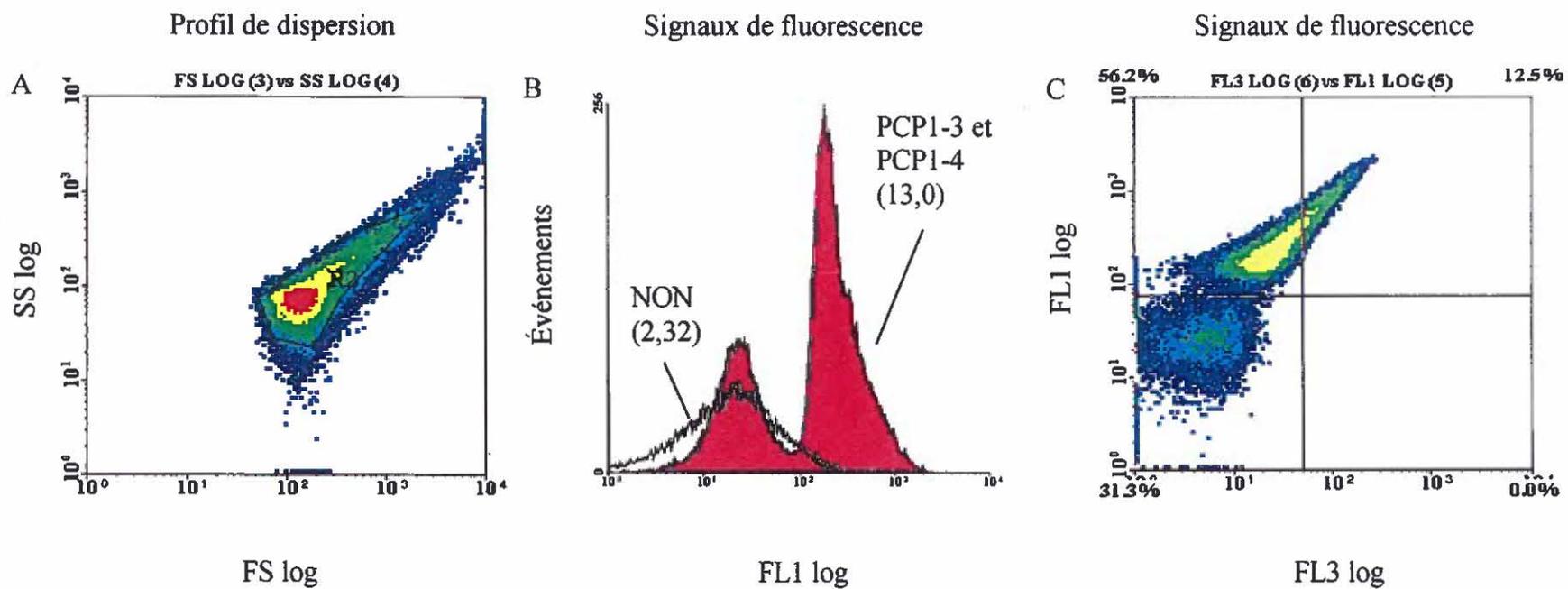


Figure 23: Hybridation *in situ* de la souche PCP-1 en présence d'un consortium méthanogène au temps 48 heures.

Voir la légende de la figure 21. Les signaux de fluorescence sont mesurés dans la région R4.

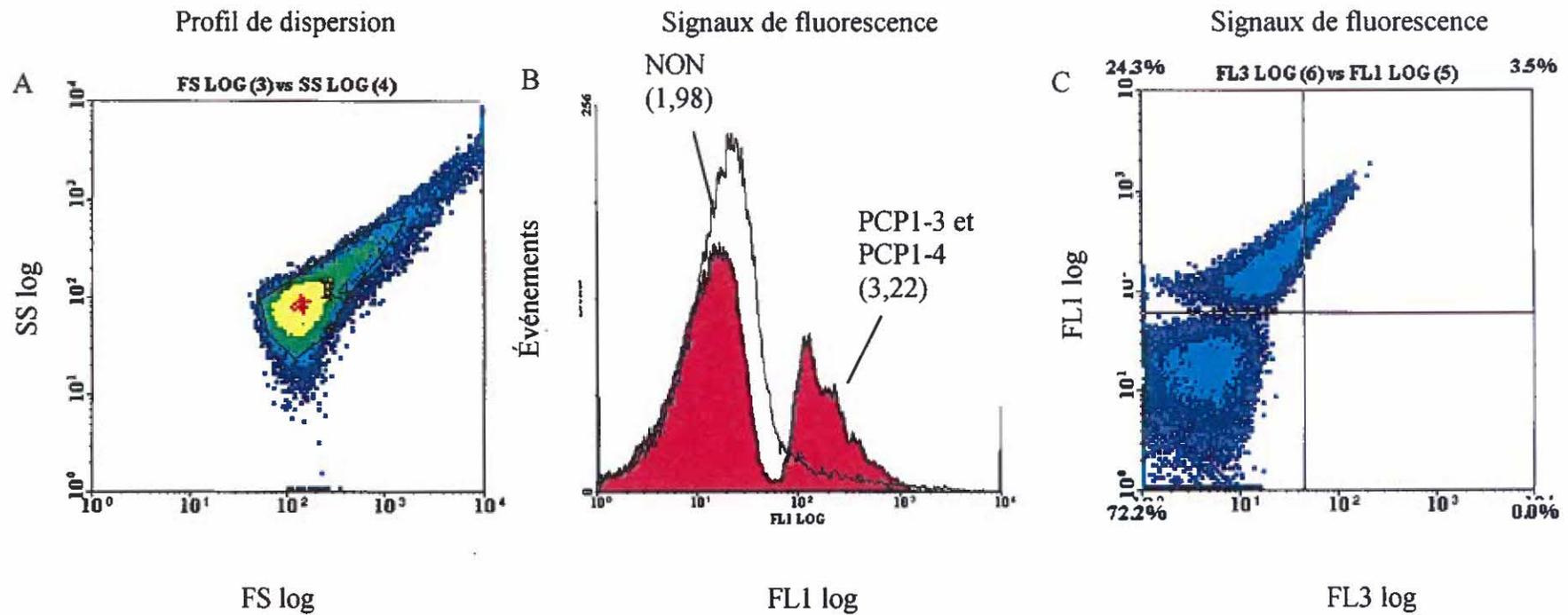


Figure 24: Hybridation *in situ* de la souche PCP-1 en présence d'un consortium méthanogène au temps 72 heures.
 Voir la légende de la figure 21. Les signaux de fluorescence sont mesurés dans la région d'acquisition R5.

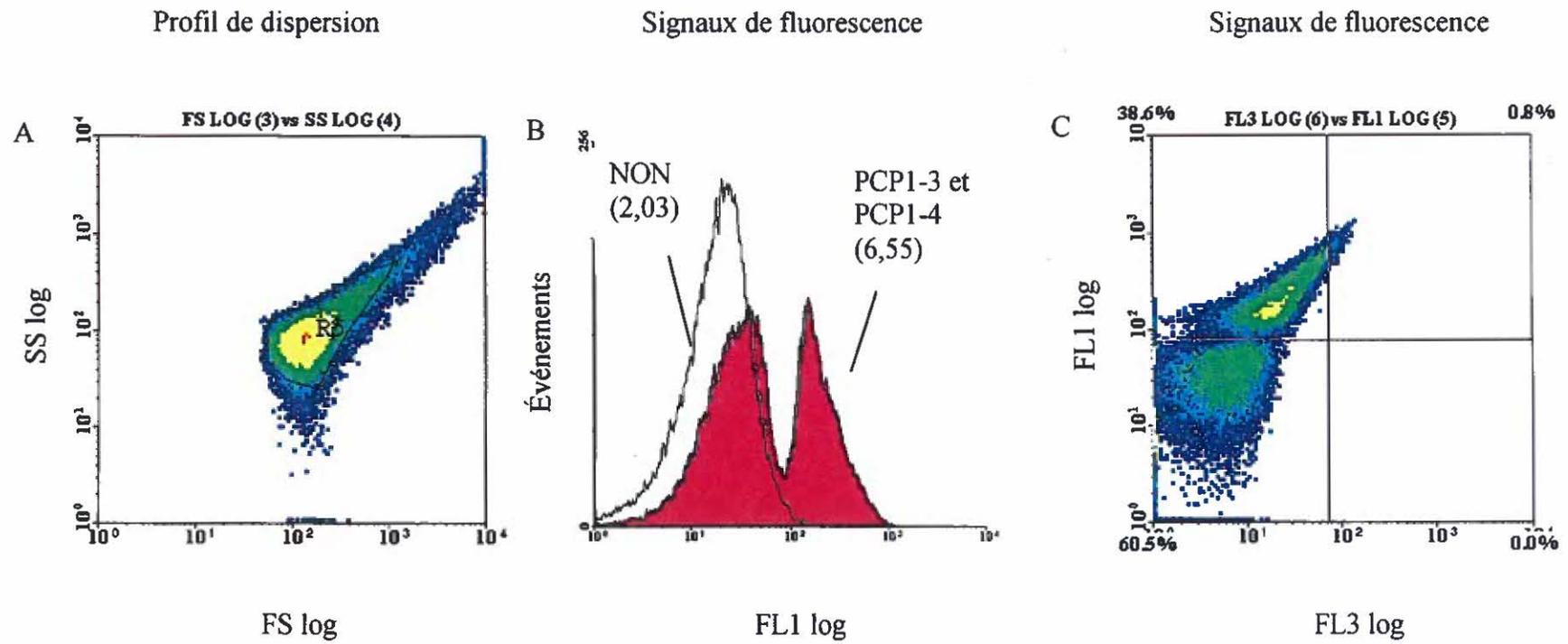


Figure 25 : Concentrations de la souche PCP-1 et des comptes totaux par millilitre obtenues par unités formatrices de colonies (UFC) et par cytométrie dans la culture mixte pendant 72 heures.

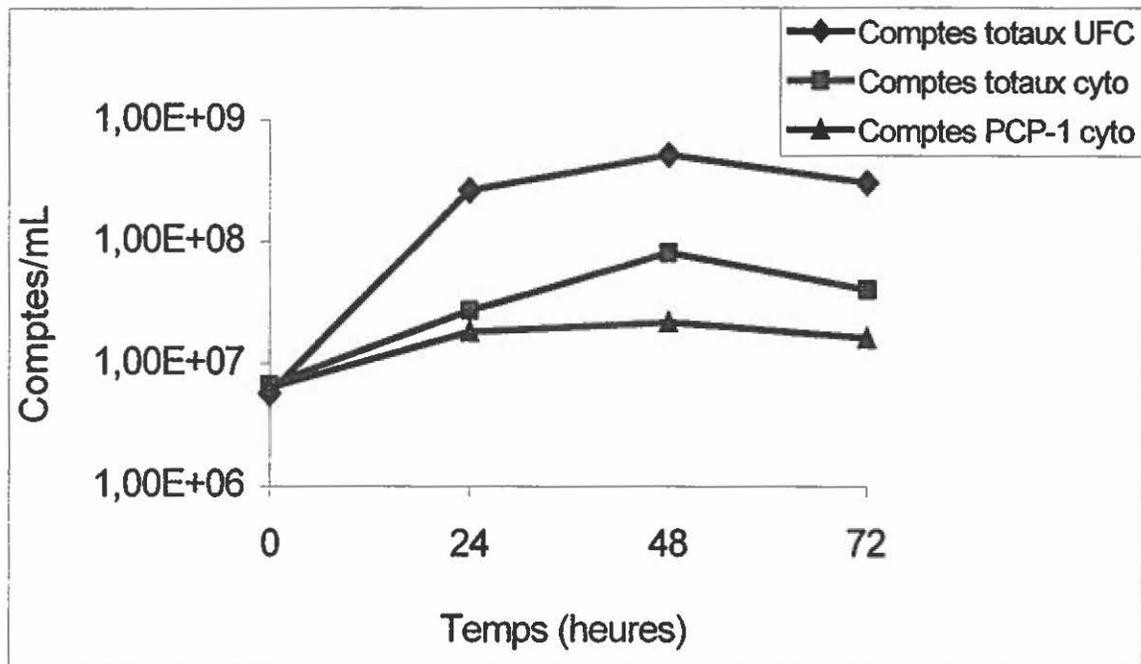
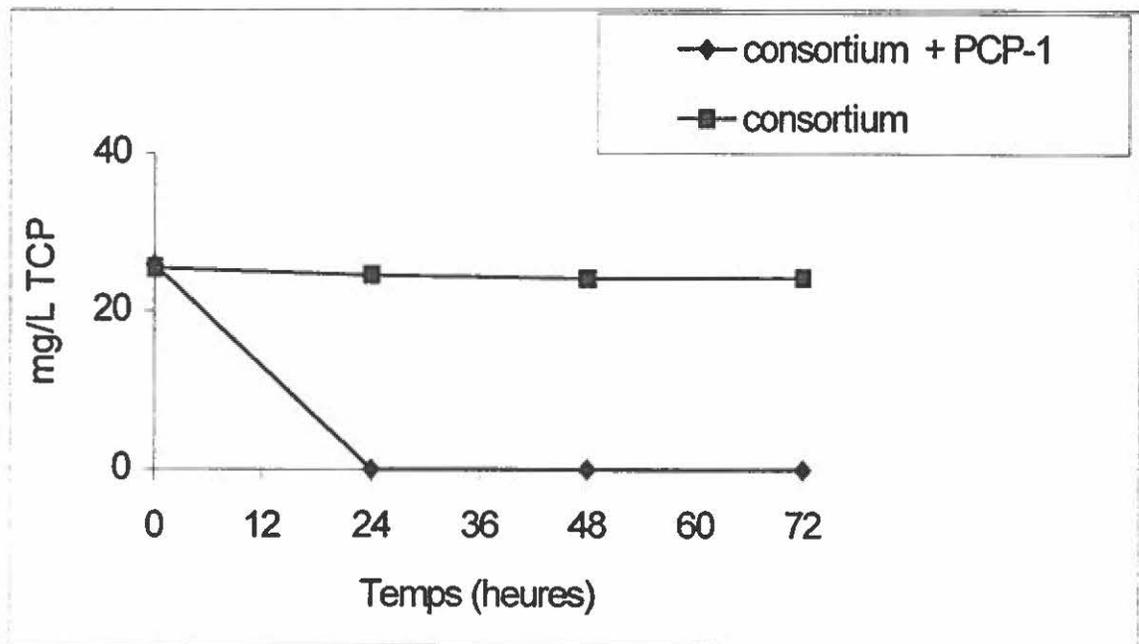


Figure 26: Concentration du TCP dans le consortium méthanogène en présence ou en absence de la souche PCP-1.



5.2. Suivi des chlorophénols

Le suivi de la transformation du 2,4,6-TCP par HPLC a permis de confirmer l'action de la déshalogénéation de la souche PCP-1 dans le consortium. Il a été possible de comparer la disparition du 2,4,6-TCP dans le consortium en présence ou en absence de *D. frappieri* PCP-1 (Fig. 26). La quantité initiale de 2,4,6-TCP a été éliminée complètement après 24 heures dans le consortium en présence de la souche *D. frappieri* PCP-1. En effet, la concentration au temps 0 est de 25,9 mg/L alors qu'aux temps 24, 48 et 72 heures il n'y a aucune trace du contaminant. Cependant, en absence de celle-ci, la concentration du contaminant n'a pas ou a très peu diminué dans les temps étudiés. En effet, les concentrations du contaminant sont passées de 25,5 mg/L, au temps 0, à 24,5 mg/L (au temps 24 heures), 24,1 mg/L (au temps 48 heures) puis à 24,2 mg/L au temps 72 heures.

6. Suivi de la souche *D. frappieri* PCP-1 en microcosmes

Cette expérience consistait à faire le suivi de la souche *D. frappieri* PCP-1 par hybridation *in situ*, jusqu'à la transformation complète du 2,4,6-TCP présent dans un microcosme liquide constitué de 10% de sol non stérile et du milieu de culture habituel de la souche. Des comptes totaux bactériens par étalement ont aussi été effectués dans le but de comparer les comptes obtenus par cytométrie en flux. Cette expérience a été menée à bien à deux reprises et les séries de résultats des deux essais sont exposées successivement. Les résultats de la première expérience sont présentés sous le titre de microcosme #1 tandis que les résultats de la deuxième tentative sont développés sous le titre de microcosme #2.

Lors de la première expérience avec le sol, la population bactérienne a été enrichie grâce à une centrifugation à basse vitesse sur un coussin de Nycodenz. Ce coussin

avait la capacité de retenir les cellules bactériennes à l'interface du milieu de culture et du Nycodenz lorsque celui-ci est utilisé à une concentration de 1,3 g/mL (Lindahl et Bakken, 1995). De plus, cette étape a permis d'éliminer le plus possible les particules de sol. En effet, il est reconnu que les particules organiques et inorganiques du sol peuvent masquer ou diminuer fortement les signaux de fluorescence spécifique des populations visées soit par autofluorescence des particules ou par hybridation non spécifique avec les sondes utilisées (Amann *et al.*, 1995, Hahn *et al.*, 1992). Ainsi, des résultats ont été obtenus en comparant le même échantillon du microcosme #1 avant et après l'extraction au Nycodenz. Ces résultats sont représentés par les profils de dispersion obtenus par cytométrie et illustrés à la figure 27. Nous pouvons entre autres apprécier la diminution de l'ensemble d'événements analysés et du changement du profil de dispersion après le passage sur Nycodenz.

Le suivi de la souche PCP-1 dans le microcosme #1 est présenté aux figures 28 et 29. Les hybridations *in situ* se sont effectuées aux temps 24 et 48 heures. La figure 28A expose le profil de dispersion du microcosme #1 au temps 24 heures. Les signaux de fluorescence spécifiques détectés en FL1 pour le temps 24 heures (Fig. 28B) ont démontré la présence de la souche *D. frappieri* PCP-1 dans une très forte proportion. En effet, un faible pourcentage (20,1%) d'événements non spécifiques a été enregistré dans la première décade avec les sondes PCP1-3 et PCP1-4. Le bromure d'éthidium, colorant d'acides nucléiques, a été utilisé dans l'échantillon d'autofluorescence afin de démarquer les micro-organismes (marqués par le bromure d'éthidium) des particules restantes de sol. Aussi à la figure 28C, la fluorescence révélée par la présence de bromure d'éthidium a démontré qu'une forte majorité de l'ensemble des événements analysés étant majoritairement des micro-organismes (près de 80% dans les quadrants de droite) et non des particules de sol.

Dans la figure 29A, le profil de dispersion du microcosme #1 au temps 48 heures présente une variation lorsqu'il est comparé avec celui du temps de 24 heures.

Figure 27 : Extraction des bactéries par centrifugation à basse vitesse sur un coussin de Nycodenz

Histogrammes du profil de dispersion du microcosme #1, au temps 24 heures avant le passage du microcosme sur Nycodenz (A) et après le passage des cellules sur Nycodenz (B).

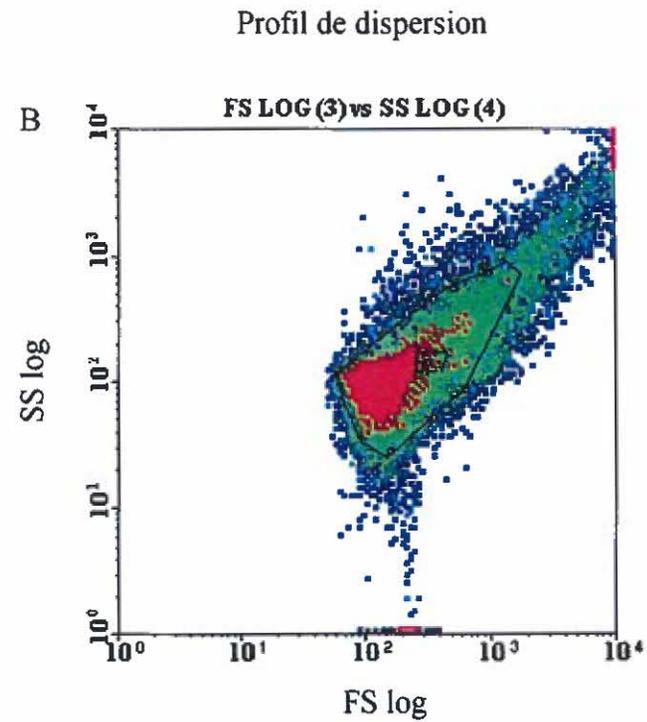
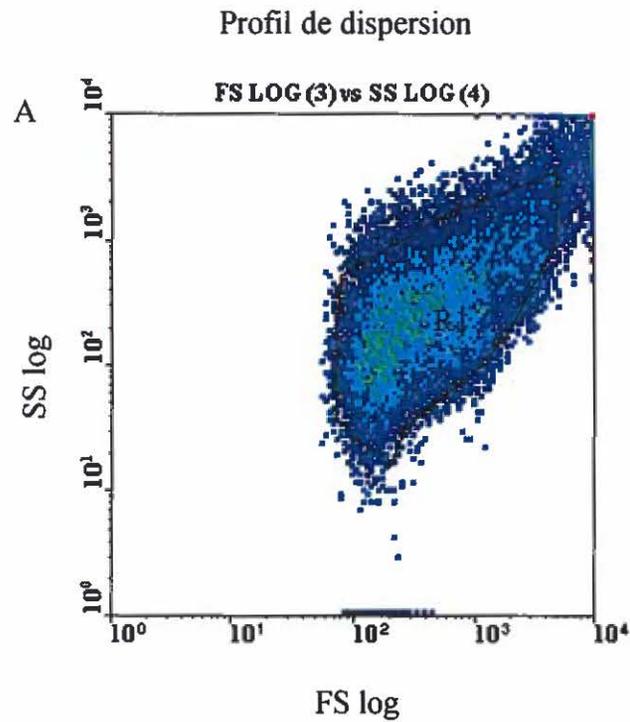


Figure 28: Hybridation *in situ* du microcosme #1 au temps 24 heures.

La population microbienne enrichie du microcosme 1 a été hybridée avec les sondes PCP1-3 et PCP1-4 ou avec la sonde NON, ou colorée au bromure d'éthidium. Histogrammes du profil de dispersion (A) et des signaux de fluorescence des sondes PCP1-3 et PCP1-4 et de la sonde NON (B). Histogramme bi-paramétrique des signaux de l'autofluorescence (FL1) et du bromure d'éthidium (FL3). Les signaux de fluorescence sont mesurés dans la région d'acquisition R7. Les nombres entre parenthèses sont les IMF.

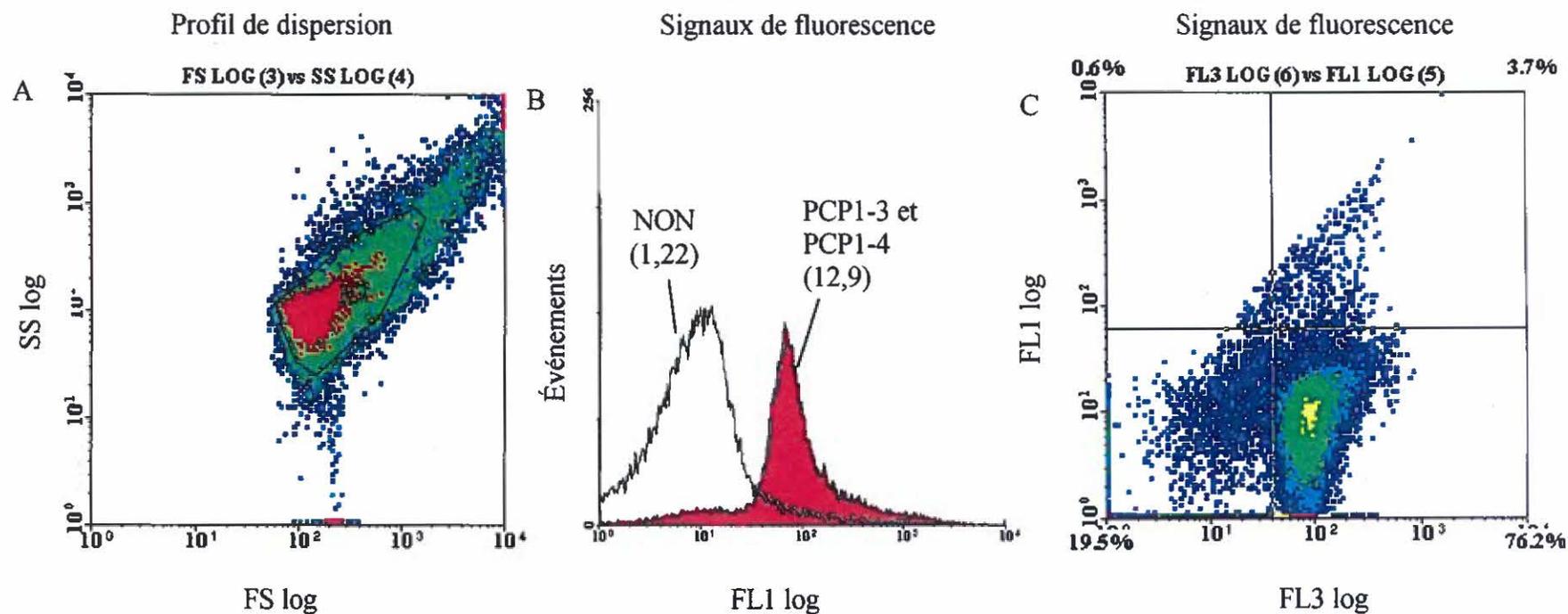
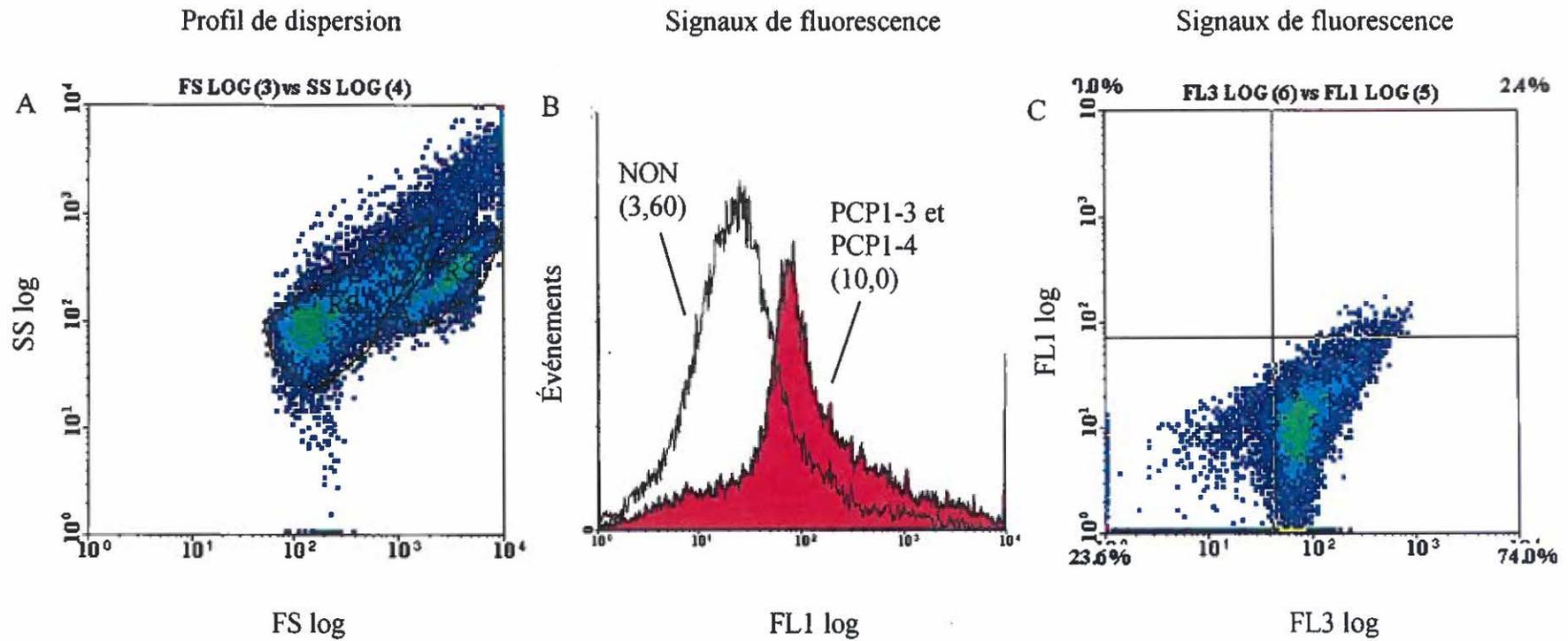


Figure 29 : Hybridation *in situ* du microcosme #1 au temps 48 heures.

Voir la légende de la figure 28. Les signaux de fluorescence sont mesurés dans la région d'acquisition R8



Effectivement, une seconde population est apparue à droite de la population principale (R9). Cette population possède une valeur légèrement supérieure pour la diffraction à grand angle (SS log) ainsi qu'une valeur supérieure pour la diffraction à petit angle (FS log). Cette population aurait donc une plus grande taille ainsi qu'une plus grande granulosité que la population principale. Le signal de fluorescence spécifique à la souche *D. frappieri* PCP-1 était toujours présent en majorité dans le microcosme avec, cependant, une perte d'intensité et une baisse de proportion dans l'ensemble de la population totale et ce, par rapport au temps de 24 heures. En effet, une certaine proportion d'événements n'a pas été marquée par les sondes spécifiques et est rassemblée à gauche du pic principal lors de l'hybridation spécifique à la figure 29B. L'ajout de bromure d'éthidium a encore révélé que la grande majorité des événements analysés était des micro-organismes (près de 76,4% dans les quadrants de droite).

Dans le cas du microcosme #2, les résultats d'hybridation sont présentés aux figures 30 à 35. Dans ce cas-ci le bromure d'éthidium a été ajouté 5 à 10 minutes avant l'analyse des échantillons en cytométrie. Cet ajout a permis de tenter une distinction supplémentaire de la population visée en les distinguant des particules de sol en plus de différencier les événements par la spécificité des sondes, tel qu'étudié par Thomas *et al.* (1997). Tout d'abord, le profil de dispersion du temps 24 heures est présenté à la figure 30A. Ce profil est légèrement différent du temps 24 heures du microcosme #1. Il y a un nombre plus élevé d'événements ayant des valeurs de FS log et SS log plus grandes par rapport à la population habituelle observée et toujours présente. Les signaux de fluorescence spécifiques sont de moindre intensité que ceux du premier microcosme pour la même période de temps (Fig. 30B). Une nette distinction du signal de la population de *D. frappieri* PCP-1 est beaucoup moins évidente. Cependant, il y a eu un déplacement de la population par rapport au signal non spécifique. Le profil de fluorescence des sondes et du bromure d'éthidium est illustré à la figure 31 sous forme d'histogrammes bi-paramétrique. Les signaux de

Figure 30 : Hybridation *in situ* du microcosme #2 au temps 24 heures

La population microbienne enrichie du microcosme #2 a été hybridée avec soit les sondes PCP1-3 et PCP1-4, EUB, NON. Chaque échantillon a été ensuite coloré au bromure d'éthidium. Histogrammes du profil de dispersion (A) et des signaux de fluorescence en FL1 (B) et FL3 (C). Les signaux de fluorescence ont été mesurés à partir de la région d'acquisition R1. Les nombres entre parenthèses représentent les IMF.

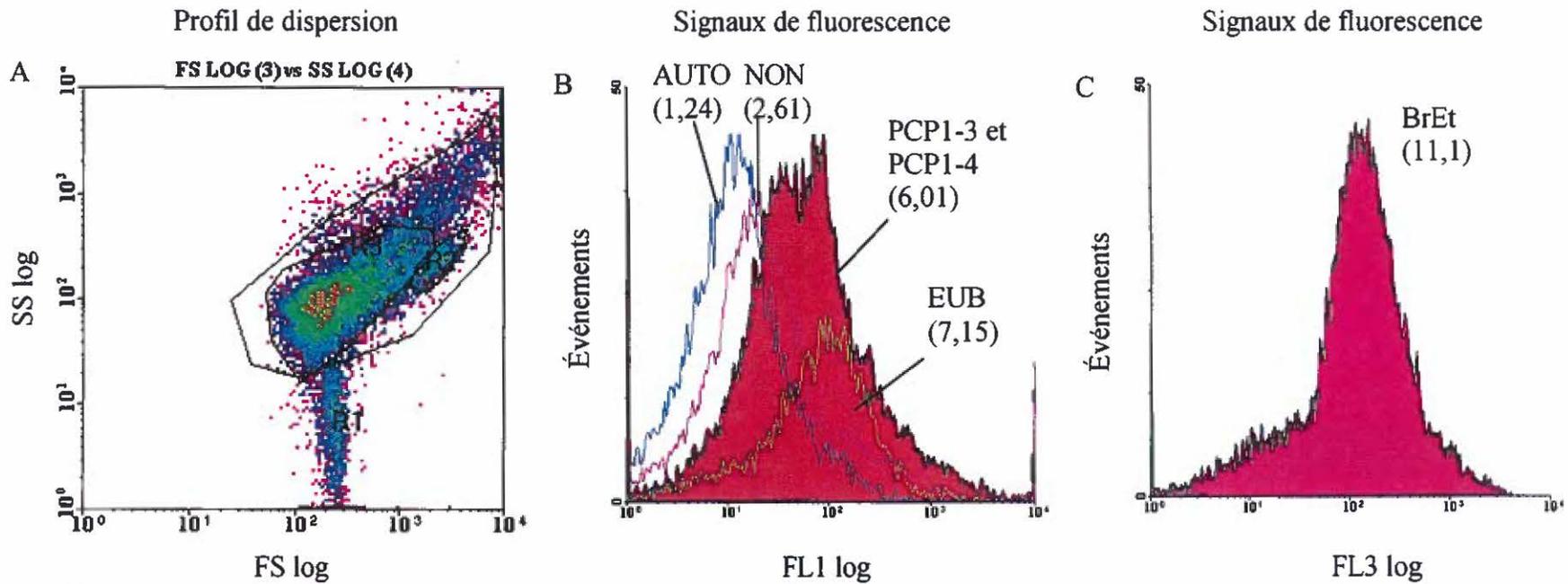


Figure 31: Histogrammes bi-paramétriques des signaux de fluorescence du microcosme #2 au temps 24 heures

Voir légende de la figure 30. Signaux de fluorescence des sondes NON (A), spécifiques PCP1-3 et PCP1-4 (B) et EUB (C) en FL1 et ceux du bromure d'éthidium en FL3.

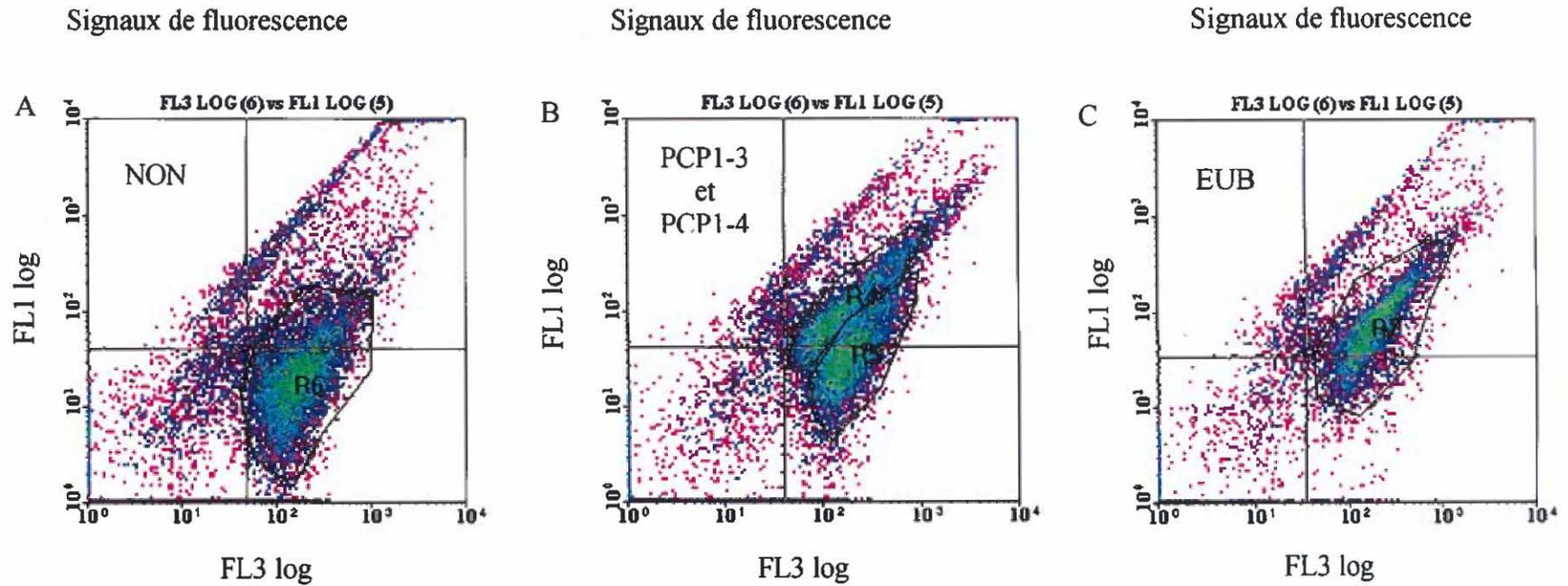


Figure 32 : Hybridation *in situ* du microcosme #2 au temps 48 heures

Voir la légende de la figure 30. Les signaux de fluorescence ont été mesurés à partir de la région d'acquisition R1.

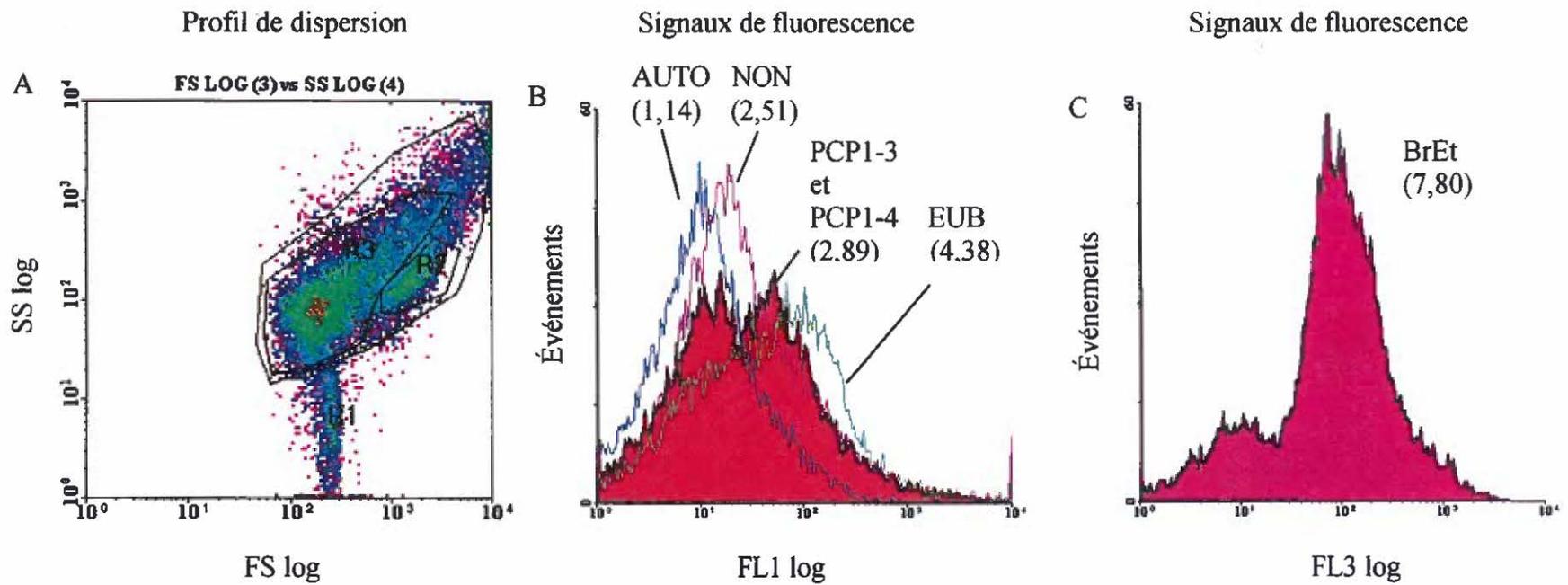


Figure 33 : Histogrammes bi-paramétriques des signaux de fluorescence du microcosme #2 au temps 48 heures

Voir légende de la figure 30.

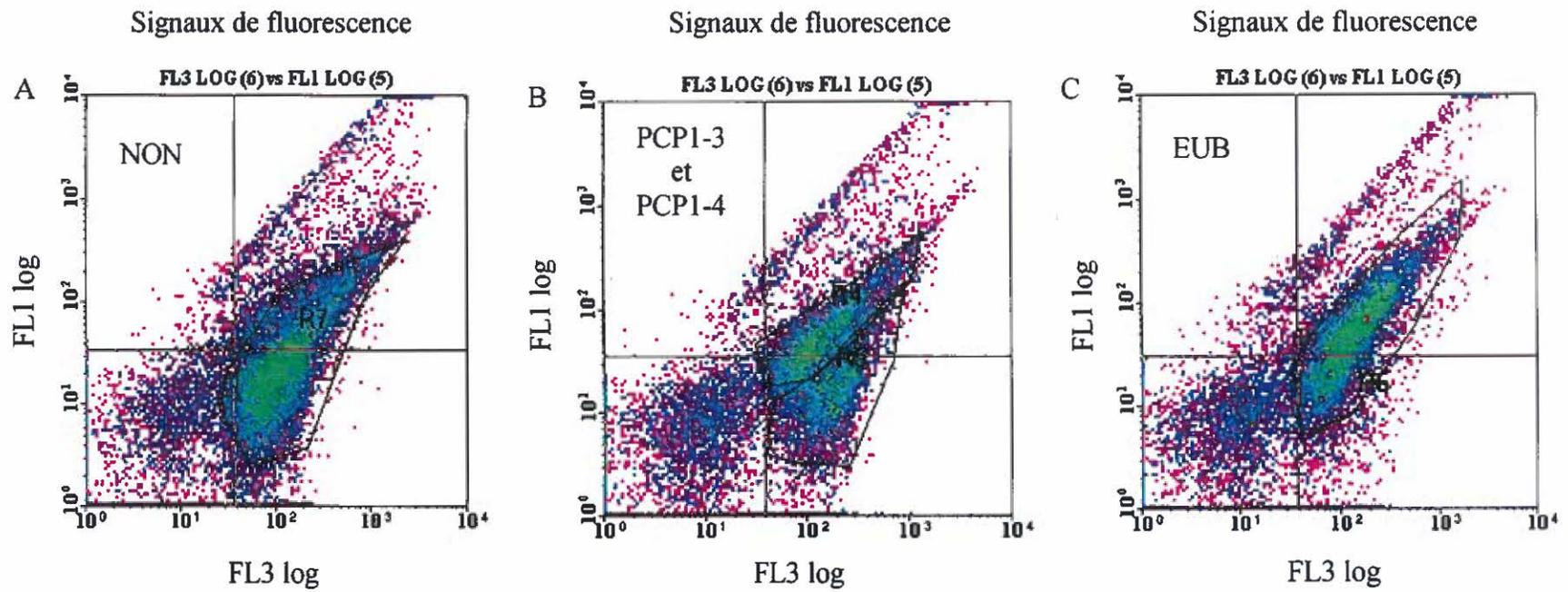


Figure 34 : Hybridation *in situ* du microcosme #2 au temps 72 heures

Voir la légende de la figure 30. Les signaux de fluorescence ont été mesurés à partir de la région d'acquisition R1.

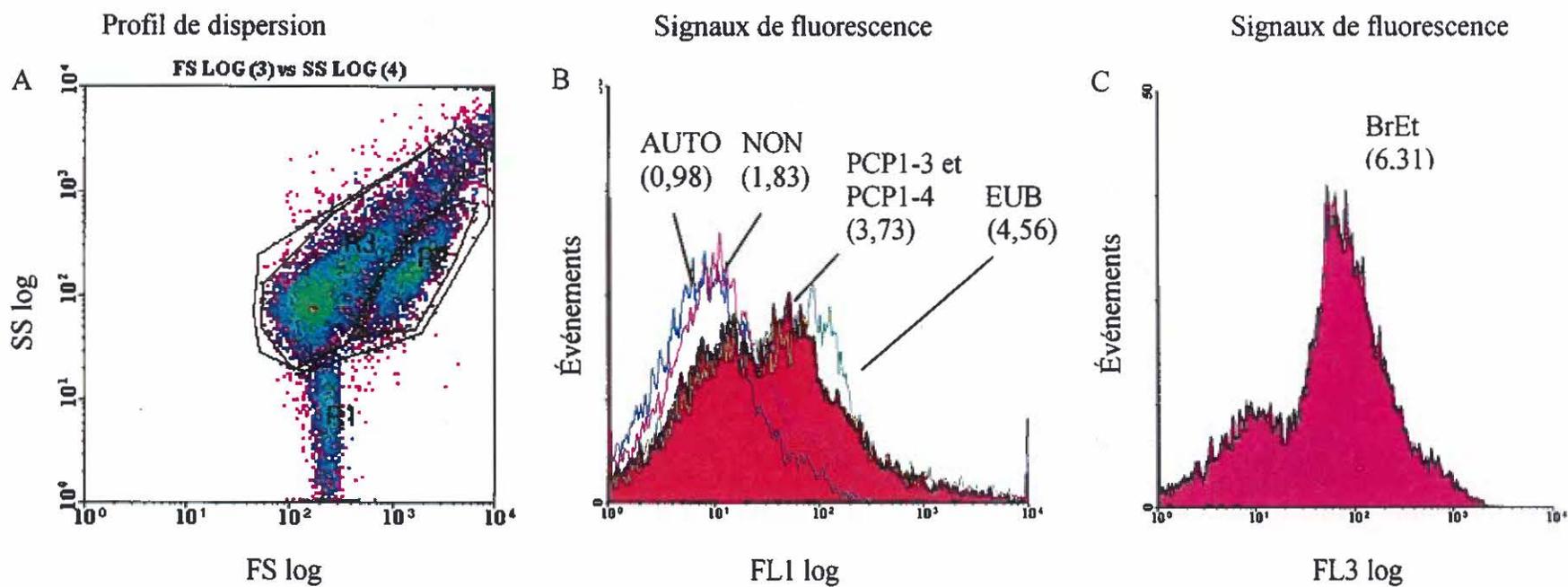
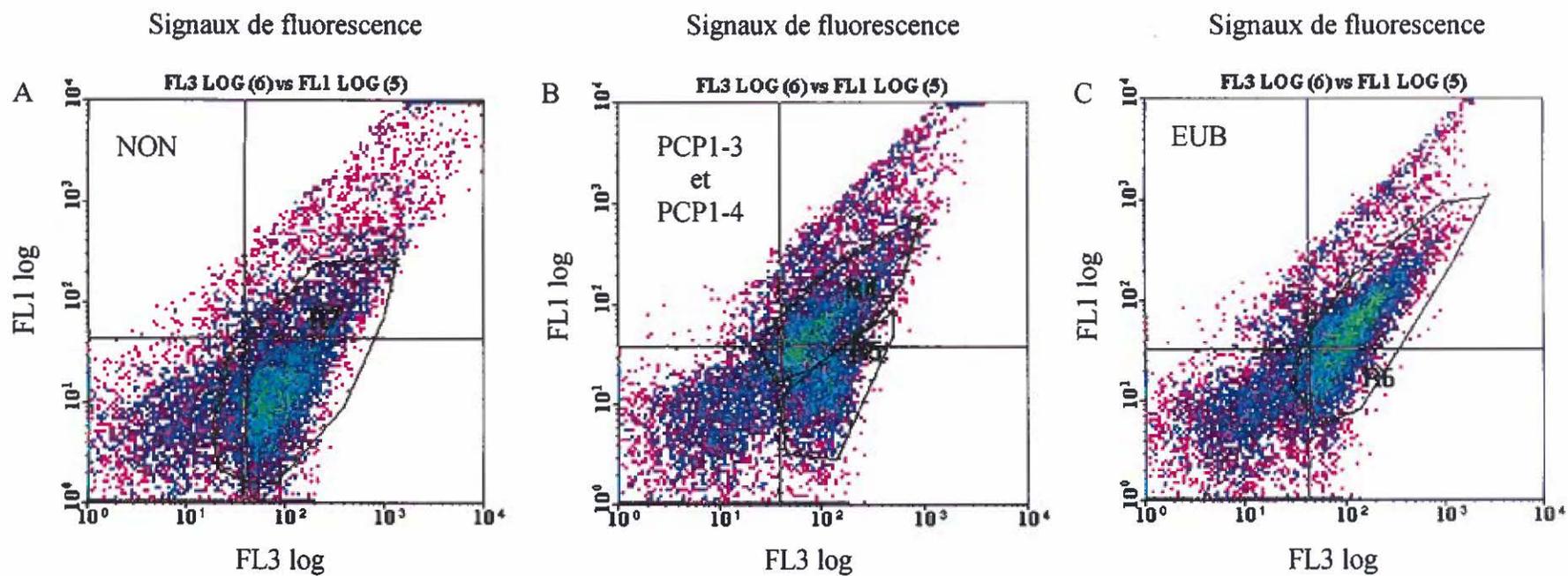


Figure 35 : Histogrammes bi-paramétriques des signaux de fluorescence du microcosme #2 au temps 48 heures

Voir légende de la figure 30. Signaux de fluorescence des sondes NON (A), spécifiques PCP1-3 et PCP1-4 (B) et EUB (C) en FL1 et ceux du bromure d'éthidium en FL3.



fluorescence du bromure d'éthidium (Fig. 31C) a montré que l'ensemble des événements étaient en majorité des micro-organismes.

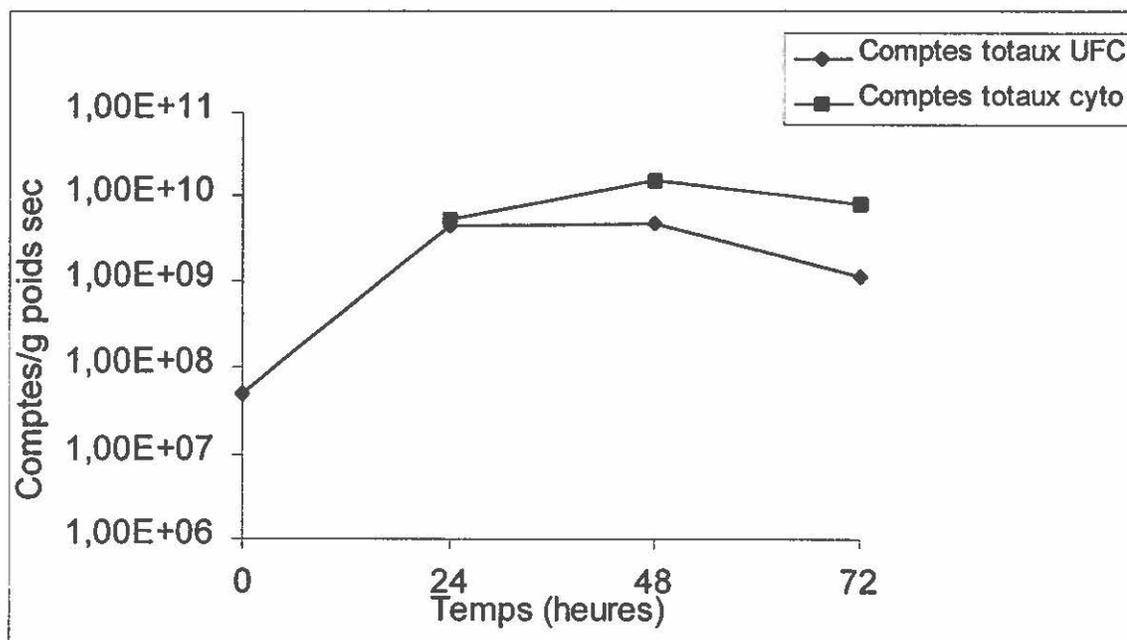
En présence de la sonde NON (Fig. 31A), la population principale était marquée au bromure d'éthidium (FL3) mais pas ou très peu avec la sonde (FL1). En présence des sondes spécifiques (Fig. 31B), deux populations se sont démarquées, la population de PCP-1 et le reste. Finalement, en présence de la sonde EUB (Fig. 31C), l'ensemble de la population s'est bien démarqué du bruit de fond.

Les résultats des temps 48 et 72 heures présentent approximativement les mêmes profils de dispersion (Fig. 32A et 34A) avec une augmentation de la proportion de la population secondaire tel qu'observé dans le microcosme #1. Les signaux des sondes spécifiques PCP1-3 et PCP1-4 (Fig. 32B et 34B) étaient moins intenses après 48 et 72 heures. Le même phénomène a aussi été remarqué avec le microcosme #1. Dans le cas des signaux de fluorescence résultant de la combinaison des deux fluorochromes (Fig. 33C et 35C), une nette distinction entre *D. frappieri* PCP-1 et le reste de la population n'a pu être établie. Cependant, il est possible d'observer sur les mêmes graphiques que les signaux de fluorescence enregistrés en FL3 pour le bromure d'éthidium ont démontré que la majorité des événements analysés étaient bien des micro-organismes mais que cette proportion a eu tendance à décroître par rapport aux particules de sol et que l'intensité a suivi la même diminution que le signal de fluorescence spécifique.

6.1. Comparaison des comptes sur milieu solide et par cytométrie, et suivi des chlorophénols

La comparaison des comptes totaux a été effectuée seulement pour le microcosme #2. Les comptes obtenus par unités formatrices de colonies et par cytométrie ont été comparés pour les temps 24, 48 et 72 heures (Fig. 36). Le temps 0 n'a pas pu être

Figure 36 : Concentration des comptes totaux par gramme de poids sec dans le microcosme 2, pendant 72 heures.

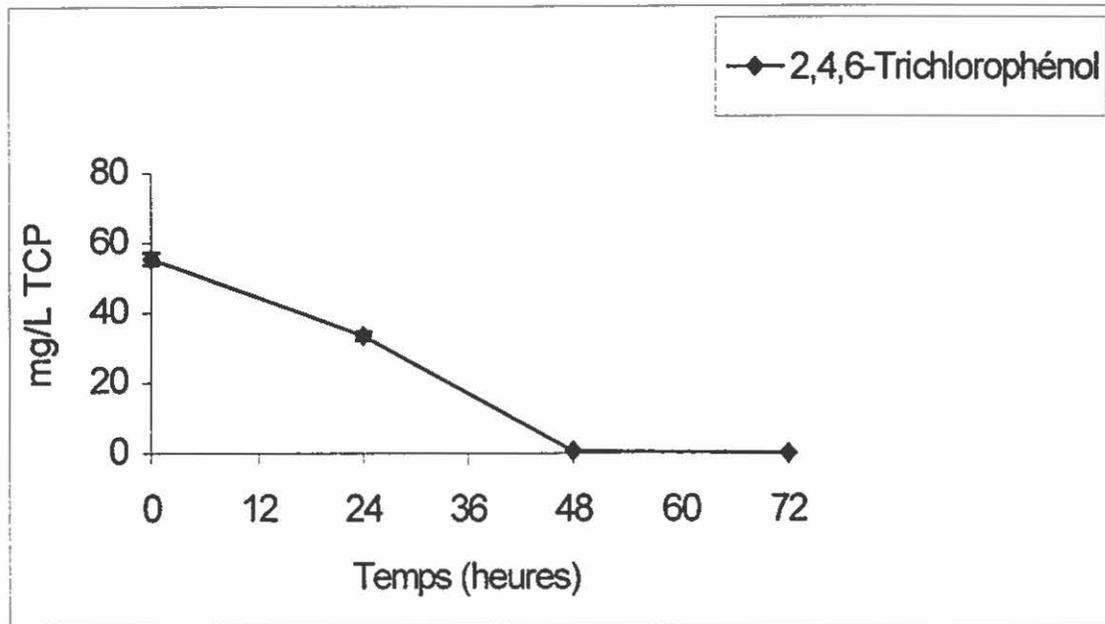


obtenu par cytométrie étant donné le faible nombre de bactéries ayant pu être récupérées au premier temps. Les comptes obtenus par cytométrie ont été légèrement supérieurs à ceux obtenus sur milieu solide.

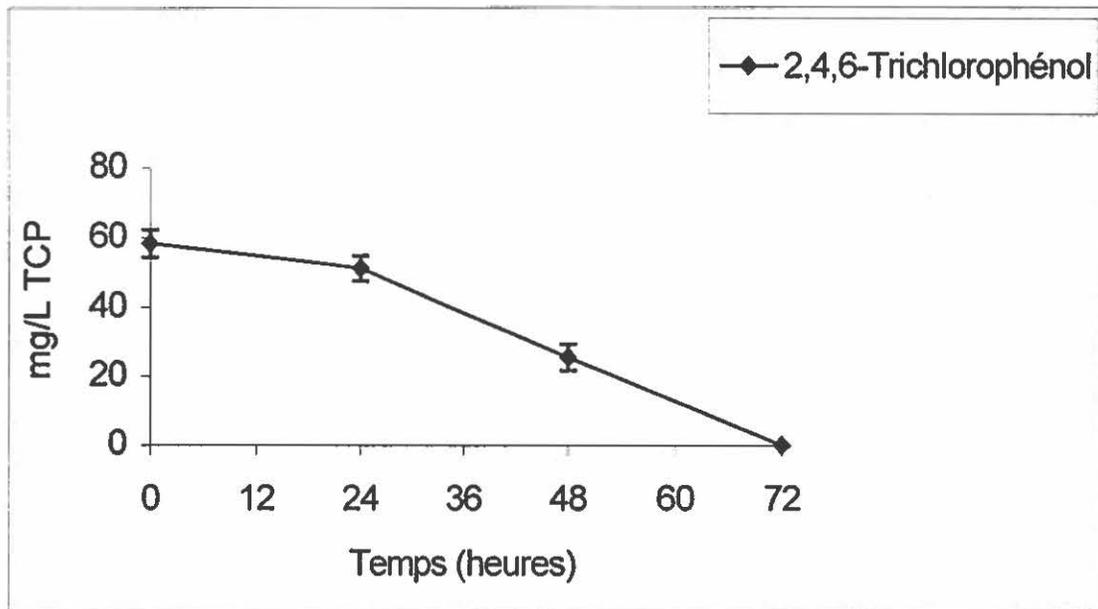
L'analyse de la concentration du contaminant 2,4,6-TCP dans les microcosmes #1 et #2 à différents temps (0, 24, 48 et 72 heures) ont permis d'observer l'évolution de disparition de ce polluant en présence de la souche *D. frappieri* PCP-1 et de sol (Fig. 37). La disparition de 55 à 60 mg/L de trichlorophénol dans les microcosmes a été effective entre 48 et 72 heures.

Figure 37: Concentration de TCP dans les microcosmes #1 (A) et #2 (B) ensemencés avec la souche PCP-1.

A



B



DISCUSSION

1. Développement de protocoles d'hybridation *in situ*

Lors de la mise en place d'un biotraitement, soit par la flore indigène ou par bioaugmentation, le suivi des micro-organismes impliqués dans la dégradation des contaminants s'avère essentiel. En effet, il est nécessaire de s'assurer du maintien des micro-organismes tout au long du biotraitement, de relier la disparition des contaminants au processus biologique ainsi que de prévenir l'arrêt du traitement dû à la disparition des souches impliquées dans la biodégradation. L'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* pour détecter et suivre une souche bactérienne à l'intérieur d'un biotraitement présente plusieurs avantages. Premièrement, face aux méthodes de microbiologie traditionnelles, cette méthode ne nécessite pas une étape de culture des micro-organismes d'intérêt pour pouvoir les étudier. Deuxièmement, la technique d'hybridation *in situ* permet de détecter les bactéries intactes et vivantes dans l'environnement ou dans un biotraitement contrairement à d'autres méthodes tel que le PCR qui détecte les molécules d'acides nucléiques libres ou provenant de bactéries mortes. De plus, la combinaison de la méthode d'hybridation *in situ* avec l'utilisation de la cytométrie en flux permet d'effectuer des analyses rapides, automatisées et quantitatives. Par contre la technique possède aussi quelques limites dont la récupération et l'extraction des cellules impliquées dans un biotraitement. En effet, comme l'hybridation permet de détecter les cellules entières, il est nécessaire de s'assurer d'avoir une quantité minimale de cellules pour pouvoir les déceler au-delà de la limite de détection des outils disponibles tels que la microscopie et la cytométrie en flux. Il faut aussi s'assurer que l'extraction est efficace et qu'elle permet de récupérer l'ensemble de la population microbienne. De plus, si les micro-organismes ne représentent qu'une petite partie de la population totale, les seuils de détection restent à nouveau problématiques. Aussi, les micro-organismes à croissance lente ainsi que ceux en état de latence ne pourront être que difficilement détectés à cause de leur faible contenu en ARNr et donc par la faible possibilité d'hybridation des sondes.

L'application de la technique d'hybridation *in situ* sur des cultures pures est essentielle à réaliser avant d'appliquer la technique directement sur des milieux plus complexes tels que les sols en biotraitement. Ainsi, plusieurs expériences sur des cultures pures de quelques espèces ont été effectuées. D'abord, les hybridations avec les cultures pures des souches *Sphingomonas* sp. 107 et *D. frappieri* PCP-1 a permis d'observer des résultats concluants tandis que les expériences avec les souches 6 et *Mycobacterium* sp. Jo1 ont présenté des résultats moins intéressants. Ces résultats suivent la littérature présentée sur le sujet puisque les bactéries de type Gram négatif, comme *Sphingomonas* sp.107, sont plus facilement perméabilisées. Effectivement, les expériences d'hybridation *in situ* avec des bactéries de type Gram positif sont plus rares et moins concluantes dans la littérature que celles effectuées avec les bactéries de type Gram négatif, et cette situation a guidé en partie l'orientation du projet. De plus, l'hétérogénéité des parois cellulaires des bactéries de type Gram positif (Prescott *et al.*, 1995) permet d'expliquer les traitements variables utilisés pour celles-ci de même que de nombreux échecs.

Les Mycobactéries, par exemple, possèdent habituellement une épaisse paroi cellulaire, avec un contenu en lipides très élevé, et possèdent aussi des chaînes de 60 à 90 carbones (cires) portant le nom d'acides mycoliques. Ces lipides se retrouvent à l'extérieur du peptidoglycane et rendent les Mycobactéries acido-alcool-résistantes (Prescott *et al.*, 1995). Cet élément permet sans doute d'expliquer le très faible signal de fluorescence obtenu lors de l'essai d'hybridation *in situ* avec la souche *Mycobacterium* sp. Jo1 ainsi que la forte adhérence des cellules entre elles nuisant à une resuspension efficace et menant à un profil de dispersion plus étendu.

2. Optimisation de la technique d'hybridation *in situ*

L'optimisation de la technique d'hybridation *in situ* avec la souche *D. frappieri* PCP-1

a comporté plusieurs tentatives. Cependant, la synthèse de nouvelles sondes, visant différentes séquences de l'ARNr 16S, a permis une amélioration du protocole. L'ARNr possède une structure tridimensionnelle où plusieurs séquences hybrident ou interagissent entre elles mais aussi avec les protéines des ribosomes. Ces structures peuvent ainsi cacher les sites d'hybridation des sondes choisies. Une étude de Fuchs *et al.* (1998) a démontré par hybridation *in situ* les différences d'accessibilité de plus de 200 sondes (pour la plupart de 18 nucléotides) visant différents sites de l'ARN 16S de la bactérie *Escherichia coli* et couvrant toute la séquence de celle-ci. À partir du modèle de la structure secondaire, ils ont choisi quelques oligonucléotides qui couvraient les mêmes régions ou hélice mais décalés de 5 à 13 nucléotides. Les sondes étaient marquées à la carboxyfluorescéine et les mesures des bactéries fluorescentes s'effectuaient par cytométrie en flux. Ils ont pu démontrer, par cette étude systématique de l'accessibilité des sites de l'ARNr 16S, des différences allant jusqu'à 44 fois plus d'intensité entre la meilleure et la pire des sondes. En décalant de quelques nucléotides l'intensité obtenue pouvait également varier de beaucoup. Cette étude peut expliquer les faibles intensités ou les variations obtenues lors d'expériences avec certaines de nos sondes. La souche *D. frappieri* PCP-1 possède effectivement une insertion spécifique de 128 nucléotides dans la séquence d'ARN 16S ribosomal (Bouchard *et al.*, 1996) et dans laquelle 3 des sondes spécifiques utilisées sont ciblées. Dans le cas de la première sonde utilisée (PCP1-1), le signal de fluorescence obtenu lors de l'hybridation spécifique était adéquat mais un meilleur signal obtenu par la combinaison des sondes PCP1-3 et PCP1-4 a permis une meilleure démarcation de la population de la souche PCP-1 en culture mixte et en présence de particules de sol. Parmi les sondes utilisées, certaines n'ont démontré que très peu de différence avec l'hybridation non spécifique (sonde NON) possiblement à cause d'un repliement particulier ou des liaisons des sites d'hybridation des sondes. Par ailleurs, la combinaison de 4 sondes n'a pas produit un meilleur signal de fluorescence que la combinaison des deux sondes PCP1-3 et PCP1-4. De même, une étude de Lee *et al.* (1993) a montré que l'utilisation de plus de 5 sondes ne participait pas à l'obtention

d'une meilleure fluorescence et que l'accessibilité des sites choisis pour les sondes est souvent limitée.

Il existe d'autres outils qui peuvent s'ajouter au protocole d'hybridation *in situ* pour augmenter les signaux de fluorescence. Ces outils sont utiles lorsqu'une faible quantité d'ARNr est présente dans les bactéries visées ou lorsque l'autofluorescence du milieu ou des cellules camoufle le signal. En effet, lorsque les bactéries sont dans l'environnement ou impliquées dans un bioprocédé, leur état métabolique se retrouve à un plus bas niveau qu'en culture pure ou en période de forte croissance. Dans ces cas, le nombre de ribosomes est moindre donc moins de copies de la séquence visée sont disponibles.

Ainsi, le développement de sondes d'ADN liées de façon covalente à une molécule de biotine, elle-même conjuguée à un complexe streptavidine-peroxydase de raifort (SA-HRP), a été inspiré d'une technique utilisée en immunochimie. La peroxydase du raifort est utilisée comme enzyme reporteur qui catalyse la déposition sur les cellules fixées de molécules de tyramide marquées par un fluorochrome (fluorescéine, tetramethylrhodamine, cyanine 3 ou aminomethylcoumarine). Cette méthode a été développée par la compagnie DuPont, et est appelée *TSA-direct systems*. Lebaron *et al.* (1997) ont utilisé cette technique afin de détecter des bactéries à partir d'un échantillon d'eau de mer. Ils ont pu obtenir une amplification du signal d'environ 12 fois celui normalement atteint avec un oligonucléotide marqué par un fluorochrome. De plus, 78% de la communauté microbienne totale a pu être détecté comparativement à un taux de 30% avec l'utilisation d'un oligonucléotide marqué. Par ailleurs, Schönhuber *et al.* (1997) ont simplifié le système en liant directement la peroxydase du raifort à l'oligonucléotide. L'élimination d'une étape permet la diminution de liaisons non spécifiques et ils ont pu obtenir un signal de 10 à 20 fois supérieur qu'en utilisant la sonde marquée par un fluorochrome. Schönhuber *et al.* (1999) ont également pu distinguer des cyanobactéries de leur propre autofluorescence par le

même système ce qui n'était pas possible avec un oligonucléotide marqué uniquement par un fluorochrome dû à leur forte pigmentation naturelle. Ces trois études (Schönhuber *et al.*, 1997, 1999, Lebaron *et al.*, 1997) ont cependant toutes insisté sur la principale limitation de la méthode: obtenir une excellente perméabilisation. Ils ont aussi mentionné l'impossibilité de détecter plusieurs souches avec cette méthode même en utilisant des molécules qui s'attaquent à la paroi cellulaire telles que le lysozyme, la protéinase K et le sodium dodecyl sulfate-dithiothreitol. La pénétration de molécules à haut poids moléculaires telles que les enzymes et la streptavidine, augmentant de 6000 à 50 000 fois le poids moléculaire total d'une sonde marquée par un seul fluorochrome (Amann *et al.*, 1992), entraînent donc une perméabilisation plus difficile. En effet, la limite entre la lyse cellulaire et l'accessibilité des molécules visées se rétrécit dangereusement.

Également, une méthode inspirée de l'hybridation *in situ* et de la technique du PCR a été utilisée à quelques reprises afin de provoquer une amplification du signal de fluorescence: le PCR *in situ*. Une première méthode de PCR *in situ* a été développée par Hodson *et al.* (1995) et modifiée par Tani *et al.* (1998) afin de détecter des bactéries à croissance lente ou en état de dormance et qui sont présentes dans l'environnement. Cette méthode consiste à fixer et perméabiliser les cellules afin de laisser pénétrer les oligonucléotides, la polymérase, les désoxynucléotides (dNTP) et les désoxynucléotides uridines (dUTP) marqués à la digoxigénine. L'amplification effectuée, les produits de PCR qui ont introduit des dUTP sont détectés par des anticorps anti-digoxigénine couplés à la phosphatase alcaline. Ensuite, l'ajout de l'acide-2-hydroxy-3-naphtoïque 2'-phénylanilide-phosphate (HNPP) et de Fast Red TR produit un signal rouge fluorescent par l'association de la forme déphosphorylée (par la phosphatase alcaline) du HNPP et du fluorochrome Fast Red TR. Avec cette technique, l'équipe de Tani *et al.* (1998) a pu détecter par microscope à épifluorescence et à l'aide d'une amorce spécifique à *Escherichia coli* cette bactérie à l'intérieur d'une communauté microbienne tirée d'une rivière polluée. Le signal

obtenu s'est révélé environ 8 fois supérieur à celui obtenu lors de l'utilisation d'oligonucléotides marqués par un seul fluorochrome et a permis la visualisation d'image à très fort contraste. Cependant, Hodson *et al.* (1995) mentionne que la perméabilisation est une étape critique de la technique car il faut modifier la membrane suffisamment pour permettre aux enzymes et aux réactifs de pénétrer, tout en gardant les produits de PCR à l'intérieur et l'intégrité cellulaire pour la détection au microscope.

Ces deux méthodes sont donc limitées par la perméabilisation. Cette étape de l'hybridation *in situ* est particulièrement difficile à obtenir avec les bactéries de type Gram positif telle que la souche *D. frappieri* PCP-1. Aussi les nombreux essais effectués avec cette souche afin d'augmenter l'efficacité de la perméabilisation n'ont pas donné de meilleurs résultats avec les produits tels que le SDS, le chlorure de benzalkonium, le lysozyme, l'HCl concentré, l'eau de javel et le chloramphénicol. Mentionnons que l'effet du chloramphénicol tel que rapporté par Ouverney et Furhman (1997) aurait dû augmenter la quantité de molécules d'ARN ribosomal et ainsi permettre d'augmenter le signal enregistré en éliminant les protéines responsables de la dégradation de ces molécules. Cependant, lors d'études subséquentes effectuées dans le laboratoire du Dr Villemur, la souche *D. frappieri* PCP-1 s'est révélée résistante à d'importantes doses de cet antibiotique expliquant possiblement l'absence d'effet de cette tentative.

3. Comparaison des comptes de *D. frappieri* PCP-1 par cytométrie en flux et par étalement

Le développement d'un milieu solide adapté à la croissance de la souche *D. frappieri* PCP-1 a permis d'obtenir des colonies en moins de 48 heures plutôt que de 10 à 15 jours habituels obtenus avec l'utilisation du milieu standard Columbia. Le milieu était constitué du milieu de croissance en culture liquide dans lequel la souche est cultivée

en milieu depuis quelques années mais avec un ajout d'agarose au lieu d'agar. La souche était parfaitement acclimatée à ce milieu de culture, contrairement au milieu Columbia acheté commercialement et utilisé précédemment comme milieu de culture solide. La souche a donc été en mesure de croître rapidement. L'ajout d'agarose peut sembler étonnant puisque aucune croissance n'avait été obtenue en utilisant de l'agar. Les impuretés pouvant se retrouver dans celui-ci ont pu inhiber la croissance de la souche contrairement à l'agarose purifié qui a été utilisé avec succès. De plus, une étude a récemment démontré que la croissance de la souche *Desulfitobacterium dehalogenans* a augmenté de 2,7 fois lorsque seulement 1% d'agar purifié a été utilisé (Smidt *et al.*, 1999) suggérant ainsi que les impuretés contenues dans l'agar inhibent la croissance des souches du genre *Desulfitobacterium*.

Lors de l'expérience visant à comparer la concentration de la souche PCP-1 obtenue par unités formatrices de colonies sur le nouveau milieu et par cytométrie en flux, les comptes observés par cytométrie se sont révélés inférieurs d'un facteur de 10. Le suivi d'une culture pure de la souche PCP-1 sur trois jours ont montré que l'écart entre les deux méthodes était constant. Cette différence pourrait être due à la tendance d'agglutination des cellules PCP-1 et causant ainsi un problème important lors du défilement des cellules dans la veine d'entraînement du cytomètre. Effectivement, les cellules passeraient en groupe, au lieu d'une par une, variant de quelques-unes à possiblement plus d'une dizaine. La moyenne des groupes serait de 10 cellules étant donné l'écart observé d'un facteur de 10. Dans les différents histogrammes de profil de dispersion de la souche *D. frappieri* PCP-1 en culture pure présentés dans la section Résultats, nous avons observé que les profils étaient en effet assez étendus, en forme de poire, et terminés avec une longue extrémité représentant les événements les plus gros et granuleux, possiblement des groupes de plusieurs bactéries. Bien que le tampon utilisé tout au long de l'expérience possédait du pyrophosphate, reconnu pour favoriser la dispersion d'agrégats (Manz *et al.*, 1994), et que les cellules avaient subi une vive agitation mécanique, des efforts supplémentaires devraient être orientés vers

la séparation des agrégats par diverses méthodes chimiques ou physiques sans pour autant empêcher la visualisation des cellules et de leur fluorescence.

4. Intensité de la fluorescence en fonction du temps de la culture de *D. frappieri* PCP-1

Le suivi sur 3 jours de la souche PCP-1 en culture pure par hybridation *in situ* couplé à la cytométrie a permis quelques observations. Tout d'abord, les histogrammes de profil de dispersion ont conservé la même forme tout au long des analyses. Ainsi, la population de la souche PCP-1 est restée constante dans sa taille et sa granulosité au cours de la phase de croissance observée. La coloration des cellules au bromure d'éthidium a permis d'observer la variation d'ARNr présent à l'intérieur des cellules. En effet, le bromure d'éthidium possède la capacité de s'intercaler à l'intérieur des séquences d'acides nucléiques de manière non spécifique à toutes les 4 ou 5 bases (Haugland et Johnson, 1996) et permettant par la suite la détection par microscopie ou cytométrie en flux. Ainsi, plus l'intensité de la fluorescence émise par le bromure d'éthidium est forte, plus il devrait y avoir de molécules d'ARNr par cellules. En culture pure, le signal de fluorescence de la souche PCP-1 a conservé sensiblement la même intensité tout le long de l'expérience. Cependant, au temps 6 et 12 heures, l'intensité moyenne de fluorescence avait atteint son maximum (respectivement 3,6 et 4,3), en comparant les rapports des IMF des hybridations spécifique au non spécifique (tableau 3).

Dans le suivi des signaux de l'autofluorescence et des hybridations spécifique et non spécifique, la plus grande différence de fluorescence obtenue entre l'hybridation spécifique et non spécifique a été obtenue aux temps 6 et 12 heures. Il est reconnu qu'une relation claire existe entre la composition des cellules en macromolécules telles l'ARN, l'ADN et les protéines et la phase de croissance (Binder et Liu, 1998). Particulièrement, le contenu en ARN ribosomal serait lié étroitement à l'évolution des

cellules dans la phase de croissance et ainsi, l'intensité de la fluorescence par cellule varierait selon la phase de croissance (DeLong *et al.*, 1989).

Une estimation de la phase de croissance de la souche PCP-1 a pu être tentée. La phase de latence, dans laquelle il n'y a pas augmentation du nombre ou de la masse cellulaire et dans laquelle de nouveaux composants cellulaires commencent à être synthétisés, se situerait entre les temps 0 et 6 heures. La phase exponentielle ou logarithmique, dans laquelle la souche PCP-1 se divise à la vitesse maximale se situerait entre les temps 6 et 12 heures. C'est dans cette phase où l'on retrouve le plus grand nombre de macromolécules dont l'ARNr. Finalement, la phase stationnaire, dans laquelle un équilibre entre la division et la mort cellulaire survient, se situerait entre le temps 12 et 24 heures et durerait au moins jusqu'au temps 72 heures, temps auquel les expériences se sont achevées. Pendant cette période, la production de déchets organiques produits par les cellules augmentent (Prescott *et al.*, 1995) avec l'évolution dans la phase de croissance et peut ainsi expliquer l'augmentation de la fluorescence de l'hybridation non spécifique particulièrement à partir des temps 32, 48 et 72 heures. Notons que les courbes de croissance varient selon les espèces de même que par la nature et la composition du milieu dans lequel les micro-organismes sont. La courbe de croissance peut aussi dépendre de la quantité de l'inoculum et sa qualité (par exemple provenant d'une culture âgée ou refroidie) (Prescott *et al.*, 1995).

5. Suivi de la souche de *D. frappieri* PCP-1 en consortium méthanogène

La série d'expérience sur le suivi de la souche *D. frappieri* PCP-1 à l'intérieur d'un consortium méthanogène a permis d'observer la dynamique de la population pendant 72 heures. Les histogrammes de profil de dispersion pour les différents temps échantillonnés ont conservé la même silhouette démontrant que les micro-organismes du consortium possèdent approximativement la même taille et granulosité que la population de la souche PCP-1. De plus, les histogrammes des signaux de

fluorescence ont montré que les signaux découlant de l'hybridation des sondes PCP1-3 et PCP1-4 se démarquant d'au moins une décade par rapport aux signaux de l'hybridation non spécifiques pendant les trois jours échantillonnés. Ainsi, le protocole d'hybridation *in situ* spécifique à la souche PCP-1 s'est révélé très efficace étant donné la bonne démarcation entre la population du consortium et la souche PCP-1. Ces résultats suggèrent que le contenu en ribosomes était suffisant et que la population de la souche PCP-1 était donc clairement active pendant ce temps. D'ailleurs la totalité du trichlorophénol a été transformé en moins de 24 heures, comparativement au consortium seul dans lequel le trichlorophénol n'a pas été transformé. Notons que le plus haut taux de transformation du 2,4,6-trichlorophénol a été observé par Madsen et Aamand (1992) et que 1700 mg/L de 2,4,6-TCP a été transformé en 72 heures par une culture mixte enrichie. Toutefois, au temps 72 heures l'écart entre la fluorescence spécifique et non spécifique était moins prononcé. La baisse du signal de fluorescence enregistré peut provenir de la diminution de l'ARN visé selon la progression des cellules dans la phase de croissance. En effet, tel que décrit dans la section ci haut, l'ARNr varierait selon la phase de croissance et entraînerait donc une évolution des signaux de fluorescence pendant ce suivi. De plus, l'augmentation de l'hybridation non spécifique au temps 72 heures a été observée. Celle-ci pourrait être due à l'augmentation de débris organiques dans la cellule proportionnellement à la phase de croissance (Prescott *et al.*, 1995) et ainsi entraîner une augmentation de l'hybridation non spécifique.

Dans le cas des comptes totaux obtenus par unités formatrices de colonies et par cytométrie en flux, les concentrations bactériennes obtenues par cytométrie ont toujours été approximativement de 10 fois inférieures. Encore une fois, l'agglomération naturelle des bactéries de la souche PCP-1 aurait empêcher un compte correspondant aux unités formatrices de colonies. Par contre, les concentrations de la souche PCP-1 et des comptes totaux par cytométrie correspondaient aux observations des histogrammes de fluorescence. En effet, au temps 0, la souche PCP-1 constituait

l'ensemble de la population étudiée tandis qu'au temps 24 heures, elle constituait près de 70% de la population totale. Par la suite, la souche PCP-1 représentait près de 30% de la population totale au temps 48 heures et près de 40% au temps 72 heures. La diminution de la concentration de la souche PCP-1 est sûrement due à l'augmentation de la microflore du consortium méthanogène. En effet, la quantité initiale injectée du consortium (0,25 mL) était moindre que celle de la culture de la souche PCP-1 injectée (3 mL) et a donc permis une augmentation de la concentration des micro-organismes du consortium méthanogène.

L'utilisation de la cytométrie en flux combinée à l'hybridation *in situ* permet d'effectuer des analyses de haute résolution, rapides et automatisées des micro-organismes spécifiques (Wallner *et al.* 1993). Effectivement la distinction de la souche PCP-1 des autres bactéries du consortium méthanogène a été possible et l'utilisation du cytomètre a permis d'effectuer une estimation de la population de la souche PCP-1 de manière objective et automatisée. De plus, la possibilité d'effectuer des analyses multiparamétriques permettent de retirer davantage d'informations sur la composition microbienne de l'échantillon étudié (Porter *et al.* 1996).

6. Suivi de la souche de *D. frappieri* PCP-1 en microcosmes

Dans la dernière partie du projet de maîtrise, la souche PCP-1 a été ajoutée à des microcosmes composés de 10% de sol non stérile et du milieu minimal de culture de la souche. La présence du sol occasionne des conséquences importantes pour la réalisation du protocole d'hybridation *in situ*. En effet, les particules de sol peuvent entraîner différents problèmes tels qu'une augmentation de l'hybridation non spécifique, l'émission de l'autofluorescence des composantes du sol, la récupération plus difficile des micro-organismes et aussi la distinction des micro-organismes d'intérêt dans une flore indigène abondante (Hahn *et al.*, 1992).

Afin de remédier à quelques-uns de ces problèmes, dont l'hybridation non spécifique, l'autofluorescence et la récupération, la centrifugation des extraits de sol sur un coussin de Nycodenz a été privilégiée. Cette centrifugation a permis de récupérer les micro-organismes du microcosme anaérobie et ainsi réduire l'interaction nuisible des particules de sol. Il aurait été intéressant de connaître la proportion de micro-organismes récupérés par cette méthode. Cependant, ces manipulations ne pouvaient s'effectuer à l'intérieur de l'enceinte anaérobie et étant donné la sensibilité de la souche PCP-1 à l'oxygène; celle-ci n'aurait pu être cultivée et analysée.

Des résultats intéressants ont été obtenus par le suivi de la souche PCP-1 dans deux microcosmes. Premièrement, au temps 24 heures du microcosme #1, le signal de fluorescence spécifique de la souche PCP-1 s'est démarqué d'une décade et demie du signal de fluorescence non spécifique. De plus, la population de PCP-1 constituait visiblement la majorité de la population puisque seulement un faible nombre d'événements, lors de l'hybridation spécifique, n'ont pas hybridé avec les deux sondes PCP1-3 et PCP1-4. Ces événements pouvaient être constitués de particules de sol résiduelles ou de micro-organismes autres que la souche PCP-1. Quant au signal de fluorescence du bromure d'éthidium, celui-ci nous a indiqué que près de 80% des événements analysés sont effectivement des micro-organismes, démontrant l'efficacité de la récupération.

Au temps 48 heures, l'histogramme du profil de dispersion a révélé qu'une population secondaire (région R9) est apparue avec une taille et une granulosité plus grande que la population principale. Cette population secondaire serait donc composée d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes dont la taille et la granulosité seraient supérieures à celles de la souche PCP-1. Cette population est aussi en forme de comète comme la population de la souche PCP-1 et serait possiblement composée de plusieurs espèces différant légèrement de taille et de granulosité l'une de l'autre et/ou d'agglutinations de cellules de la même espèce. Celle-ci a pu avoir provoqué des

répercussions sur le signal de fluorescence spécifique dans lequel un plus grand nombre d'événements, par rapport au temps 24 heures, superpose la fluorescence non spécifique. Aussi, le signal de fluorescence spécifique a diminué en intensité, possiblement à cause d'une réduction de l'ARN ribosomal cible au cours de la phase de croissance. Encore une fois, le signal de fluorescence du bromure d'éthidium a indiqué que la réduction des particules de sol a permis d'obtenir un proportion de près de 80% de micro-organismes. L'ensemble des résultats ont concordé avec la transformation complète et rapide du trichlorophénol après 24 heures, suggérant que la population de la souche PCP-1 ait été fortement active pendant les premières 24 heures.

Dans le cas du microcosme #2, le premier signal de fluorescence spécifique enregistré au temps 24 heures était plus faible par rapport au premier signal obtenu avec le microcosme #1. De plus, avec l'histogramme du profil de dispersion de la lumière, la population secondaire, observée au temps 48 heures dans le microcosme #1 est apparue dès le temps 24 heures. Cette population pouvant émettre de l'autofluorescence, celle-ci a pu masquer la fluorescence spécifique à la population de la souche PCP-1 et expliquer la moins bonne démarcation obtenue dans le microcosme #2 qu'avec le microcosme #1. La population de la souche PCP-1 a aussi été certainement moins active dans ce second microcosme et la concentration d'ARN ribosomal ciblé par les sondes PCP1-3 et PCP1-4 n'a pas permis une aussi bonne discrimination de la population indigène que pour le premier essai. Les histogrammes bi-paramétriques ont permis d'observer la distinction obtenue entre les particules de sol, la population indigène et la population de la souche PCP-1 lors des hybridations avec les sondes non spécifique, spécifique et universelle. Lors de l'hybridation avec la sonde NON au temps 24 heures, la majorité des événements n'ont pas hybridé avec cette sonde, tel qu'attendu. Cependant, ceux-ci ont été colorés par le bromure d'éthidium démontrant que la majorité des événements étaient effectivement des micro-organismes. L'ensemble de la population a aussi hybridé avec la sonde

universelle EUB, hybridant avec toutes les eubactéries. Les événements enregistrés étaient donc pour la plupart des eubactéries. Par contre, lors de l'hybridation avec les sondes spécifiques (PCP1-3 et PCP1-4), bien que nous ayons observé deux populations de micro-organismes dans les quadrants de droite des histogrammes biparamétriques, la démarcation entre celles-ci est restée évasive. Ces résultats concordent avec le faible signal de fluorescence spécifique obtenu en absence de bromure d'éthidium et démontrent une faible activité de la population PCP-1. Aussi, l'ajout de bromure d'éthidium a masqué partiellement le signal de fluorescence de la fluorescéine (Thomas *et al.* 1997) et a pu nuire à une meilleure démarcation, bien que la concentration ait été ajustée pour en minimiser l'interaction. Aux temps 48 et 72 heures, les histogrammes de profil de dispersion sont restés les mêmes avec une légère augmentation de la population secondaire. Encore une fois, la présence de la population secondaire a pu masquer les signaux de fluorescence spécifique par l'autofluorescence de cette population et aussi par la possibilité d'hybridation non spécifique avec les sondes PCP1-3 et PCP1-4. Les signaux de fluorescence spécifique ont diminué avec le temps tel qu'observé précédemment et étaient aussi de faible intensité par rapport à ceux obtenus avec le microcosme #1. Les histogrammes biparamétriques ont toujours montré les mêmes résultats. Cependant, ajoutons que la proportion de micro-organismes a diminué ainsi que le signal du bromure d'éthidium. Ces résultats peuvent s'expliquer par une moins bonne extraction par Nycodenz pour ces deux échantillons mais aussi par une forte mortalité des cellules provoquant un enregistrement d'événements qui sont en fait des micro-organismes morts. Cette période serait survenue plus tôt dans le microcosme #2 que le #1 car dès la première analyse, la population ne démontrait pas la même intensité de fluorescence. La population aurait été moins active dans le microcosme #2 et aurait posséder une quantité moindre d'ARNr cible.

La comparaison des concentrations de la souche PCP-1 dans le microcosme #2 par cytométrie en flux et par unités formatrices de colonies a présenté des résultats

étonnants. En effet, les expériences précédentes ont toutes démontrés une surestimation des comptes par unités formatrices de colonies plutôt que par cytométrie en flux. Dans ce cas-ci, les comptes obtenus par cytométrie se sont révélés égaux ou supérieurs que ceux obtenus par unités formatrices de colonies. Cependant, cette différence peut être en partie expliquée par l'inégalité de la quantité d'échantillon prélevé pour le cytomètre (4 mL) par rapport à la quantité de départ prélevée pour l'étalement sur milieu solide (0,1 mL). La différence d'échantillonnage peut sans doute expliquer cet écart.

7. Perspectives

D'autres outils et méthodologies ont été développés et peuvent être associés à la technique d'hybridation *in situ* pour en permettre une utilisation avantageuse. Mentionnons l'utilisation du microscope confocal et de l'analyse d'image en trois dimensions a permis l'établissement de nouveaux standards de précision. Le microscope confocal permet de visualiser non seulement les micro-organismes eux-mêmes selon un plan à deux dimensions mais aussi leur positionnement, leur croissance et leur métabolisme dans le système en plus des environnements physico-chimiques et biochimiques encadrant chaque cellule (Caldwell *et al.*, 1992). L'analyse par ordinateur permet la création d'image numérique et ainsi d'éliminer l'interférence d'objets hors foyer pour créer des reconstructions 3-D. Le microscope confocal combiné avec l'hybridation *in situ* permet donc d'étudier les relations des micro-organismes avec son micro-environnement en temps réel.

Aussi, les récentes études effectuées par Nielsen *et al.* (1999) de même que par Ouverney et Fuhrman (1999) ont démontré l'importance d'accroître les connaissances sur la composante structure-fonction des micro-organismes dans leur environnement. Ces études ont porté sur la combinaison de la technique d'hybridation *in situ* avec la microautoradiographie. Cette combinaison vise à analyser les liens entre

l'identification, la diversité et l'activité des différents composants à l'intérieur d'une communauté microbienne. Cet aspect prend de l'importance non seulement dans la compréhension des abondantes associations microbiennes mais aussi dans la compréhension plus vaste des cycles biogéochimiques dans lesquels les transformations s'effectuent pour la plupart par des consortium et non par une seule espèce microbienne.

Finalement, l'introduction de gènes biomarqueurs à l'intérieur des micro-organismes cibles se révèle aussi une technique des plus prometteuses. Par exemple, le gène *lux*, un gène bioluminescent fusionné avec un gène de dégradation pourrait être utilisé afin de suivre l'expression des gènes de dégradation dans un biotraitement. Lorsque le gène de dégradation est exprimé, la lumière est émise et peut être mesurée indiquant le niveau d'expression du gène ciblé (Atlas *et al.*, 1992). Aussi, la *protéine fluorescente verte* ou GFP (Green Fluorescent Protein), est un gène biomarqueur important. Cette protéine est issue de la méduse *Aequorea victoria* et possède la propriété, lorsque exprimé et excité, d'émettre de la fluorescence verte. Cette propriété permet donc d'analyser par microscopie confocale ou cytométrie en flux, lorsque le gène est introduit dans un souche bactérienne d'intérêt, d'effectuer des analyses directement sur des cellules vivantes (Inouye et Tsuji, 1994).

Ainsi, les techniques issues de la biologie moléculaire combinées aux méthodes plus traditionnelles de la microbiologie vont permettre une meilleure analyse de la diversité microbienne de même qu'un meilleur suivi des micro-organismes impliqués dans la dégradation de contaminant.

CONCLUSION

La participation des micro-organismes dans l'assainissement des sites contaminés constitue une alternative efficace et intéressante par rapport aux méthodes physiques de décontamination répandues telles que l'incinération. La biorestauration peut s'effectuer grâce à la flore indigène du site ou par l'introduction de micro-organismes ayant la capacité de dégrader un contaminant. Afin de s'assurer de la réussite et de l'efficacité d'un biotraitement, le suivi des micro-organismes impliqués dans la dégradation des contaminants se révèle comme un paramètre important à étudier. Contrairement aux méthodes traditionnelles de microbiologie, les outils de la biologie moléculaire permettent la détection de micro-organismes par un procédé rapide, sensible et spécifique et ce, sans avoir eu à les cultiver. Toutefois, la quantité de micro-organismes et leur récupération des échantillons environnementaux subsistent en tant que facteurs déterminants dans la réussite de certaines techniques. Également, la quantité du matériel génétique des micro-organismes, tel que le contenu en ribosomes, détermine l'intensité des signaux obtenus et contribue au succès des différents outils.

Au cours de ce projet de maîtrise, une technique d'hybridation *in situ* permettant de détecter la souche de type Gram positif *Desulfotobacterium frappieri* PCP-1 a été mise au point. Cette souche possède la capacité de déshalogéner le pentachlorophénol et d'autres composés aromatiques homocycliques et hétérocycliques. La création d'un nouveau milieu de culture solide a permis de comparer les concentrations de la souche PCP-1 obtenues par unités formatrices de colonies et par cytométrie en flux. La technique d'hybridation *in situ* a été utilisée avec succès afin de suivre la souche PCP-1 à l'intérieur d'un consortium méthanogène, en présence du contaminant trichlorophénol. Aussi, la même technique a été appliquée afin de détecter la souche PCP-1 introduite dans un microcosme composé de sol non stérile, du milieu de culture minimal liquide et en présence du contaminant trichlorophénol. Bien que la distinction de la souche PCP-1 des particules de sol et de la microflore indigène ait été réussie, seulement une estimation des concentrations de la souche a pu être réalisée.

L'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* combinée à la cytométrie en flux a permis de détecter avantageusement la bactérie de type Gram positif *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 en culture pure, à l'intérieur d'un consortium méthanogène ainsi que dans un microcosme comprenant du sol non stérile. De plus, l'utilisation de la cytométrie en flux a permis d'effectuer des analyses rapides et automatisées. Par contre, bien que la technique ait réussi à détecter la souche dans plusieurs conditions, elle a aussi confirmé une importante corrélation de la réussite de la technique avec la phase de croissance de la culture.

Quoique les méthodes traditionnelles utilisées en microbiologie demeureront indispensables et continueront de se développer, les techniques de biologie moléculaire permettent d'accéder à une voie portée sur l'étude des fonctions et structures des communautés microbiennes provenant de différents écosystèmes.

BIBLIOGRAPHIE

- Amann, R. I., Zarda, B., Stahl, D. A., Schleifer, K.-H. 1992. « Identification of Individual Prokaryotic Cells by Using Enzyme-Labeled rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes ». Applied and Environmental Microbiology **58**(9): 3007-3011.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. 1995. « Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation ». Microbiological Reviews **59**(1): 143-169.
- Amann, R. I., Springer, N., Schnönhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E. N., Müller, K.-D., Michel, R. 1997. « Obligate Intracellular Bacterial Parasites of *Acanthamoebae* Related to *Chlamydia* spp ». Applied and Environmental Microbiology **63**(1): 115-121.
- Atlas, R. M., Sayler, G., Burlage, R. S., Bej, A. K. 1992. « Molecular Approaches for Environmental Monitoring of Microorganisms ». Biotechniques **12**: 706-717.
- Bidnenko, E., Mercier, C., Tremblay, J., Tailliez, P., Kulukauskas, S. 1998. « Estimation of the State of the Bacterial Cell Wall by Fluorescent In Situ Hybridization ». Applied and Environmental Microbiology **64**(8): 3059-3062.
- Binder, J. B., Liu, Y. C. 1998. « Growth Rate Regulation of rRNA Content of a Marine *Synechococcus* (Cyanobacterium) Strain ». Applied and Environmental Microbiology **64**(9): 3346-
- Bouchard, B., Beudet, R., Villemur, R., McSween, G., Lépine, F., Bisailon, J.-G. 1996. « Isolation and Characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an Anaerobic Bacterium Which Reductively Dechlorinates Pentachlorophenol

to 3-Chlorophenol ». International Journal of Systematic Bacteriology **46(4)**: 1010-1015.

Boyd, S. A., Shelton, D. R., Berry, D., Tiedje, J. M. 1983. « Anaerobic Biodegradation of Phenolic Compounds in Digested Sludge ». Applied and Environmental Microbiology **46(1)**: 50-54.

Boye, M., Jensen, T. K., Møller, K., Leser, T. D., Jorsal, S. E. 1998. « Specific Detection of the Genus *Serpulin*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in Porcine Intestines by Fluorescent rRNA *in situ* Hybridization ». Molecular and Cellular probes **12**: 323-330.

Braun-Howland, E. B., Danielsen, S. A., Nierzwicki-Bauer, S. A. 1992, « Development of a Rapid Method for Detecting Bacterial Cells *In Situ* Using 16S rRNA-Targeted Probes ». Biotechniques **13(6)**: 928-933.

Braun-Howland, E. B., Vescio, P. A., Nierzwicki-Bauer, S. A. 1993. « Use of Simplified Cell Blot Technique and 16S rRNA-Directed Probes for Identification of Common Environmental Isolates ». Applied an Environmental Microbiology **59(10)**: 3219-3224.

Brockman, F. J. 1995. « Nucleic-Acid-Based Methods for Monitoring the Performance of *in situ* Bioremediation ». Molecular Ecology **4**: 567-578.

Bruce, K. D., Hiorns, W. D., Hobman, J. L., Osborn, A. M., Strike, P., Ritchie, D. A. 1992. « Amplification of DNA from Native Populations of Soil Bacteria by Using Polymerase Chain Reaction ». Applied and Environmental Microbiology **58**: 3413-3416.

- Caldwell, D. E., Korber, D., R., Lawrence, J. R. 1992. « Confocal Laser Microscopy and Digital Image Analysis in Microbial Ecology », in: Advances in Microbial Ecology (K. C. Marshall, ed.), Plenum Press, New York, pp.1-67.
- Cary, S. C., Cottrell, M. T., Stein, J. L., Camacho, F., Desbruyères, D. 1997. « Molecular Identification and Localization of Filamentous Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Annelid *Alvinella pompejana* ». Applied and Environmental Microbiology 63(3): 1124-1130.
- Cerniglia, C. E. 1992. « Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ». Biodegradation 3: 351-368.
- Christensen, H., Hansen, M., Sørensen, J. 1999. « Counting and Size Classification of Active Soil Bacteria by Fluorescence In Situ Hybridization with an rRNA Oligonucleotide Probe ». Applied and Environmental Microbiology 65(4): 1753-1761.
- Dagher, F., Déziel, É., Lirette, P., Paquette, G., Bisailon, J.-G., Villemur, R. 1997. « Comparative Study of five Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacterial Strains Isolated from Contaminated Soils ». Canadian Journal of Microbiology 43: 368-377.
- Davey, H. M., Kell, D.B. 1996. « Flow Cytometric and Cell sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses ». Microbiological Reviews 60(4): 641-696.
- Davey, H. M., Kell, D.B. 1997. « Fluorescent Brighteners: Novel Stains for the Flow Cytometric Analysis of Microorganisms ». Cytometry 28: 311-315.

- DeLong, E. F., Wickham G. S., Pace, N. R. 1989. « Phylogenetic Stains: Ribosomal RNA-Based Probes for the Identification of Single Microbial Cells ». Science **243**: 1360-1363.
- de los Reyes, F. L., Ritter, W., Raskin, L. 1997. « Group-Specific Small-Subunit rRNA Hybridization Probes To Characterize Filamentous Foaming in Activated Sludge Systems ». Applied and Environmental Microbiology **63**(3): 1107-1117.
- Dennie, D., Gladu, I., Lépine, F., Villemur, R., Bisailon, J.-G., Beaudet, R. 1998. « Spectrum of the Reductive Dehalogenation Activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 ». Applied and Environmental Microbiology **64**(11): 4603-4606.
- Dietrich, M. A., Truax, R.E., French, D. D., Lea, D. F., Stear, M. J., Newman, M. J. 1991. « Measurement of Antibody Binding to Intact Bacteria Using Flow Cytometric Techniques ». Journal of Microbiological Methods **13**: 281-291.
- El Fantroussi, S., Mahillon, J., Naveau, H., Agathos, S. N. 1997. « Introduction of Anaerobic Dechlorinating Bacteria into Soil Slurry Microcosms and Nested-PCR Monitoring ». Applied and Environmental Microbiology **63**: 806-811.
- Erhart, R., Bradford, D., Seviour, R. J., Amann, R., Blackall, L. L. 1997. « Development and Use of Fluorescent *In Situ* Hybridization Probes for the Detection and Identification of "*Microthrix parvicella*" in Activated Sludge ». Systematic Applied Microbiology **20**: 310-318.
- Franks, A. H., Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., Welling, G. W. 1998. « Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by

- Fluorescent In Situ Hybridization with Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes ». Applied and Environmental Microbiology 64(9): 3336-3345.
- Fuchs, B. M., Wallner G., Beisker, W., Schwiipp, I., Ludwig, W., Amann, R. 1998. « Flow Cytometric Analysis of the In Situ Accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes ». Applied and Environmental Microbiology 64(12): 4973-4982.
- Galliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, H. F. 1990. « Analysis of Cytokine mRNA and DNA: Detection and Quantification by Competitive Polymerase Chain Reaction ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 2725-2729.
- Haggblöm, M. M. et Valo, R. J. 1995. Bioremediation of Chlorophenol Wastes. In: Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals, Wiley-Liss, Inc. pp.389-434.
- Hahn, D., Amann, R. I., Ludwig, W., Akkermans, A. D. L., Schleifer, K.-H. 1992. « Detection of Micro-organisms in Soil after *in situ* Hybridization with rRNA-Targeted, Fluorescently Labelled Oligonucleotides ». Journal of General Microbiology 138: 879-887.
- Haugland, R. P., Johnson, I. D. 1996. « Nucleic Acids Stains ». in: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Spence, M. T. Z., Ed. Molecular Probes, Leiden, pp.143-178.
- Herrick, J. B., Madsen, E. L., Batt, C. A., Ghiorse, W. C. 1993. « Polymerase Chain Reaction Amplification of Naphtalene-catabolic and 16S rRNA Gene Sequences from Indigeneous Sediment Bacteria ». Applied and Environmental

Microbiology 59: 687-694.

Hess, A., Zarda, B., Hahn, D., Häner, A., Stax, D., Höhener, P., Zeyer, J. 1997. « In Situ Analysis of Denitrifying Toluene- and *m*-Xylene-Degrading Bacteria in a Diesel Fuel-Contaminated Laboratory Aquifer Column ». Applied and Environmental Microbiology 63(6): 2136-2141.

Hodson, R. E., Dustman, W. A., Garg, R. P., Moran, M. A. 1995. « In Situ PCR for Visualization of Microscale Distribution of Specific Genes and Gene Products in Prokariotic Communities ». Applied and Environmental Microbiology 61(11): 4074-4082.

Inouye, S., Tsuji, F. 1994. « *Aequorea* Green Fluorescent Protein: Expression of the Gene and Fluorescence characteristics of the Recombinant Protein ». FEBS Letters 341: 277-280.

Juhasz, A. L., Britz, M. L., Stanley, G. A. 1996. « Degradation of High Molecular Weight PAH by *Pseudomonas cepacia* ». Biotechnology Letters 83 : 189-198.

Johnson, L. D. 1996. « Introduction to Fluorescence Techniques ». in: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Spence, M. T. Z., Ed. Molecular Probes, Leiden, pp.1-6.

Kalmbach, S., Manz, W., Szewzyk, U. 1997. « Isolation of New Bacterial Species from Drinking Water and Proof of Their In Situ Dominance with Highly Specific 16S rRNA Probes ». Applied and Environmental Microbiology 63(11): 164-4170.

Kästner, M., Breur-Jammali, M., Mahro, B. 1994. « Enumeration and Characterization

of the Soil Microflora from Hydrocarbon-Contaminated Soil Sites Able to Mineralize Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) ». Applied Microbiology and Biotechnology **41**: 267-273.

Lebaron, P., Catala, P., Fajon, C., Joux, F., Baudart, J., Bernard, L. 1997. « A New Sensitive, Whole-Cell Hybridization Technique for Detection of Bacteria Involving a Biotynilated Oligonucleotide Probe Targeting rRNA and Tyramide Signal Amplification ». Applied and Environmental Microbiology **63**(8): 274-3278.

Lee, S. H., Malone, C., Kemp, P. F. 1993. « Use of Multiple 16S rRNA-Targeted Fluorescent Probes to Increase Signal Strength and Measure Cellular RNA from Natural Planktonic Bacteria ». Marine Ecology Progress Series **101**: 193-201.

Lévesque, M.-J. 1998. « Détection de souches bactériennes cibles impliquées dans la biodégradation de contaminant ». Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier, pp.24-26.

Li, T., Bisailon, J.-G., Villemur, R., Létourneau, L., Bernard, K., Lépine, F., Beaudet, R. 1996. « Isolation and Characterization of a New Bacterium Carboxylating Phenol to Benzoic Acid under Anaerobic Conditions ». Journal of Bacteriology **178**: 2551-2558.

Lindahl, V., Bakken, L. R. 1995. « Evaluation of Methods for Extraction of Bacteria from Soil ». FEMS Microbiology Ecology **16**: 135-142.

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Darnell, J. 1995. « Microscopy ». in: Molecular Cell Biology, 3^e édition, Scientific American

Books Inc. New York.

- Loge, F. J., Emerick, R. W., Thompson, D. E., Nelson, D. C., Darby, J. L. 1999. « Development of a Fluorescent 16S rRNA Oligonucleotide Probe Specific to the Family *Enterobacteriaceae* ». Water Environmental Research **71**: 75-83.
- Macnaughton, S. J., O'Donnell, A. G., Embley, T. M. 1994. « Permeabilization of Mycolic-Acid Containing Actinomycetes for *in situ* Hybridization with Oligonucleotide Fluorescently Labelled Probes ». Microbiology **140**: 2859-2865.
- Madsen, T., Aamand, J. 1992. « Anaerobic Transformation and Toxicity of Trichlorophenols in a Stable Enrichment Culture ». Applied and Environmental Microbiology **58**: 557-561.
- Maftah, A., Renault, D., Vignobles, C., Héchard, Y., Bressolier, P., Ratinaud, M. H., Cenatiempo, Y., Julien, R. 1993. « Membrane Permeabilization of *Listeria monocytogenes* and Mitochondria by the Bacterocin Mesentericin Y105 ». Journal of Bacteriology **10(175)**: 3232-3235.
- Manz, W., Wagner, M., Amann, R., Schleifer, K.-H. « *In Situ* Characterization of the Microbial Consortia Active in two Wastewater Treatment Plants ». Water Research **28(8)**: 1715-1723.
- Mc Allister, K. A., Lee, H., Trevors, J. T. 1996. « Microbial Degradation of Pentachlorophenol ». Biodegradation **7**: 1-40.
- Mohn, W. W., Kennedy, K. J. 1992. « Reductive Dehalogenation of Chlorophenols by Desulfomonile tiedjei DCB-1 ». Applied and Environmental Microbiology **58**:

1367-1372.

Nielsen, P. H., Andreasen, K., Lee, n., Wagner, M. 1999. « Use of Microautoradiography and Fluorescent *in situ* Hybridization for Characterization of Microbial Activity in Activated Sludge ». Water Science and Technology 39(1): 1-9.

Nielsen, P. H., Andreasen, K., Wagner, M., Blackall, L. L., Lemmer, H., Seviour, R. J. 1998. « Variability of Type 021N in Activated Sludge as Determined by *in situ* Substrate Uptake Pattern and *in situ* Hybridization with Fluorescent rRNA-Targeted Probes ». Water Science and Technology 37(4-5): 423-430.

Orser, C. S., Lange, C. C. 1994. « Molecular Analysis of Pentachlorophenol degradation ». Biodegradation 5: 277-288.

Ouverney, C. C., Fuhrman, J. A. 1997. « Increase in Fluorescence Intensity of 16S rRNA In Situ Hybridization in Natural Samples Treated with Chloramphenicol ». Applied and Environmental Microbiology 63: 2735-2740.

Ouverney, C. C., Fuhrman, J., A. 1999. « Combined Microautoradiography-16S rRNA Probe Technique for Determination of Radioisotope Uptake by Specific Microbial Cell Types In Situ ». Applied and Environmental Microbiology 65(4): 1746-1752

Pinder, A. C., Purdy, P. W., Poulter, S. A. G., Clark, D. C. 1990. « Validation of Flow Cytometry for Rapid Enumeration of Bacterial Concentrations in Pure Cultures ». Journal of Applied Bacteriology 69: 92-100.

Porter, J., Deere, D., Pickup, R., Edwards, C. 1996. « Fluorescent Probes and Flow

Cytometry: New Insights Into Environmental Bacteriology ». Cytometry 23: 91-96.

Prescott, L., Harley, J. P., Klein, D., A. 1995. « Introduction à la microbiologie ». in: Microbiologie, W.C. Brown Publishers, Ed., De Boeck-Wesmael S.A, Bruxelles, pp.4-68; p.972.

Sanford, A. R., Cole, J. R., Löffler, F. E., Tiedje J. M. 1996. « Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov, which Grows by Coupling the Oxidation of Lactate to the Reductive Dechloration of 3-chloro-4-hydroxybenzoate ». Applied and Environmental Microbiology 62: 3800-3808.

Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H. 1999. « Fluorescence In Situ Hybridization Using 16S rRNA-Targeted Oligonucleotides Reveals Localization of Methanogens and Uncultured Bacteria in Mesophilic and Thermophilic Sludge Granules ». Applied and Environmental Microbiology 65(3): 1280-1288.

Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., Amann, R. 1997. « Improved Sensitivity of Whole-Cell Hybridization by the Combination of Horseradish Peroxidase-Labeled Oligonucleotides and Tyramide Signal Amplification ». Applied and Environmental Microbiology 63(8): 3268-3273

Schönhuber, W, Zarda, B., Eix, S., Rippka, R., Herdman, M., Ludwig, L., Amann, R. 1999. « In Situ Identification of Cyanobacteria with Horseradish Peroxidase-Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes ». Applied and Environmental Microbiology 65(3): 1259-1267.

Schneegurt, M. A., Kulpa, C. F. 1998. « The Application of Molecular Techniques in

Environmental Biotechnology for Monitoring Microbial Systems ». Biotechnology and Applied Biochemistry 27: 73-79.

Schuppler, M., Wagner, M., Schön, G., Göbel, U. B. 1998. « *In situ* Identification of Nocardioform Actinomycetes in Activated Sludge Using Fluorescent rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes ». Microbiology 144: 249-259.

Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M., Amann, R. 1998. « Identification and Activities In Situ of Nitrospira and Nitrospira spp. as Dominant Populations in a Nitrifying Fluidized Bed Reactor ». Applied and Environmental Microbiology 64(9): 3480-3485.

Shapiro, H. M. 1995. « Microbiology, Parasitology and Marine Biology ». in: Practical Flow Cytometry, Shapiro, H. M. Ed., John Wiley & Sons, New York, pp.412-425.

Smidt, H., Donglin, D. Van der Oost, J., de Vos, W. M. 1999. « Random Transposition by *Desulfotobacterium dehalogenans* Allows for Isolation and Characterization of Halorespiration-Deficient Mutants ». Journal of Bacteriology 181(22): 6882-6888.

Sohier, D., Lonvaud-Funel, A. 1998. « Rapid and Sensitive *in situ* Hybridization Method for Detecting and Identifying Lactic Acid Bacteria in Wine ». Food Microbiology 15: 391-397.

Steffan, R. J., Goksoyr, J., Bej, A. K., Atlas, R. M. 1988. « Recovery of DNA from Soils and Sediments ». Applied and Environmental Microbiology. 54: 2908-2915.

- Tani, K., Yamaguchi, N., Nasu, M. 1997. « Rapid Detection of Specific Microbial Cells by Fluorescent Staining Techniques ». Japanese Journal of Toxicol. Environ. Health 43(3): 145-154.
- Tani, K., Kurokawa, K., Nasu, M. 1998. « Development of a Direct In Situ PCR Method for Detection of Specific Bacteria in Natural Environments ». Applied and Environmental Microbiology 64(4): 1536-1540.
- Tartakovsky, B., Lévesque, M.-J., Dumortier, R., Beaudet, R., Guiot, S. R. 1999. « Biodegradation of Pentachlorophenol in a Continuous Anaerobic Reactor Augmented with *Desulfotobacterium frappieri* PCP-1. » Applied and Environmental Microbiology 65: 4357-4362.
- Thomas, J.-C., Desrosiers, M., St-Pierre, Y., Lirette, P., Bisailon, J.-G., Beaudet, R., Villemur, R. 1997. « Quantitative Flow Cytometry Detection of Specific Microorganisms in Soil Samples Using rRNA Targeted Fluorescent Probes and Ethidium Bromide ». Cytometry 27: 224-232.
- Tolker-Nielsen, T., Holmstrøm, K., Molin, S. 1997 « Visualization of Specific Gene Expression in Individual *Salmonella typhimurium* Cells by In Situ PCR ». Applied and Environmental Microbiology 63(11): 4196-4203.
- van der Waaij, L. A., Mesander, G., Limburg, P. C., van der Waaij, D. 1994. « Direct Flow Cytometry of Anaerobic Bacteria in Human Feces ». Cytometry 16: 270-279.
- Wagner, M., Noguera, D. R., Juretschko, S., Rath, G., Koops, H.-P., Schleifer, K.-H. 1998. « Combining Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) with Cultivation and mathematical Modeling to Study Population Structure and Function of

- Ammonia-Oxidizing Bacteria in Activated Sludge ». Water Science and Technology 37(4-5): 441-449.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W. 1993. « Optimizing fluorescent in Situ Hybridization of Suspended Cells with rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for the Flow Cytometric Identification of Microorganisms ». Cytometry 14: 136-143.
- Wallner, G., Erhart, R., Amann, R. 1995. « Flow Cytometric Analysis of Activated Sludge with rRNA-Targeted Probes ». Applied and Environmental Microbiology 61(5): 1859-1866.
- Wallner, G., Steinmetz, D., Bitter-Suermann, D., Amann, R. 1996. « Combination of rRNA-Targeted Hybridization Probes and Immuno-Probes for the Identification of Bacteria by Flow Cytometry ». Systematic Applied Microbiology 19: 569-576.
- Wallner, G., Fuchs, B., Spring, S., Beisker, W., Amann, R. 1997. « Flow Sorting of Microorganisms for Molecular Analysis ». Applied an Environmental Microbiology 63(11): 4223-4231.
- Wild, S. R., Harrad, S. J., Jones, K. C. 1993. « Chlorophenols in Digested U. K. Sewage Sludge ». Water Research 27: 1527-1534.
- Wilkström, P., Wilklund, A., Andersson, A. C., Forsman, M. 1996. « DNA Recovery and PCR Quantification of Catechol 2,3-Dioxygenase Genes from Different Soils Types ». Journal of Biotechnology 52: 107-120.