

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

BERTRAND BOUCHARD

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION D'UN MICROORGANISME  
ANAÉROBIE EFFECTUANT LA DÉCHLORATION  
DU PENTACHLOROPHÉNOL

AOUT 1995

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	ii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
SOMMAIRE	viii
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1.    DESCRIPTION ET UTILISATION DU PENTACHLOROPHÉNOL	4
1.1    Nomenclature et abréviations	4
2.    LES CHLOROPHÉNOLS DANS L'ENVIRONNEMENT	4
2.1    La contamination par les usines de traitement	4
2.2    Les chlorophénols dans notre propre environnement	6
3.    MICROORGANISMES AÉROBIES S'ATTAQUANT AU PCP	7
3.1    Les procaryotes	7
3.2    Les Eucaryotes	9
3.2.1    Leur système enzymatique	9
3.2.2    De nombreux Micromycètes éliminent le PCP	9
3.2.3    Le PCP, inhibiteur de la croissance des champignons	11
4.    LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE	11
5.    LA DÉCHLORATION DE COMPOSÉS AROMATIQUES PAR DES SOUCHES ANAÉROBIES PURES	12
5.1 <i>Desulfomonile tiedjei</i>	13
5.1.1    Conditions de culture de <i>D. tiedjei</i>	13
5.1.2    Spectre d'activité de <i>D. tiedjei</i>	14
5.1.3    Autres caractéristiques de <i>D. tiedjei</i>	17
5.2    La souche DCB-2	17
5.3    La souche 2CP-1	18
5.4 <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	19
5.4.1    Spectre d'activité de <i>D. dehalogenans</i>	19
5.5    Résumé des souches anaérobies effectuant de la déchloration des composés aromatiques	21
6.    LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE, UN PROCESSUS RESPIRATOIRE	22
6.1    Le PCE, accepteur d'électrons chez <i>Dehalobacter restrictus</i>	23
7.    DES CONSORTIA MÉTHANOGENIQUES DÉGRADENT LE PCP	25
8.    CONSORTIUM ANAÉROBIE À L'ÉTUDE DANS NOS LABORATOIRES	26
8.1    Isolement du consortium et performances des bioréacteurs	26
8.2    Conditions de culture du consortium	26
8.3    Voie biochimique de dégradation du PCP	27
8.4    Caractérisation du consortium anaérobie	27
9.    CONCLUSION	29

<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>31</b>
1. PROVENANCE DU CONSORTIUM	32
2. MILIEU DE CULTURE	32
2.1 Préparation du milieu minimal	32
2.2 Préparation de la solution de vitamines	33
2.3 Préparation du DEAE Séphacel	33
2.4 Ajout des sources de carbones, du PCP et de l'inoculum bactérien	33
3. CULTURE SUR MILIEUX SOLIDES	34
4. MANIPULATIONS EFFECTUÉES EN CONDITIONS ANAÉROBIES	35
5. QUANTIFICATION ET IDENTIFICATION DES CHLOROPHÉNOLS	35
5.1 Analyse par HPLC	35
5.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse - Identification d'un trichlorophénol	36
5.2.1 Acétylation et extraction	36
5.2.2 Séparation et identification	37
6. ISOLEMENT DE LA SOUCHE PCP-1	37
6.1 Traitement à la chaleur et enrichissement	37
6.2 Dilutions et étalement sur milieu solide anaérobie	38
6.3 Vérification de l'activité de déshalogénéation des colonies isolées dans différents milieux de culture	38
6.3.1 Récupération de la biomasse totale sur les géloses	38
6.3.2 Évaluation de l'activité de déshalogénéation des colonies isolées	39
7. ESSAIS DE CROISSANCE DE LA SOUCHE PCP-1 DANS DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE	41
8. LYOPHILISATION DE LA SOUCHE PCP-1	42
8.1 Activité de déshalogénéation des cellules lyophilisées	43
9. MICROSCOPIE OPTIQUE ET ÉLECTRONIQUE	43
10. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET ESSAI D'IDENTIFICATION	43
11. IDENTIFICATION PAR ANALYSE DU 16S rRNA	44
11.1 Extraction de l'ADN bactérien	44
11.2 Amplification du gène 16S rRNA par PCR	44
11.3 Clonage et séquençage du gène 16S ribosomal	44
11.4 Étude phylogénétique	45
12. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNATION DE LA SOUCHE PCP-1	45
12.1 Conditions de culture utilisées	45
12.2 Cinétique de déchloration du PCP	46
12.3 Effet du DEAE Séphacel sur l'activité de déshalogénéation	46
12.4 Dose maximale de PCP	47
12.5 Spectre d'activité vis-à-vis différents chlorophénols	47
12.6 Vitesse de déshalogénéation	48
12.6.1 Dosage des protéines	48
<b>RÉSULTATS</b>	<b>49</b>
1. ISOLEMENT	50
1.1 Traitement à la chaleur et enrichissements	50
1.2 Colonies isolées et testées en milieu liquide	50
1.3 Activité conservée après passage sur milieu solide	51

1.4	Enrichissement par dilutions	51
1.5	Isolement de la souche PCP-1	51
2.	MILIEUX DE CULTURE	52
2.1	Temps de division cellulaire	55
3.	CONSERVATION DE LA SOUCHE PCP-1	55
4.	CARACTÉRISTIQUES MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES	55
4.1	Réaction à la coloration Gram	60
5.	CARACTÉRISTIQUE BIOCHIMIQUE	60
6.	IDENTIFICATION BACTÉRIENNE	60
7.	DÉSHALOGÉNATION	62
7.1	Voie de déchloration	62
7.2	Cinétique de déchloration	62
7.3	Effet des billes de DEAE Séphacel	68
7.4	Dose maximale	69
7.5	Spectre d'activité	69
	DISCUSSION	77
1.	ENRICHISSEMENT PAR TRAITEMENT À LA CHALEUR ET REPIQUAGES	78
2.	ISOLEMENT ET CONDITIONS DE CULTURE DE LA SOUCHE PCP-1	79
3.	CARACTÉRISATION DE LA SOUCHE PCP-1	80
3.1	La souche PCP-1 de type Gram positif	80
3.2	Caractéristiques communes des souches effectuant la déshalogénéation de molécules aromatiques	80
4.	UNE NOUVELLE ESPECE DU GENRE <i>DESULFITOBACTERIUM</i>	81
5.	CULTURE DE LA SOUCHE PCP-1 EN MILIEU LIQUIDE	82
5.1	Les vitamines et la 1,4-naphtoquinone	84
5.2	Croissance sur milieu solide	85
6.	DÉSHALOGÉNATION DES CHLOROPHÉNOLS	86
6.1	Voie de déshalogénéation	86
6.1.1	Le 3-MCP, produit final de la déchloration	86
6.1.2	L'origine du 3,4-DCP détecté dans les cultures	86
6.2	Bilan de masse	87
6.3	Deux systèmes enzymatiques impliqués dans la déshalogénéation du PCP	88
6.4	Toxicité du PCP envers la souche PCP-1	89
6.5	Vitesse de déshalogénéation	90
6.6	Rôle des billes de DEAE Séphacel	91
	CONCLUSION	93
	REMERCIEMENTS	95
	BIBLIOGRAPHIE	97

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I:	Liste partielle de bactéries aérobies capables de minéraliser le PCP.	8
TABLEAU II:	Déshalogénéation des chlorophénols par <i>Desulfomonile tiedjei</i> .	15
TABLEAU III:	Résultats des tests biochimiques du système API 20E réalisé sur la souche PCP-1.	61
TABLEAU IV:	Comparaison entre les bactéries PCP-1 et <i>Desulfobacterium dehalogenans</i> .	83

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1:	Substrats monohalogénés subissant la déshalogénéation réductrice par <i>D. tiedjei</i> .	16
FIGURE 2:	Inducteurs de la déshalogénéation réductrice chez <i>D. tiedjei</i> .	16
FIGURE 3:	Schéma général des <i>ortho</i> -déshalogénations réductrices effectuées par <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> .	20
FIGURE 4:	Modèle respiratoire de <i>Dehalobacter restrictus</i> .	24
FIGURE 5:	Voie biochimique de la dégradation du PCP par le consortium expérimental.	28
FIGURE 6:	Croissance de la souche PCP-1 dans différents milieux nutritifs.	53
FIGURE 7:	Effet de l'addition de différentes substances au pyruvate de sodium sur la croissance cellulaire de la souche PCP-1.	54
FIGURE 8:	Bactéries de la souche PCP-1 observées au microscope électronique après coloration négative.	57
FIGURE 9:	Bactérie de la souche PCP-1 montrant la présence d'une spore observée au microscope électronique après coloration négative.	59
FIGURE 10:	Comparaison des séquences du gène 16S rRNA de la souche PCP-1 (1654 nt) et <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> (1513 nt).	63
FIGURE 11:	Arbre phylogénétique de la souche PCP-1.	64
FIGURE 12:	Voie biochimique de la déchloration du PCP par la souche PCP-1.	65

FIGURE 13: Identification de l'intermédiaire trichloré dans la voie de déchloration du PCP par la souche PCP-1 tel que déterminé par GC-MS.	66
FIGURE 14: Cinétique de déchloration du PCP par la souche PCP-1.	67
FIGURE 15: Effet des billes de DEAE Séphacel sur la déchloration du PCP par la souche PCP-1 après 10 jours d'incubation.	70
FIGURE 16: Déchloration de différentes doses de PCP par la souche PCP-1 après 10 jours d'incubation.	71
Figure 17: Activité de déchloration du 2,3,4,5-TeCP, du 2,3,5,6-TeCP, du 2,3,4-TCP et du 2,3,5-TCP par la souche PCP-1.	73
Figure 18: Activité de déchloration du 2,3,6-TCP, du 2,4,5-TCP du 2,4,6-TCP et du 3,4,5-TCP par la souche PCP-1.	74
FIGURE 19: Activité de déchloration du 2,4-DCP, du 2,6-DCP et du 3,5-DCP par la souche PCP-1.	75
FIGURE 20: Substances où aucune transformation n'a été observée après 8 jours d'incubation avec la souche PCP-1.	76

# **SOMMAIRE**

Le pentachlorophénol (PCP) est un biocide utilisé principalement pour la préservation du bois destiné à l'utilisation extérieure. Son emploi par les industries reliées au traitement du bois et aux sites d'entreposage a conduit à d'importants problèmes environnementaux.

Un consortium anaérobie pouvant effectuer la dégradation du PCP par fermentation méthanogénique est à l'étude dans les laboratoires du Dr R. Beaudet. Ce consortium est maintenu dans des bioréacteurs à alimentation continue. Une méthodologie a été développée afin de maintenir l'activité du consortium dans des bouteilles sérologiques. Après un traitement à la chaleur, enrichissement par repiquages successifs, dilutions et étalements sur milieux solides, une souche microbienne anaérobie pouvant effectuer la déshalogénéation du PCP jusqu'au 3-MCP a été isolée. Cette souche a été nommée PCP-1.

Cette bactérie sporulante, non-mobile et assacharolytique est un bacille colorant Gram négatif mais apparaissant au type Gram positif en microscopie électronique. Elle a été cultivée dans un milieu contenant du pyruvate de sodium, de l'extrait de levure, des minéraux et des vitamines. La voie de déchloration du PCP est la suivante:  $PCP \rightarrow 2,3,4,5\text{-TeCP} \rightarrow 3,4,5\text{-TCP} \rightarrow 3,5\text{-DCP} \rightarrow 3\text{-MCP}$ . La dose maximale déchlorée jusqu'au 3-MCP est de 10 mg/l PCP, tandis qu'à 15 mg/l, la transformation s'est arrêtée au 3,4,5-TCP. L'ajout d'un support, le DEAE Séphacel, est essentiel au maintien de l'activité de déshalogénéation dans des bouteilles sérologiques. Le spectre d'activité de la souche PCP-1 envers 17 chlorophénols a été étudié. Les chlores situés en position *ortho* sont généralement éliminés. Le chlore situé en position *para* du 3,4,5-TCP a été retiré et un des deux chlores positionnés en *méta* du 3,5-DCP et 2,3,5-TCP ont également été enlevés. Les résultats obtenus suggèrent qu'il y aurait deux systèmes enzymatiques inductifs impliqués dans la déshalogénéation du PCP et des chlorophénols. Un premier système s'attaquerait aux chlores situés en position *ortho* tandis que le second éliminerait les chlores en position *para* et *méta*. La souche PCP-1 n'a pas d'activité de déshalogénéation sur les monochlorophénols et elle ne métabolise pas le phénol.

L'analyse du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal, effectuée dans le laboratoire du Dr Richard Villemur, a montré que ce microorganisme serait une nouvelle espèce bactérienne appartenant au genre *Desulfitobacterium*.

# **INTRODUCTION**

Le pentachlorophénol est un biocide très toxique qui est encore utilisé de nos jours pour la conservation de bois destiné à une utilisation extérieure, entre autres pour les poteaux servant au transport des lignes électriques et téléphoniques. Son utilisation depuis plus de 50 ans a créé de graves problèmes environnementaux et plusieurs sites sont lourdement contaminés par cette substance.

Les biotechnologies et l'emploi de microorganismes capables d'éliminer les xénobiotiques représentent une solution à la restauration de certains de ces sites pollués. Il existe plusieurs souches aérobies pouvant minéraliser le PCP. Quelques unes sont performantes et peuvent s'attaquer à des doses élevées de PCP.

Les procédés anaérobies offrent un grand potentiel pour dégrader plusieurs polluants. Ces procédés seraient plus économiques que les traitements aérobies puisqu'ils ne nécessitent pas d'aération. Il serait ainsi plus facilement applicable *in situ*. Des travaux ont montré que des consortia anaérobies pouvaient dégrader efficacement le pentachlorophénol par fermentation méthanogénique. Les connaissances concernant les microorganismes impliqués dans ces consortia sont très limitées, notamment pour ceux responsables de la déshalogénéation du pentachlorophénol. Jusqu'à présent, seul quelques souches anaérobies pouvant effectuer la déshalogénéation de certains chlorophénols ont été isolées en cultures pures.

Les pages qui suivent présentent les résultats d'une étude portant sur l'isolement d'une souche bactérienne appartenant à une nouvelle espèce capable de déshalogéner le pentachlorophénol. Le premier objectif était d'isoler un microorganisme responsable de la déshalogénéation du PCP. Le second objectif consistait à caractériser sommairement cette bactérie afin de mieux connaître ses besoins nutritifs, son fonctionnement et son potentiel de déshalogénéation envers différents chlorophénols.

**REVUE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1. DESCRIPTION ET UTILISATION DU PENTACHLOROPHÉNOL**

Le pentachlorophénol (PCP) est une substance toxique utilisée depuis le début des années 1930 comme agent antimicrobien, fongicide, insecticide, pesticide et herbicide. La production mondiale annuelle était estimée à  $5 \times 10^7$  kg en 1981 (Crosby, 1981). Vu sa toxicité, le PCP a été fortement règlementé dans les années 1970 et son utilité principale consiste aujourd'hui à la préservation du bois destiné à l'usage extérieur (Crosby, 1981; Cirelli, 1977).

Les produits chlorophénoliques forment une classe majeure de contaminants environnementaux. Le PCP, de même que certains autres chlorophénols (mono-, di-, et trichlorophénols) font partis de la liste des 129 contaminants prioritaires établie en 1976 par l'agence de protection environnementale américaine (US EPA, 1979). Le PCP peut être retrouvé dans l'eau, les sols et même dans des chaînes alimentaires d'environnement naturel très sain (Paasivirta *et al.*, 1985). Pour une revue élaborée sur la description, l'utilité et la toxicité du PCP, le lecteur est invité à consulter le mémoire de maîtrise de Pierre Juteau (1993).

### **1.1 NOMENCLATURE ET ABRÉVIATIONS**

Afin d'alléger la lecture du texte, les abréviations suivantes ont été utilisées: PCP pour le pentachlorophénol; PCP-Na pour son sel de sodium; TeCP pour les tétrachlorophénols; TCP pour les trichlorophénols; DCP pour les dichlorophénols et MCP pour les monochlorophénols.

## **2. LES CHLOROPHÉNOLS DANS L'ENVIRONNEMENT**

### **2.1 LA CONTAMINATION PAR LES USINES DE TRAITEMENT**

Le domaine de la préservation du bois représente un secteur important de l'industrie forestière. Le pentachlorophénol permet de conserver le bois contre les intempéries, les insectes et les microorganismes durant une période de 10 à

15 ans. Le traitement des poteaux électriques et téléphoniques consiste à l'application d'une solution de 3 à 6% de PCP dans de l'huile de pétrole, une opération effectuée dans un autoclave (Sylvestre *et al.*, 1991). Des problèmes importants de pollutions ont été engendrés par les industries qui traitent le bois en employant le PCP. Leurs sols peuvent être sérieusement contaminés autour des réservoirs d'entreposage des solutions de PCP, près des installations de traitement, dans les zones d'égouttement du bois fraîchement traité et dans les zones d'entreposage des produits finis (Sylvestre *et al.*, 1991). Ces zones peuvent contenir plusieurs milliers de milligrammes de PCP par kilogramme de sol (Jackson et Bisson, 1990). Les chlorophénols pénètrent plusieurs mètres dans le sol (Valo *et al.*, 1990). De plus, le PCP peut être lessivé du sol et donc se retrouver dans la nappe phréatique ou dans les effluents industriels. Ce toxique a un potentiel de migration relativement haut pour les phases aqueuses du sol (Jackson et Bisson, 1990). L'adsorption du PCP dans un sol particulier est évidemment dépendante de certaines caractéristiques physico-chimiques. Par exemple, une haute concentration de matière organique retient une plus grande partie de PCP au sol alors qu'un pH élevé augmente la désorption de cette molécule, la forme ionisée du PCP (à pH plus haut que celui du pKa, soit 4,7) étant plus hydrophile que sa forme non-ionisée (Banergi *et al.*, 1993). Ces caractéristiques ont donc une grande influence sur la persistance du PCP dans l'environnement, sa biodisponibilité et sur les concentrations retrouvées dans les cours d'eau voisins des usines de traitement.

L'organisation mondiale de la santé (OSM, 1987) a recensé 7 études qui démontrent des concentrations de PCP dans des effluents municipaux et industriels variant de 0,1 à 75000 µg/l, les pires provenant d'effluents non-traités d'usines de traitement du bois. Un sol d'une industrie atteignait une concentration de 1,9 g de PCP/kg (Kitunen *et al.*, 1987) tandis que l'OSM rapporte des niveaux de contamination de 25 à 45 600 ug/kg dans le cas de six autres études. Il y a même eu un cas en Finlande où l'eau de surface d'une municipalité contenait de 56 000 à 190 000 ug/l de chlorophénols totaux provenant d'une vieille scierie et entre 70 et 140 ug/l se retrouvaient dans l'eau de consommation domestique (Lampi *et al.*, 1992).

## 2.2 LES CHLOROPHÉNOLS DANS NOTRE PROPRE ENVIRONNEMENT

Au Canada, il existe une cinquantaine d'usines de traitement du bois dont onze au Québec. Parmi ces onze, quatre utilisent le PCP dans leur procédé de traitement (Sylvestre *et al.*, 1991). Une récente publication illustre bien la présence des chlorophénols dans notre propre environnement. Il s'agit d'une étude sur la contamination du fleuve St-Laurent par ces molécules aromatiques réalisée par le Centre St-Laurent d'Environnement Canada (Quémaraïs *et al.*, 1994).

Des échantillons d'eau (282) ont été prélevés entre Cornwall et la ville de Québec pour ensuite être analysés. Les analyses de ces échantillons ont montré qu'à toutes les stations d'échantillonnage, un tétrachlorophénol (le 2,3,4,6 TeCP) et le PCP étaient respectivement détectés à 94 et 100%. La concentration maximale observée pour le TeCP a été de 97 ng/g de matière organique, avec une moyenne de 16 ng/g. La concentration du PCP a été maximale à 177 ng/g alors que la moyenne était de 46 ng/g. À noter que leur méthode de dosage ne permettait que de déterminer la concentration des chlorophénols adsorbés sur la matière organique. Ces deux composés sont solubles et ont des coefficients de partition faibles pour la matière organique, (Schellenberg *et al.*, 1984), la quantité de chlorophénol présent dans le fleuve St-Laurent serait vraisemblablement plus élevée. Notre fleuve n'est évidemment pas le seul cours d'eau contaminé au Canada, d'autres études ont démontré la présence de chlorophénols dans le lac Ontario et dans la rivière Fraser (Colombie-Britannique) (Carey *et al.*, 1988a; Fox et Joshi, 1984).

Bien que ces chlorophénols puissent être retrouvés dans les écosystèmes aquatiques à cause de l'utilisation du chlore lors du blanchiment du papier par les industries papetières (Carey et Hart, 1988b), selon Jones (1984), le PCP et le 2,3,4,6 TeCP (aussi employé pour la préservation du bois) sont principalement introduits dans l'environnement par le lessivage du bois traité et des sols contaminés. Le PCP et le TeCP sont bioaccumulés par les organismes aquatiques (Jones, 1984) et deviennent persistants dans les sols (Metcalf *et al.*, 1988). De plus, les chercheurs du Centre St-Laurent ont noté un profil de distribution semblable entre le TeCP et le PCP, ce qui suggère aussi que ces contaminants ont une origine commune, soit le traitement du bois.

Ainsi, le traitement du bois par le pentachlorophénol a engendré la contamination de nombreux sites, autant terrestres qu'aquatiques. Les recherches visant à mettre au point des procédés de biodégradation du PCP dans les sols ou les eaux sont donc pleinement justifiées, d'autant plus que ce toxique est encore employé et qu'il continue d'endommager l'environnement. Mieux encore, des procédés anaérobies seraient appropriés puisque la plupart de ces sites sont anaérobies ou bien pauvres en oxygène.

### 3. MICROORGANISMES AÉROBIES S'ATTAQUANT AU PCP

#### 3.1 LES PROCARYOTES

Les connaissances concernant les bactéries aérobies capables de dégrader le PCP sont nettement supérieures à celles concernant les microorganismes anaérobies. Plusieurs bactéries aérobies isolées en culture pure peuvent minéraliser rapidement d'importantes doses de PCP, souvent en l'utilisant comme seule source de carbone et d'énergie (Tableau 1). Les carbones de la molécule sont utilisés pour produire de la biomasse ou bien libérés sous forme de CO<sub>2</sub> tandis que les atomes de chlore se retrouvent sous la forme de HCl (Premalatha et Rajakumar, 1994; Radehaus et Schmidt, 1992; Saber et Crawford, 1985). C'est à une souche de *Pseudomonas aeruginosa* que revient le mérite du meilleur "destructeur de PCP" puisqu'il peut s'attaquer à des doses très élevées pouvant atteindre 800 mg/l (Premalatha et Rajakumar, 1994).

La voie de minéralisation du PCP et d'autres chlorophénols a été déterminée chez plusieurs souches aérobies, entre autres chez *Flavobacterium* sp. (Steiert et Crawford, 1985), *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apajalahti et Salkinoja-Salonen, 1987), *Pseudomonas* sp. (Knackmuss et Hellwig, 1978) et *Arthobacter* sp. (Bollag *et al.*, 1968). Les bactéries aérobies ont la possibilité de dégrader les chlorophénols de deux manières distinctes. La première consiste à l'enlèvement des atomes de chlore avant l'ouverture du cycle aromatique, rencontrée surtout pour les chlorophénols les plus substitués. La seconde façon de procéder est d'abord d'ouvrir le cycle aromatique et ensuite d'éliminer les

**TABLEAU I: Liste partielle de bactéries aérobies capables de minéraliser le PCP**

Organisme	Concentration (mg PCP/l)	Particularités	Référence
<i>Arthrobacter</i> ATCC 33790	130 <sup>a</sup>	Aucune source de carbone complémentaire. Pouvait recevoir 15 doses de 100 mg PCP/l, au total 1500 mg PCP/l.	Stanlake et Finn, 1982
<i>Arthrobacter</i> ATCC 33790	500	En culture continue	Edgehill, 1994
<i>Flavobacterium</i> sp	100	En 50 heures. Aucune source de carbone complémentaire	Saber et Crawford, 1985
<i>Flavobacterium</i> ATCC 39723	600	Avec cellobiose	Brown <i>et al.</i> , 1986
<i>Flavobacterium</i> ATCC 39723	150	En 8 heures, avec glucose ou glutamate	Hu <i>et al.</i> , 1994
<i>Flavobacterium</i> sp	130	85% de minéralisation en 1,5 heure, avec glutamate	Topp <i>et al.</i> , 1988
<i>Mycobacterium chloro-phenolicum</i> cp-2	130	40% de minéralisation en 1 jour	Valo <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas</i> RA2	160 <sup>a</sup>	En 6 jours. Aucune source de carbone complémentaire.	Radehaus et Schmidt, 1992
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	800	En 6 jours. Avec glucose 0,5%	Premalatha et Rajakumar, 1994
<i>Streptomyces rochei</i> 303	53	En culture continue	Golovleva <i>et al.</i> , 1993

<sup>a</sup> Taux de croissance maximal à cette concentration.

halogènes. Les mono- et dichlorophénols sont souvent dégradés de cette manière (Hagblom, 1990).

Ces microorganismes peuvent retirer les halogènes par une réaction hydrolytique, où le chlore est substitué par un groupement hydroxyle provenant de l'eau, ce qui conduit à des chlorohydroquinones. Par exemple, le tétrachloro-*p*-hydroquinone semble être un métabolite central dans la dégradation du PCP par les bactéries aérobies (Janssen *et al.*, 1994; Hagblom, 1990; Apajalahti et Salkinoja-Solonen, 1986). Ces organismes peuvent aussi catalyser des réactions de déshalogénéation réductrice. Il s'agit de la substitution du chlore par un atome d'hydrogène. Cette réaction est plus souvent rencontrée chez les bactéries anaérobies mais elle est tout de même utilisée par certaines bactéries aérobies (Mohn et Tiedje, 1992c; Hagblom, 1990). Par la suite, c'est généralement via les enzymes de types dioxygénases que le cycle aromatique est clivé. En ce qui concerne le cas où le cycle est ouvert avant la déshalogénéation, les mêmes enzymes dioxygénases brisent le cycle aromatique des chlorocathéchols et ensuite la chaîne est déchlorée. Les chlorocathéchols sont préalablement formés par l'action de monooxygénases ou d'hydroxylases (Hagblom, 1990; Steiert et Crawford, 1985).

### **3.2 LES EUCARYOTES**

#### **3.2.1 Leur système enzymatique.**

Les champignons unicellulaires sont dotés d'un système d'enzymes extracellulaires à spectre large qui est capable de dégrader la lignine. Deux de ces enzymes non-spécifiques sont les ligninases et les peroxydases. Leur système a la capacité de déchlorer le PCP et certains de ces microorganismes peuvent minéraliser d'importantes doses de PCP (Benoit-Guyod *et al.*, 1994; Kennes et Lema, 1994; Logan *et al.*, 1994;).

#### **3.2.2 De nombreux Micromycètes éliminent le PCP.**

Plusieurs souches de champignons s'attaquant au PCP ont été isolées. Pour ne citer qu'un seul exemple, le Groupe pour l'Étude du Devenir des Xénobiotiques dans l'Environnement (GEDEXE) a systématiquement testé la capacité de

biodégradation des différents groupes taxonomiques de leur collection de 1059 Micromycètes, en obtenant d'excellents résultats. Parmi les Zygomycètes (Seigle-Murandi *et al.*, 1992), les Ascomycètes, les Basidiomycètes, les levures (Steiman *et al.*, 1994) et les Deutéromycètes (Benoit-Guyod *et al.*, 1994) étudiés, près de 10% des souches ont efficacement éliminé au moins 80 % des 100 mg/l PCP en cinq jours, en présence de glucose (Seigle-Murandi *et al.*, 1993). À noter que ces microorganismes n'avaient nullement bénéficié d'une période d'adaptation ou d'enrichissement au PCP. Il faut tout de même demeurer prudent quant à l'interprétation de tels résultats puisque fréquemment, seul le taux de disparition du PCP est indiqué et rien n'est évoqué quant au devenir du PCP. Les enzymes non-spécifiques présentent le désavantage, dans certains cas, de produire des intermédiaires de dégradation qui s'accumulent et qui peuvent être plus toxiques que le PCP lui-même. Ces intermédiaires cités sont le pentachloroanisole, des dioxines ou des furanes polychlorés (Roy-Arcand et Archibald, 1991). Le groupement hydroxyle du PCP subit souvent une méthylation par les champignons, ce qui conduit au pentachloroanisole, moins toxique que le PCP mais plus difficilement biodégradable (Seigle-Murandi *et al.*, 1992).

D'après les études de Seigle-Murandi *et al.* (1993), il pourrait sembler paradoxal qu'autant de champignons puissent s'attaquer au PCP alors que celui-ci est reconnu pour être fongicide. Il est évident que dans plusieurs cas, il s'agit simplement de biotransformation et non de biodégradation. De plus, Venkatadri *et al.* (1992) ont rapporté que la disparition du PCP chez une souche de *Phanerochaete chrysosporium* était causée à 75% par l'adsorption du toxique aux cellules fongiques. Peu d'équipes de chercheurs ont clairement démontré la minéralisation du PCP par les champignons (Lin et Wang, 1990; Mileski *et al.*, 1988). Ces résultats ont été obtenus principalement chez *P. chrysosporium*. Ainsi donc, certains micromycètes sont tolérant et peuvent croître à des doses de 500 et même 1000 mg/l PCP (Seigle-Murandi *et al.*, 1993; Mileski *et al.*, 1988) et cette capacité à tolérer et dans certains cas à dégrader le PCP fait des champignons un groupe d'organismes qui pourraient être utilisé dans la restauration de sols contaminés (Lamar et Dietrich, 1990).

### 3.2.3 Le PCP, inhibiteur de la croissance des champignons

Voici une particularité intéressante concernant la dégradation du PCP par les champignons: l'âge des cultures et des pré-incubations ont une grande influence sur la capacité d'élimination du toxique par ces microorganismes (Keenes et Lema, 1994; Logan *et al.*, 1994; Mileski *et al.*, 1988).

La germination des spores de *Phanerochaete chrysosporium* était inhibée lorsqu'elles étaient inoculées dans un milieu contenant plus de 4 mg/l de PCP alors que ce même microorganisme pouvait croître et minéraliser 500 mg/l du biocide après avoir bénéficié d'une période de pré-incubation de 6 jours. Ainsi, l'effet toxique du PCP sur la germination était enrayé (Mileski *et al.*, 1988). Seigle-Murandi *et al.* (1993) ont aussi observé la grande sensibilité des spores de nombreux champignons envers le PCP. Keenes et Lema (1994) ont noté la nécessité de laisser croître sur du glucose *P. chrysosporium* une semaine avant l'ajout du PCP afin de permettre la croissance et la dégradation. En dernier lieu, certains chercheurs ont laissé aux champignons des périodes de pré-incubation de 8 à 20 jours et ont conclu que l'âge des cultures au moment de l'addition du toxique était un facteur important quant aux taux d'élimination du PCP (Logan *et al.*, 1994).

## 4. LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE

La déshalogénéation réductrice de substances chlorées est l'étape initiale rencontrée dans de nombreuses biodégradations. Les insecticides organochlorés, les solvants halogénés et bien d'autres composés parmi les plus toxiques et persistants dans l'environnement subissent la déshalogénéation réductrice des microorganismes. Dans certains cas, il s'agit du seul mécanisme connu de biodégradation d'importants polluants, par exemples des biphényles, du pentachlorophénol, de l'hexachlorobenzène et du tétrachloroéthène (Mohn et Tiedje, 1992c).

Ce mécanisme est rencontré principalement en milieu anaérobie. Il est tout de même possible de rencontrer la déshalogénéation réductrice de composés hautement halogénés en milieu aérobie (Mohn et Tiedje, 1992c).

La déshalogénéation réductrice est l'enlèvement d'un substitut halogéné d'une molécule suivi de l'addition d'un électron à cette molécule. Cette réaction peut se produire selon les deux procédés suivants: l'hydrogénolyse ou la réduction vicinale. L'hydrogénolyse est le remplacement d'un substitut halogéné par un atome d'hydrogène alors que la réduction vicinale ou dihaloélimination consiste en l'élimination de deux substitués halogénés adjacents et à la formation d'un double lien entre les atomes de carbone (Mohn et Tiedje, 1992c).

Dans le cas des composés aromatiques, la déshalogénéation réductrice est la première étape lors de la dégradation. Ce n'est que lorsque tous les atomes d'halogènes sont enlevés du noyau que ce dernier peut être clivé. Les bactéries anaérobies sont responsables de la déshalogénéation réductrice mais ne sont pas capables de cliver le cycle aromatique (Berry *et al.*, 1987). L'étude de la déshalogénéation réductrice et des microorganismes qui en sont responsables est certainement d'intérêt puisqu'ils sont impliqués au niveau environnemental et ont un potentiel de biodégradation de nombreux polluants (Mohn et Tiedje, 1992c).

## 5. LA DÉCHLORATION DE COMPOSÉS AROMATIQUES PAR DES SOUCHES ANAÉROBIES PURES

Présentement, il y aurait seulement quatre souches anaérobies capables de déchlorer un composé aromatique. Il s'agit de *Desulfomonile tiedjei*, DCB-2 (pour *dechlorinating bacterium* no2), de 2CP-1 (pour 2-chlorophénol no1) et de *Desulfitobacterium dehalogenans*. Les deux premières ont été isolées respectivement en 1984 et 1992, les deux dernières en 1994 (Shelton et Tiedje, 1984; Madsen et Licht, 1992; Cole *et al.*, 1994; Utkin *et al.*, 1994). D'autres équipes ont rapporté avoir tenté d'isoler de telles bactéries, à partir de consortia stables minéralisant des molécules chlorées, sans y parvenir (Dietrich et Winter, 1990; Zhang et Wiegel, 1990).

## 5.1 DESULFOMONILE TIEDJEI

*Desulfomonile tiedjei* est un nouveau genre et une nouvelle espèce bactérienne qui fait partie de la classe des *proteobacteria*. Elle a été isolée à partir d'un consortium méthanogénique qui utilisait l'acide 3-chlorobenzoïque comme seule source de carbone et d'énergie. Cette bactérie transforme donc le 3-chlorobenzoate en benzoate (Shelton et Tiedje, 1984) et conserve l'énergie de la déchloration réductrice en produisant de l'ATP (Dolfing, 1990; Mohn et Tiedje, 1990b), un sujet qui est discuté à la section 6 de ce chapitre. C'est une bactérie réductrice de sulfate, bâtonnet Gram négatif, anaérobie strict, non-sporulante et non-flagellée (DeWeerd *et al.*, 1990a; Shelton et Tiedje, 1984). La croissance de cette bactérie pouvait être soutenue avec l'ajout de liquide de rumen et d'extrait de levure dans le milieu de culture (Shelton et Tiedje, 1984).

### 5.1.1 Conditions de culture de *D. tiedjei*

Malgré bien des efforts (Linkfield et Tiedje, 1990; Stevens *et al.*, 1988), le faible taux de croissance de la bactérie dans le milieu mentionné ci-haut (4 à 5 jours) (Shelton et Tiedje, 1984) a limité les recherches jusqu'à ce que DeWeerd *et al.* (1990a) identifie des éléments essentiels à sa croissance et sa culture en continu. Il s'agissait, en plus des vitamines de la solution de Wolin *et al.* (1963), de la 1,4-naphtoquinone (un analogue à la vitamine k), de l'hémine et de l'acide lipoïque. La thiamine était particulièrement importante, de même que la nicotinamine, à concentration élevée. La vitamine k et l'hémine sont par ailleurs reconnues comme étant des facteurs de croissance indispensables à la culture pure de certaines espèces (Bryant et Robinson, 1962; Gibbons et Macdonald, 1960). La 1,4-naphtoquinone est aussi le précurseur de la ménaquinone, un transporteur d'électrons commun chez les bactéries réductrices de sulfates (Deweerd *et al.*, 1990a). Des naphtoquinones sont synthétisées par une variété de microorganismes aérobies et anaérobies (Gibbons et Engle, 1964). Ces molécules pouvaient donc être produites par d'autres microorganismes du consortium avant le démantèlement de ce dernier.

*D. tiedjei* peut croître de façon autotrophe sur du  $H_2:CO_2$  en utilisant le sulfate ou le thiosulfate comme accepteur d'électrons. Elle peut aussi croître de

façon hétérotrophe en métabolisant le pyruvate en lactate et acétate, en absence d'autres accepteurs d'électrons (DeWeerd *et al.*, 1990a).

### 5.1.2 Spectre d'activité de *D. tiedjei*

Le spectre d'activité de cette bactérie a été étudié au cours des dernières années. *D. tiedjei* peut s'attaquer à une variété de substrats aromatiques monohalogénés (figure 1). Elle déshalogène principalement la position *méta* de certaines molécules aromatiques mais cette activité peut aussi se produire sur les halogènes situés en *para* ou *ortho* (Mohn et Tiedje, 1992c). Voici quelques exemples de molécules transformées par *D. tiedjei*: le 3-chlorobenzoate, le 3,5-dichlorobenzoate (DeWeerd *et al.*, 1986), le 2,5-dichlorobenzoate (Griffith *et al.*, 1992), le 2-, le 3- et le 4-bromobenzoate, le 2-, le 3- et le 4-iodobenzoate (DeWeerd et Sufliya, 1990b). Dans plusieurs cas, l'activité de déshalogénéation nécessitait le 3-chlorobenzoate qui agit en tant qu'inducteur de la réaction.

La déshalogénéation des chlorophénols se produit exclusivement sur les chlores retrouvés en position *méta* et en présence de l'inducteur (Tableau II). *D. tiedjei* convertit le PCP en 2,4,6-TCP par une réaction co-métabolique mais une concentration de plus de 10  $\mu$ M (2,4 mg/l) du toxique inhibait la croissance de la bactérie (Mohn et Kennedy, 1992b). Les molécules 2-bromobenzoate et tétrachloroéthène (PCE) sont aussi biotransformées uniquement s'il y a un inducteur. *D. tiedjei* n'a aucune activité envers les monochlorophénols, les monofluorobenzoates et le benzoate (Mohn et Tiedje, 1992c). Même le 3-chlorophénol, structure relativement similaire au 3-chlorobenzoate, ne peut être déshalogéné. Outre le 3-chlorobenzoate, d'autres molécules halogénées en position *méta*, ont démontré la capacité d'induire la déshalogénéation, en voici quelques exemples: le 3-bromobenzoate, le 3-bromobenzamide, les 3-iodo-, 3-fluoro- et 3-méthyl-benzoate ou benzamide (figure 2). Aucun chlorophénol ne peut induire la déshalogénéation (Mohn et Tiedje, 1992c). Un consortium anaérobie dont faisait partie *D. tiedjei* a pu dégrader avec succès le tétrachloroéthène, le trichloroéthane et le chloroforme dans un bioréacteur à film fixe (Fathepure et Tiedje, 1994). Le mécanisme de la réaction a été étudié avec le 2,5-dichlorobenzoate et de l'eau deutérée D<sub>2</sub>O par Griffith *et al.* (1992). Les analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectre de masse (GC-MS) en plus de la résonance magnétique nucléaire (RMN) ont

**TABLEAU II: Déshalogénéation des chlorophénols par  
*Desulfomonile tiedjei*.**

substrat	% d'élimination	Produit(s)
PCP	100	2,4,6-TCP
2,3,4,6-TeCP	100	2,4,6-TCP
2,3,5,6-TeCP	100	2,3,6-TCP, 2,6-DCP
2,3,4-TCP	100	2,4-DCP
2,3,5-TCP	100	2,3-DCP, 2-MCP
2,3,6-TCP	51	2,6-DCP
2,4,5-TCP	100	2,4-DCP
2,4,6-TCP	1	aucun
2,3-DCP	34	2-MCP
2,4-DCP	0	aucun
2,5-DCP	56	2-MCP
2,6-DCP	1	aucun
3,4-DCP	100	4-MCP
3,5-DCP	28	3-MCP
2-MCP	0	aucun
3-MCP	0	aucun
4-MCP	0	aucun

Tiré de Mohn et Kennedy, 1992b.

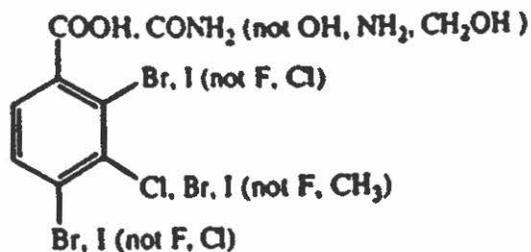


FIGURE 1: Substrats monohalogénés subissant la déshalogénéation réductrice par *D. tiedjei*. Un des deux substituents en position C-1 est nécessaire. Tiré de Mohn et Tiedje, 1992c.

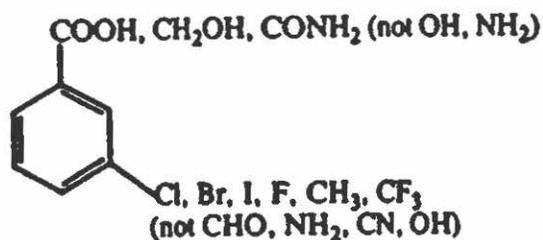


FIGURE 2: Inducteurs de la déshalogénéation réductrice chez *D. tiedjei*. Tiré de Mohn et Tiedje, 1992c.

démonstré que le deutérium était incorporé seulement à la position *méta* du chlore enlevé et qu'il dérive du solvant. Ceci signifie que cette réaction de déshalogénéation réductrice ne permet l'échange de protons qu'à la position de l'halogène retiré.

### 5.1.3 Autres caractéristiques de *D. tiedjei*

Pour terminer, mentionnons que le génome de *D. tiedjei* comporte un plasmide d'environ 28 kbs (Cole et Tiedje, 1991) qui, à notre connaissance, n'a pas été caractérisé. La déshalogénéation serait un processus associé à la membrane, ce qu'ont démontré des dosages réalisés à partir d'extraits cellulaires (DeWeerd et Sulfito, 1990b). Finalement, un fait inusité, la division cellulaire de *D. tiedjei* impliquerait une structure en forme de collet unique et très particulière (Mohn *et al.*, 1990a). La cellule fille origine de ce collet situé à l'extrémité terminale de la cellule mère. La cellule fille s'allonge graduellement à partir du collet jusqu'à ce qu'elle soit de la même longueur que la cellule mère. C'est à ce collet qu'il y a division cellulaire, ce qui implique des invaginations des membranes. À la fin du processus, les deux cellules séparées ont chacune leur propre collet.

## 5.2 LA SOUCHE DCB-2

Une bactérie s'apparentant au genre *Clostridium* et capable de faire la déchloration de certains chlorophénols a été isolée en 1992 par Madsen et Licht. Une étape importante et qui a mené à l'isolement de cette souche a été un traitement à la chaleur de 60 minutes à 80°C de manière à sélectionner les bactéries sporulantes de leur consortium, lesquelles étaient impliquées dans la déshalogénéation. Dans l'hypothèse que la bactérie responsable de cette activité nécessitait des métabolites produits par d'autres membres de la communauté bactérienne, la culture des bactéries sporulantes a été maintenue dans un milieu nutritif auquel était ajouté du milieu filtré du consortium actif qui n'avait pas été chauffée. Lors des essais de déshalogénéation en milieu liquide des colonies isolées sur milieu solide, trois des cent isolats ont démontré de l'activité envers le 2,4,6-TCP. Cette bactérie nommée DCB-2 était un bâtonnet légèrement courbé de type Gram positif, anaérobie strict, mobile et sporulant.

Le plus haut taux de croissance de DCB-2 a été obtenu avec un milieu contenant du pyruvate de sodium (20 mM) et de l'extrait de levure (0,1%), et cela sans l'ajout du milieu de culture filtré. DCB-2 présente une activité de déchloration sur différents chlorophénols, avec une préférence pour l'élimination des chlores en position *ortho*. DCB-2 effectue notamment la déshalogénéation de 300  $\mu$ M (60 mg/l) de 2,4,6-TCP en 4-CP via le 2,4-DCP. Les chlores en position *ortho* des chlorophénols suivants peuvent être retirés: PCP, 2,4,5-TCP et 2,4-DCP. Le PCP a été transformé lentement en 2,3,4,5-TeCP pour ensuite s'accumuler en 3,4,5-TCP. Les auteurs expliquent la lente déchloration par l'effet toxique de la dose de 40  $\mu$ M (11 mg/l) de PCP sur la bactérie. Dans un cas, DCB-2 a pu déchlorer un substituant en position *mé*ta, ainsi le 3,5-DCP était transformé en 3-CP. Aucune élimination en position *para* n'a pu être observée.

Peu d'informations sont disponibles sur cette souche bactérienne puisqu'à notre connaissance, aucune caractérisation plus complète n'a été publiée à ce jour.

### 5.3 LA SOUCHE 2CP-1

Le groupe de Tiedje a isolé une troisième souche capable d'effectuer de la déchloration réductrice (Cole *et al.*, 1994). Ce microorganisme désigné 2CP-1 est un bâtonnet Gram positif, anaérobie facultatif et membre du groupe des myxobactéries. Il peut déchlorer 100  $\mu$ M de 2-chlorophénol en phénol, ceci en cinq jours. Son spectre d'activité est très limité; les chlores en position *ortho* du 2-CP, 2,5-DCP et 2,6-DCP peuvent être enlevés alors que des chlores additionnels en position *para* ou *mé*ta ralentissent ou inhibent totalement la déshalogénéation. Cette activité est inductible.

La souche 2CP-1 a été isolée sur un milieu solide d'agarose constitué de sels minéraux et de vitamines auquel étaient ajoutés l'hémine, la 1,4-naphtoquinone, la nicotinamine, la thiamine et l'acide lipoïque. L'acétate (1 mM, donneur partiel d'électrons) et le 2-chlorophénol (accepteur d'électrons) étaient essentiels à la formation de colonies qui apparaissaient après seulement six semaines de croissance. Dans le milieu de culture liquide, avec du fumarate (1 g/l), le temps de division cellulaire était de 3,7 jours. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette bactérie, tout comme *D. tiedjei* (Dolfing, 1990; Mohn et

Tiedje, 1990b), obtiendrait de l'énergie en utilisant le xénobiotique comme accepteur d'électrons dans la chaîne respiratoire.

#### 5.4 *DESULFITOBACTERIUM DEHALOGENANS*

Tout récemment, une souche du nom de *Desulfitobacterium dehalogenans* a été isolée par Utkin *et al.* (1994). Il s'agit d'une nouvelle espèce et d'un nouveau genre bactérien. Ce microorganisme anaérobie est de type Gram positif, mobile et en forme de bâtonnet. Lors de l'enrichissement d'une culture mixte, cette bactérie a su résister à un traitement à la chaleur de 25 minutes à 85°C bien qu'en culture pure, des spores n'ont pu être observées. Ce bacille asaccharolytique peut croître en présence de 0,1% d'extrait de levure lorsque le pyruvate, le lactate, le formiate ou l'hydrogène servait de donneur d'électrons pour la déshalogénéation réductrice du 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (3-Cl-4-OHPA). L'une des particularités de cette bactérie est le fait qu'elle soit incapable de croître sur milieu solide lorsque la concentration d'agar est de plus de 0,9%. La formation de colonies de *D. dehalogenans* n'est possible que sur un milieu contenant entre 0,6 et 0,9% d'agar.

##### 5.4.1 Spectre d'activité de *D. dehalogenans*

Le spectre d'activité de cette bactérie a été testé envers de nombreuses molécules aromatiques halogénées (figure 4). La déshalogénéation s'est avérée être un processus inductible et c'est le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate qui a été utilisé comme inducteur dans ces expériences. *Desulfitobacterium dehalogenans* ne peut qu'éliminer des halogènes à la position *ortho* d'une molécule aromatique mais le spectre de déshalogénéation vis-à-vis ces molécules est relativement large. Des nitrophénols, des hydroxybenzoates, des acides phénylacétiques, des méthylphénols et des bromophénols peuvent être déshalogénés ou déméthylés. En ce qui concerne les chlorophénols, *D. dehalogenans* peut déchlorer, à différentes vitesses, le PCP de même que neuf autres chlorophénols qui possèdent un ou deux chlores en position *ortho*. La déshalogénéation complète de ces molécules n'est jamais accomplie puisque la bactérie n'a aucune activité sur les monochlorophénols (Utkin *et al.*, 1995).

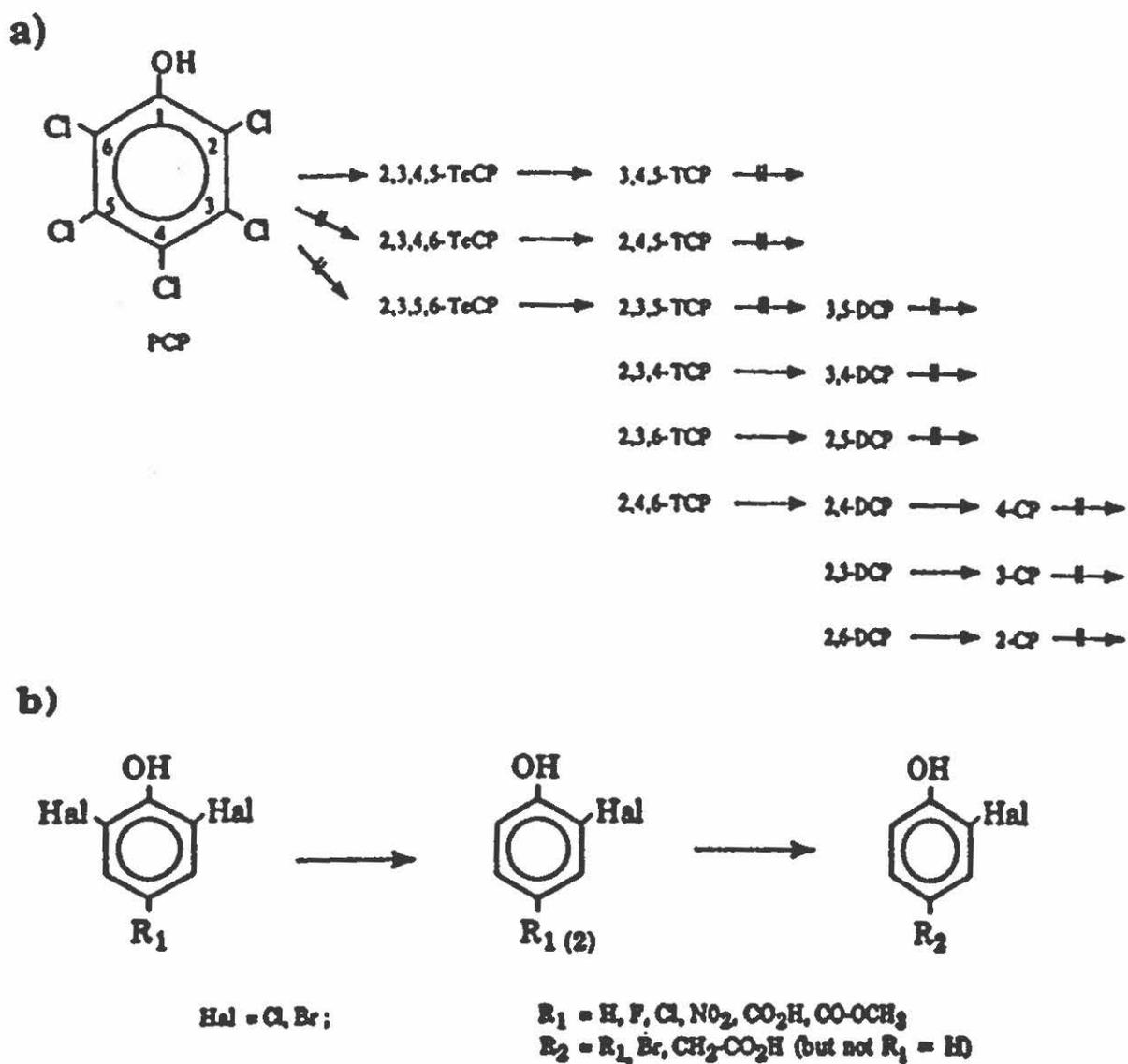


FIGURE 3: Schéma général des *ortho*-déshalogénations réductrices effectuées par *Desulfitobacterium dehalogenans*.

Tiré de Utkin *et al.*, 1995.

La température optimale pour la déchloration du 3-Cl-4-OHPA est de 38°C et le pH optimal est de 7,5. Dans ces conditions, le temps de division cellulaire est de 3,5 heures lorsque la source de carbone est le pyruvate de sodium à une concentration de 20 mM. En l'absence du 3-Cl-4-OHPA, aucune croissance n'était obtenue avec le lactate, le formiate et l'hydrogène. Une latence d'une journée était observée sur la croissance de *D. dehalogenans* dans un milieu contenant du pyruvate mais sans l'inducteur. Ceci n'était pas le cas lorsque cette molécule était présente dans le milieu de culture.

### 5.5 RÉSUMÉ DES SOUCHES ANAÉROBIES EFFECTUANT DE LA DÉCHLORATION SUR UN COMPOSÉ AROMATIQUE

Somme toute, ces quatre souches ont chacune leur spectre d'activité caractéristique, autant au niveau des substrats que de la position des halogènes qu'elles attaquent. *Desulfomonile tiedjei* déchloro principalement la position *méta* tandis que DCB-2, 2CP-1 et *Desulfitobacterium dehalogenans* ont une nette préférence pour la déshalogénéation en position *ortho*. Aucune n'a la possibilité d'enlever un chlore à la position *para*. Dans deux cas, DCB-2 et 2CP-1, leur spectre d'activité est très limité. Les quatre souches effectuent la déchloration via le processus de déshalogénéation réductrice et dans trois cas, *D. tiedjei*, 2CP-1 et *D. dehalogenans*, elles semblent gagner de l'énergie en effectuant la déshalogénéation. Par ailleurs, cette déshalogénéation réductrice est de plus en plus reconnue comme étant un nouveau mode de respiration par les bactéries anaérobies, la molécule aromatique servant d'accepteur final des électrons (Holliger et Schraa, 1994a). Les quatre microorganismes nécessitent l'addition de co-substrats, ce qui est évident si l'on considère qu'aucune n'a la possibilité de cliver le noyau aromatique, donc d'utiliser les carbones de cette molécule. À ce jour, il n'y a qu'une seule molécule chlorée, le chlorure de méthyle, qui peut être utilisé comme unique source de carbone et d'énergie à une bactérie anaérobie (Traunecker et al., 1991). Cette dernière est un Gram positif non-motile, capable de croître dans un atmosphère de 2 à 3% de CH<sub>3</sub>Cl. Dans ces conditions, un temps de division cellulaire de 30 heures a été observé.

Parmi les quatre souches décrites, trois ont été isolées dans les trois dernières années. Il n'y a que *D. tiedjei* qui ait fait l'objet de nombreuses publications et c'est la seule qui soit aujourd'hui relativement bien connue. Ce

sont des bactéries qui appartiennent à des espèces différentes et elles ont des propriétés différentes. Ces quatre souches bactériennes sont des bâtonnets et seule la souche DCB-2 peut former des spores.

Bien que *D. tiedjei*, DCB-2 et *D. dehalogenans* aient une certaine activité de déchloration du PCP, aucune bactérie anaérobie s'attaquant efficacement à ce toxique n'a pu être isolée en culture pure jusqu'à maintenant.

## 6. LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE, UN PROCESSUS RESPIRATOIRE.

Certaines bactéries anaérobies catalysent les réactions de déshalogénéation réductrice par un processus co-métabolique alors que d'autres peuvent effectuer la déshalogénéation de molécules halogénées aliphatiques ou aromatiques par un processus respiratoire (Holliger et Schraa, 1994a; Mohn et Tiedje, 1992c).

Dans le processus co-métabolique, la déshalogénéation n'est pas couplée à la conservation d'énergie et elle serait le fruit de réactions non-spécifiques de la part de certaines enzymes qui normalement catalysent d'autres réactions.

Des cultures capables de croître notamment avec de l'hydrogène moléculaire, du formiate, de l'acétate ou du pyruvate servant de donneurs d'électrons, en plus d'une molécule halogénée comme accepteur d'électrons, couplent la déshalogénéation à la conservation d'énergie. Par exemple, dans le cas de *Desulfomonile tiedjei*, la thermodynamique de la déshalogénéation réductrice du 3-chlorobenzoate indique qu'il s'agit d'une réaction exothermique et qu'elle pourrait être utile à l'activité biologique (Dolfing, 1990). Le mécanisme de conservation d'énergie n'est présentement pas connu (Holliger et Schumacher, 1994b). *D. tiedjei* a été la première bactérie anaérobie décrite pouvant utiliser un produit chloré comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire (Deweerd et al., 1990a; Dolfing, 1990; Mohn et Tiedje, 1990b) et les bactéries 2CP-1 et *D. dehalogenans* semblent aussi capables d'un tel mécanisme. En ce qui concerne les molécules aliphatiques, *Dehalobacter restrictus* et *Dehalospirillum multivorans* utilisent le tétrachloroéthène (PCE)

comme accepteur d'électrons dans un processus respiratoire (Holliger et Schumacher, 1994b).

### 6.1 LE PCE, ACCEPTEUR D'ÉLECTRONS CHEZ *DEHALOBACTER RESTRICTUS*.

Un modèle du système respiratoire de *Dehalobacter restrictus* a été proposé par Holliger et Schumacher (1994b). Ce modèle est présenté à la figure 4. Cette bactérie ne peut utiliser que l'hydrogène moléculaire comme donneur d'électrons. Au moins deux enzymes seraient impliquées dans la réaction de déshalogénéation du PCE. Une hydrogénase et une PCE réductase catalyseraient la réaction suivante:



Des évidences expérimentales suggèrent que l'hydrogénase serait localisée à l'extérieur de la membrane cellulaire tandis que la PCE réductase serait située à l'intérieur. La voie par laquelle les électrons sont transférés n'est pas connue. Les auteurs n'ont pu déterminer si une pompe à protons est couplée au transfert d'électrons.

Le modèle proposé libère deux protons  $\text{H}^+$  à l'extérieur de la membrane lorsqu'une molécule de HCl est formée et qu'il y a eu transport de deux électrons. En assumant qu'une molécule d'ATP nécessite trois protons, c'est 2/3 d'ATP qui peut être formé par molécule de HCl. C'est ainsi que la déshalogénéation via la voie réductrice permet de gagner de l'énergie. Des expériences menées par Dolfing (1990) sur des cellules de *D. tiedjei* privées en nutriments ont montré que l'ajout du 3-chlorobenzoate dans le milieu triplait le taux d'ATP dans les cellules. La croissance de cette bactérie était aussi améliorée en présence du chlorobenzoate plutôt qu'avec le benzoate.

Enfin, une meilleure caractérisation de la biochimie des systèmes énergétiques des bactéries *D. restrictus* et *D. tiedjei* est nécessaire de façon à mieux définir le système respiratoire couplé à la déshalogénéation réductrice.

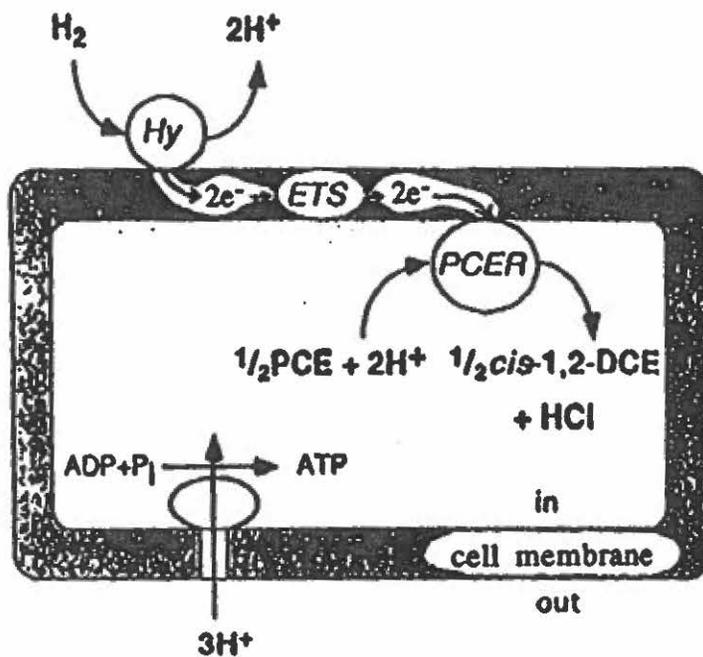


FIGURE 4: Modèle du système respiratoire de *Dehalobacter restrictus*. Hy = hydrogénase, EST = système de transport des électrons, PCER = tétrachloroéthène réductase. Tiré de Holliger et Schumacher, 1994.

## 7. DES CONSORTIA MÉTHANOGENIQUES DÉGRADENT LE PCP

La dégradation du PCP par les bactéries anaérobies a été observée principalement par des consortia fonctionnant par fermentation méthanogénique. Différents types de réacteurs ont pu minéraliser le PCP à divers taux. Le réacteur à alimentation continue le plus performant en est un à courant ascendant avec boues granulaires (*upflow anaerobic sludge blanket, UASB*, Wu *et al.* 1993). Ce réacteur pouvait traiter un effluent contenant de 40 à 60 mg PCP/l, à un taux de 90 mg/l de réacteur par jour, ceci avec un court temps de résidence hydraulique d'au maximum 15 heures. D'autres réacteurs ont été rapportés, par exemples à film fixe (Hendriksen *et al.*, 1991), à boues granulaires (Hendriksen *et al.*, 1992) ou à alimentation semi-continue (Guthrie *et al.*, 1984), mais ils n'apparaissaient pas particulièrement efficaces.

La déchloration totale du PCP via la déshalogénéation réductrice est primordiale à sa minéralisation. La minéralisation de ce produit passerait donc systématiquement par le phénol (Mohn et Kennedy, 1992a; Nicholson *et al.*, 1992; Bhatnagar et Fathepure, 1991; Mikesell et Boyd, 1985). De plus, plusieurs voies biochimiques de déchloration ont été élucidées et il semblerait que le dernier intermédiaire chloré le plus souvent rencontré soit le 3-MCP (Wu *et al.*, 1993; Bhatnagar et Fathepure, 1991). Afin d'obtenir la minéralisation du PCP dans les bioréacteurs, les chercheurs ont parfois eu besoin de laisser de longues périodes d'acclimatation au PCP puisque ce toxique est un fort inhibiteur des bactéries méthanogéniques (Wu *et al.*, 1993; Tiedje *et al.*, 1987). Dans un cas (Guthrie *et al.*, 1984) la production de méthane par des boues de digesteur anaérobie non-acclimatées au PCP s'arrêtait à une dose d'au delà de 0,2 mg de PCP/l. Les auteurs de cet article indiquent que c'est probablement à cause de cette inhibition que la dégradation anaérobie du PCP n'a pu être démontrée qu'après le début des années 1980.

## 8. CONSORTIUM À L'ÉTUDE DANS NOS LABORATOIRES.

### 8.1 ISOLEMENT DU CONSORTIUM ET PERFORMANCES DES BIORÉACTEURS

Des travaux portant sur un consortium anaérobie effectuant la dégradation du PCP par fermentation méthanogénique sont présentement en cours dans les laboratoires du Dr R. Beaudet à l'Institut Armand Frappier (Juteau *et al.*, 1995a; Juteau, 1993).

Le consortium anaérobie a été obtenu à partir d'un mélange de deux sols contaminés au PCP, l'un provenait d'un site d'entreposage de poteaux d'Hydro-Québec, l'autre d'un site d'une usine de traitement du bois de la compagnie Domtar. Des boues d'un digesteur anaérobie d'une usine d'épuration des eaux usées (Deux Montagnes) ont également été ajoutées aux sols contaminés. Dans un premier temps, le consortium a subi un enrichissement dans un bioréacteur alimenté en mode semi-continu et en second lieu, en mode continu. Des réacteurs à film fixe à flux ascendant fonctionnant en mode continu ont également été développés. Les performances de dégradation dans les réacteurs à alimentation semi-continue demeuraient pauvres, ces réacteurs n'étaient pas stables et ne pouvaient traiter que de faibles doses de PCP. Les bioréacteurs à alimentation continue se sont avérés beaucoup plus performants. Ils pouvaient éliminer plus de 99% du PCP avec une charge de 60  $\mu$ mole (16 mg) de PCP/l/jour avec un temps de rétention hydraulique de 0,7 jour (Juteau, 1993; Juteau *et al.*, 1995a). En fait d'efficacité, ces performances placent ces réacteurs au second rang, derrière ceux à boues granulaires de Wu *et al.* (1993).

### 8.2 CONDITIONS DE CULTURE DU CONSORTIUM

Le consortium a été cultivé dans le milieu de minéraux de Boyd *et al.* (1983) qui contenait les vitamines de la solution de Wolin *et al.* (1963), des sources de carbone et une dose de pentachlorophénol. La dégradation de PCP nécessite l'addition d'une source de carbone complémentaire au milieu de culture. Le glucose, le formiate de sodium, le lactate de sodium ou l'extrait de levure se sont avérés efficaces pour maintenir l'activité de déshalogénéation du consortium contrairement à l'acétate où l'activité était rapidement arrêtée. Un

mélange de 1 g/l de glucose et de 2,26 g/l de formiate s'est révélé idéal autant dans les réacteurs que lors d'essais en petits volumes, dans des bouteilles sérologiques. Ce mélange avait l'avantage de maintenir le pH de la culture stable. À noter que l'utilisation du glucose seul provoquait une baisse de pH lorsqu'il était métabolisé (la déchloration était inhibée lorsque le pH chutait à des valeurs inférieures à 6,7) tandis que le formiate seul causait l'effet inverse, soit une hausse de pH.

### 8.3 VOIE BIOCHIMIQUE DE DÉGRADATION DU PCP

La voie biochimique de déchloration a été déterminée par l'analyse des différents intermédiaires chlorés à l'aide de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et de la chromatographie gazeuse couplée à un spectre de masse (GC-MS). Cette voie est présentée à la figure 5. Dans ce consortium, le PCP subit la déchloration principalement via le 2,3,5,6-TeCP, le 2,3,5-TCP, le 3,5-TCP et le 3-MCP pour finalement donner le phénol. Par la suite l'ouverture de son cycle aromatique est effectuée puis les bactéries acétogéniques et méthanogéniques du consortium seraient responsable de la production du méthane et du gaz carbonique. Une voie secondaire mineure serait aussi empruntée puisque le 2,3,4,5-TeCP et le 3,4-DCP ont pu être détectés. Par contre, le lien entre ces molécules, le 2,3,4-TCP, le 3,4,5-TCP ou le 2,4,5-TCP n'a jamais été observé. L'étape limitante de ce processus est la transformation du 3-MCP en phénol. Ceci n'a rien d'exceptionnel puisqu'il est bien connu qu'en conditions anaérobies, pour des raisons de thermodynamique et de solubilité, les phénols les moins chlorés sont dégradés plus difficilement et plus lentement que les phénols hautement chlorés (Hendriksen *et al.*, 1992; Madsen et Licht, 1992; Mohn et Kennedy, 1992a).

### 8.4 CARACTÉRISATION DU CONSORTIUM ANAÉROBIE

Le PCP était déshalogéné jusqu'au 3-MCP (qui s'accumulait dans le milieu) suite à un traitement à la chaleur d'une heure à 80°C des bactéries du consortium. Ces résultats suggèrent que des bactéries sporulantes sont responsables de ces déshalogénations et que les bactéries non-sporulantes, dont les acétogéniques et méthanogéniques, ne sont pas impliquées dans ces réactions. Un autre argument indiquant que les bactéries méthanogéniques ne sont

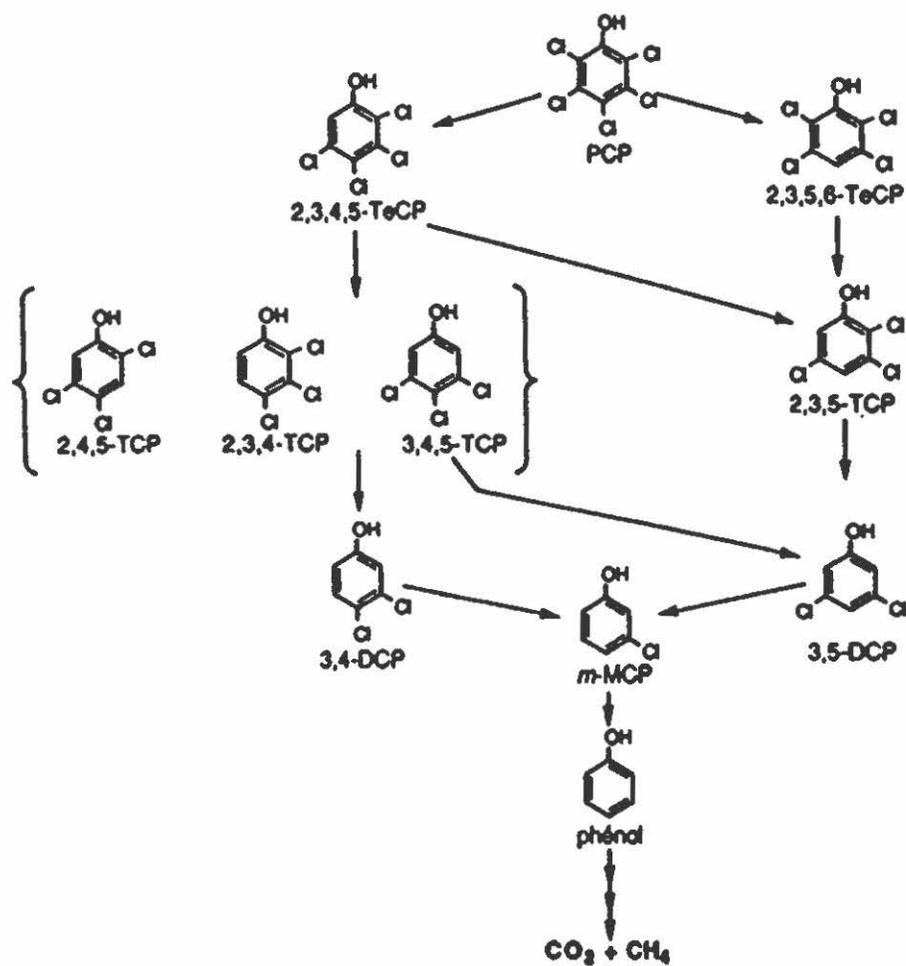


FIGURE 5: Voie biochimique de la dégradation du PCP par le consortium expérimental. Tiré de Juteau *et al.* (1995a).

pas nécessaires à cette activité est le fait que lorsqu'elles étaient inhibées par l'acide bromoéthane sulfonique (BESA) (Hendriksen et Ahring, 1992) la déchloration de quatre des cinq chlores du PCP se poursuivait normalement. Les traitements à la chaleur et au BESA qui ont inhibé la déchloration du 3-MCP suggèrent qu'une bactérie syntrophe et dépendante de la méthanogénèse serait responsable de cette réaction (Juteau *et al.*, 1995b; Juteau, 1993).

Les bactéries s'attaquant au PCP seraient vraisemblablement anaérobies strictes puisqu'aucune déshalogénéation n'était observée lorsqu'elles étaient en présence d'oxygène. L'addition de nitrate n'a eu aucun effet sur la déchloration alors que le sulfate et l'hydrogène ont diminué le taux de déchloration du PCP. La déshalogénéation a été maximale à 37°C mais aussi très efficace à 29°C, température à laquelle sont incubés les bioréacteurs. À 45°C, les trois premiers chlores du PCP ont été efficacement enlevés mais la dégradation ne s'est pas poursuivie au delà du 3,5-DCP tandis qu'à 15°C, l'activité était à toute fin pratique inexistante.

Notons en dernier lieu la très grande difficulté qu'à eu Juteau (1993) à travailler en petits volumes, dans des bouteilles sérologiques. "Par exemple, il a été impossible de repiquer le consortium en bouteille, c'est à dire de prélever un échantillon du consortium et d'inoculer une bouteille contenant du milieu frais, et ce, peu importe la grosseur de l'inoculum." Toutefois, une nette amélioration de la déchloration en bouteille a été obtenue lorsque du DEAE Séphacel était ajouté. Il a été suggéré que le DEAE Séphacel employé favorisait la formation d'association ou d'aggrégation des bactéries. La proximité cellulaire engendrée pourrait avantager certains échanges de métabolites ou favoriser l'expression de l'activité de déchloration.

## 9. CONCLUSION

La biodégradation anaérobie du PCP offre un grand potentiel d'application dans le traitement des sols et des eaux contaminés. Des consortia anaérobies dégradant le PCP par fermentation méthanogénique sont impliqués dans ces procédés. Très peu de connaissances sont disponibles sur les microorganismes impliqués dans les premières étapes de dégradation, soit la déchloration du PCP

en phénol. Quelques souches bactériennes ayant une activité de déchloration envers certains chlorophénols ont été isolées en culture pure mais leur activité est très limitée envers le PCP. Il est donc de première importance d'isoler et de caractériser les microorganismes impliqués dans la déchloration du PCP.

Ce projet de recherche a pour but d'étudier le consortium anaérobie dégradant le PCP qui a été sélectionné à l'Institut Armand-Frappier. Les résultats obtenus de Pierre Juteau (1993) suggèrent que des microorganismes sporulants et stables à un traitement à la chaleur seraient impliqués dans la déchloration du PCP au 3-MCP. Les principaux objectifs de ce projet sont d'enrichir les microorganismes effectuant la déchloration du PCP au 3-MCP et d'isoler et de caractériser le(s) microorganisme(s) impliqué(s) dans cette activité de déchloration. Les résultats de ces travaux apporteront des connaissances importantes qui permettront une meilleure compréhension des étapes de déchloration du PCP et le développement de procédés de biodégradation plus efficaces.

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 1. PROVENANCE DU CONSORTIUM

Le consortium qui a servi d'inoculum de départ pour nos cultures dans les bouteilles sérologiques a été obtenu du bioréacteur R-4. Celui-ci est un réacteur à alimentation continue maintenu sous agitation constante dans lequel un consortium méthanogénique dégrade le pentachlorophénol. Son volume est de 1,7 litre. Au moment du prélèvement, son débit quotidien était de 165 ml et le milieu de culture qui l'alimentait contenait une dose de 10 mg/l de PCP-Na.

## 2. MILIEU DE CULTURE

### 2.1 PRÉPARATION DU MILIEU MINIMAL

Le milieu de culture utilisé est une modification de celui de Boyd *et al.* (1983). Ce milieu minimal contenait les minéraux suivants, par litre: 0,27 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,35 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,53 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,10 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,073 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,020 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Baker, Phillipsburg, É-U). La résazurine (Sigma, St-Louis, É-U), un indicateur du potentiel rédox, était présente à 0,001 g/l. Un volume de 10 ml d'une solution d'éléments minéraux retrouvés en trace était ajouté. Cette solution contenait, par litre: 0,1 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 mg  $\text{ZnCl}_2$ ; 0,1 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,1 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Le pH de ce milieu de culture était ajusté à 7,65 avec du  $\text{NaHCO}_3$  (Mallinckrodt, Kentucky, É-U). Ce milieu a été bouilli une heure en utilisant une colonne réfrigérante. Des volumes de 21,2 ml ont ensuite été distribués dans des bouteilles sérologiques en verre de 70 ml (Canlab, Pointe-Claire) et ont été barbottés 5 minutes par un mélange de gaz anaérobie contenant 10% d'hydrogène  $\text{H}_2$ , 10% de gaz carbonique  $\text{CO}_2$  et 80% d'azote  $\text{N}_2$  (Médigas, Ville St-Laurent). Les bouteilles ont été hermétiquement fermées avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, É-U). Ces bouteilles et leur contenu ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Par la suite, un volume de 0,15 ml d'une solution de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  10% a été ajouté afin de rendre le milieu anaérobie. Celle-ci a été préparée avec de l'eau qui a été chauffée pendant 10 minutes. La solution a été barbottée pendant 5 minutes avec le mélange gazeux et stérilisée à l'autoclave.

## 2.2 PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE VITAMINES

Une solution mère de vitamines (Sigma sauf contre-indication) a été préparée et contenait, par litre (Wolin *et al.*, 1963): 2 mg de biotine; 2 mg d'acide folique; 5 mg de riboflavine; 5 mg de thiamine (Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, É-U); 10 mg d'hydrochlorure de pyridoxine; 5 mg d'acide nicotinique; 5 mg d'acide panthoténique; 0,1 mg de vitamine B<sub>12</sub>; 5 mg d'acide thioctique et 5 mg d'acide *p*-aminobenzoïque. Cette solution a été stérilisée par filtration (filtre AcroDisk de porosité 0,2 µm, Gelman Sciences, Ann Arbor, É-U) et injectée dans une bouteille scellée et stérile contenant un atmosphère anaérobie. De cette bouteille, un volume de 0,15 ml a été injecté dans les bouteilles contenant le milieu minimal. Des quantités de 200 µg/l de 1,4-naphtoquinone (Aldrich) et de 100 µg/l d'hémine (Eastman Kodak Co, É-U) ont été ajoutés au milieu nutritif lorsque l'activité de déshalogénéation du PCP par des colonies isolées était suivie (section 6.).

## 2.3 PRÉPARATION DU DEAE SÉPHACEL

Dans deux tubes à centrifugation, un volume de 60 ml de DEAE Séphacel (Pharmacia, Suède) a été centrifugé à 1000 g (centrifugeuse Sorvall, modèle GCL-2B) pendant 2 minutes. Le surnageant a été retiré et remplacé par le même volume de milieu minimal (aérobie, non-stérile). Les préparations ont été homogénéisées et recentrifugées. Trois lavages ont ainsi été effectués. Cette préparation de DEAE Séphacel a par la suite été barbottée une heure avec le mélange de gaz H<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>, scellée et autoclavée pendant 15 minutes à 121°C. Un volume de 0,5 ml était injecté à chaque bouteille contenant 21,2 ml de milieu minimal, la solution de vitamines et le Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O.

## 2.4 AJOUT DES SOURCES DE CARBONE, DU PCP ET DE L'INOCULUM BACTÉRIEN.

Les différentes sources de carbone testées ont été ajoutées au milieu minimal à partir de solutions aqueuses, stériles (filtrées ou autoclavées) et anaérobies. Les sources de carbone dans le milieu nutritif du consortium original étaient le glucose (1 g/l) et le formiate de sodium (2,26 g/l). Ces substances étaient ajoutées dans les bouteilles sérologiques à raison de 0,5 ml

d'une solution mère du mélange de 50 g/l de glucose (Mallinckrodt) et 113 g/l de formiate de sodium (Sigma), stérilisée par filtration. Un volume de 2,0 ml d'une préparation bactérienne obtenue sur milieu solide ou d'une culture liquide provenant d'une bouteille sérologique servait d'inoculum pourensemencer de nouvelles bouteilles contenant du milieu frais. Une dose de 3 ou 5 mg/l de PCP-Na (Aldrich, Milwaukee, É-U) provenant d'une solution mère de 150 mg/l était injectée aux bouteilles 24 heures après l'inoculum. Cette solution a été préparée en dissolvant le PCP-Na dans de l'eau chauffée pendant 10 minutes contenant quelques gouttes de NaOH 2N (la solubilité du PCP-Na est augmentée en milieu basique). Par la suite, elle était barbottée pendant 5 minutes avec le mélange gazeux  $H_2:CO_2:N_2$ . La bouteille était scellée et le tout stérilisé à l'autoclave. La combinaison de l'ajout du  $Na_2S \cdot 9H_2O$ , des vitamines, des sources de carbone, du DEAE Séphacel, de l'inoculum et du PCP-Na devait compléter le volume des bouteilles à 25 ml. Toutes les opérations sur les bouteilles ont été effectuées à l'aide d'aiguilles et de seringues stériles (Becton Dickinson, É-U). Toutes les bouteilles inoculées ont été incubées dans l'obscurité à 37°C.

### 3. CULTURE SUR MILIEUX SOLIDES

Les géloses commerciales anaérobies Columbia ANA #1121 (Quélab, Montréal) ont été utilisées comme milieu de croissance des bactéries du consortium enrichi ou des souches isolées en culture pure. Il s'agit d'un milieu riche, contenant entre autres du sang de mouton défibriné, de l'extrait de levure et de boeuf puis du peptone de caséine et de viande, . Les géloses étaient rendues anaérobies dans une jarre par l'action du système Gas-Pack (BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Maryland, É-U) et transférées dans une chambre anaérobie. Des quantités de 3 mg/l de PCP-Na et 3 mg/l de 2,3,5-TCP ont parfois été ajoutées sur ces géloses de façon à maintenir les bactéries en contact avec ces substances toxiques pendant leur croissance. Un volume de 0,3 ml d'une solution anaérobie de 200 mg/l (préparée dans de l'éthanol 70%, barbottée pendant 5 minutes et à laquelle a été ajouté 0,05%  $Na_2S \cdot 9H_2O$ ) de ces deux chlorophénols était ajouté à la surface des géloses Columbia. Celles-ci bénéficiaient alors de 48 heures pour absorber ce liquide. Les géloses inoculées étaient incubées à 29°C dans la chambre anaérobie.

#### **4. MANIPULATIONS EFFECTUÉES EN CONDITIONS ANAÉROBIES**

Les travaux nécessitant des manipulations en conditions anaérobies (isolements de souches, énumérations bactériennes...) ont été effectués dans une chambre anaérobie (Shel Lab, Sheldon Manufacturing Inc., modèle BAC II, Orégon, É-U). Le mélange gazeux présent dans cette chambre est constitué de 10% de H<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> et 80% de N<sub>2</sub>. Une étuve maintenue à 29°C permet l'incubation à l'obscurité des cultures sur milieux solides. Cette enceinte anaérobie permet le travail à main nue (sans gants), ce qui facilite d'autant les manipulations de plus grande précision requise pour l'isolement des souches bactériennes.

#### **5. QUANTIFICATION ET IDENTIFICATION DES CHLOROPHÉNOLS**

##### **5.1 ANALYSE PAR HPLC**

Le dosage des chlorophénols en milieu liquide s'est effectué par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'extraction consistait en un mélange de 1,0 ml d'échantillon à 0,5 ml d'acétonitrile (qualité HPLC, Anachemia, Montréal) contenant 0,33% d'acide acétique. La préparation était agitée et centrifugée 5 minutes à 14000 g (Canlab, modèle Biofuge A). Le HPLC utilisé était de marque Waters (Mississauga, Ontario) et comprenait deux pompes (modèle 510), un spectrophotomètre (Lambda-Max, modèle 481) et un injecteur automatique (Millipore, modèle 717 Plus). Le système était contrôlé par un ordinateur NEC Power Mate 2 (modèle APC IV), régi par le logiciel Chromatography Workstation, version 3.30. La colonne hydrophobique utilisée pour séparer les chlorophénols était une NovaPaK C<sub>18</sub> (3,9 mm x 150 mm). Le programme utilisé avait recours à 2 phases mobiles. La première (A) était composée d'eau et d'acide acétique (Baxter, Toronto) dans le rapport 100:0,1. La deuxième (B) était composée d'acétonitrile et d'acide acétique dans les mêmes proportions (100:0,1). Les deux phases mobiles étaient préparées séparément et dégazées sous-vacuum pendant 10 minutes. La colonne était équilibrée dans un mélange de 70% de la phase mobile A et 30% de la phase B à un débit de 2 ml/min.

Ce débit a été gardé constant tout au long du programme d'une durée de 13 minutes. Au cours des 4 premières minutes, la concentration de la phase mobile B était augmentée de façon linéaire jusqu'à 55% alors que celle de la phase A diminuait à 45%. Cette concentration était maintenue constante jusqu'à la dixième minute. À la fin du programme, la colonne était rééquilibrée par un gradient concave aux conditions initiales déjà décrites. La concentration des différents chlorophénols a été évaluée par leur absorbance à 220 nm. Ce programme a permis la séparation, l'identification et la quantification des principaux intermédiaires rencontrés lors de la déshalogénéation des chlorophénols par les microorganismes. Les temps de rétention de chacun des intermédiaires chlorés du PCP (18 standards, Aldrich) de même que celui du phénol (Baker) étaient régulièrement vérifiés. Des courbes d'étalonnage ont été effectuées pour le PCP-Na, le 2,3,5-TCP, le 3,4,5-TCP, le 2,4,5-TCP, le 3,5-DCP, le 3,4-DCP, le 3-MCP et le phénol.

## **5.2 ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE ET SPECTROPHOTOMÉTRIE DE MASSE - IDENTIFICATION D'UN TRICHLOROPHÉNOL**

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) a été utilisée pour confirmer l'identité de l'intermédiaire trichloré observé dans les essais de déchloration du PCP par la souche PCP-1. Les chromatogrammes et fragmentogrammes des standards 2,3,5-TCP et 3,4,5-TCP ont été comparés à ceux obtenus d'un échantillon d'une culture active. Au moment du prélèvement de cet échantillon, un dosage au HPLC indiquait que la souche PCP-1 avait déshalogéné le PCP en trichlorophénol. Bien qu'ayant des temps de rétention voisin l'un de l'autre, le HPLC suggèrait que cet intermédiaire était le 3,4,5-TCP, ce qui devait être confirmé par GC-MS.

### **5.2.1 Acétylation et extraction**

Dans un tube de verre à bouchon vissable contenant 10 ml d'échantillon, 20 µl de standard interne ont été ajoutés (*m*-crésol 1870 mg/l, Aldrich), 10 gouttes de HCl 12N et 1,5 ml d'éthyl éther. Une fois les phases bien séparées, la phase organique a été récupérée et mise dans une fiole conique de 2 ml contenant du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'éther récupéré de cette fiole a subi une seconde

déshydratation, dans une autre fiole contenant du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Un volume de 200  $\mu\text{l}$  a été prélevé et ajouté à 50  $\mu\text{l}$  de bis-(triméthylsilyle)-trifluoroacétamide (BSTFA 5%, Pierce, Rockford, É-U). La réaction d'acétylation s'est déroulée à 70°C pendant 30 minutes et 1  $\mu\text{l}$  a été injecté dans le chromatographe.

### **5.2.2 Séparation et identification**

Le chromatographe utilisé était de marque Varian, modèle 3500, muni d'une colonne capillaire de type DB5 (5% phényle, 95% méthyle de silicone) de 30 mètres de longueur et de 0,2 mm de diamètre interne. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 2,4 ml/min initialement à 70°C. Les températures de l'injecteur et du détecteur à ionisation à flamme (FID) étaient de 250°C. Les échantillons ont été injectés en mode de séparation. Le four a été programmé pour que la température subisse les variations suivantes: elle est demeurée stable à 70°C la première minute et a subi par la suite une augmentation de 10°C/min jusqu'à 125°C. La température est demeurée constante pendant 7 minutes. Elle passait ensuite de 125 à 190°C, à raison de 8°C/min, et de 190 à 235°C, à un taux de 20°C/min. La température a été élevée jusqu'à 310°C avec un gradient de 30°C/min et maintenue ainsi pendant une minute.

Le chromatographe était couplé à un spectre de masse de type ionique (Finigan Mat, modèle 700). Les spectres ont été obtenus par des balayages à toutes les secondes pour les masses comprises entre 70 et 440 uA. Les temps de rétention ont été déterminés pour les standards 2,3,5-TCP et 3,4,5-TCP, leur identité a été confirmée par la signature du spectre de masse et l'échantillon de la culture active a été comparé à ces standards.

## **6. ISOLEMENT DE LA SOUCHE PCP-1**

### **6.1 TRAITEMENT À LA CHALEUR ET ENRICHISSEMENT**

L'inoculum de départ (10 ml du bioréacteur R-4) a été traité 30 minutes à 80°C dans un bain d'eau. La température de la bouteille a été contrôlée avec un thermomètre placé dans une autre bouteille contenant le même volume d'eau.

La température a été amenée à 80°C avant que débute la durée du traitement. Les bactéries résistantes à la chaleur ont ensuite été enrichies par repiquages successifs dans des bouteilles à sérum. Un inoculum de 8% (2,0 ml) était utilisé lors de chaque transfert. Les sources de carbones utilisées dans les milieux d'enrichissement consistaient au mélange de 1 g/l de glucose et 2,26 g/l de formiate de sodium. Les cultures enrichies recevaient une dose de 3 mg/l de PCP-Na (0,5 ml d'une solution à 150 mg/l) 24 heures après avoir été inoculées.

## **6.2 DILUTIONS ET ÉTALEMENT SUR MILIEU SOLIDE ANAÉROBIE**

Cette méthode a été utilisée lors des essais d'isolement des bactéries en souche pure et également pour évaluer la concentration cellulaire (unité formatrice de colonies, ufc/ml) des cultures pures en milieu liquide. Dans la chambre anaérobie, les cultures étaient tout d'abord diluées dans le milieu liquide anaérobie et par la suite étalées sur les géloses Columbia. Les dilutions étaient effectuées de façon décimale dans la chambre anaérobie avec le milieu minimal auquel avait été ajouté seulement la solution de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ . Un volume de 0,4 ml d'une culture en bouteille à sérum était ajouté à 3,6 ml de ce milieu minimal anaérobie dans un tube stérile. Cette solution était homogénéisée au Vortex et rediluée ainsi 4 fois, jusqu'à la dilution  $10^{-5}$ . Des volumes de 0,1 ml étaient prélevés des tubes et étalés sur les géloses, en duplicata ou triplicata. Ces milieux étaient incubés à 29°C dans la chambre anaérobie pendant une période de 10 à 20 jours avant d'effectuer le prélèvement ou l'énumération des colonies.

## **6.3 VÉRIFICATION DE L'ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNATION DES COLONIES ISOLÉES DANS DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE**

### **6.3.1 Récupération de la biomasse totale sur les géloses**

La biomasse de certaines géloses sur lesquelles se trouvaient des colonies isolées a été récupérée après 2 semaines d'incubation à 29°C avec 3,0 ml de milieu minimal anaérobie. Ce milieu était ajouté à la surface des géloses et la biomasse était resuspendue à l'aide d'une pipette Pasteur recourbée. La suspension bactérienne était récupérée et ajoutée dans une bouteille contenant le milieu minimal anaérobie enrichi avec le glucose, le formiate de sodium, les vitamines et le DEAE Séphacel. Une dose de 3 mg/l de PCP-Na (0,5 ml d'une

solution mère de 150 mg/l) était ajoutée 24 heures après l'ensemencement des bouteilles. La déchloration du PCP par l'ensemble des colonies retrouvées sur ces géloses était vérifiée par le dosage des chlorophénols au HPLC selon la méthode indiquée après 3 à 7 jours d'incubation. Les duplicatas et triplicatas des géloses dont la biomasse a conservé l'activité de déchloration (elles servaient de témoin positif) étaient utilisées pour prélever des colonies isolées et vérifier leur abilité à déshalogéner le PCP individuellement. Plusieurs milieux de culture liquide ont été essayés tel que présenté à la section suivante.

### 6.3.2 Évaluation de l'activité de déshalogénéation des colonies isolées

Tous les milieux de cultures qui seront décrit dans cette section étaient constitués du milieu minimal (21,2 ml) auquel avait été ajouté la solution de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , la solution de vitamines et le DEAE Séphacel (milieu A). Les sources de carbone dans les milieux de culture ont varié. Ces différentes solutions mères ont été préparées dans des bouteilles sérologiques avec de l'eau bouillie pendant 10 minutes. Elles ont été barbottées pendant 5 minutes avec le mélange gazeux composé de 10% de  $\text{H}_2$ , 10% de  $\text{CO}_2$  et 80% de  $\text{N}_2$  avant d'être scellées et stérilisées. Une dose de 3 mg/l de PCP-Na était ajoutée 24 heures après l'ensemencement des bouteilles par les colonies isolées. Celles-ci, retrouvées sur le milieu solide Columbia contenant une dose de 3 mg/l de PCP-Na et 3 mg/l de 2,3,5-TCP, étaient récupérées avec un fil de platine stérile et resuspendues séparément dans un volume de 2,0 ml de milieu minimal anaérobie. Cette suspension bactérienne était utilisée pour inoculer une bouteille sérologique contenant le milieu de culture.

Les milieux suivants ont été utilisés pour évaluer l'activité de déshalogénéation des colonies isolées. Celle-ci a été vérifiée par l'analyse des chlorophénols selon la méthode déjà décrite après 20 jours d'incubation à 37°C .

- Milieu A supplémenté de 1 g/l de glucose et 2,26 g/l de formiate de sodium. 77 colonies ont été testées.
- Milieu A supplémenté de 0,1% d'extrait de levure (Difco, Détroit, É-U; solution mère de 5% stérilisée à l'autoclave). 15 colonies (1 ml de la suspension) ont été testées.

- Milieu A supplémenté de 0,05% de protéose peptone (Difco, 0,5 ml d'une solution mère de 2,5%, stérilisée à l'autoclave). Les mêmes suspensions bactériennes des 15 colonies ayant servi à l'ensemencement des bouteilles contenant de l'extrait de levure ont été ajoutées à ces bouteilles. Celles-ci ont aussi reçu un inoculum de 2,0 ml d'un consortium méthanogénique capable de minéraliser le phénol mais n'ayant aucune activité envers le PCP. Ce consortium a été ajouté au cas où la bactérie impliquée dans la déchloration du PCP ait besoin d'un facteur quelconque sécrété par certaines bactéries présentes dans un consortium méthanogénique.
- Milieu A supplémenté de 1,24 g/l de lactate de sodium (Sigma) et 2,26 g/l de formiate de sodium (0,5 ml d'un mélange de 62 g/l de lactate et de 113 g/l de formiate, solution stérilisée par filtration; filtre AcroDick de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ , Gelman Sciences). 20 colonies ont été testées.
- Milieu A supplémenté de 1,24 g/l de lactate de sodium et 2,2 g/l (20 mM) de pyruvate de sodium (Sigma; 0,5 ml d'un mélange de 62 g/l de lactate et 110 g/l de pyruvate, stérilisée par filtration). 14 colonies ont été testées.
- Milieu A supplémenté de 1 g/l de glucose, de 2,26 g/l de formiate de sodium et d'un volume de 30% provenant du filtrat d'une culture enrichie en bouteille. 4 colonies ont été testées.
- Milieu A supplémenté de 1 g/l de glucose, de 2,26 g/l de formiate de sodium et d'un volume de 30% provenant d'une culture enrichie autoclavé. 3 colonies ont été testées.
- Milieu A supplémenté de 1 g/l de glucose et de 2,26 g/l de formiate de sodium. 28 colonies isolées sur des géloses Columbia contenant 25 ou 50 mg/l de PCP-Na (au lieu de 3 mg/l de PCP-Na et 3 mg/l de 2,3,5-TCP) ont été testées.
- Milieu A supplémenté de 1 g/l de glucose, de 2,26 g/l de formiate de sodium et de 0,1% d'extrait de levure. 4 colonies ont été testées.

## 7. ESSAIS DE CROISSANCE DE LA SOUCHE PCP-1 DANS DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE

La croissance de la souche PCP-1 a été étudiée dans deux séries de milieux de culture. Dans la première série, cinq milieux ont été expérimentés. Ils étaient tous constitués entre autres des éléments suivants: 21,2 ml de milieu minimal, 0,15 ml d'une solution de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  10%, 0,15 ml de la solution de vitamines et 0,5 ml de DEAE Séphacel.

La première bouteille contenait, en plus des éléments déjà mentionnés, 0,5 ml d'extrait de levure 5% (concentration finale de 0,1%), 200 mg/l de 1,4-naphtoquinone et 100 mg/l d'hémine. La deuxième bouteille était constituée des mêmes éléments mais a reçu la dose de 3 mg/l de PCP après 7 jours d'incubation au lieu de 24 heures. Dans la troisième bouteille, la 1,4-naphtoquinone et l'hémine ont été omises. La quatrième bouteille avait reçu un volume de 1,0 ml d'extrait de levure (concentration finale 0,2%), 200mg/l de 1,4-naphtoquinone et 100 mg/l d'hémine. La cinquième bouteille avait reçu un volume de 0,5 ml de pyruvate de sodium 1 M (concentration finale de 20 mM), 0,1% d'extrait de levure, la 1,4-naphtoquinone et l'hémine. Une dose de 3 mg/l de PCP-Na provenant d'une solution mère de 150 mg/l a été ajouté 24 heures après l'inoculation de quatre des cinq bouteilles. Un volume de 2,0 ml provenant d'une culture en bouteille de la souche PCP-1 a servi d'inoculum à ce test.

Des énumérations bactériennes ont été effectuées par dilutions décimales et étalements en duplicata sur les milieux Columbia. Elles ont été effectuées au moment de l'ensemencement des bouteilles et après 6, 11, 21, 31 et 38 jours d'incubation pour les cultures qui ont reçu la dose de PCP 24 heures après l'inoculation. Des énumérations bactériennes de la culture qui a reçu la dose de PCP après 7 jours d'incubation ont été effectués au moment de l'ensemencement et après 7, 12, 17 et 22 jours.

Dans une deuxième série, la croissance de la souche PCP-1 a été évaluée dans quatre milieux de culture différents. Ils étaient tous constitués entre autres des éléments suivants: 21,2 ml de milieu minimal, 0,15 ml de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  10%, 0,15 ml de la solution de vitamines, 0,5 ml de DEAE Séphacel et 0,5 ml de pyruvate de sodium 1M. Une dose de 3 mg/l de PCP-Na a été ajouté 24 heures après

l'ensemencement des bouteilles. Un volume de 2,0 ml provenant de la culture qui contenait le pyruvate de sodium, dans la première série de milieu de culture, a servi d'inoculum pour ce test.

La première bouteille contenait, en plus des éléments déjà mentionnés, 0,5 ml d'une solution d'extrait de levure à 5% (concentration finale de 0,1%), 200 mg/l de 1,4-naphtoquinone et 100 mg/l d'hémine. La deuxième bouteille était constituée des mêmes éléments mais la concentration d'extrait de levure était réduite à 0,02%. Dans la troisième bouteille, l'extrait de levure a été omis. La quatrième bouteille contenait 0,1% d'extrait de levure mais pas de naphtoquinone et d'hémine. Des énumérations bactériennes de ces cultures ont été effectuées au moment de l'ensemencement et après 6, 11 et 21 jours d'incubation.

L'examen des milieux inoculés et les comptes des colonies ont été effectués après deux semaines d'incubation à 29°C.

## **8. LYOPHILISATION DE LA SOUCHE PCP-1**

La souche PCP-1 a été lyophilisée. Dans la chambre anaérobie, la biomasse produite sur trois géloses Columbia, après 20 jours d'incubation, a été récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur recourbée et stérile. La biomasse a été resuspendue dans un tube contenant 5 ml de lait écrémé 2% (Difco) préparée de façon anaérobie et stérilisé à l'autoclave. Un volume de 0,5 ml a été distribué dans 10 ampoules à lyophilisation (Wheaton Scientific, Millville, N.-J., É-U) stériles. De la ouate a été placée à l'embouchure de chacune des ampoules. Celles-ci ont été sorties de la chambre anaérobie et immédiatement placées dans du méthyle cellulose contenant de la glace sèche. Les ampoules contenant les solutions bactériennes congelées ont été fixées sur le lyophilisateur (F. G. Stokes Machine Co., Philadelphie, É-U). Après 24 heures de lyophilisation, les ampoules ont été scellées à l'aide d'un brûleur au propane.

## 8.1 ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNATION DES CELLULES LYOPHILISÉES

Une ampoule de la souche PCP-1 lyophilisée a été ouverte dans la chambre anaérobie. Un volume de 0,5 ml de milieu minimal a été ajouté au milieu déshydraté. La suspension bactérienne a été prélevée et ajoutée dans une bouteille contenant le milieu de culture permettant la croissance de la souche PCP-1. Une dose de 5 mg/l de PCP-Na, à partir d'une solution mère de 150 mg/l, a été ajouté 24 heures après l'ensemencement de la bouteille. Le résultat de la déchloration a été vérifié selon la méthode déjà décrite après 6 jours d'incubation.

## 9. MICROSCOPIE OPTIQUE ET ÉLECTRONIQUE

Des colorations Gram (Difco) ont été effectuées de façon routinière afin de vérifier la pureté de la souche PCP-1 cultivée dans les bouteilles sérologiques.

L'utilisation du microscope électronique a permis de préciser les paramètres morphologiques de la souche isolée. La technique de Alain *et al.* (1987) a été utilisée pour la coloration négative des bactéries. Il s'agit d'une imprégnation à l'acide phosphotungstique (PTA 1%, pH 6,0) et d'une ultracentrifugation (Airfuge, Beckman, Palo Alto, É-U) à 122 000g pendant 5 minutes sur une grille à microscope. Le microscope électronique à transmission utilisé était un Hitachi, modèle 7100.

## 10. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET ESSAI D'IDENTIFICATION

Des essais d'identification de la souche PCP-1 et d'évaluation des capacités à utiliser certains substrats ont été réalisés avec le système API 20E (bioMérieux, Hazelwood, É-U). L'expérience a été effectuée trois fois, selon les indications du fournisseur. Les galeries API ont été incubées à 37°C durant 24 heures dans la chambre anaérobie. Les inocula ont consisté en la biomasse récupérée d'une douzaine de Pétri inoculés avec la souche PCP-1 et incubé pendant au moins 10 jours, de manière à obtenir la concentration bactérienne initiale recommandée.

## 11. IDENTIFICATION BACTÉRIENNE PAR ANALYSE DU 16S rRNA

La souche PCP-1 a été identifiée par le séquençage et l'analyse du gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome (16S rRNA). Ces manipulations, impliquant les outils de la biologie moléculaire, ont été réalisées dans le laboratoire du Dr R. Villemur par la technicienne Francine Turcotte. Même si je n'ai pas effectué ces travaux, la technique utilisée pour isoler et séquencer ce gène est décrite sommairement.

### 11.1 EXTRACTION DE L'ADN BACTÉRIEN

La biomasse de la souche PCP-1 produite sur trois géloses Columbia après deux semaines d'incubation à 29°C a été récupérée et resuspendue dans le milieu minimal puis lavée par centrifugation à 5000g pendant 10 minutes. Le milieu minimal anaérobie et stérile avait été préalablement filtré afin d'éliminer le précipité noir qu'il contient. Le culot bactérien a été resuspendu et l'ADN a été extrait selon la méthode de Li *et al.* (1995).

### 11.2 AMPLIFICATION DU GÈNE 16S rRNA PAR PCR.

Les amorces (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' et 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') représentant les extrémités du gène 16S ribosomal (Bruce *et al.*, 1992) chez toutes les espèces bactériennes ont été synthétisés par le système Gene Assembler Plus (Pharmacia LKB). La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée par le contrôleur Gene ATAQ (Pharmacia LKB) selon la méthode de Li *et al.* (1995).

### 11.3 CLONAGE ET SÉQUENÇAGE DU GÈNE 16S RIBOSOMAL

Le produit du PCR, un fragment unique de 1,6 Kb, a été traité avec la protéine K et le long fragment polymérase de *E. coli* tel que décrit par Hitti et Bertino (1994). Le fragment obtenu a été cloné dans le vecteur Bluescript (Stratagene) au site *SmaI* tel que décrit par Sambrook *et al.* (1989).

Plusieurs clones contenant un insert de 1,6 Kb ont été isolés et deux ont été complètement séquencés. Différentes parties de l'insert ont été sous-clonées dans le vecteur Bluescript à des sites de restriction appropriés chez la souche *E. coli* MV1190. Des simples brins d'ADN ont été générés avec le phage helper M13K07. La séquence du gène a été déterminée par la méthode des didéoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977).

#### 11.4 ÉTUDE PHYLOGÉNÉTIQUE

La comparaison de la séquence obtenue avec celles contenues dans les banques de données a été effectuée par le Dr R. Villemur.

Les programmes FASTA et PILEUP (Genetics Computer Group Inc.) ont été utilisés afin de trouver des séquences 16S rRNA similaires à celle de la souche PCP-1. Les analyses phylogénétiques ont été réalisées avec différents programmes de l'ensemble 3.5 de PHILIP (Felsenstein, 1989). Les nucléotides du gène de la souche PCP-1 ont été alignés de façon à être pairés avec d'autres séquences par le programme DNALIST. Le programme FITCH a dérivé un arbre phylogénétique comprenant la souche PCP-1.

## 12. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNATION DE LA SOUCHE PCP-1

### 12.1 CONDITIONS DE CULTURE UTILISÉES

Les cinq expériences qui sont décrites dans les pages suivantes ont été réalisées dans des bouteilles sérologiques contenant un volume total de 25 ml de milieu de culture. Ces derniers étaient constitués de 21,1 ml de milieu minimal, de 0,15 ml de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , de 0,15 ml de la solution de vitamines (sans hémine et 1,4-naphtoquinone), de 0,5 ml de DEAE Séphacel (sauf contre indication, dans l'expérience sur l'effet de cette résine), de 0,1 ml d'une solution d'extrait de levure à 5% (concentration finale de 0,02%) et de 0,5 ml d'une solution de pyruvate de sodium 1 M (concentration finale de 20 mM).

Un volume de 2,5 ml (10%) d'une culture active a servi pour inoculer les bouteilles. Cette culture provenait d'une bouteille contenant la souche pure PCP-1 qui récemment avait déshalogéné une dose de 5 mg/l de PCP-Na. Les bouteilles étaient incubées dans l'obscurité à 29°C.

### 12.2 CINÉTIQUE DE DÉCHLORATION DU PCP

La cinétique de déshalogénéation du PCP par la souche PCP-1 consistait en un suivi, par HPLC, de chacun de ses intermédiaires chlorés retrouvés dans des échantillons prélevés après différents temps d'incubation. Le dosage des chlorophénols a eu lieu à toutes les 12 heures, du moment de l'injection du PCP-Na jusqu'à la 108ième heure. Une dernière lecture a été effectuée à 150 heures. L'expérience a été réalisée en triplicata. Un témoin négatif a été inoculé avec 2,5 ml d'une suspension bactérienne autoclavée de la souche PCP-1. Les culturesensemencées ont reçu une dose de 5 mg/l de PCP-Na 24 heures plus tard. Cette dose provenait d'une solution mère de 500 mg/l de PCP-Na. La concentration du PCP et des intermédiaires chlorés a été évaluée par HPLC et/ou GC-MS selon les méthodes déjà décrites.

### 12.3 EFFET DU DEAE SÉPHACEL SUR L'ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNATION

La nécessité des billes de DEAE Séphacel pour la déshalogénéation du PCP par la souche PCP-1 a été vérifiée. Dans cette expérience, trois variations du milieu de culture ont été utilisées. Les essais ont été réalisés en triplicata. Dans un premier groupe, le DEAE Séphacel (2% du volume liquide ou 1% du volume solide) a été remplacé par 1% (0,25 g) de sable de silice broyé ( $\text{SiO}_2$ , Fisher S-150). Dans un deuxième groupe, les billes de Séphacel ont été omises. Dans un troisième groupe, les billes et leur extrémité DEAE (diéthyl-amino-éthyle) ont été substitué par 0,25 ml de triéthyl-amino-éthyle (TEAE 0,01%) afin de mimer l'extrémité échangeuse d'ions. Les témoins positif et négatif (2,5 ml d'une suspension bactérienne autoclavée de la souche PCP-1) contenaient du DEAE Séphacel. Une dose de 5 mg/l de PCP-Na provenant d'une solution mère de 500 mg/l a été ajoutée 24 heures après l'ensemencement des cultures. L'analyse des chlorophénols a été effectuée par HPLC au moment de l'injection du PCP-Na et à la dixième journée d'incubation, selon la méthode déjà décrite.

#### 12.4 DOSE MAXIMALE DE PCP

La dose maximale de PCP pouvant être déchlorée par la souche PCP-1 a été étudiée. Différentes quantités de PCP-Na correspondant à des concentrations finales de 5, 10, 15, 20, 30 et 50 mg/l ont été ajoutées dans les bouteilles, en triplicata, 24 heures après l'inoculum. Les doses de 5, 10, 15 et 20 mg/l de PCP-Na ont été obtenues en utilisant une solution mère de 500 mg/l et les doses de 30 et 50 mg/l PCP-Na ont été obtenues en utilisant une solution mère de 5000 mg/l. Le témoin négatif inoculé par un volume de 2,5 ml d'une suspension bactérienne autoclavée de la souche PCP-1 a reçu une dose de 5 mg/l PCP-Na. L'analyse des chlorophénols a eu lieu au moment de l'injection du PCP-Na puis au dixième et vingtième jours d'incubation en sa présence, selon la méthode déjà décrite.

#### 12.5 SPECTRE D'ACTIVITÉ VIS-À-VIS DIFFÉRENTS CHLOROPHÉNOLS

Le spectre d'activité de la souche PCP-1 sur les chlorophénols a été évalué. Toutes ces molécules aromatiques chlorées, du PCP jusqu'au phénol ont été testées, sauf le 2,3,4,6-TeCP, non disponible. Ceci consiste en 19 molécules: le PCP-Na (témoin positif), 2 TeCP, les 6 TCP, les 6 DCP, les 3 MCP et le phénol. Trois bouteilles d'une culture de la souche PCP-1 ont dû être combinées afin d'obtenir le volume nécessaire pour inoculer toutes les bouteilles de ce test. La concentration initiale du PCP-Na et des TeCP dans les cultures étaient de 5 mg/l. La concentration initiale des TCP, DCP, MCP et du phénol étaient de 3 mg/l. Les chlorophénols étaient ajoutés 24 heures après l'ensemement des bouteilles à partir de solutions de 200 mg/l solubilisées dans de l'éthanol à 70%. Les produits de transformation de ces molécules ont tous été identifiés par chromatographie en phase liquide HPLC, selon les temps de rétention des pics et leur comparaison au standard correspondant. Le témoin négatif, inoculé par un volume de 2,5 ml d'une suspension bactérienne autoclavée de la souche PCP-1, a reçu une dose de 5 mg/l de PCP-Na. L'expérience qualitative s'est déroulée en duplicata, mais en deux temps différents de façon à faciliter le suivi de chacune des cultures. L'analyse des chlorophénols a eu lieu au moment de leur injection, à la première, deuxième, quatrième et huitième journée d'incubation en leur présence, selon la méthode déjà décrite.

L'expérience a été reprise avec le 2-MCP, le 4-MCP, le 2,3-DCP, le 2,5-DCP et le 3,4-DCP. Dans cinq cultures de la souche PCP-1, 3 mg/l de chacun de ces chlorophénols et 3 mg/l de PCP-Na ont été ajoutés 24 heures après l'ensemencement des bouteilles. Le PCP-Na a été ajouté afin de servir d'inducteur de la déshalogénéation.

## 12.6 VITESSE DE DÉSHALOGÉNATION

Une dose de 5 mg/l de PCP-Na a été ajouté à deux cultures de la souche PCP-1. La concentration de PCP a été évaluée par HPLC selon la méthode déjà décrite. Le dosage des chlorophénols a été effectué au moment de l'ajout du PCP et après 1, 2, 4, 6.5, 10.75, 13 et 15 heures d'incubation. La vitesse de déshalogénéation a été calculée lorsque la déshalogénéation du PCP suivait une relation linéaire. Une énumération bactérienne a été effectuée après 24 heures d'incubation.

### 12.6.1 Dosage des protéines.

Le dosage des protéines selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) a été utilisé afin de pouvoir exprimer la vitesse de déshalogénéation du PCP en mmole/h/g de protéines. Une courbe standard a été établie entre 0 et 150 mg/l avec de l'albumine sérique bovine (Sigma). Un volume de 1 ml a été prélevé de chacune des deux cultures de la souche PCP-1 et mis dans un tube Eppendoff. Les cultures ont été centrifugées à 14000 g pendant 5 minutes. Le surnageant a été éliminé et remplacé par 1 ml d'eau. Le culot bactérien et l'eau ont été vortexés et une seconde centrifugation à 14000 g pendant 5 minutes a été effectuée. Le surnageant a été éliminé et remplacé par 1 ml d'eau déionisé. Après homogénéisation, le dosage des protéines de la suspension bactérienne a été effectué. Deux contrôles ont été réalisés par le lavage de 1 ml du milieu de culture stérile (non-inoculé) selon la technique décrite. Ces opérations ont été nécessaires afin de laver les cellules de la souche PCP-1 du milieu de culture qui contient de l'extrait de levure. Celui-ci aurait pu fausser le résultat du dosage des protéines d'origine bactérienne.

# RÉSULTATS

## 1. ISOLEMENT

### 1.1 TRAITEMENT À LA CHALEUR ET ENRICHISSEMENTS

Un traitement à la chaleur de 30 minutes à 80°C a éliminé les espèces non-résistantes du consortium méthanogénique prélevé du bioréacteur R-4. Ces bactéries n'étaient pas nécessaires à la déchloration du PCP jusqu'au 3-MCP dans des bouteilles sérologiques puisque cette activité était retrouvée après ce traitement (section 8.4 de la revue bibliographique). Une stabilité a été obtenue dans les cultures et l'activité de déshalogénéation était maintenue lors des repiquages par l'ajout du DEAE Séphacel et de l'ajustement du pH à 7,65 avec du  $\text{NaHCO}_3$ .

### 1.2 COLONIES ISOLÉES ET TESTÉES EN MILIEU LIQUIDE

Près de 200 cultures provenant de colonies isolées, prélevées sur le milieu solide Columbia et remises en milieu liquide n'ont pas dégradé le PCP. Ces colonies appartenaient à quelques types de morphologie. Diverses conditions et différents milieux de culture liquide ont été essayés. Aucune des 77 colonies isolées n'a démontré la capacité de déshalogéner le PCP dans le milieu de culture contenant du glucose et du formiate de sodium. Il en est de même pour 15 autres colonies mises dans un milieu de culture contenant de l'extrait de levure. La déshalogénéation du PCP par ces 15 colonies a aussi été testée dans un milieu qui contenait du protéose peptone et un consortium méthanogénique capable de minéraliser le phénol. Aucune n'a démontré la capacité de transformer le PCP. Le même résultat a été obtenu pour 20 autres colonies testées dans un milieu de culture composé de lactate et de formiate de sodium. Dans 14 autres cas, les colonies évaluées dans un milieu contenant du lactate et du pyruvate de sodium ont également donné un résultat négatif. Dans le cas de 4 colonies incubées dans le milieu contenant du glucose, du formiate de sodium en plus d'un filtrat d'une culture enrichie en bouteille, aucune déshalogénéation n'a été observée. Le même résultat a été obtenu avec les 3 colonies incubées en présence d'un volume d'une culture enrichie autoclavée. L'extrait de levure seul n'a pas permis à 15 colonies de déchloration le PCP. Aucune déshalogénéation ne s'est produite lorsque le PCP a été ajouté dans 28 cultures contenant des colonies qui avaient été prélevées sur le milieu solide Columbia dans lequel se trouvait une

dose de 25 ou 50 mg/l de PCP-Na (plutôt que 3 mg/l PCP-Na et 3 mg/l 2,3,5-TCP). Le milieu de culture utilisé pour les essais de ces 28 colonies était constitué de glucose et de formiate de sodium.

### **1.3 ACTIVITÉ CONSERVÉE APRES PASSAGE SUR MILIEU SOLIDE**

Malgré les résultats du paragraphe précédent, la biomasse produite sur milieu solide Columbia après deux semaines d'incubation, récupérée et injectée dans une bouteille contenant le glucose et le formiate conservait parfois l'activité de déshalogénéation. Ceci a été vrai même pour certaines biomasses produites à partir des dilutions les plus élevées ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) et qui pouvaient être constituées d'aussi peu que 7 colonies présentant 2 à 4 morphologies différentes. Ces géloses servaient de témoin positif et toutes les colonies isolées, prélevées et testées individuellement dans les divers milieux de culture provenaient de leur duplicata ou triplicata.

### **1.4 ENRICHISSEMENT PAR DILUTIONS**

Le mélange des bactéries résistantes au traitement à la chaleur a été fortement enrichi par les séries de dilutions. Le prélèvement de la biomasse engendrée par l'ensemencement sur milieu solide des dilutions les plus élevées a éliminé les espèces bactériennes présentes en nombre moins important d'un facteur de 10. Les inocula les plus enrichis servant aux opérations subséquentes, ces séries de dilutions répétées ont séquentiellement fait baisser le nombre d'espèces bactériennes dans les bouteilles. Une culture fortement enrichie et qui représentait qu'un seul type de colonies bien isolées les unes des autres sur milieu solide, a ainsi été obtenue. Quatre colonies ont été prélevées séparément, resuspendues et injectées chacune dans deux bouteilles. La première était constitué du milieu de culture liquide normal, avec du glucose et du formiate de sodium. La seconde contenait ces éléments mais contenait aussi un supplément de 0,1% d'extrait de levure.

### **1.5 ISOLEMENT DE LA SOUCHE PCP-1**

Ces quatre colonies ont démontrée la capacité de déchlorer le PCP seulement dans les bouteilles qui contenaient l'extrait de levure. Aucune

activité de déshalogénéation n'a été détecté dans les autres bouteilles. L'une des souches a été réisolée par prélèvement d'une colonie unique sur milieu solide. Cette souche a été nommée PCP-1. La pureté de cette souche a été vérifiée par l'aspect des colonies sur milieu solide, par microscopie optique et électronique.

Il n'a pas été possible de conserver l'activité de déshalogénéation d'une culture contenant la souche PCP-1 lorsque celle-ci était repiquée dans du milieu de culture frais contenant l'extrait de levure. Le milieu de culture liquide permettant la croissance de cette souche a du être redéfini.

## 2. MILIEUX DE CULTURE

Dans un premier temps, la croissance de la souche PCP-1 a été évaluée dans cinq milieux de culture différents. Les résultats des différentes énumérations bactériennes effectuées au cours du temps (et non des lectures de la densité optique puisque les bouteilles ne devenaient pas troubles) sont présentés à la figure 6. Celle-ci montre que c'est seulement le milieu qui contenait le pyruvate de sodium (20 mM) qui a permis la croissance cellulaire. Un compte bactérien de  $6 \cdot 10^5$  ufc/ml a ainsi été obtenu après 30 heures d'incubation. L'extrait de levure seul, sans autre source de carbone complémentaire, n'était pas suffisant pour supporter la croissance de la souche PCP-1. Les comptes bactériens des cultures qui ne contenaient que ce substrat, après plus de 20 jours d'incubation, variaient de 200 à 5000 ufc/ml.

Dans un deuxième temps, une seconde série de milieux a été testée de manière à mieux définir celui qui allait permettre la croissance de la souche PCP-1 tout en conservant l'activité de déshalogénéation lors du repiquage des cultures. Les résultats de ces essais (figure 7) ont montré que l'hémine et la 1,4-naphtoquinone n'étaient pas nécessaire et qu'une concentration de 0,02% d'extrait de levure était suffisante à la croissance optimale de la bactérie. Cette croissance était toutefois faible puisqu'elle est passé de  $7 \cdot 10^4$  à  $2 \cdot 10^6$  ufc/ml après 6 jours d'incubation. Sans extrait de levure, la croissance a été diminué d'environ dix fois comparativement aux cultures qui en contenaient une dose de 0,02 ou 0,1%. Suite aux résultats des figures 6 et 7, le milieu de culture liquide permettant une certaine croissance de la souche PCP-1 était constitué des

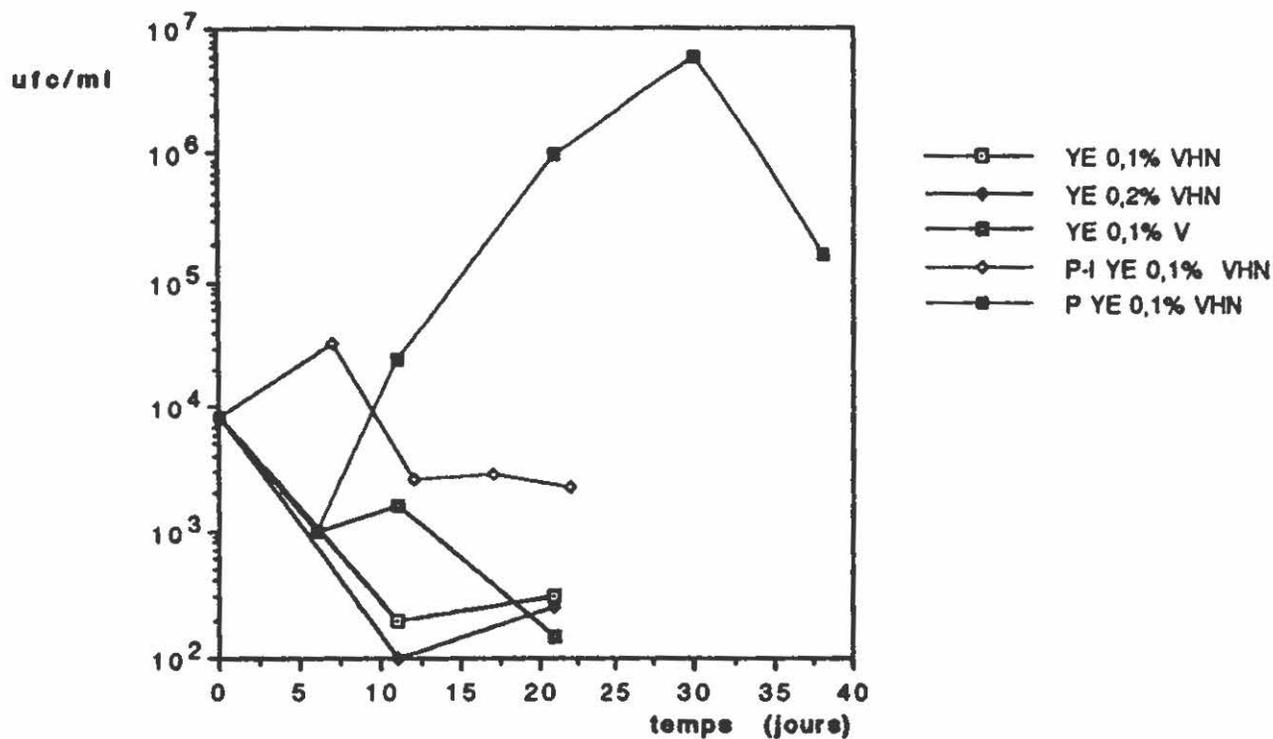
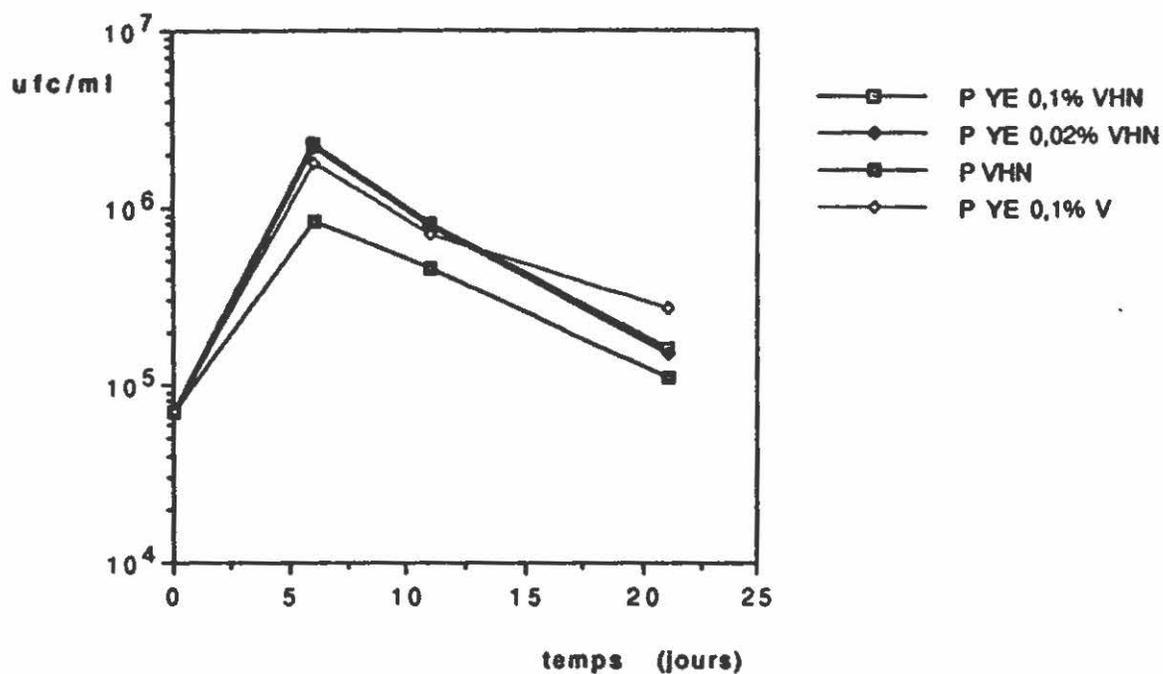


FIGURE 6: Croissance de la souche PCP-1 dans différents milieux nutritifs. YE extrait de levure; V vitamines; P pyruvate de sodium 20 mM; N 1,4-naphtoquinone 200 µg/l; H hémine 100 µg/l; P-I pré-incubation de 7 jours avant l'ajout du PCP contrairement à 24 heures dans les autres cas.



**FIGURE 7:** Effet de l'addition de différentes substances au pyruvate de sodium sur la croissance de la souche PCP-1.  
 P Pyruvate de sodium 20 mM; YE extrait de levure; V vitamines;  
 H hémine 100 µg/l; N 1,4-naphtoquinone 200 µg/l.

éléments suivants: milieu minimal, 0,05% d'une solution de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 2% (v/v) de DEAE Séphacel, 0,05% de la solution de vitamines, 20 mM de pyruvate de sodium et 0,02% d'extrait de levure.

## 2.1 TEMPS DE DIVISION CELLULAIRE

Le temps de division cellulaire de la souche PCP-1 a été évalué approximativement à 3,0 heures dans le milieu mentionné ci-haut qui contenait également 5 mg/l de PCP-Na. Cette valeur a été évaluée à partir du résultat d'énumérations bactériennes de trois cultures. Ces énumérations ont été réalisées en duplicata à partir du moment de l'ensemencement des cultures jusqu'à la vingt-quatrième heures d'incubation.

## 3. CONSERVATION DE LA SOUCHE PCP-1

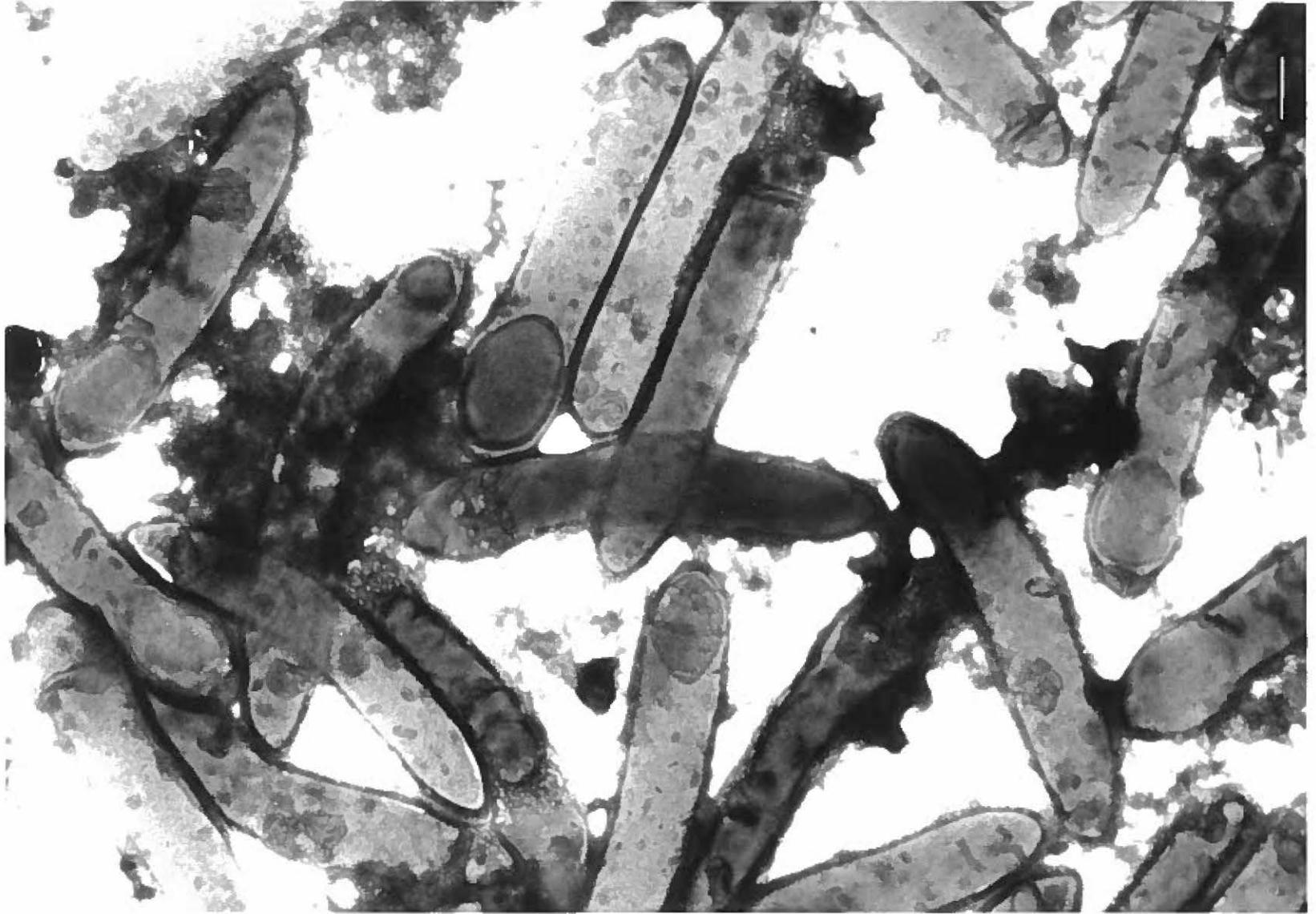
Des bouteilles ont été inoculées à partir d'une préparation bactérienne de la souche PCP-1 qui avait été lyophilisée. Ces cultures ont déchloré le PCP jusqu'au 3-MCP. La lyophilisation a donc conservé la viabilité des cellules de la souche PCP-1, de même que son activité de déshalogénéation.

## 4. CARACTÉRISTIQUES MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES

Les colonies de la souche PCP-1 formées à partir des bactéries étalées sur le milieu solide Columbia apparaissent après quatre jours d'incubation à 29°C dans la chambre anaérobie. Voici les caractéristiques macroscopiques des colonies de cette souche après 14 jours d'incubation: elles sont de couleur blanche et ont un diamètre de 2,5 mm, sont de forme ronde et présente une surface mate, avec un contour dentelé et un relief ombiliqué.

Les examens au microscope électronique de la souche PCP-1 (figures 8 et 9) montrent que cette bactérie est en forme de bâtonnet non-flagellé ayant une largeur de 0,7  $\mu\text{m}$  et d'une longueur variant de 2,2 à 4,5  $\mu\text{m}$ . L'absence d'une membrane externe suggère que cette bactérie serait de type Gram positif. La

**FIGURE 8: Bactéries de la souche PCP-1 observées au microscope électronique après coloration négative. Les structures ovales à l'extrémité de certaines bactéries sont des spores. Barre = 0,5  $\mu$ m. Grossissement: 21000x.**



**FIGURE 9: Bactérie de la souche PCP-1 montrant la présence d'une spore observée au microscope électronique après coloration négative.**  
Barre = 0,5  $\mu\text{m}$ . Grossissement: 21000x.



présence de spores, terminales et déformantes, est notée chez plusieurs spécimens.

#### 4.1 RÉACTION À LA COLORATION GRAM

La réaction à la coloration Gram de la souche PCP-1 est négative, peu importe l'âge ou la phase de croissance des cultures.

### 5. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE

Le système de caractérisation biochimique rapide API 20E a été réalisé à trois reprises sur différentes cultures prélevées sur milieu solide. Les réactions colorimétriques ont indiqué que la souche PCP-1 était asaccharolytique puisqu'elle n'a métabolisé aucun des 16 sucres contenus dans les différentes galeries, incluant entre autres le glucose, le mannose, la lactose et le xylose (tableau III). L'hydrolyse du tryptophane qui produit de l'indole a été la seule réaction positive lors des trois tests. Il est toutefois difficile de conclure si la bactérie produit des enzymes de type catalase. Ce test consiste à vérifier s'il y a libération de bulles d'oxygène 30 minutes après avoir ajouté du peroxyde d'hydrogène dans une cupule. Ceci semble avoir été le cas, mais à un taux très faible, dans deux cas sur trois. L'identification de la souche PCP-1 par ce test n'a pas été possible puisque le code numérique obtenu à partir des réactions colorimétriques ne correspondait avec celui d'aucune souche inventoriée dans les fiches API.

### 6. IDENTIFICATION BACTÉRIENNE

Le gène codant pour la sous-unité 16S ribosomale de la souche PCP-1 est d'une longueur de 1654 nucléotides. La comparaison de cette séquence avec celles contenues dans les banques de données n'a pas permis d'associer une espèce bactérienne à la souche PCP-1. Cette séquence s'est avérée homologue à 95% à celle de la bactérie *Desulfitobacterium dehalogenans*. Ce taux d'homologie est suffisant pour affirmer que la souche PCP-1 appartient à ce genre.

**TABLEAU III: Résultats des tests biochimiques du système API 20E réalisés sur la souche PCP-1.**

Test biochimique	Résultat
Indole	+
Urée	-
Glucose	-
Mannitol	-
Lactose	-
Saccharose	-
Maltose	-
Salicin	-
Xylose	-
Arabinose	-
Glycérol	-
Cellobiose	-
Mannose	-
Melezitose	-
Raffinose	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Tréhalose	-
Gélatine	-
Esculine	-
Catalase	+/-

Les séquences des deux gènes 16S rRNA sont indiquées à la figure 10. La principale différence entre les deux consiste en deux insertions (près de 100 nucléotides en tout) chez la souche PCP-1, au début du gène. Ces deux régions ne sont pas retrouvées chez *D. dehalogenans*.

La figure 11 illustre un arbre phylogénétique comprenant entre autres les espèces *D. dehalogenans* et la souche PCP-1. Elles font partie du groupe des espèces Gram positif à bas contenu en guanine et cytosine.

## 7. DÉSHALOGÉNATION

### 7.1 VOIE DE DÉCHLORATION

La souche PCP-1 est capable d'éliminer les chlores du PCP jusqu'au 3-MCP en passant par le 2,3,4,5-TeCP, le 3,4,5-TCP et le 3,5-DCP (figure 12). L'identité de l'intermédiaire trichloré a été confirmé par GC-MS. Les résultats des chromatogrammes et fragmentogrammes ainsi obtenus sont illustrés à la figure 13. L'identité des autres intermédiaires a été déterminée par HPLC. La figure 12 fait aussi voir la déchloration du 2,3,4,6-TeCP. Celui-ci est un contaminant retrouvé dans les solutions de PCP-Na. Ce contaminant serait déchloré en 3,4-DCP via le 2,4,5-TCP. Ce dernier produit a été détecté mais n'a pu être quantifié, l'aire sous la courbe de son pic se retrouvant en partie dans celui du 3,4,5-TCP. La concentration initiale du 2,3,4,6-TeCP n'a pu être déterminée, son standard n'étant pas disponible sur le marché. Le 3-MCP et le 3,4-DCP se sont accumulés dans les bouteilles et sont des produits finaux de biotransformation dans les conditions de culture utilisée .

### 7.2 CINÉTIQUE DE DÉCHLORATION

La déchloration du PCP par la souche PCP-1 en fonction du temps est présentée à la figure 14. Les premiers chlores éliminés sont ceux situés en position *ortho*. Ils sont rapidement éliminés puisqu'au premier dosage, effectué après 12 heures d'incubation, le PCP est complètement transformé en 3,4,5-TCP. Par la suite, il y a une latence d'environ 36 heures avant que les chlores des positions *para* et *méta* soient subséquentement éliminés. Le 3,5-DCP apparaît

```

PCP1      ....AGAOTTTGATCCCTCCCTCAAGACGAACTCCCTCCCTCCCTCA
De. deb.  atggagagtcttgatcctggctcaggagcgaacgctggcggcgtgctt
44 ACACATOCAAAGTCGAACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
51 acacatgcaagtgcgaacgg.....
94 AGATAAAGTGGATGACACCGAAGAACCCCGAAGAAATGAAACCCCTCCACACATTC
70 .....agaactc
144 AATAAAGTCTCAACACAGCTTCTCGAACTCCCTCCCTCAAGTCTTTAGATCTCCGATAG
77 aataagctt.....aaytagacattacttag
194 TCCCGGACCGGTCGAGTAACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
103 cggcggacgggtgagtacgcgctggatccctacccaatagacgggaca
244 ACCCTTCGAAACGAACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
153 accctcggaaacgggctaatccgnaatagcttccccatggcatcat
294 TGATTAAGAAAGATCCCTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
203 ggmat aaggaaagatggcctctgaayatgctatcgttaatggatggatcc
344 CCCTTCGAAACGAACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
353 gcyctcgtatagctagtgggggggtaaggccatcccaaggcgcgataca
394 GTAACCCGCTCGAAGCGGTCGAACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
403 gtacgcggcctgaggggtaacggccacactgggactgagacacggccc
444 AGACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
453 agnctcctacgggaggcagcagtggggaatctccgcaatggcgaagt
494 CTGACCGAAGCAACCCCTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
603 ctgacgggacacgcgcgctgtacgacgaaggcctcgggtgt aaagt
544 CTCTCTTCAGGACGAACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
653 ctgtcttcagggaacacggcaggtatgaaatattgacttgcatac
594 GTAACCTGAGGAGGAACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
603 gtaacctgaggaggaaagcccggctaacctcgtgcagcagcggcgtaat
644 ACGTACCGGACGAACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
653 aogt aggggnnaagcgttgtccgnaatcattgggctaaaggcggcgtag
694 CCGGATACCTAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
703 gggatgat aagtctgggtgaaacactaggctcaacctgggnetgc
744 ATCCGAAACTCGGATCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
653 atcggaaactggcttatcttgaggacgggaggyaagtggaattccatgt
794 GTAACCGGACGAACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
703 gtacgcggtaaatgctgatatgt.ggaggacacactggcgaaggcg
844 ACTTCTCGACTCTAACTGACCTCGAAGCCCGAAGCCCTCCCTCCCTCA
753 acttctcggactgt aactgacgctgggcgcgaaagcgtggggagcaaac
894 ACGATTAGATACCTCGTATGCACTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
902 agyatlngatnccctggngtccacgcccannaacgatgagtgctaggtgt
944 AGAAGGATACGACCCCTTCTTCCCTCCCTCAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
952 agagggtatcgacccctctgtgcgcagttacmcactnagcactccgc
994 CTCCCGGATACCGCCCGAAGTCTTAAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
902 cggggagtcggcggcgaaggttgaaactcaaggaaatgacggggggccc
1044 GCACAAAGCGGTCGACATGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
952 gcacaagcgggtggagcatgtgggttcaatcgannaaacgcggaagacctt
1094 ACCAAGCGTTCGACATGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1002 accaaggttgacatccatagaatcccgtaagcaatgggngtgccttcc
1144 GCGAAGCTATGACGACGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1052 ggggagctatgagacaggtgggtgcatggttgtcgtcagctcgttctgtga
1192 GATGATGATGATGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1102 gatgtgggttaagtcccgcaacgagcgaacccctatgtttagttgca
1242 ACCGATGATGATGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1152 gcaagtcaagttgggcaactctagacagactgcgggtgacaaacggaggga
1292 ACGTCCGATGACGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1202 aggtggggtgagctcaatcaatcagcccttatgtcttgggctaccc
1342 CCGTACGATGATGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1252 cgtgctacaatggccagtaacgacgggagcgaagcgggtgaggtgggca
1392 ATCCGAAAGCTGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1402 ttccgggcaatgtacacacgcgcctcacaccacyaagctctgcaaac
1442 TGAAGTCCGATGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1352 tgaagtgggaatcgtcgtcaatcgcaggtcagcatactgggtgaaacg
1492 TTCCCGGCTTATGACGACCGCCCTTCAACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1402 ttccgggcaatgtacacacgcgcctcacaccacyaagctctgcaaac
1542 CCGAAGCGGTCGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1452 ccgaagcgggtgaggtaacctttgggagctagccgtogaaaggtggggc
1592 CGATGATGATGATGATGATTTAATTCGACCGAAGTCTTTAAAGAGC
1502 cgtgattggg.....

```

FIGURE 10: Comparaison des séquences du gène 16S rRNA de la souche PCP-1 (1654 nt) et *Desulfitobacterium dehalogenans* (1513 nt).

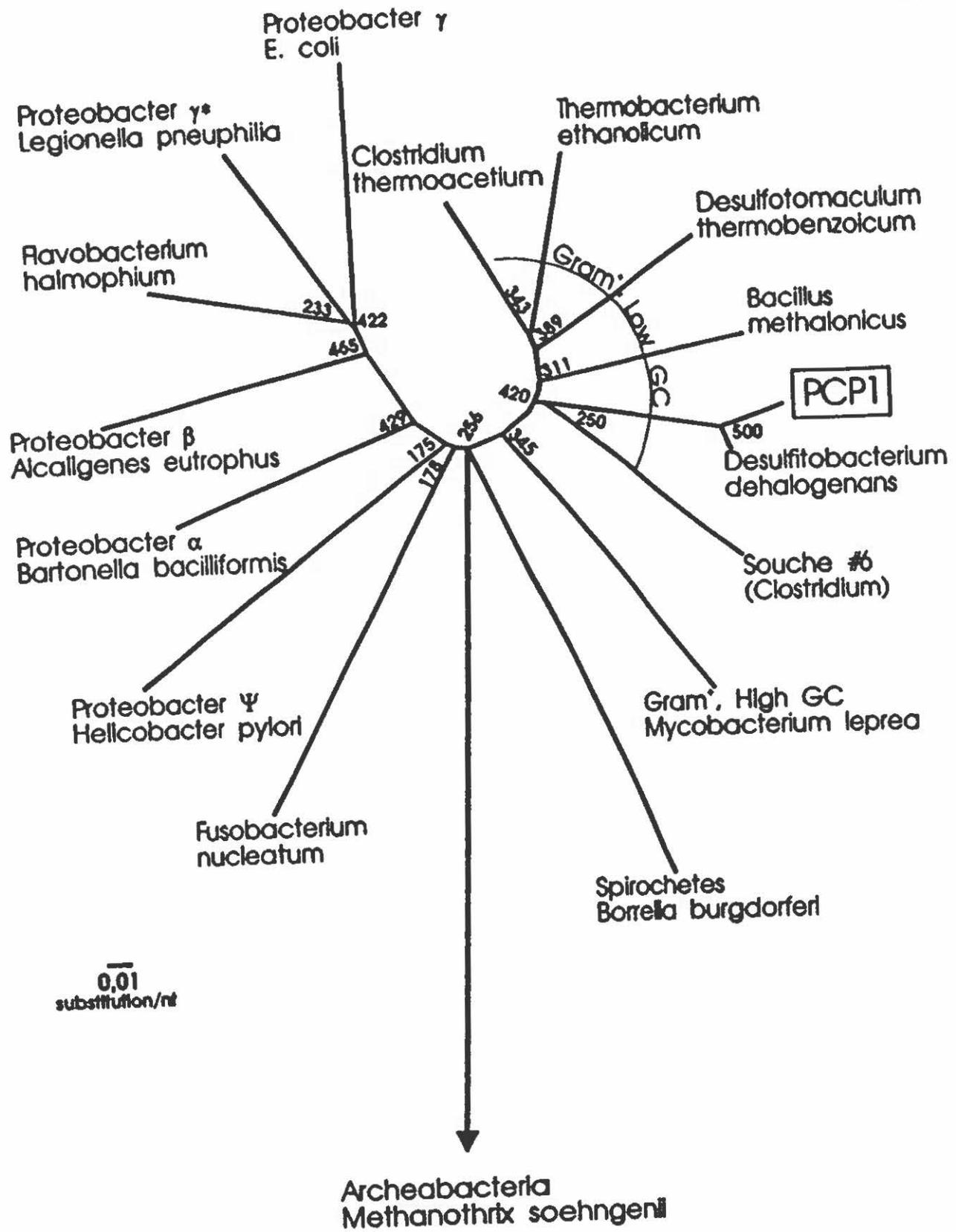


FIGURE 11: Arbre phylogénétique de la souche PCP-1.

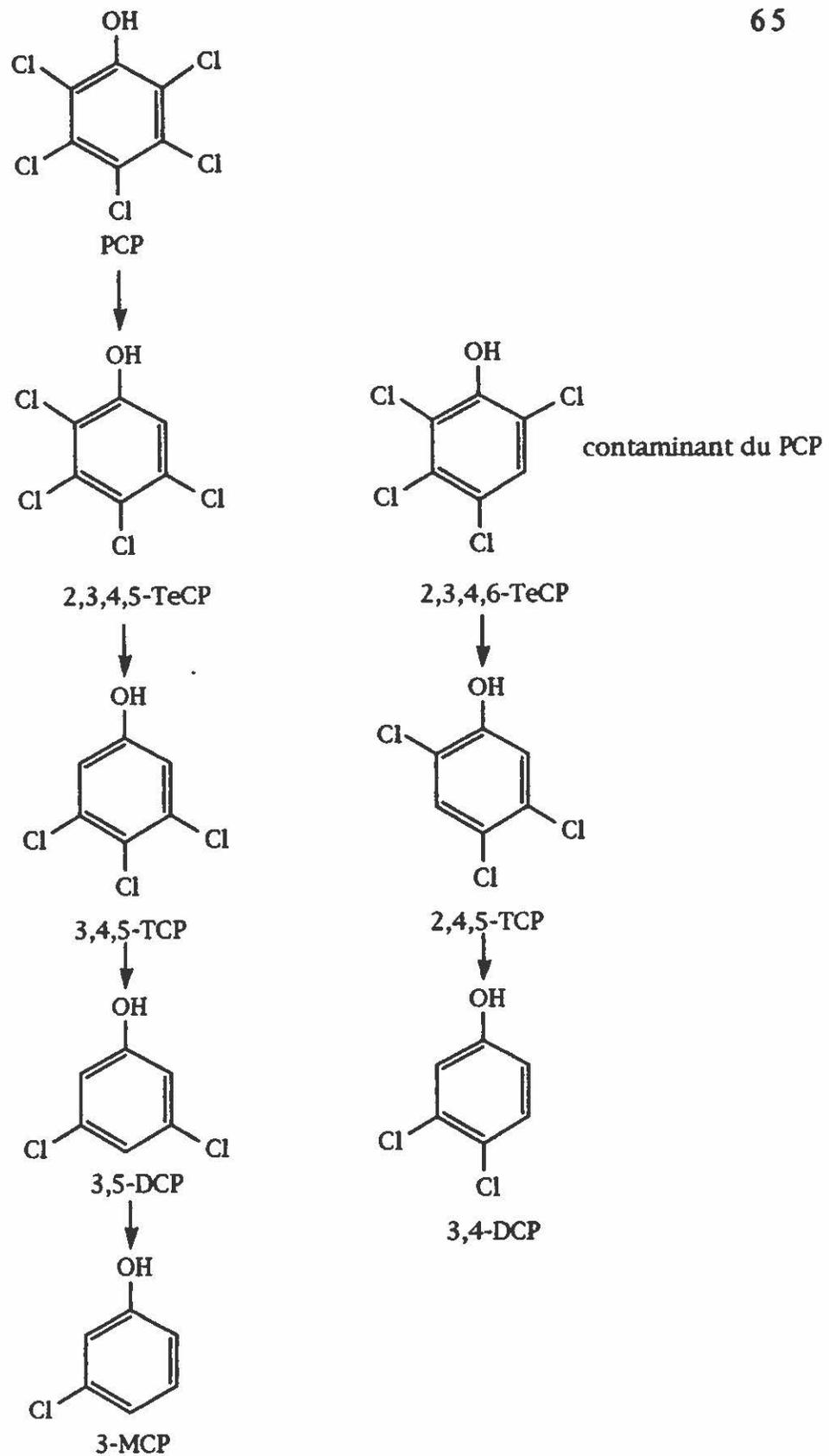


FIGURE 12: Voie biochimique de la déchloration du PCP par la souche PCP-1.

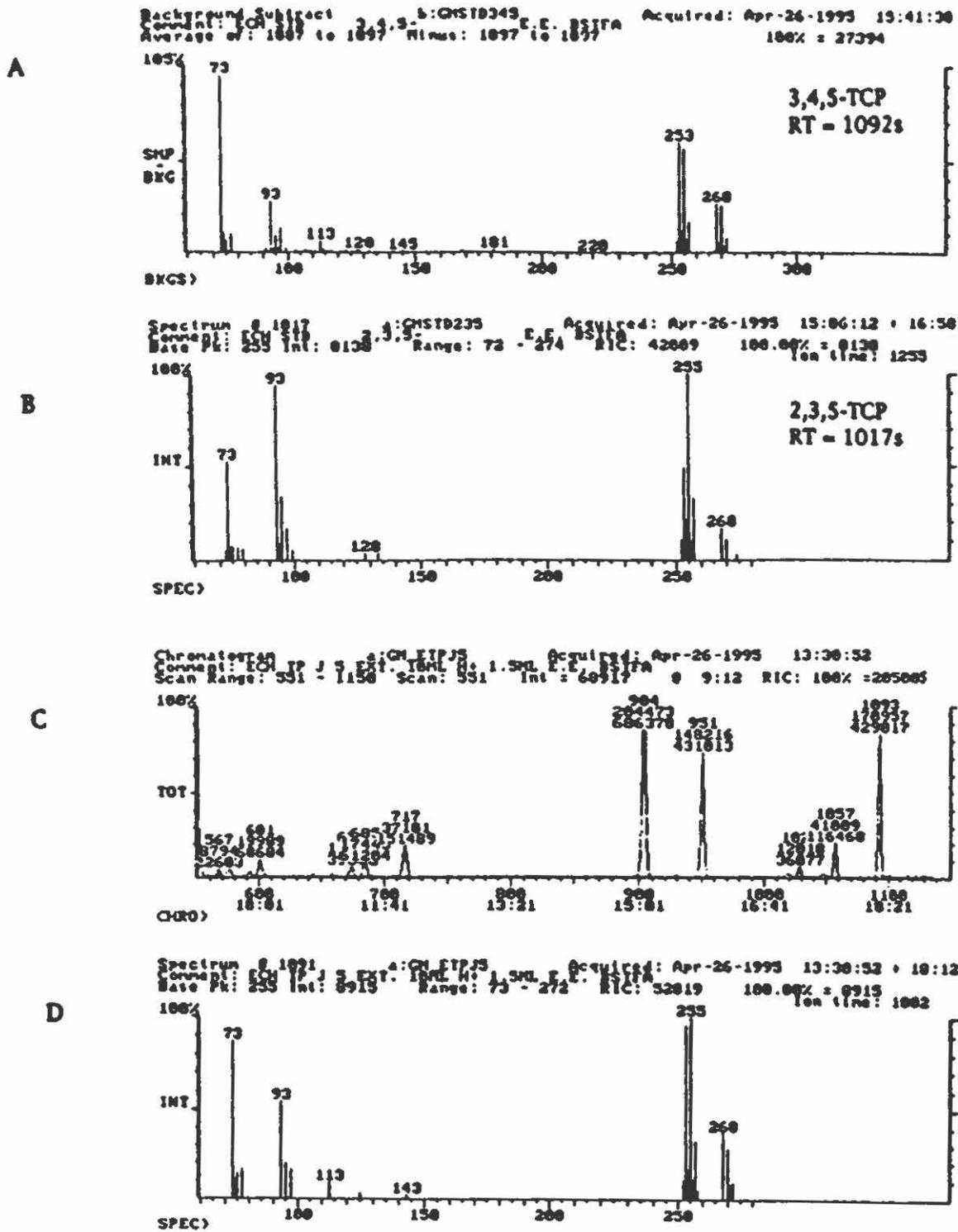


FIGURE 13: Identification de l'intermédiaire trichloré dans la voie de déchloration du PCP par la souche PCP-1 tel que déterminé par GC-MS. A. Fragmentogramme du standard 3,4,5-TCP; B. Fragmentogramme du standard 2,3,5-TCP; C. Chromatographe d'une culture active après cinq jours d'incubation; D. Fragmentogramme du pic visible à 1093s en C.  
 TR: temps de rétention.

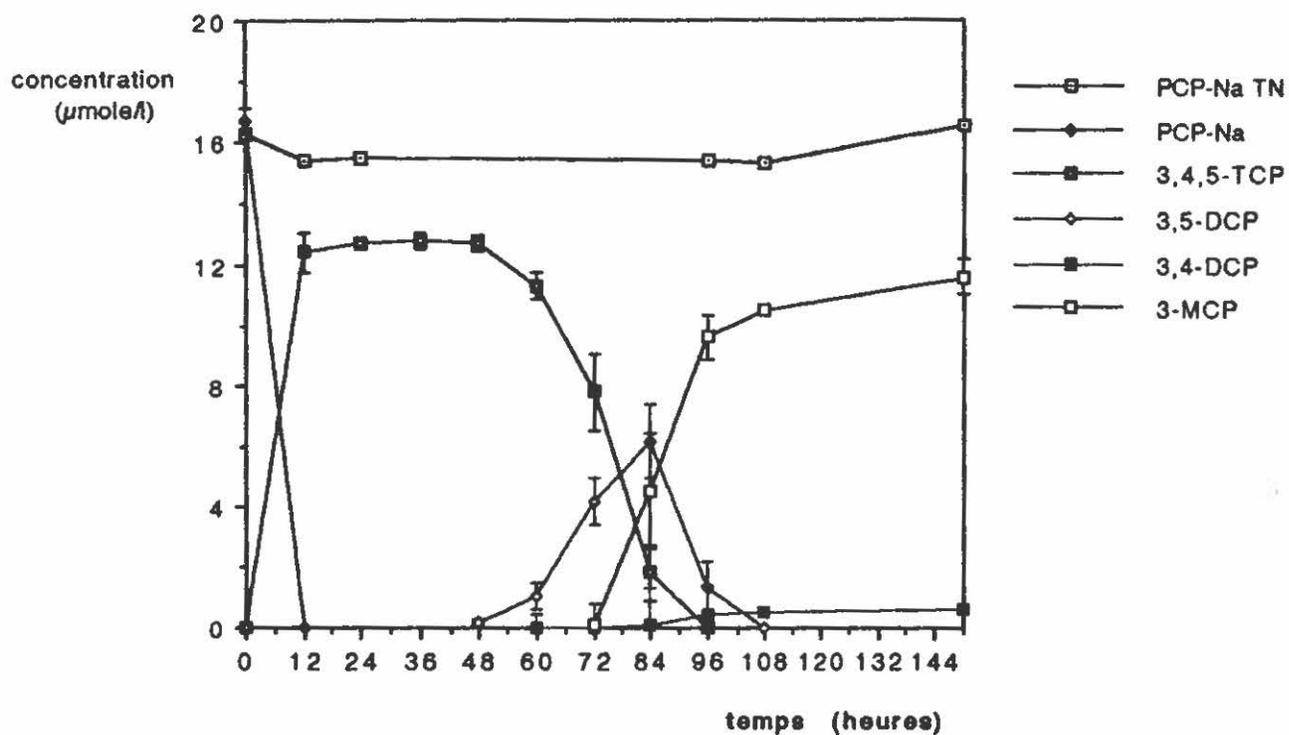


FIGURE 14: Cinétique de déchloration du PCP par la souche PCP-1 (n=3).  
TN=témoin négatif (n=1)

après 48 heures, suivi du 3-MCP, 24 heures plus tard. À la fin du processus, après une incubation de 108 heures, seulement le 3-MCP est détecté, en plus du 3,4-DCP représentant 5% des chlorophénols. Le témoin négatif n'a pas dégradé le PCP durant cette période puisque la concentration initiale est retrouvée après 150 heures d'incubation.

Une partie de cette expérience a été reprise dans le but de calculer la vitesse de déshalogénéation du PCP. L'élimination du PCP a été vérifiée fréquemment jusqu'à la 15<sup>ième</sup> heure après l'ajout de la dose de PCP. Dans cette expérience, il y a eu une période d'environ 8 heures durant laquelle le PCP n'a pas été éliminé. Par la suite, le PCP a été déshalogéné à un taux de 2,9  $\mu\text{mole/h}$ . Le dosage des protéines effectuée à la 12<sup>ième</sup> heure n'a donné aucun résultat valable puisque les contrôles non-inoculés indiquaient une quantité de protéines semblable aux cultures de la souche PCP-1. L'énumération bactérienne effectuée après 24 heures d'incubation indiquait une population de  $6 \cdot 10^5$  ufc/ml. La vitesse de déshalogénéation a été déterminé à partir de ce compte et est de 4,8  $\mu\text{moles/h}/10^6$  ufc/ml.

### 7.3. EFFET DES BILLES DE DEAE SÉPHACEL

L'effet de la présence de DEAE Séphacel sur l'activité de déchloration du PCP est présenté à la figure 15. Dans cette expérience, seul le témoin positif (contenant le DEAE Séphacel) a déshalogéné le PCP jusqu'au 3-MCP. Aucune activité significative n'a été observée dans les trois bouteilles où le DEAE Séphacel avaient été omis. Dans celles-ci, 89% de la concentration initiale de PCP était retrouvé après 10 jours d'incubation et 3% se retrouvait sous la forme 2,3,4,5-TeCP. Le même résultat a été obtenu dans les bouteilles où le sable de silice avait remplacé le DEAE Séphacel. Le dosage des chlorophénols a dévoilé une réduction de 11% du PCP, celui-ci étant transformé à 3% en 2,3,4,5-TeCP et 3% en 3,4,5-TCP. Le TEAE, qui substituait l'extrémité DEAE des billes de Séphacel, n'a pas permis de les remplacer puisque 96% du PCP était toujours présent après l'incubation. Les billes de DEAE Séphacel apparaissent donc nécessaire à la déchloration du PCP par la souche PCP-1.

#### 7.4 DOSE MAXIMALE

Les résultats concernant l'effet de doses élevées de PCP sur l'activité de déchloration de la souche PCP-1 sont montrés à la figure 16. Ces résultats font suite à un dosage des chlorophénols après 10 jours d'incubation. Aucune activité significative de déchloration n'a été notée après ce moment, ce qui a été vérifié par le dosage des chlorophénols réalisé au vingtième jour. La dose maximale de PCP-Na ayant été déchlorée jusqu'au 3-MCP par la souche PCP-1 a été de 10 mg/l de PCP-Na. À 15 mg/l, le PCP a été entièrement transformé en 3,4,5-TCP. Le 2,4,5-TCP (8%) a aussi été quantifié dans ces bouteilles et la déchloration ne s'est pas poursuivie jusqu'au 3-MCP. Lorsqu'une dose de 20 mg/l a été ajoutée, 87% du PCP a été éliminé. Celui-ci a été transformé principalement en 2,3,4,5-TeCP (51%) et à moindre taux (26%) en 3,4,5-TCP. À cette dose, les valeurs ne sont pas une moyenne d'un triplicata puisque deux bouteilles sur trois ont dû être écartées (elles n'avaient pas reçu la bonne quantité de PCP-Na initialement et n'ont pu être reprises puisque l'inoculum aurait été différent). Les cultures qui avaient reçu une dose de 30 mg/l de PCP-Na ont démontré une diminution de 24% de celui-ci, mais il n'avait perdu qu'un seul chlore et la déchloration a été stoppé au niveau du 2,3,4,5-TeCP. À une dose élevée de 50 mg/l de PCP-Na, 95% de la concentration initiale a été retrouvée au dixième jour et aucun intermédiaire chloré n'a été détecté.

#### 7.5 SPECTRE D'ACTIVITÉ

La déshalogénéation du phénol et de 17 chlorophénols par la souche PCP-1 a été étudiée. Les résultats de la transformation de certains chlorophénols sont présentés aux figures 17 à 19. Les substances étudiées n'ayant montré aucune transformation par la souche PCP-1 sont résumées à la figure 20.

Dans la majorité des cas, les chlores en position *ortho* ont été éliminés tandis que l'activité est plutôt limitée en ce qui concerne les chlores des positions *méta* et *para*. Les chlores en positions *ortho* des molécules suivantes n'ont pu être retirés: 2,3,5-TCP, 2,3-DCP, 2,5-DCP et 2-MCP. Le seul chlore de la position *para* ayant pu être éliminé est celui du 3,4,5-TCP. Un des deux chlores en position *méta* du 2,3,5-TCP et du 3,5-DCP a été enlevé. La bactérie n'a

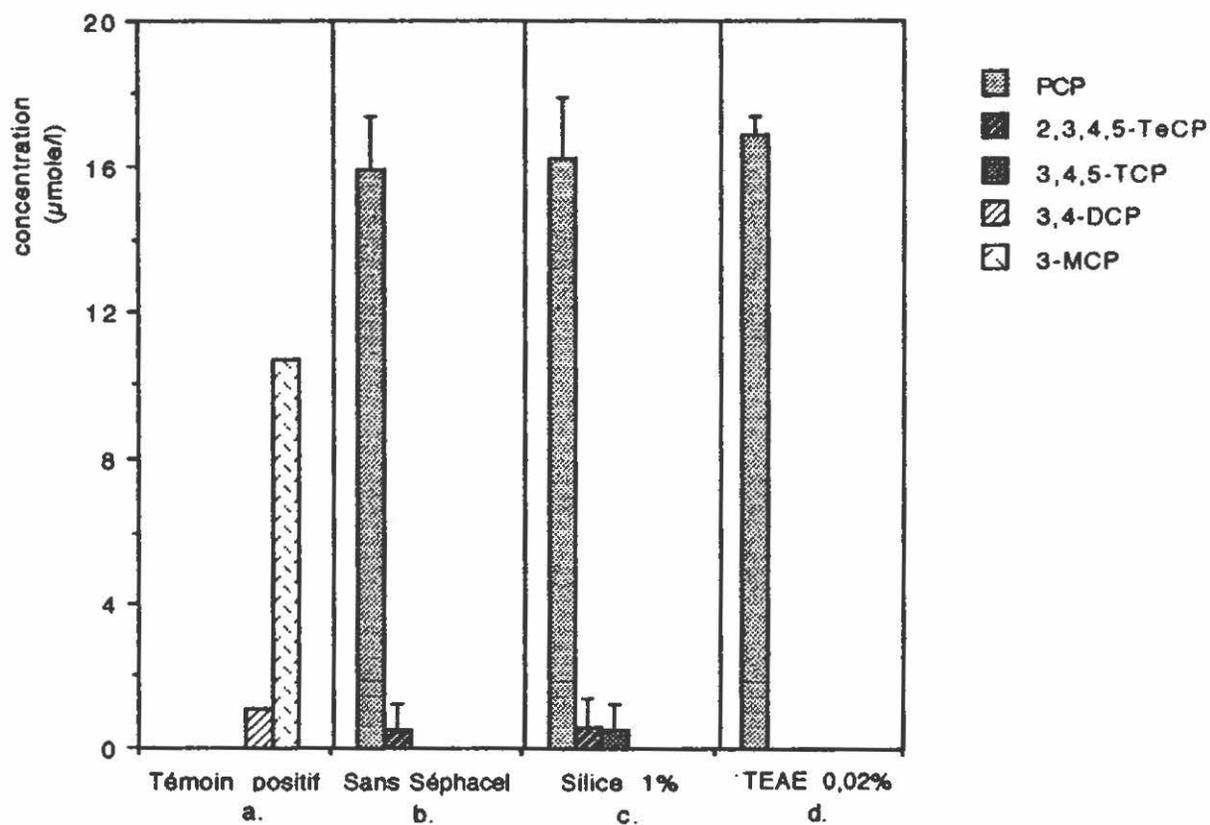


FIGURE 15: Effet des billes de DEAE Séphacel sur la déchloration du PCP par la souche PCP-1 après 10 jours d'incubation. a. témoin positif (n=1); b. les billes ont été omises (n=3); c. 1% de sable de silice a substitué les billes (n=3); d. 0,02% de TEAE a substitué les billes (n=3)

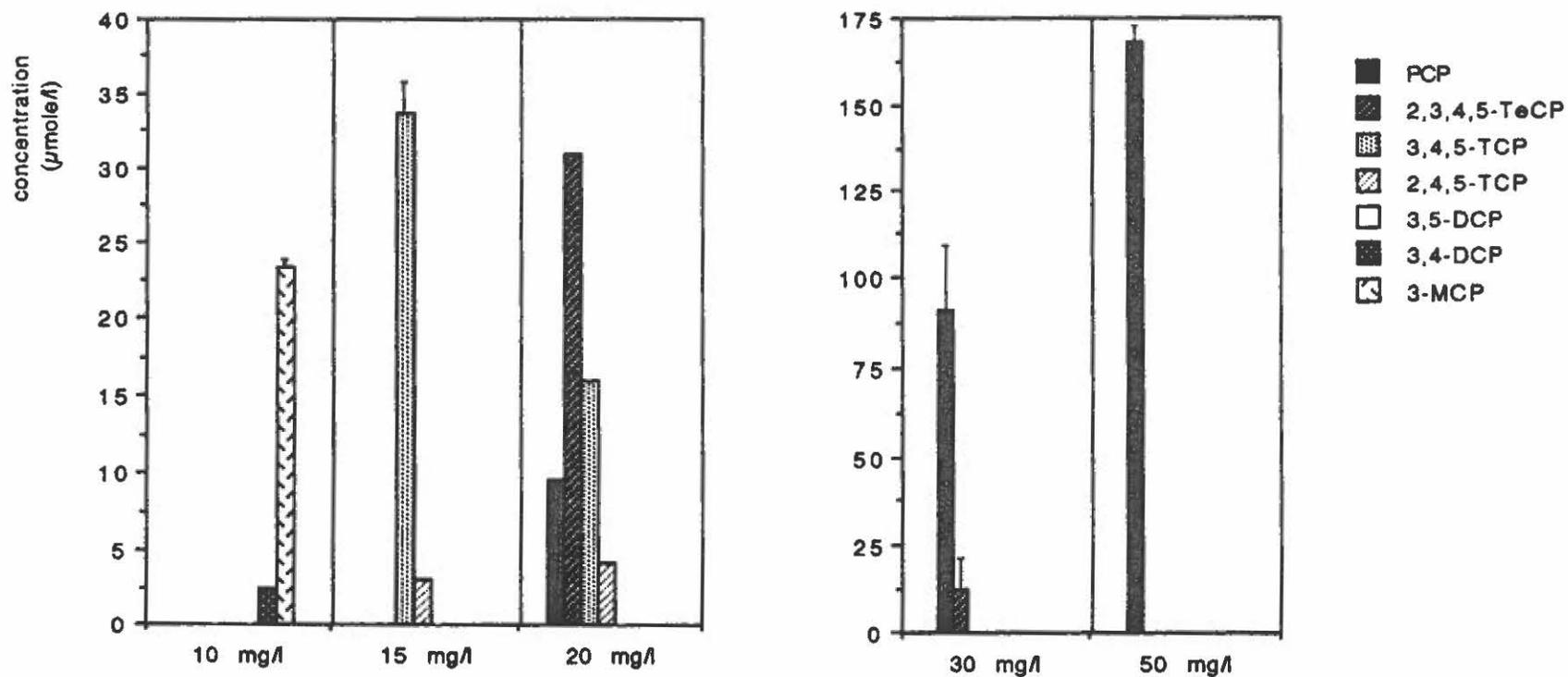
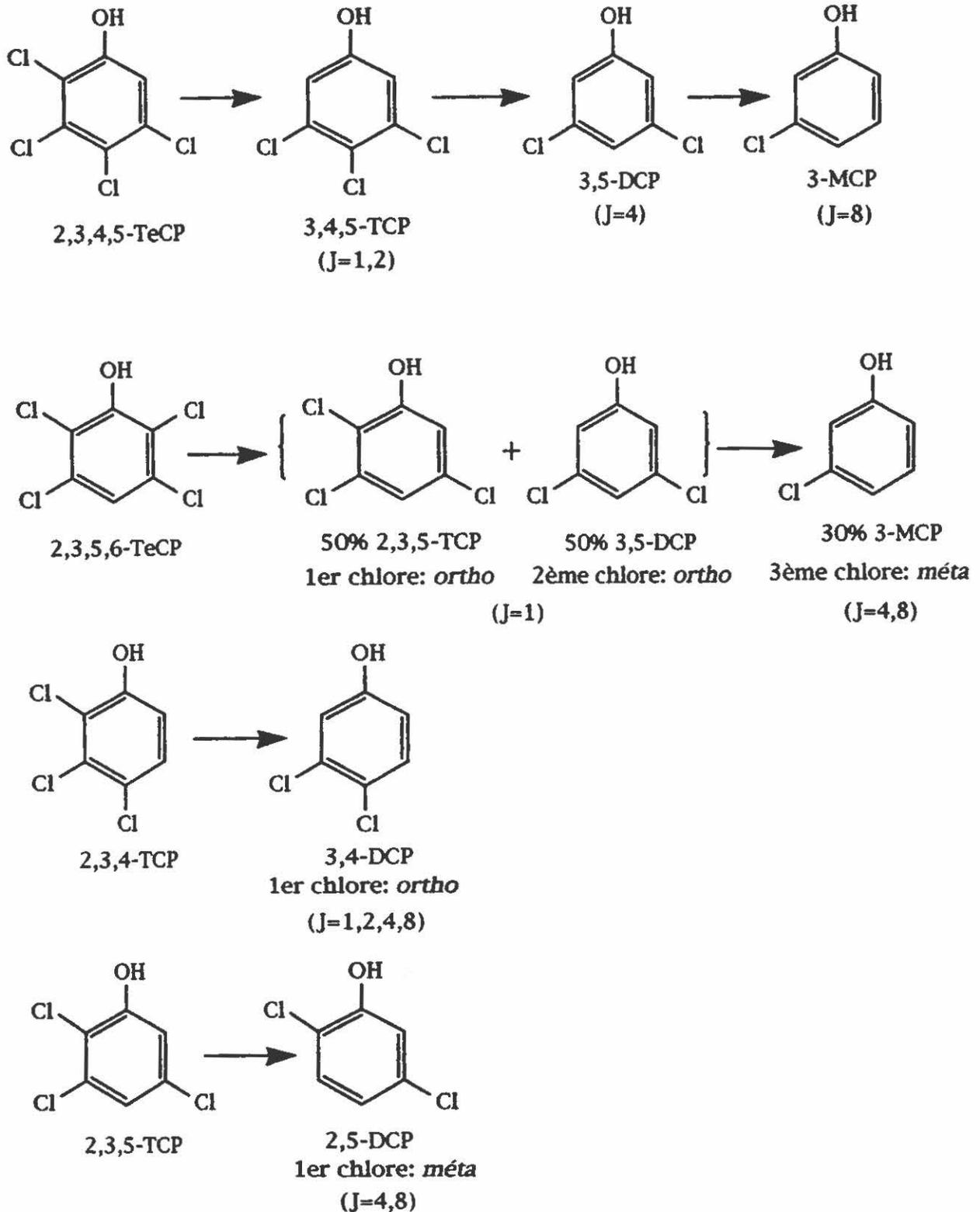


FIGURE 16: Déchloration de différentes doses de PCP par la souche PCP-1 après 10 jours d'incubation (n=3 sauf à 20 mg/l où n=1)

démontré aucune activité envers les trois monochlorophénols, le 2,3-DCP, le 2,5-DCP et le 3,4-DCP. De plus, elle n'est pas capable de transformer le phénol. Même si cette expérience a été réalisée qualitativement et non quantitativement, les chromatogrammes ont indiqué que les chlorophénols transformés l'ont tous été à près de 100%, sauf une exception. Il s'agit du 2,4,5-TCP qui, dans les conditions utilisées, n'a été qu'en partie déchloré en 3,4-DCP.

Le 2-MCP, le 4-MCP le 2,3-DCP, le 2,5-DCP et le 3,4-DCP n'ont pas été déchlorés par la souche PCP-1 lorsque l'activité de déshalogénéation dans ces cultures était induite par le PCP.



**FIGURE 17:** Activité de déchloration du 2,3,4,5-TeCP, du 2,3,5,6-TeCP, du 2,3,4-TCP et du 2,3,5-TCP par la souche PCP-1. Les valeurs entre parenthèses indiquent la journée (après incubation) où ces substances ont été détectées.

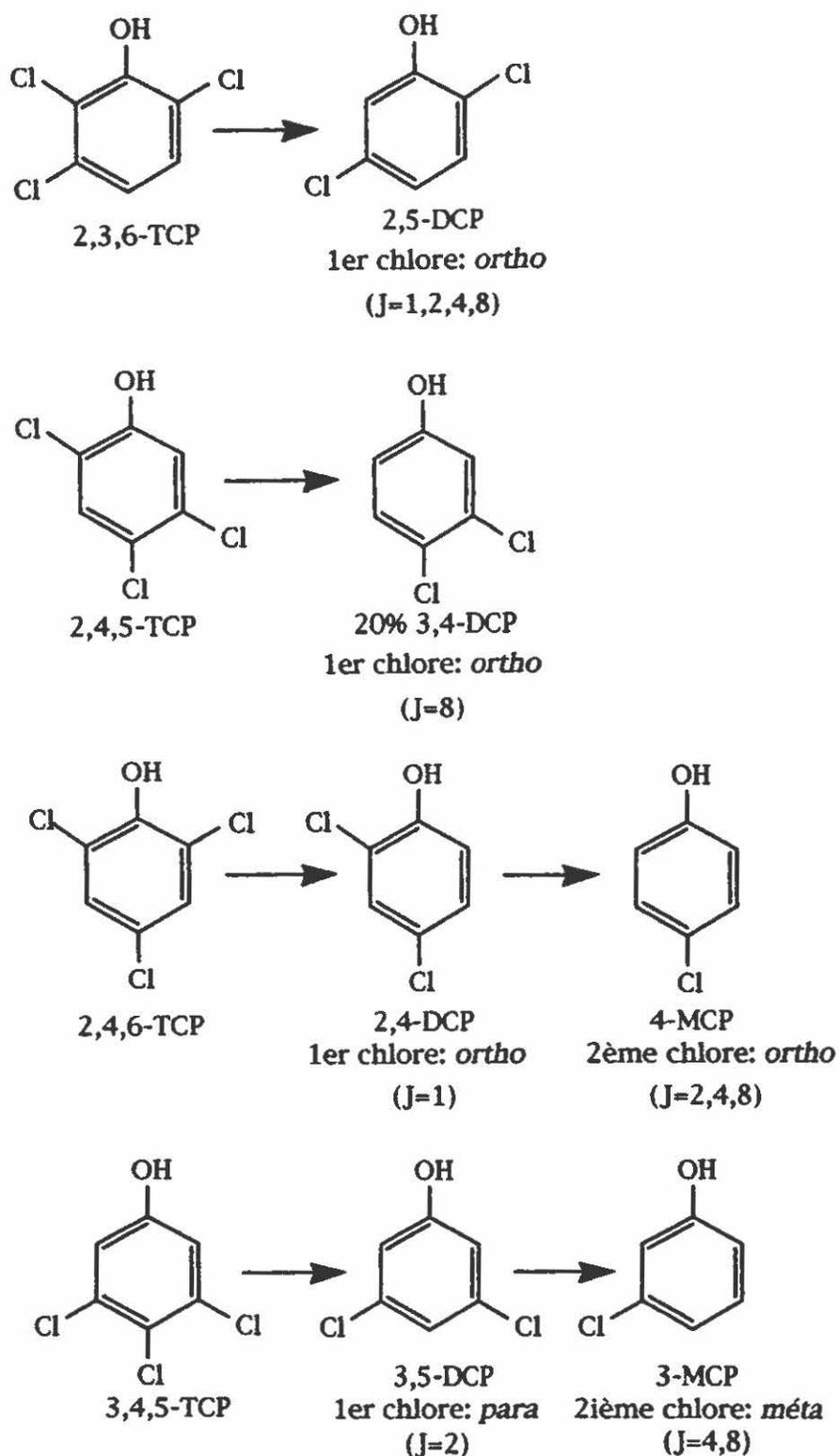
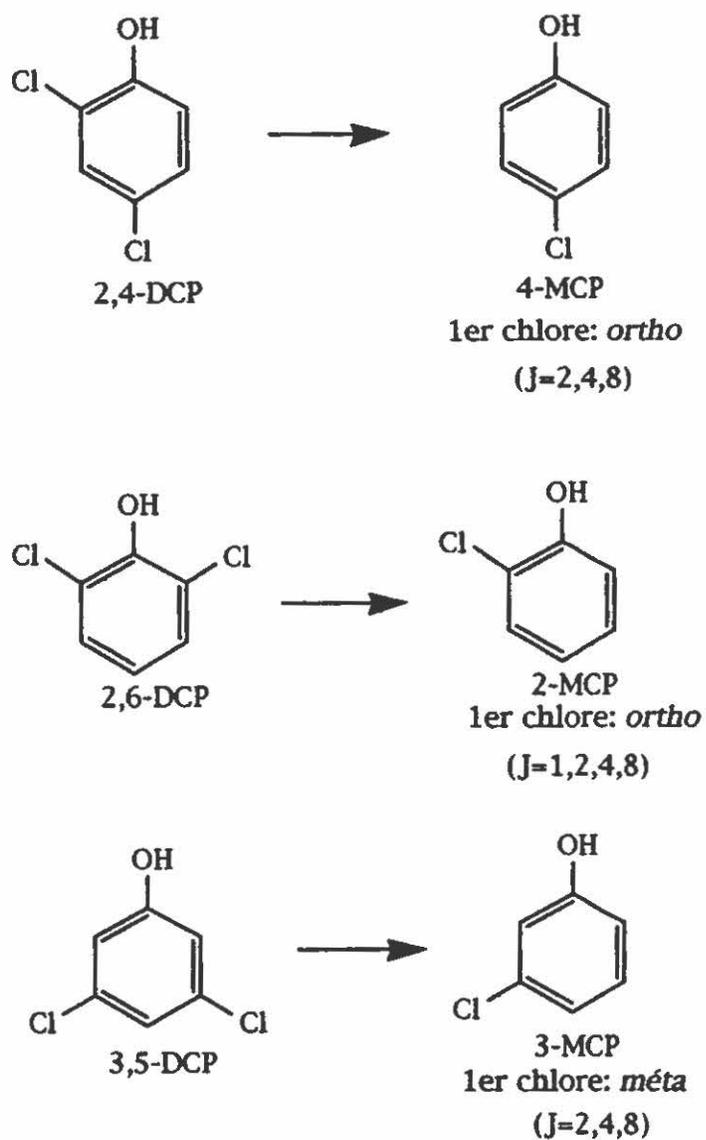
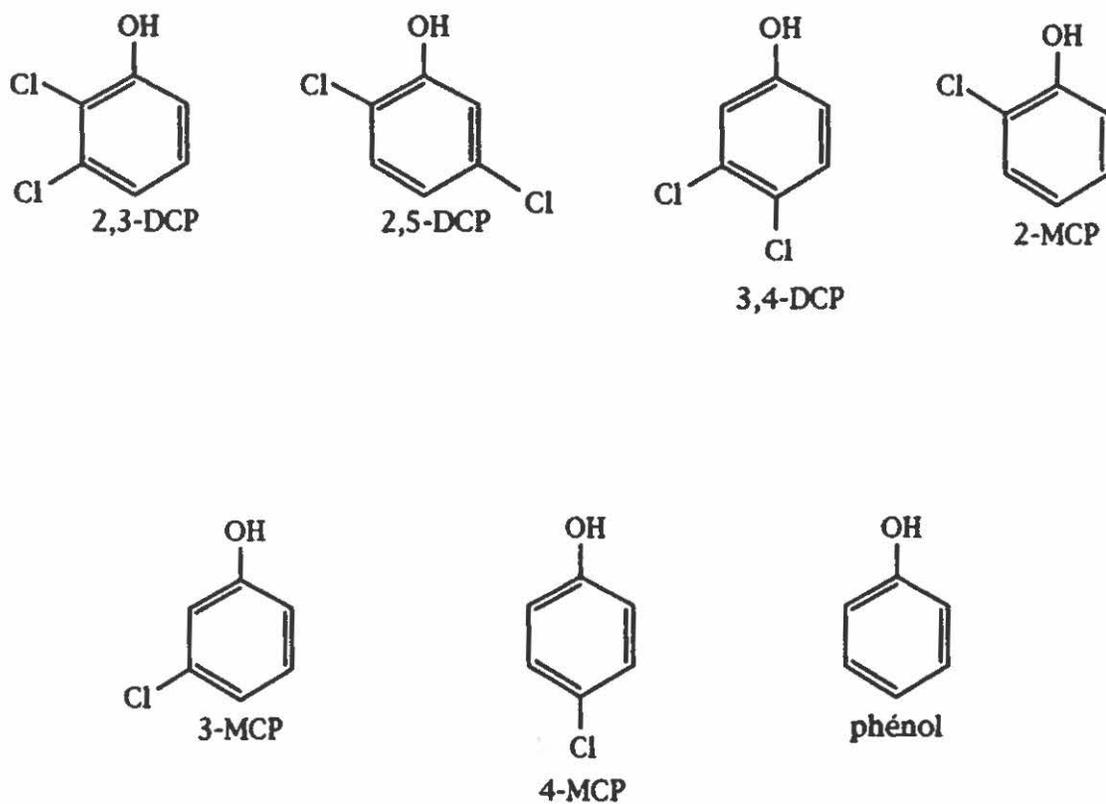


FIGURE 18: Activité de déchloration du 2,3,6-TCP, du 2,4,5-TCP, du 2,4,6-TCP et du 3,4,5-TCP par la souche PCP-1. Les valeurs entre parenthèses indiquent la journée (après incubation) où ces substances ont été détectées.



**FIGURE 19: Activité de déchloration du 2,4-DCP, du 2,6-DCP et du 3,5-DCP par la souche PCP-1.**  
 Les valeurs entre parenthèses indiquent la journée (après incubation) où ces substances ont été détectées.



**FIGURE 20: Substances où aucune transformation n'a été observée après 8 jours d'incubation avec la souche PCP-1.**

# **DISCUSSION**

## 1. ENRICHISSEMENT PAR TRAITEMENT À LA CHALEUR ET REPIQUAGES

C'est d'abord par un traitement à la chaleur de 30 minutes à 80°C que certaines espèces du consortium méthanogénique ont été éliminées. Ce traitement visait à sélectionner les espèces sporulantes puisque ces dernières seraient responsables de la déchloration du PCP en 3-MCP, une donnée connue d'après les résultats de Pierre Juteau (1993). Les cultures enrichies des souches DCB-2 et *Desulfitobacterium dehalogenans* avait également subi un traitement semblable, ce qui avait facilité leur isolement (Utkin *et al.*, 1994; Madsen et Licht, 1992).

L'enrichissement des bactéries sporulées déshalogénant le PCP par repiquages dans des bouteilles sérologiques a été possible. Ceci n'avait pu être réalisé par Juteau (1993) et était nécessaire pour faciliter l'isolement des microorganismes impliqués dans la déchloration du PCP. Trois variations de la manière dont Juteau (1993) procédait ont permis l'utilisation de cette méthode d'enrichissement. Elles sont (i) l'ajout en tout temps de DEAE Séphacel qui favorisait la déshalogénéation tel que suggéré par Juteau (1993); (ii) l'ajustement du pH à 7,65 avec du NaHCO<sub>3</sub> plutôt qu'avec du NaOH pour une plus grande stabilité du pH et (iii) l'addition du PCP aux cultures enrichies 24 heures après l'ensemencement des bouteilles. Des périodes de pré-incubation avant l'addition du PCP ont été bénéfiques et dans certains cas nécessaires à la dégradation du PCP par les champignons unicellulaires (Kennes et Lema, 1994; Logan *et al.*, 1994; Seigle-Murandi *et al.*, 1993; Mileski *et al.*, 1988). La toxicité du PCP envers les bactéries anaérobies et l'inhibition de l'activité microbienne ont aussi été observée (Madsen et Licht, 1992; Mohn et Kennedy, 1992a; Ruckdeschel *et al.*, 1987; Guthrie *et al.*, 1984). Une période de pré-incubation semble permettre aux bactéries de mieux résister au toxique, peut-être dû au fait qu'elles seraient en meilleures conditions physiologiques au moment de son ajout. En ce qui concerne le pH, la concentration élevée du tampon bicarbonate jumelé au tampon phosphate était en mesure de conserver les pH au delà d'une valeur de 7,0 dans les bouteilles contenant les cultures enrichies, ce qui n'était pas le cas lorsque le NaOH avait été utilisé au lieu du NaHCO<sub>3</sub>.

## 2. ISOLEMENT ET CONDITIONS DE CULTURES DE LA SOUCHE PCP-1

L'isolement d'une souche pure (PCP-1) pouvant effectuer la déshalogénéation du PCP s'est avéré difficile. Il a été effectué sur milieu riche Columbia après plusieurs mois d'enrichissement tant en milieu liquide que solide.

Des souches bactériennes pouvant déshalogéner le PCP ont été obtenues dans un milieu de culture contenant du glucose, du formiate de sodium et de l'extrait de levure. Malgré cela, il était impossible de repiquer ces dernières dans de nouveaux milieux, de même composition, en conservant l'activité de déchloration. Des énumérations bactériennes réalisées sur ces cultures suggéraient que la bactérie était incapable de croître dans ce milieu puisque les concentrations bactériennes après quelques journées d'incubation étaient très faibles, autour de  $10^3$  et  $10^4$  ufc/ml. À cette époque, une expérience préliminaire avec le système API 20E indiquait que ces souches ne métabolisaient pas le glucose. Ainsi, différents milieux de culture ont été testés afin de permettre la croissance de ces bactéries.

La culture de la souche PCP-1 n'a été possible qu'une fois que le pyruvate de sodium eut été identifié comme étant une source de carbone adéquate au maintien de sa croissance et de la déshalogénéation. Cette bactérie s'est révélée assacharolytique et c'est sans doute pour cette raison que son isolement a été ardu. Le glucose était utilisé comme source de carbone dans la plupart des expériences tentées pour l'isoler. La bactérie PCP-1 ne pouvait le métaboliser et était alors cultivable qu'en co-culture, avec des microorganismes qui le dégradent notamment en pyruvate. À ce jour, seul le pyruvate de sodium a permis la croissance cellulaire de la souche PCP-1 dans un milieu chimiquement défini. Les acides gras volatils, acétate, butyrate et propionate, n'ont pas été testés comme source potentielle de carbone.

### 3. CARACTÉRISATION DE LA SOUCHE PCP-1

#### 3.1 LA SOUCHE PCP-1 DE TYPE GRAM POSITIF

La coloration Gram de la souche PCP-1 est négative. Par contre, l'absence d'une membrane externe, caractéristique des bactéries Gram positif, a été remarquée lorsque la souche était observée en microscopie électronique. Ces résultats peuvent sembler contradictoires mais ont tout de même été observés chez de nombreuses espèces, par exemples chez des *Bacillus* et des *Clostridium* (Wiegel, 1981; Buchanan et Gibbons, 1974).

La taxonomie bactérienne utilise de plus en plus couramment le terme de "type Gram", basé sur des critères biochimiques comme la détermination de la structure de la paroi cellulaire ou la vérification de la présence de composés caractéristiques dont les lipopolysaccharides ou certaines enzymes (Wiegel, 1981). Ainsi, la souche PCP-1 serait de type Gram positif dû au fait qu'elle ne possède pas de membrane externe. Cette propriété est également confirmée par son appartenance au genre *Desulfitobacterium*.

#### 3.2 CARACTÉRISTIQUES COMMUNES DES SOUCHES EFFECTUANT LA DÉSHALOGÉNATION DE MOLÉCULES AROMATIQUES

La souche PCP-1 est la sixième bactérie anaérobie ayant une activité de déshalogénéation envers un substrat aromatique halogéné. Les souches *D. tiedjei*, DCB-2, 2CP-1 et *D. dehalogenans* ont déjà été présentées. Une présentation au congrès de la société Américaine de microbiologie (ASM) en mai 1995 par Zhang *et al.* montrait une nouvelle bactérie (XZ-1) ayant des propriétés s'apparentant au genre *Desulfitobacterium*. Son spectre d'activité, spécifique aux chlores en positions *ortho*, inclu par contre le 2-MCP en présence de l'inducteur 3-Chloro-4-hydroxyphénylacétate. Le 2-MCP n'est pas déchloré par *D. dehalogenans*.

Les souches *D. tiedjei* et 2CP-1 sont de type Gram négatif (Cole *et al.*, 1994; Deweerd *et al.*, 1990a). La souche PCP-1 partage plutôt de nombreuses caractéristiques avec les souches DCB-2, *D. dehalogenans* et XZ-1. Les comparaisons qui suivent sont tirées des articles de Madsen et Licht (1992) en ce qui concerne la

souche DCB-2, de Utkin *et al.* (1994) pour *D. dehalogenans* et de Zhang *et al.* (1995) pour la souche XZ-1.

Les quatre dernières souches citées sont des bâtonnets. Les souches PCP-1, DCB-2 et *D. dehalogenans* sont de type Gram positif alors que la souche XZ-1 réagit négativement à la coloration Gram, tout comme la PCP-1 et aucune information sur le type de Gram n'est disponible. Elles sont toutes assacharolytiques et leur milieu de culture est composé de pyruvate et d'extrait de levure. Les souches DCB-2, *D. dehalogenans* et XZ-1 sont résistantes à des conditions microaérophiles, ce qui n'a pas encore été étudié chez PCP-1. La souche DCB-2 produit des enzymes de type catalase, ce qui semble le cas de la souche PCP-1. Cette caractéristique n'est pas indiquée chez *D. dehalogenans* et XZ-1. Les souches PCP-1, XZ-1 et DCB-2 sont sporulantes tandis que *D. dehalogenans* est considérée thermostable. Celle-ci avait initialement résisté à un traitement à la chaleur d'une durée de 25 minutes à 85°C suggérant qu'elle était sporulante mais des spores n'ont jamais été observées dans les cultures de *D. dehalogenans*.

La bactérie PCP-1 a un temps de division cellulaire de 3,0 heures dans les conditions utilisées. Les souches *D. dehalogenans*, XZ-1 et DCB-2 ont respectivement des temps de division de 3,5, 1,8 et 24 heures.

#### 4. UNE NOUVELLE ESPECE DU GENRE *DESULFITOBACTERIUM*

Le gène 16S rRNA est utilisé en microbiologie pour l'identification des espèces bactériennes, par la comparaison des séquences contenues dans les banques de données. L'analyse phylogénétique de la séquence de ce gène chez la souche PCP-1 indique que celle-ci serait vraisemblablement une nouvelle espèce bactérienne faisant partie du genre *Desulfitobacterium*. Ce genre était jusqu'à maintenant constitué d'une seule espèce, *D. dehalogenans* (Utkin *et al.*, 1994) et 95% d'homologie a été remarquée entre elle et la souche PCP-1.

*D. dehalogenans* est une bactérie anaérobie aussi capable d'effectuer de la déshalogénéation réductrice. Le spectre d'activité de cette dernière, déjà présenté dans ce mémoire, est limité aux halogènes de la position *ortho*. La

souche PCP-1 possède un spectre plus large puisqu'elle est capable d'éliminer les chlores en positions *ortho*, *para* et *méta*. Les deux bactéries partagent plusieurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et nutritionnelles tel qu'indiqué dans la section précédente. Quelques unes d'entre elles sont indiquées dans le tableau IV. Elles diffèrent entre autre par leur mobilité et leur abilité à former des spores. Les deux bactéries ont chacune des exigences particulières sur milieu solide. D'un coté, *D. dehalogenans* ne peut croître que sur un milieu mou contenant de 0,6 à 0,9% d'agar. Une concentration plus élevée inhibe complètement la croissance de cette souche. Des géloses de 1,2% d'agar ont même été utilisées pour vérifier la pureté de la souche (seulement les contaminants auraient poussé). La souche PCP-1 s'est montrée incapable de croître sur les géloses Columbia du fournisseur BBL, alors qu'une bonne croissance était obtenue sur les géloses Columbia de Quélab.

## 5. CULTURE DE LA SOUCHE PCP-1 EN MILIEU LIQUIDE

La croissance de la souche PCP-1 en milieu liquide, dans les conditions utilisées, est faible. En aucun cas, les bouteilles ne devenaient troubles, la turbidité étant un bon indice d'une concentration bactérienne élevée. Plusieurs énumérations bactériennes ont été effectués au cours de différentes expériences. Ceux-ci montraient que la concentration maximale généralement atteinte était relativement basse et tournait autour de  $5 \times 10^6$  ufc/ml.

Le pH optimal de la croissance et de la déshalogénation du 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (3-Cl-4-OHPA) par *D. dehalogenans* est de 7,5 (Utkin *et al.*, 1994). Le pH optimal de la bactérie XZ-1 au niveau de la croissance, était autour de 8,0 (Zhang *et al.*, 1995). Des résultats préliminaires obtenues avec la souche PCP-1 suggèrent que le pH optimal de la déshalogénation serait autour de 8,0 (I. Gladu, communication personnelle). Le pH optimal de sa croissance devra également être étudié.

L'effet de différents accepteurs d'électrons, organiques ou inorganiques (sulfite, sulfate, thiosulfate, nitrate, fumarate), sur la croissance et la déshalogénation de la souche PCP-1 n'a pas été testé, faute de temps. Ceci devrait être effectué sous peu puisqu'il est probable que quelques-unes de ces molécules

TABLEAU IV: Comparaison entre les bactéries PCP-1 et *Desulfitobacterium dehalogenans*<sup>1</sup>

Caractéristique	PCP-1	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> <sup>1</sup>
Morphologie	bâtonnet 0,7 x 2,2-4,5 µm non-flagellé	bâtonnet 0,5-0,7 x 2,5-4 µm 1 à 4 flagelles
Gram: coloration type	négative positif selon la microscopie électronique	positive positif selon l'analyse des LPS
Sporulation	oui	non, mais initialement thermostable
Spectre d'activité	déchloration du PCP en position <i>ortho</i> , <i>para</i> et <i>méta</i>	déshalogénéation en position <i>ortho</i>
Longueur du 16S rRNA	1654 bp <sup>2</sup>	1513 pb
Milieu de culture	pyruvate 20 mM, extrait de levure 0,02%	pyruvate 20 mM, extrait de levure 0,1%
Particularité sur milieu solide	Croît sur Columbia Quélab mais aucune croissance sur Columbia BBL	croissance seulement sur milieu contenant de 0,6 à 0,9% d'agar
Métabolismes des sucres	non	non
Autres	non-déterminé  non-déterminé	réduction du sulfite mais pas du sulfate  résistante à des conditions microaérophiles

<sup>1</sup> Utkin *et al.* (1994).

<sup>2</sup> paires de bases.

favorisent la croissance cellulaire. Ainsi, pour la souche XZ-1, Zhang *et al.* (1995) ont observé une stimulation de la croissance par l'ajout de sulfite, de thiosulfate et de nitrate, mais pas avec le sulfate. Les mêmes molécules servent d'accepteurs d'électrons à la souche *D. dehalogenans* qui peut aussi utiliser le 3-Cl-4-OHPA et obtenir de l'énergie via la déshalogénéation réductrice. Utkin *et al.* (1994) ont montré une relation linéaire entre la déchloration du 3-Cl-4-OHPA et la croissance de *D. dehalogenans*.

Le milieu de culture liquide permettant une meilleure croissance de la souche PCP-1 devra être redéfini prochainement. Une variation de la concentration de pyruvate, du pH et de l'ajout d'accepteurs d'électrons pourraient favoriser la croissance et augmenter les performances de déshalogénéation du PCP et d'autres substrats halogénés. De récents résultats ont montré qu'une concentration bactérienne élevée de la souche PCP-1 a été obtenue en utilisant dans le milieu de culture 50 mM de pyruvate de sodium et un accepteur d'électrons (sulfite, thiosulfate ou nitrate, R. Alary, communication personnelle).

## 5.1 LES VITAMINES ET LA 1,4-NAPHTOQUINONE

La 1,4-naphtoquinone est un analogue à la vitamine k qui peut servir de transporteur d'électrons (Brock et Madigan, 1991). Cette molécule est essentielle à la croissance de la souche *D. tiedjei*. Elle a été ajoutée dans les milieux de culture qui ont été utilisés pour isoler et maintenir en culture pure les souches DCB-2, 2CP-1 et *D. dehalogenans*. Toutefois, son importance n'a pas été clairement démontrée chez ces trois souches. La souche PCP-1 n'a aucune dépendance envers cette molécule et est cultivée dans un milieu qui ne la contient pas. De plus, il ne serait pas étonnant que les dix vitamines ajoutées au milieu de culture de la souche PCP-1 ne soient pas nécessaires à sa croissance et son activité de déshalogénéation. Ces vitamines avaient été omises dans certaines cultures enrichies sans que ceci n'engendre d'effets néfastes sur la déshalogénéation.

## 5.2 CROISSANCE SUR MILIEU SOLIDE

Des fractions du consortium enrichie provenant des bouteilles ont été à maintes fois dilués et inoculés sur milieu solide. C'est le milieu anaérobie Columbia qui a permis d'obtenir le meilleur taux de croissance des colonies. La croissance dans le même milieu que celui utilisé en bouteille (glucose et formiate de sodium), mais avec 1% d'agar, était très pauvre. De minuscules colonies n'apparaissaient qu'après plus de trois semaines d'incubation. De plus, les différentes espèces bactériennes ne démontraient que très peu de variations morphologiques, ce qui ne pouvaient permettre leur distinction, contrairement aux colonies retrouvées sur les géloses Columbia. Le milieu solide ressemblant à celui ayant permis d'isoler la bactérie DCB-2 (Madsen et Licht, 1992) contenant du pyruvate de sodium et de l'extrait de levure a aussi été testé. Ce milieu n'a pas donné de résultats supérieurs à celui qui contenait du glucose et du formiate de sodium. C'est donc pour ces raisons que les géloses commerciales Columbia ont été employées lors du processus d'isolement. Elles recevaient une dose de 3 mg/l de PCP-Na et 3 mg/l de 2,3,5-TCP de façon à ce que les bactéries en croissance sur ce milieu riche soient maintenues en contact avec des chlorophénols. Ceci a été effectué afin de maintenir une certaine pression sélective et ainsi favoriser le maintien de l'activité de déshalogénéation dans le cas où les gènes codant pour celle-ci auraient été situés sur un plasmide.

Il a déjà été mentionné que la souche PCP-1 n'a jamais pu former de colonies visibles lorsqu'inoculées sur le milieu Columbia ANA SB du fournisseur BBL (Montréal). Les compositions chimiques et biochimiques des milieux Columbia des fournisseurs Quélab et BBL ont été comparées. La différence principale réside dans l'emploi d'agents réducteurs différents pour réduire le potentiel redox des milieux. La compagnie BBL utilise de la L-cystéine-HCL et du dithiotréitol alors que Quélab utilise du Na<sub>2</sub>S. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces différences peuvent expliquer l'absence de croissance de la souche PCP-1 sur le milieu Columbia de la compagnie BBL.

## **6. DÉSHALOGÉNATION DES CHLOROPHÉNOLS**

### **6.1 VOIE DE DÉSHALOGÉNATION**

La souche PCP-1 déchlorure le PCP jusqu'au 3-MCP. Aucune autre bactérie anaérobie décrite dans la littérature est capable d'une telle activité. La voie de déshalogénéation de la souche PCP-1 diffère de celle décrite par Pierre Juteau pour le consortium anaérobie au niveau du trichlorophénol. Ce dernier avait identifié le 2,3,5-TCP, par GC-MS, comme étant l'un des intermédiaires majeurs de dégradation du PCP. En ce qui concerne la souche PCP-1, il est hors de tout doute que cet intermédiaire trichloré est le 3,4,5-TCP. Cette différence peut être dû au fait que le bioréacteur dont s'est servi Juteau pour déterminer la voie biochimique est différent de celui que nous avons utilisé pour prélever l'inoculum de départ qui a conduit à l'isolement de la souche PCP-1. Ces deux bioréacteurs ayant été sélectionnés et enrichies différemment sur une longue période de temps, il est possible que les flores microbiennes qui les composent soient quelque peu différentes, ainsi la dégradation du PCP ne s'effectuait pas exactement par la même voie.

#### **6.1.1 Le 3-MCP, produit final de la déchloration**

Le 3-MCP est le produit final de la déchloration du PCP par la souche PCP-1. Il s'accumule dans les bouteilles. Au niveau du consortium anaérobie, d'autres microorganismes sont responsables de l'élimination de ce chlorophénol. L'isolement des microorganismes impliqués dans ces étapes est important, tant au niveau fondamental qu'au niveau des applications. Si l'on voulait introduire la souche PCP-1 dans un sol anaérobie ou des eaux souterraines contaminées par le PCP, elle devrait être jumelée à d'autres microorganismes afin que le traitement soit en mesure de déchlorer entièrement la substance toxique et d'ouvrir le cycle aromatique.

#### **6.1.2 L'origine du 3,4-DCP détecté dans les cultures**

Juteau (1993) faisait mention de la possibilité d'une voie métabolique secondaire qui pouvait être emprunté par les bactéries du consortium pour dégrader le PCP puisque du 3,4-DCP était régulièrement détecté en faible

concentration dans les bioréacteurs ainsi que lors de ses essais en bouteilles. Par contre, un trichlorophénol pouvant conduire à ce dichlorophénol n'a jamais été mis en évidence. En ce qui concerne la déchloration du PCP par la souche PCP-1, le 3,4-DCP est constamment apparu à la fin du processus, dans des proportions variant de 4 à 9%.

L'hypothèse d'une voie métabolique secondaire ne semble pas s'appliquer pour la déshalogénéation des chlorophénols par la souche PCP-1. Aucun produit secondaire et minoritaire n'a été détecté lors de l'expérience étudiant le spectre d'activité de la souche PCP-1 envers les différents chlorophénols. Ces substances étaient initialement pures, ce qui n'est pas le cas du PCP-Na. Ce dernier est contaminé par près de 10% de 2,3,4,6-TeCP. Cette valeur ne peut être déterminée précisément, ce standard n'étant pas disponible. L'identité de ce contaminant est suggéré par le fait que les temps de rétention des deux autres TeCP standards, bien que très près du contaminant, ne correspondent pas à celui-ci. Juteau (1993) avait aussi identifié ce contaminant par spectrométrie de masse. Des évidences expérimentales suggèrent que le 3,4-DCP origine de ce contaminant. Ce tétrachlorophénol, en perdant successivement ces deux chlores de la position *ortho* (d'abord celui de la position 2, ensuite celui de la position 6), sera biotransformé en 2,4,5-TCP puis en 3,4-DCP. Les résultats de la déshalogénéation des standards 2,3,4,5-TeCP et 2,3,5,6-TeCP n'ont pas produit de 2,4,5-TCP mais ont plutôt passé respectivement par le 3,4,5-TCP et le 2,3,5-TCP. De surcroît, le 2,4,5-TCP, qui n'avait pas été détecté par Pierre Juteau, l'a effectivement été dans nos expériences, un point fort en faveur de la transformation du 2,3,4,6-TeCP en 2,4,5-TCP qui peut alors conduire au 3,4-DCP. C'est d'ailleurs ce qui s'est produit lors des essais de la déshalogénéation du 2,4,5-TCP où du 3,4-DCP a été obtenu. Ce produit s'accumule dans les bouteilles puisque la bactérie PCP-1 n'a pas d'activité envers celui-ci, ce qui a aussi été vérifié lors des essais d'évaluation du spectre d'activité.

## 6.2 BILAN DE MASSE

On observe à la figure 12 que 73% de la dose initiale de PCP est retrouvé sous la forme de 3-MCP et de 3,4-DCP. Même s'il semble manquer 27% de chlorophénol, nous ne croyons pas que le PCP subisse des transformations autres que celles rapportées. Cette perte pourrait surtout être expliquée par la

difficulté de mesurer précisément la concentration de PCP-Na dans les solutions mères. Ces concentrations seraient légèrement sur-évaluées. La présence du contaminant 2,3,4,6-TeCP tel que déjà mentionné et également la présence de molécules d'eau dans une proportion indéterminée dans les cristaux de PCP-Na ( $\text{PCP-Na} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) pourraient être les causes d'une certaine erreur dans l'évaluation des concentrations initiales de PCP ajoutés aux cultures.

### 6.3 DEUX SYSTEMES ENZYMATIQUES IMPLIQUÉS DANS LA DÉSHALOGÉNATION DU PCP

Les résultats sur la cinétique de déshalogénéation du PCP, l'étude du spectre d'activité et de la dose maximale du PCP suggèrent qu'au moins deux systèmes enzymatiques seraient responsables de la déchloration de ce substrat. Chacun de ces systèmes pourraient éliminer deux chlores. Le premier serait spécifique aux chlores en position *ortho* et serait rapidement exprimé. La figure 12 démontre ce fait, soit l'élimination rapide de ces deux chlores. Les figures 17 à 19 indiquent aussi que les chlores en positions *ortho* sont les premiers à disparaître. Un deuxième système enzymatique serait exprimé plus tardivement et il s'attaquerait aux chlores des positions *para* et *méta*. Celui-ci serait induit par le 3,4,5-TCP, le 2,3,5-TCP ou le 3,5-DCP, ce qui expliquerait la latence remarquée entre l'élimination des chlores en position *ortho* et ceux situés en *para* ou *méta*. Madsen et Licht (1992) rapportent que deux enzymes distinctes et inductibles semblaient impliquées dans la déchloration des chlorophénols chez la souche DCB-2. Par l'emploi d'inhibiteur spécifique de la synthèse protéique (chloramphénicol), il serait intéressant de vérifier si les deux systèmes enzymatiques de la souche PCP-1 sont inductifs. À ce jour, c'est ce qui a été observé chez toutes les bactéries anaérobies capables de déchlorer un substrat aromatique.

Le premier système enzymatique posséderait un spectre d'activité spécifique aux chlores de la position *ortho*, tout comme celui de *D. dehalogenans*. Malgré cela, une caractéristique importante les distingue. Chez *D. dehalogenans*, la déshalogénéation est induite par le 3-Cl-4-OHPA, le 2,4,6-TCP, le 2,4-DCP, le 2,3-DCP et également par la plupart des 2-Cl (ou Br)-4-RP où R = F, BR,  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{CH}_3$  et  $\text{COOCH}_3$  (Utkin *et al.*, 1995). Chez la souche PCP-1, le PCP induirait la déchloration en *ortho* et c'est le 3,4,5-TCP qui l'induit en position *méta* et *para*.

Le 2,3,5-TCP et le 3,5-DCP ont aussi agi ainsi puisqu'ils ont subi l'élimination de chlores en *para* et/ou *méta* alors que 6 chlorophénols autre que le PCP seraient inducteur du premier système enzymatique. La bactérie *D. tiedjei* nécessite aussi l'addition d'une molécule inductrice (3-chlorobenzoate ou autres) pour pouvoir déchlorer le PCP en position *méta* (Mohn et Kennedy, 1992b).

La souche PCP-1 serait donc la première à pouvoir éliminer les chlores des positions *ortho*, *para* et *méta*, en conditions anaérobies et deux systèmes enzymatiques seraient responsables de cette activité.

Deux voies différentes de déshalogénéation ont été observées pour le 2,3,5-TCP. Ainsi, on a observé que le 2,3,5,6-TeCP a été déshalogéné en 3-MCP via deux déchloration successives en *ortho* pour donner le 2,3,5-TCP et le 3,5-DCP. Or, lorsque la souche PCP-1 est mise en présence du 2,3,5-TCP, ce substrat subit une déshalogénéation en position *méta* pour donner le 2,5-DCP. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que le 2,3,5-TCP serait inducteur d'une déchloration en position *méta* et non en *ortho* comme l'avait fait le 2,3,5,6-TeCP.

Les deux systèmes enzymatiques de la souche PCP-1 sont spécifiques à certains chlorophénols et n'ont aucune activité envers d'autres. Ceci a été vérifié par l'ajout de PCP à cinq chlorophénols qui n'avaient pas été déshalogénés une première fois dans des cultures de la souche PCP-1. Le PCP devait servir d'inducteur et favoriser la transformation des chlorophénols récalcitrants. L'utilisation de l'inducteur n'a pas élargi le spectre d'activité de la souche PCP-1 envers les chlorophénols.

#### 6.4 TOXICITÉ DU PCP ENVERS LA SOUCHE PCP-1

Les résultats de la déshalogénéation de doses élevées de PCP suggère que la toxicité du PCP sur la souche PCP-1 débiterait entre 10 et 15 mg/l puisqu'à cette dernière dose, la déshalogénéation du 3,4,5-TCP a été inhibée. Une partie du PCP disparaissait à 20 mg/l mais la déchloration était pratiquement inexistante à des doses plus élevées. Le niveau de tolérance envers le PCP des souches *D. tiedjei*, DCB-2 et XZ-1 a été discutée brièvement. Ainsi, la croissance de *D. tiedjei* est inhibée réversiblement à 4 mg/l (Mohn et Kennedy, 1992b). Une dose de 11 mg/l est néfaste au métabolisme de la souche DCB-2 (Madsen et Licht, 1992) et à

12 mg/l, la croissance de la souche XZ-1 est complètement inhibée (Zhang *et al.*, 1995). Utkin *et al.* (1995), qui ont étudié le spectre d'activité de *D.dehalogenans* envers les chlorophénols, ne se sont pas prononcés sur la toxicité du PCP sur leur souche. Par contre, en travaillant à une dose de 27 mg/l, ils ont pu observer la déchloration du PCP en 3,4,5-TCP, bien qu'ils ne mentionnent pas son pourcentage d'élimination.

En injectant des doses élevées de PCP dans les bouteilles, il aurait été intéressant de savoir si cette substance avait un effet bactéricide ou bactériostatique (inhibition réversible de la croissance) sur la bactérie PCP-1. Des comptes bactériens avaient été effectués dans ce sens mais aucun résultat n'a pu être tiré de ces manipulations puisque les bactéries avaient été étalées sur les géloses Columbia du fournisseur BBL. C'est lors de cette expérience que nous avons réalisé que la souche PCP-1 était incapable de croître sur ces géloses.

## 6.5 VITESSE DE DÉSHALOGÉNATION

Utkin *et al.* (1995) ont calculé la vitesse de déshalogénéation de quelques chlorophénols chez *D. dehalogenans*. Dans ces conditions (100  $\mu$ M de chlorophénol, soit 27 mg/l de PCP), le PCP, avec un taux de 0,049 mmole/h/g de poids sec, a été déshalogéné plus de cent fois plus lentement que le 2,3-DCP qui démontrait une performance de 5,8 mmoles/h/g. La toxicité du PCP à cette dose pourrait expliquer ce faible taux. Cette valeur a aussi été quantifiée chez la souche DCB-2 mais il est difficile de la comparer avec celle de *D. dehalogenans* puisqu'elle est exprimée en mmole/h/g de protéine et que la dose initiale de PCP (11 mg/l) était plus basse. Elle est de 29 mmole/h/g protéine chez la souche DCB-2. La vitesse de déshalogénéation du PCP chez *D. tiedjei* est de 0,054 mmole/h/g de protéine (Mohn et Kennedy, 1992b). Elle a été déterminée avec une dose initiale de 4 mg/l de PCP et est voisine de celle de *D. dehalogenans*. Ce taux n'a été déterminé qu'en terme d'une population bactérienne chez la souche PCP-1. Cette valeur est de 4,8  $\mu$ mole/h/10<sup>6</sup>ufc/ml. Nous avons été incapable de l'exprimer en mmole/h/g de protéine puisqu'une population bactérienne trop faible était présente dans nos cultures.

## 6.6 RÔLE DES BILLES DE DEAE SÉPHACEL

L'importance de l'addition des billes de DEAE Séphacel sur l'activité de déshalogénéation du consortium dans des bouteilles sérologiques a été démontrée par Juteau (1993). Celui-ci avait initialement ajouté cette résine échangeuse d'anions dans le but de créer des agrégats bactériens et favoriser les échanges de métabolites, sources de carbone, vitamines ou autres, entre les différentes espèces bactériennes. En présence des billes de DEAE Séphacel, Juteau (1993) avait remarqué une nette amélioration de la déchloration du PCP par le consortium méthanogénique dans des bouteilles à sérum. Le choix du DEAE Séphacel était basé sur un article de Kindzierski *et al.* (1992) qui avaient observé une meilleure immobilisation des bactéries avec une résine échangeuse d'anions (XE-352 de la compagnie Ambergard) qu'avec du charbon activé ou une résine échangeuse de cations. Les auteurs rapportent néanmoins que la supériorité de la résine XE-352 pourrait être surtout due à sa porosité qu'à sa charge.

Une fois la souche responsable de la déchloration isolée et pouvant être maintenue en culture pure, nous croyions bien que ces billes ne seraient plus essentielles. Des échanges entre diverses espèces n'avaient plus lieu. Cette hypothèse s'est avérée fautive puisque même en culture pure, le DEAE Séphacel était nécessaire à la déchloration. En l'absence de ces billes, il y a eu l'arrêt de cette activité. Par ailleurs le sable de silice, qui aurait théoriquement pu servir de support en remplaçant la résine, n'a pas permis de conserver la déshalogénéation. L'effet de l'extrémité échangeuse d'ions a aussi été testé. Les chimistes de notre groupe de recherche avaient avancé l'hypothèse que ces molécules, le DEAE ou TEAE, puissent être impliquées dans la déshalogénéation réductrice en stabilisant l'intermédiaire aromatique en train de perdre un atome de chlore. Cette hypothèse s'est aussi révélée fautive puisqu'en présence du TEAE qui substituait les billes, la souche PCP-1 n'a pas déshalogéné le PCP.

Le rôle exact du DEAE Séphacel sur l'activité de déchloration n'est donc pas connu. Il n'est pas certains qu'elles ne servent que de support, sinon un minimum d'activité aurait été observé lorsque les bactéries étaient en présence de sable de silice. L'utilisation de supports ou résines n'a jamais été décrite dans les milieux de culture des bactéries *D. tiedjei*, DCB-2, 2-CP1 et *D. dehalogenans*.

Par contre, Zhang *et al.* (1995) ont utilisé dans le milieu de culture de la souche XZ-1 10% de la résine Bio-Rad SM-7. Cette résine a la capacité d'adsorber des substances polaires tels le phénol ou les chlorophénols et pourrait ainsi réduire leur toxicité dans le milieu. Il faudrait envisager que le DEAE Séphacel puisse agir de la sorte. Parallèlement, en milieu aérobie, Otte *et al.* (1994) ont rapporté que l'ajout de sol stérile était essentiel à la dégradation du PCP par un consortium. Ces auteurs n'ont pas déterminé s'il servait de support et/ou de sources de nutriments. Ce sol pouvait peut-être aussi adsorber le PCP et réduire la toxicité du milieu.

Des expériences ultérieures seraient nécessaires afin de vérifier l'effet du DEAE Séphacel sur la croissance de la souche PCP-1. Il serait aussi approprié d'effectuer des travaux de microscopie électronique à balayage sur les billes après une période d'incubation. S'il y avait formation d'aggrégats bactériens, ceux-ci permettraient une meilleure résistance des bactéries aux substances toxiques présentes dans leur environnement.

# **CONCLUSION**

Une nouvelle espèce bactérienne appartenant au genre *Desulfitobacterium* a été isolée à partir d'un consortium méthanogénique. Cette bactérie nommée présentement PCP-1 est capable d'effectuer la déshalogénéation réductrice du pentachlorophénol jusqu'au 3-monochlorophénol en passant par le 2,3,4,5-TeCP, le 3,4,5-TCP et le 3,5-DCP. Il s'agit d'un bâtonnet de coloration négative au Gram mais de type Gram positif tel que suggéré par la microscopie électronique et par son appartenance au genre *Desulfitobacterium*. La souche PCP-1 est sporulante, non-mobile et assacharolytique. Elle est la première bactérie anaérobie pouvant éliminer les chlores des trois positions du cycle aromatique, soit *ortho*, *para* et *méta*.

Cette bactérie possède une forte activité de déchloration du PCP et pourrait également, tout comme *D. dehalogenans*, avoir une activité de déshalogénéation envers plusieurs autres composés halogénés. Néanmoins, si elle devait être utilisée dans le traitement anaérobie d'un sol ou d'eaux contaminés, elle devrait être couplée à des bactéries capables d'éliminer le dernier chlore du cycle aromatique et de cliver ce dernier. L'isolement d'une bactérie responsable de la déchloration du 3-MCP devrait être réalisé, ce qui faciliterait les études d'optimisation de cette étape et permettrait aussi d'obtenir la déshalogénéation complète du PCP.

L'isolement de la souche PCP-1 ouvre la voie à des études plus fondamentales axées sur la physiologie, la biologie moléculaire et l'enzymologie de cette nouvelle espèce bactérienne. Ces études permettront éventuellement le développement de nouveaux procédés biotechnologiques anaérobies permettant d'assainir plus efficacement l'environnement et à moindre coût.

# **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier tout particulièrement:

mon directeur de maîtrise, le docteur Réjean Beaudet, pour son excellente supervision, son soutien scientifique, sa disponibilité, ses encouragements et son appui financier durant mes études à l'Institut Armand-Frappier;

madame Rita Alary et monsieur Guy McSween, pour leur support technique, leurs conseils, pour m'avoir fait bénéficier de leur connaissance ainsi que pour l'aide apportée lors de quelques expériences;

madame Francine Turcotte et monsieur Richard Villemur pour la réalisation de très précieux travaux de biologie moléculaire, notamment le séquençage du 16S ribosomal et l'identification de la nouvelle souche bactérienne. Merci Francine pour les 4 mois de consciencieuses manipulations;

monsieur Sylvain Milot pour l'aide apportée lors des analyses au GC-MS;

monsieur Robert Alain, indispensable lorsque des travaux de microscopie électronique devaient être effectués;

l'Institut Armand Frappier et le Fond pour la formation de chercheurs et d'aide à la recherche (FCAR) pour leur appui financier pendant une partie de la durée de cette maîtrise,

et finalement tous ceux qui ont contribué à rendre ces deux années très agréables, autant aux niveaux académique et scientifique que culturel et sportif.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- ALAIN, R., F. NADON, C. SÉGUIN, P. PAYMENT et M. TRUDEL. 1987. Rapid virus subunit visualization of samples on electron microscope grids. *J. Virol. Methods*. 16: 209-216.
- APAJALATHI, J. H. A., et M. S. SALKINOJA-SALONEN. 1986. Degradation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 62-67.
- APAJALATHI, J. H. A., et M. S. SALKINOJA-SALONEN. 1987. Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenicus*. *J. Bacteriol.* 169: 5125-5130.
- BANERGI, S. K., M. WEI et R. K. BAJPAI. 1993. Pentachlorophenol interactions with soil. *Water, air and soil pollution.* 69: 149-163.
- BHATNAGAR, L. et B. Z. FATHEPURE. 1991. Mixed culture in detoxification of hazardous waste, p. 293-340. Dans J. G. Zeikus et E. Johnson (ed), *Mixed culture in biotechnology*. McGraw-Hill Book Co., New-York.
- BENOIT-GUYOD, J.-L., F. SEIGLE-MURANDI, R. STEIMAN, L. SAGE et A. TOE. 1994. Biodegradation of pentachlorophenol by micromycetes. III. *Deuteromycetes*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9: 33-44.
- BERRY, D. F., A. J. FRANCIS et J. M. BOLLAG. 1987. Microbial methabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* 51: 43-59.
- BOLLAG, J.-M., C. S. HELLING et M. ALEXANDER. 1968. 2,4-D metabolism. Enzymatic hydroxylation of chlorinated phenols. *J. Agr. Food Chem.* 16: 826-833.
- BOYD, S. A., S. R. SHELDON, D. BERY, J. M. TIEDJE. 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 50-54.
- BROCK, T. D. et M. T. MADIGAN. 1991. *Biology of microorganisms*. New Jersey. Prentice-Hall, inc. 874 pages.
- BROWN, E. J., J. J. PIGNATELLO, M. M. MARTINSON et R. L. CRAWFORD. 1986. Pentachlorophenol degradation: a pure bacterial culture and an epilithic microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 92-97.
- BRUCE, K. D., W. D. HIORNS, J. L. HOBMAN, A. M. OSBORN, P. STRIKE et D. A. RITCHIE. 1992. Amplification of DNA from native population of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Env. Microbiol.* 58:3413-3416.
- BRYANT, M. P. et I. M. ROBINSON. 1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *J. Bacteriol.* 84: 605-614.
- BUCHANAN, R. E. et N. E. GIBBONS. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co. , Baltimore.
- CAREY, J. H., M. E. FOX et J. H. HART. 1988a. Identity and distribution of chlorophenols in the north arm of the Fraser River estuary. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* 23:31.

- CAREY, J. H. et J. H. HART. 1988b. Sources of chlorophenolic compounds to the Fraser River Estuary. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* 23: 55.
- CIRELLI, D. P. 1977. Patterns of pentachlorophenol usage in the United States of America. An overview. In "Pentachlorophenol, Chemistry, pharmacology, and Environmental Toxicology". Edited by K. R. Rao. Plenum Press, New-York.
- COLE, J. R., A. L. CASCARELLI, W. W. MOHN ET J. M. TIEDJE. 1994. Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10): 3536-3542.
- COLE, J. R. et J. M. TIEDJE. 1991. "The anaerobic dechlorating bacterium *Desulfomonile tiedjei* strain DCB-1 carries a plasmid," dans ASM: Abstract of the 90th Annual Meeting of the American Society for Microbiology-1990. Washington. American Society of Microbiology. Résumé Q-33.
- CROSBY, D.G. 1981. Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure Appl. Chem.* 53: 1051-1080.
- DEWEERD, K. A., L. MANDELCO, R. S. TANNER, C. R. WOOSE et J. M. SUFLITA. 1990a. *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 154: 23-30.
- DEWEERD, K. A. et J. M. SUFLITA. 1990b. Anaerobic aryl reductive dehalogenation of halobenzoates by cell extracts of *Desulfomonile tiedjei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2999-3005.
- DEWEERD, K. A., J. M. SUFLITA, T. G. LINKFIELD, J. M. TIEDJE et P. H. PRITCHARD. 1986. The relationship between reductive dehalogenation and other aryl substituent removal reactions catalyzed by anaerobes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 293-298.
- DIETRICH, G. et J. WINTER. 1990. Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34(2): 253-258.
- DOLFING, J. 1990. Reductive dechlorination of 3-chlorobenzoate is coupled to ATP production and growth in an anaerobic bacterium, strain DCB-1. *Arch. Microbiol.* 153: 264-266.
- EDGEHILL, R. U. 1994. Pentachlorophenol removal from slightly acidic mineral salts, commercial sand, and clay soil by recovered *Arthrobacter* strain ATCC 33790. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 142-148.
- FATHEPURE, B. Z. et J. M. TIEDJE. 1994. Reductive dechlorination of tetrachloroethylene by a chlorobenzoate-enriched biofilm reactor. *Environ. Sci. Technol.* 28: 746-752.
- FELSENSTEIN, J. 1989. PHILIP: Phylogeny Interference Package (version 3.2). *Cladistics.* 5: 164-166.
- FOX, M. E. et S. R. JOSHI. 1984. The fate of pentachlorophenol in the Bay of Quinte, Lake Ontario. *J. Great Lakes Res.* 10: 190.

- GIBBONS, R. J. et L. P. ENGLE. 1964. Vitamin k compounds in bacteria that are obligate anaerobes. *Science*. 146: 1307.
- GIBBONS, R. J. et J. B. MACDONALD. 1960. Hemin and vitamin k compounds as required factors for the cultivation of certain strain of *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.* 80: 164.
- GOLOVLEVA, L. A., O. E. ZABORINA et A. Y. ARINBASAROVA. 1993. Degradation of 2,4,6-TCP and a mixture of isomeric chlorophenols by immobilized *Streptomyces rochei* 303. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 815-819.
- GRIFFITH, G. D., J. R. COLE, J. F. QUENSEN III et J. M. TIEDJE. 1992. Specific deuteration of dichlorobenzoate during reductive dehalogenation by *Desulfomonile tiedjei* in D<sub>2</sub>O. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 409-411.
- GUTHRIE, M. A., E. J. KIRSCH, R. F. WUKASCH et C. P. L. GRADY JR. 1984. Pentachlorophenol biodegradation - II. Anaerobic. *Water Res.* 18(4): 451-461.
- HAGGBLOM, M. 1990. Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds. *J. Basic Microbiol.* 30(2): 115-141.
- HENDRIKSEN, H. V. et B. K. AHRING. 1992. Metabolism and kinetics of pentachlorophenol transformation in anaerobic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37(5): 662-666.
- HENDRIKSEN, H. V., S. LARSEN et B. K. AHRING. 1991. Anaerobic degradation of PCP and phenol in fixed-film reactors - The influence of an additional substrate. *Water Sci. Technol.* 24(3-4): 431-436.
- HITTI, Y. S. et A. M. BERTINO. 1994. Proteinase K and T4 DNA polymerase facilitate the Blunt-end subcloning of PCR products. *Biotechniques.* 116(5): 802-805
- HOLLIGER, C. et G. SCHRAA. 1994a. Physiological meaning and potential for application of reductive dechlorination by anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 297-304.
- HOLLIGER, C. et W. SCHUMACHER. 1994b. Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhoek.* 66: 239-246.
- HU, Z. C., R. A. KORUS, W. E. LEVINSON et R. L. CRAWFORD. 1994. Absorption and biodegradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized *Flavobacterium*. *Environ. Sci. Technol.* 28(3): 491-496.
- JACKSON, D. R. et D. L. BISSON. 1990. Mobility of polychlorinated aromatic compounds in soils contaminated with wood-preserving oil. *J. Air Waste Manage. Assc.* 40(8): 1129-1133.
- JANSSEN, D. B., F. PRIES et J. R. VAN DER PLOEG. 1994. Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 163-191.
- JONES, P. A. 1984. Les chlorophénols et leurs impuretés dans l'environnement canadien-supplément 1983. Environment Canada, Environmental Protection Branch. 93 pages.

- JUTEAU, P. 1993. Étude de la biodégradation du pentachlorophénol en conditions méthaniques. Mémoire de maîtrise. 124 pages.
- JUTEAU, P., R. BEAUDET, G. McSWEEN, F. LÉPINE, S. MILLOT et J.-G. BISAILLON. 1995a. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Sous-presse.
- JUTEAU, P., R. BEAUDET, G. McSWEEN, F. LÉPINE, et J.-G. BISAILLON. 1995b. Study of the reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Can. J. Microbiol.* Sous-presse.
- KENNES, C. et J. M. LEMA. Degradation of major compounds of creosotes (PAH and phenols) by *Phanerochaete chrysosporium*. 1994. *Biotechnol. Let.* 16(7): 759-764.
- KINDZIERSKI, W. B., M. R. GRAY, P. M. FEDORAK et S. E HRUDEY. 1992. Activated carbon and synthetic resins as support material for methanogenic phenol-degrading consortia - Comparaison of surface characteristics and initial colonization. *Water Environ. Res.* 64(6): 766-775.
- KITUNEN, V. H., R. J. VALO et M. S. SALKINOJA-SALONEN. 1987. Contamination of soil around wood-preserving facilities by polychlorinated aromatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 21(1): 96-101.
- KNACKMUSS, H.-J. et M. HELLWIG. 1978. Utilisation and cooxidation of chlorinated phenols by *Pseudomonas* sp. B13. *Arch. Microbiol.* 117: 1-7.
- LAMAR, R. T. et D. M. DIETRICH. 1990. *In situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(10): 3093-3100.
- LAMAR, R. T., J. W. EVANS et J. A. GLASER. 1993. Solid-phase treatment of pentachlorophenol-contaminated soil using lignin-degrading fungi. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2566-2571.
- LAMPI, P., K. TOLONEN, T. VARTIAINEN et J. TUOMISTO. 1992. Chlorophenols in lake bottom sediments - A retrospective study of drinking water contamination. *Chemosphere.* 24(12): 1805-1824.
- LI, T., J.-G. BISAILLON, R. VILLEMUR, L. LÉTOURNEAU, K. BERNARD, F. LÉPINE et R. BEAUDET. 1995. Anaerobic microorganism carboxylating phenol. Soumit pour publication au *J. Bacteriol.*
- LIN, J.E. et H. Y. WANG. 1990. Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Bioengineer.* 35: 1125-1134.
- LINKFIELD, T. G. et J. M. TIEDJE. 1990. Characterization of the requirements and substrates for reductive dehalogenation by strain DCB-1. *J. Ind. Microbiol.* 5: 9-15.
- LOGAN, B. E., B. C. ALLEMAN, G. L. AMY et R. L. GILBERTSON. 1994. Absorption and removal of pentachlorophénol by white rot fungi in batch culture. *Wat. Res.* 28(7): 1533-1538.

- LOWRY, O. H., N. H. ROSENBROUGH, A. L. FAN et R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MADSEN, T. et D. LICHT. 1992. Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(9): 2874-2878.
- METCALFE, J. L., M. E. FOX et J. H. CAREY. 1988. Freshwater leeches as a screening tool for organic contaminants in the environment. *Envir. Monit. Asses.* 11: 147.
- MIKESELL, M. D. et S. A. BOYD. 1985. Reductive dechlorination of the pesticide 2,4-D, 2,4,5-T and pentachlorophenol in anaerobic sludges. *J. Environ. Qual.* 14(3): 337-340.
- MILESKI, G. J., J. A. BUMPUS, M. A. JUREK et S. D. AUST. 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(12):2885-2889.
- MOHN, W. W. et K. J. KENNEDY. 1992a. Limited degradation of chlorophenols by anaerobic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(7): 2131-2136.
- MOHN, W. W. et K. J. KENNEDY. 1992b. Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1367-1370.
- MOHN, W. W. et J. M. TIEDJE. 1992c. Microbial reductive dehalogenation. *Microb. Rev.* 56(3): 482-507.
- MOHN, W. W., T. G. LINKFIELD, H. S. PANKRATZ et J. M. TIEDJE. 1990a. Involvement of a collar structure in polar growth and cell division of strain DCB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(5): 1206-1211
- MOHN, W. W. et J. M. TIEDJE. 1990b. Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. *Arch. Microbiol.* 153: 267-271.
- NICHOLSON, D. K., S. L. WOODS, J. D. ISTOK et D. C. PEEK. 1992. Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(7): 2280-2286.
- OSM. 1987. Environmental health criteria 71: Pentachlorophenol. Genève. Organisation mondiale de la santé. 236 pages.
- OTTE, M.-P., J. GAGNON, Y. COMEAU, N. MATTE C. W. GREER et R. SAMSON. 1994. Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 926-932.
- PAASIVIRTA, J., K. HEINOLA, T. HUMPPIL, A. KARJALAINEN, J. KNUUTNINEN, K. MANTYKOSKI, R. PAUKKU, T. PILOLA, K. SURMAAHO, J. TARHANEN, L. WELLIN et H. VIHONEN. 1985. Polychlorinated phenols, guaiacols and catechols in environment. *Chemosphere.* 14(5): 469-491.

- PREMALATHA, A. et G. S RAJAKUMAR. 1994. Pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 334-337.
- QUEMARAIS, B., C. LEMIEUX et K. R. LUM. 1994. Distribution and fate of chlorophenols in the St-Laurence River Bassin, Canada. *Chemosphere.* 28(11): 1943-1960.
- RADEHAUS, P. M. et S. K. SCHMIDT. 1992. Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. that mineralizes high concentration of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(9): 2879-2885.
- ROY-ARCAND, L. et F.S. ARCHIBALD. 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (coriolus) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 194-203.
- RUCKDESCHEL, G., G. RENNER et K. SCHWARZ. 1987. Effects of pentachlorophenol and some of its known and possible metabolites on different species of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2689-2692.
- SABER, D. L. et L. CRAWFORD. 1985. Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (6): 1512-1518.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *In: Molecular Biology, a Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- SANGER, F., S. NICKLEN et A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 1408-1412.
- SHELLENBERG, K., C. LEUENBERGER et R.P. SCHWARZENBACH. 1984. Sorption of chlorinated phenols by natural sediments and aquifer materials. *Envir. Sci. Technol.* 18: 652.
- SEIGLE-MURANDI, F., R.STEIMAN, J.-L. BENOIT-GUYOD et P. GUIRAUD. 1992. Biodegradation of pentachlorophenol by *Micromycetes*. I. *Zygomycetes*. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* 7: 125-139.
- SEIGLE-MURANDI, F., R.STEIMAN, J.-L. BENOIT-GUYOD et P. GUIRAUD. 1993. Fungal degradation of pentachlorophenol by *Micromycetes*. *J. Biotechnol.* 30: 27-35.
- SHELTON, D. R., et J. M. TIEDJE. 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 840-848.
- STANLAKE, G. J. et R. K. FINN. 1982. Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(6) 1421-1427.
- STEIERT, J. G. et R. L. CRAWFORD. 1985. Microbial degradation of chlorinated phenols. *Trends in Biotechnology.* 3(12): 300-305.

- STEIMAN, R., J.-L. BENOIT-GUYOD, F. SEIGLE-MURANDI et A. TOE. 1993. Biodegradation of pentachlorophenol by *Micromicetes*. II. *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, and Yeasts. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8: 1-6.
- STEVENS, T. O., T. G. LINKFIELD et J. M. TIEDJE. 1988. Physiological characterization of strain DCB-1, a unique dehalogenating sulfidogenic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2938-2943.
- SYLVESTRE, P., J. HAWARI et R. MAYER. 1991. Sols contaminés par l'industrie de la préservation du bois, extraction et photodéchloration du PCP. Compte rendu, 14ième symposium international sur le traitement des eaux usées. Hôtel Le Méridien, 12-13 novembre 1991. Montréal.
- TIEDJE, J. M., S. A. BOYD et B. Z. FATHEPURE. 1987. Anaerobic degradation of chlorinated aromatic hydrocarbones. *Dev. Ind. Microbiol.* 27: 117-127.
- TOPP, E., R. L. CRAWFORD et R. S. HANSON. 1988. Influence of readily metabolizable carbon on pentachlorophenol metabolism by a pentachlorophenol-degrading *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(10): 2452-2459.
- TRAUNECKER, J., A. PREUB et G. DIEKERT. 1991. Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 416-421.
- US EPA. 1979. "Pentachlorophenol" dans US EPA: Water-related environmental fate of 129 priority pollutants. Vol.II. Washington, D.C. US Environmental Agency. 1-87.
- UTKIN, I., D. D. DALTON et J. WIEGEL. 1995. Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(1): 346-351.
- UTKIN, I., C. WOESE et J. WIEGEL. 1994. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 612-619.
- VALO, R. J., M. M. HAGGBLOM et M. S. SALKINAJA-SALONEN. 1990. Bioremediation of chlorophenol containing simulated grown water by immobilized bacteria. *Wat. Res.* 24(2): 252-258.
- VENKATADRI, K. S. P. TSAI, N. VUKANIC et L.B. HEIN. 1992. Hazardous waste and hazardous materials. 9(3): 21-243.
- WIEGEL, J. 1981. Distinction between the Gram reaction and the Gram type of bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31(1): 88.
- WOLIN, E. A., M. J. WOLIN et R. S. WOLFE. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 238: 2882-2886.
- WU, W. M., L. BHATNAGAR et J. G. ZEIKUS. 1993. Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(2): 389-397.

ZHANG, X., J. JONES et J. ROGERS. 1995. Isolation and partial characterization of an anaerobic dehalogenating microorganism. Congrès de l'American Society of Microbiology. 21-25 mai à Washington. Abstract Q-11, page 401.

ZHANG, X. et J. WIEGEL. 1990. Isolation and partial characterization of a *Clostridium* species transforming *para*-hydroxybenzoate and 3,4-dihydroxybenzoate and producing phenols as the final transformation products. *Microb. Ecol.* 20: 103-121.

