

1-Résumé:

Nous travaillons depuis sept ans à développer, avec le centre Horticole Dumoulin, une méthode efficace et rapide de bioremédiation de sols contaminés aux métaux lourds et aux hydrocarbures en utilisant des bactéries génétiquement sélectionnées et des plantes hyperaccumulatrices. Nous avons ainsi réduit de façon importante les concentrations de plomb (46,3 %), de cadmium (63 %) et de zinc (31 %) dans le sol ($p < 0.05$). Cependant, pour maintenir cet effet bénéfique, un traitement régulier du sol avec nos bactéries était nécessaire. Ce problème est connu dans le domaine de la bioremédiation et fait obstacle à l'utilisation à grande échelle de cette technique. Pour essayer de solutionner le problème, nous avons encapsulé nos bactéries (*Bacillus velenzensis* 1A1) dans des billes d'alginate et de chitosane afin d'augmenter leur persistance dans le sol. Nous avons mené des expériences en pots et sur le terrain pour déterminer la présence de nos bactéries dans le sol par qPCR et ddPCR. Nous avons alors observé que l'encapsulation en billes d'alginate augmentait la persistance de nos bactéries de 4,5 fois plus dans le temps comparativement aux bactéries libres. Ces résultats préliminaires sont prometteurs et d'autres tests sont en cours afin d'optimiser le processus. À la fin, nous espérons trouver une méthode efficace et écologique de décontamination des sols qui serait économiquement avantageuse pour une utilisation généralisée.

2- Méthodologie:

Le but de la présente étude est de vérifier la persistance de nos bactéries dans le sol et voir si leur encapsulation augmente celle-ci de façon significative. Deux types d'expériences ont été effectuées; sur le terrain et en pots.

A- Expérience de persistance:

Pour les expériences sur le terrain (2022 et 2023), le secteur à traiter a été délimité en quadra selon la figure 1, soit: contrôle (sans bactéries), bactéries libres, bactéries encapsulées et billes vides. Des prélèvements de sol étaient effectués aux deux semaines pendant une période de 3 mois. Les échantillons étaient gardés à -20° C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Pour les expériences en pots, les pots et le sol étaient stérilisés avant l'expérience. Par la suite, 40g de sol était disposé dans les pots et quatre groupes étaient constitués, soit: contrôle, bactéries libres, bactéries + billes et billes vides. Après inoculation et brassage, les pots ont été incubés à 20 °C et 60% d'humidité relative dans une chambre environnementale. Des prélèvements de sol ont été effectués aux temps 0, 3, 6, 10 et 14 jours.

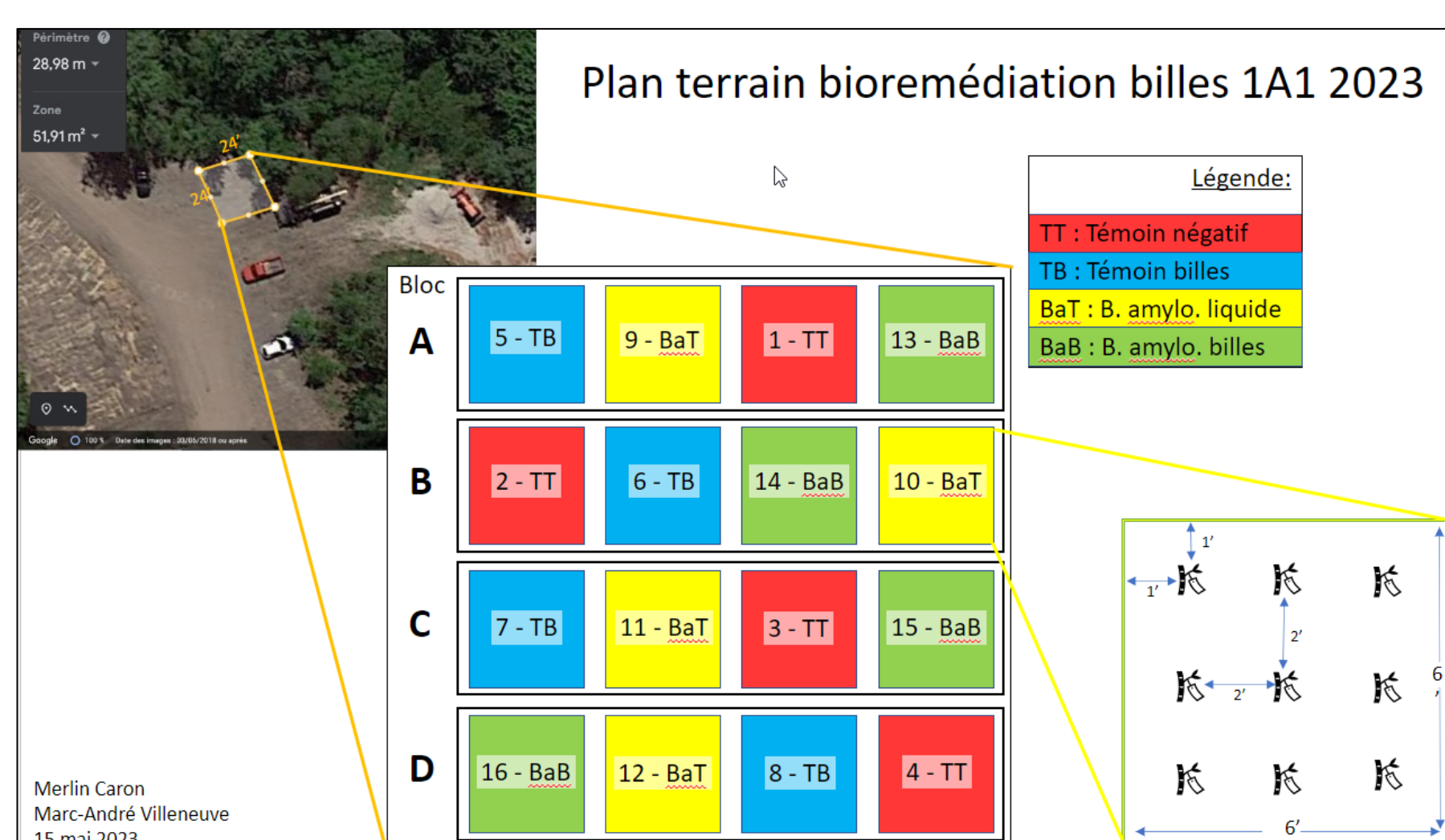


Figure 1: Plan des expériences sur le terrain (été 2023)

B- Isolation de l'ADN génomique du sol

Afin de déterminer la persistance de notre bactérie libre et encapsulée lors de nos expériences de bioremédiation (sur le terrain et en laboratoire), 250 mg d'échantillons de sol étaient prélevés et traités avec la trousse d'extraction E.Z.N.A. soil extraction kit (Oméga Bio-Tek) afin d'extraire l'ADN génomique.

C-qPCR et ddPCR:

Une fois cet ADN extrait, 20 µl étaient envoyés à l'institut d'immunologie et de cancérologie (IRIC) de l'Université de Montréal pour faire des qPCR et/ou ddPCR avec nos échantillons. Les amorces utilisées pour faire les PCR ont été développées à partir des séquences de nos bactéries (WGS par Illumina, Génome Québec). Deux paires d'amorces ont été utilisées soit une spécifique pour notre bactérie (*Bacillus velenzensis* 1A1, IR7794: 5'-3': ACGCCTTGGCATTGTAGTGA, 3'-5': CGGCAAGCTTGATCAGATC) et l'autre pour l'ARN 16S des bactéries du sol comme contrôle endogène (IR7856,5'-3': CCACACTGGGACTGAGACAC, 3'-5': CAGACTTTCGTCCATTGCGG)¹.

D- Analyse des résultats: Afin de comparer la persistance de nos bactéries dans le sol, l'expression de l'ADN génomique de nos bactéries était comparée au sol contrôle contenant les bactéries endogènes. Dépendamment si l'expérience était faite en pot ou sur le terrain, nous utilisons le signal de fond pour soustraire les bactéries endogènes des bactéries ajoutées.

3-Résultats

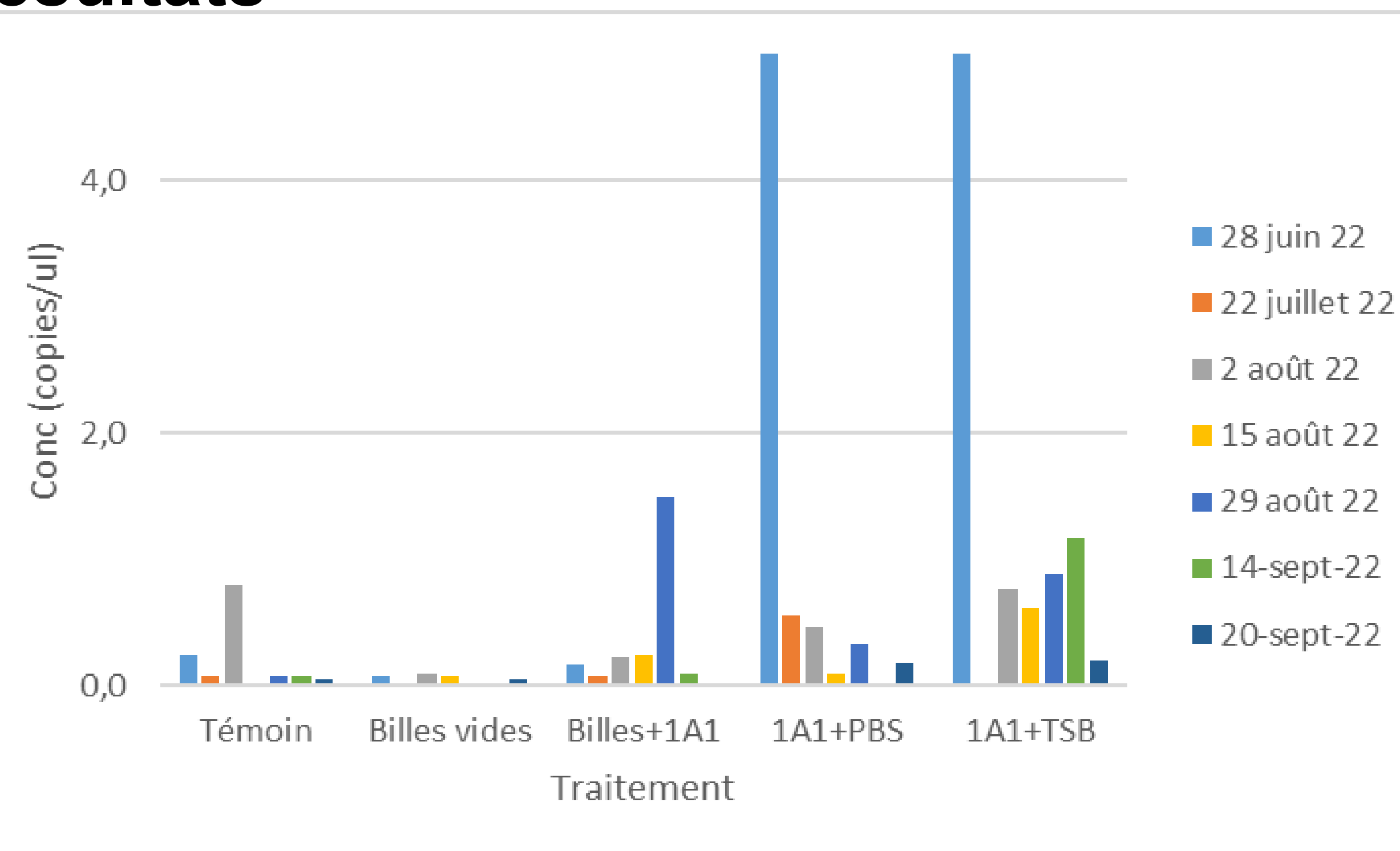


Figure 2: Concentration de l'ADN génomique de *Bacillus velenzensis* 1A1 dans des échantillons de sol selon les traitements par ddPCR. Afin de normaliser nos données, la détection du gène 16S était également fait sur nos échantillons. Été 2022.

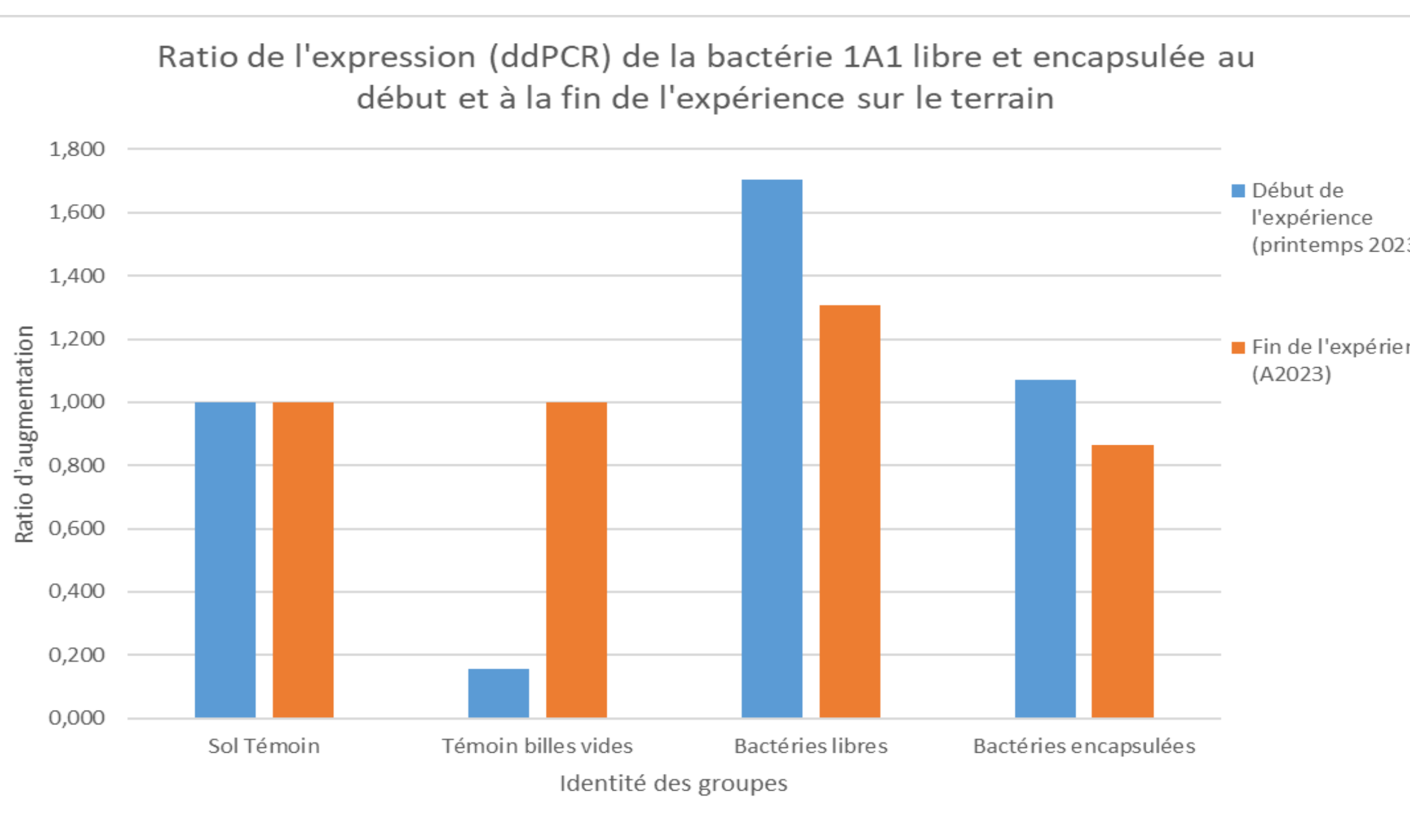


Figure 3: Persistance de *Bacillus velenzensis* 1A1 dans des échantillons de sol au début et à la fin de notre expérience sur le terrain par ddPCR. Afin de normaliser nos données, la détection du gène 16S était également fait sur nos échantillons¹. Été 2023.

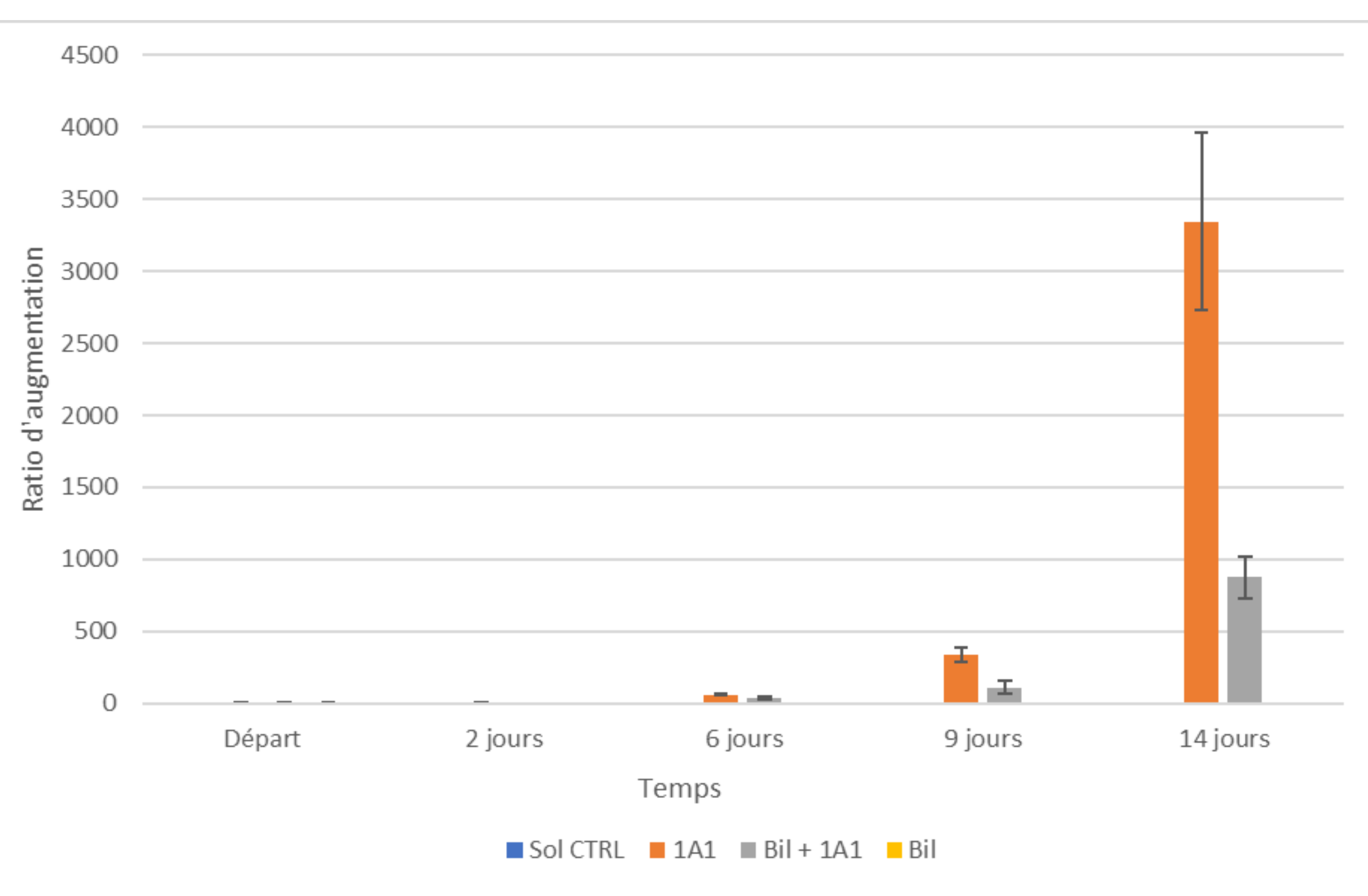


Figure 4 : Persistance de *Bacillus velenzensis* 1A1 dans des échantillons de sol en pots dans le temps selon différents traitements. Les données sont exprimées en ratio d'augmentation par rapport au contrôle sans bactérie¹. Afin de normaliser nos données, la détection du gène 16S des bactéries totales dans le sol a été fait sur nos échantillons.

4- Analyse

A- Résultats sur le terrain:

Puisque le sol contient plusieurs différentes bactéries, nous avons fait un ddPCR (plus sensible) pour détecter la présence de notre bactérie selon les traitements. La figure 2 montre la présence de la bactérie 1A1 dans le sol sur une période de trois mois pour l'été 2022. Comme on peut le voir sur la figure 2, les bactéries encapsulées (T3) sont libérées progressivement, jusqu'à un maximum de 4,5 fois plus que le contrôle à la fin du mois d'août. Pour les bactéries libres (T4 et T5), leur présence est surtout plus forte au début de l'ensemencement et diminue progressivement dans le temps.

La figure 3 montre le ratio d'augmentation de nos bactéries dans le sol pour une expérience effectuée sur le terrain en 2023. Cependant, les échantillons de sol ont été prélevés seulement au début et à la fin de l'expérience. Nous observons que la bactérie 1A1 sous forme libre est 1,7 fois plus présentes au début de l'expérience. Sa présence diminue à 1,3 fois à la fin de la saison. Pour les bactéries encapsulées, leur présence est de 1,1 fois plus au début de l'expérience pour être à 0,90 à la fin. Ces résultats sont encourageants, mais plus de prises d'échantillonnage doivent être effectuées pour avoir une meilleure idée de la persistance. Certes il y a moins de bactéries au départ, mais celles-ci sont libérées de façon continue (figure 2). À la fin de la saison, leur niveau est quand même acceptable.

B-Expérience en pots:

Afin de mieux contrôler les conditions et mieux voir la persistance de nos bactéries dans le sol, des expériences en pots ont été effectuées avec un échantillonnage plus serré. La figure 4 montre la présence de nos bactéries selon le traitement sur une période de 14 jours par qPCR. Nous voyons que le traitement de bactéries libres augmente de 276% entre le jour 6 et 9. Cette augmentation est de 3010% entre le jour 9 et 14. Pour les bactéries encapsulées, l'augmentation est plus progressive. Entre le jour 6 et 9, il y a une augmentation de 75% et de 763% entre le jour 9 et 14. Cela démontre que nos bactéries libres persistent dans le sol et sont capables de proliférer dans les bonnes conditions. Pour nos bactéries encapsulées, nous voyons qu'elles sont libérées progressivement durant la période évaluée. C'est ce que nous recherchons. Par contre, plus d'échantillonnage devra être effectué pour une période à des temps plus longs afin de voir si les bactéries encapsulées persistent plus longtemps que les bactéries libres.

5-Conclusion

Les résultats obtenus montrent que nous pouvons détecter nos bactéries dans nos échantillons afin de déterminer leur persistance. De plus, nous voyons que les bactéries encapsulées sont libérées plus tardivement dans le sol comparativement aux bactéries libres. Par contre, le relâchement, n'est pas encore selon les paramètres recherchés. D'autres tests sont en cours afin de trouver la formulation qui nous donnera le plus de relâchement progressif et une persistance accrue durant le traitement.

6- Référence:

1- Lima A., França A., Muzny C.A., Taylor C.M. et Cerca N. DNA extraction leads to bias bacterial quantification by qPCR. Applied microbiology and biotechnology (2022) 106: 7993-8006.

7- Remerciements et contact

Nous tenons à remercier notre partenaire, le centre horticole Dumoulin, le Collège Montmorency, le CRSNG et le FRQNT pour leur support financier.
 Courriel: ssachetelli@cmontmorency.qc.ca.
 Site Web: <https://www.cmontmorency.qc.ca/college/recherche-au-college/au-college/chercheurs-et-chercheuses/>