

RÉSUMÉ

Titre : Mise au point de techniques de caractérisation microbienne des roches sédimentaires à faible perméabilité
Rapport n° : NWMO TR-2013-17
Auteurs : Greg F. Slater¹, Duane P. Moser², Barbara Sherwood Lollar³
Société : ¹Université McMaster, ²Desert Research Institute, ³Université de Toronto
Date : Décembre 2013

Résumé

La mise au point de techniques de caractérisation des populations microbiennes indigènes potentielles dans les roches sédimentaires à faible perméabilité a été entreprise pour six échantillons de schiste, de schiste et de calcaire interstratifiés, de dolomie argileuse et de calcaire argileux suivant des approches à base d'analyses des acides gras phospholipides (PLFA), de techniques de génétique moléculaire et d'analyses microbiologiques traditionnelles. Pour contourner les propriétés intrinsèques de ces échantillons (par exemple, la faible biomasse et la salinité et le contenu en argile élevés), des travaux exhaustifs de mise au point de méthodes et de comparaisons avec groupes témoins ont été entrepris. Pour caractériser les sources probables de contamination, des échantillons d'eau de forage ont été recueillis et analysés en conjonction avec chacun des échantillons rocheux. De plus, le contenu en PLFA et ADN des surfaces extérieures des échantillons a été analysé et les résultats ont été comparés à ceux de l'eau de forage et de l'intérieur des échantillons. Des sous-échantillons vierges ont été extraits de l'intérieur des carottes rocheuses après avoir retranché une épaisseur minimale de 5 mm à la surface à l'aide d'un diviseur hydraulique en pulvérisant l'intérieur des échantillons dans des conditions stériles. Les procédés de cytométrie en flux, de microscopie et de culture, ainsi que les analyses du contenu en PLFA et en ADN n'ont permis de détecter que des quantités négligeables de microorganismes dans l'eau de forage. Il est présumé que la salinité élevée (1100 kg/m³) de cette eau pourrait avoir lysé la majorité des cellules microbiennes initialement présentes dans l'eau douce du lac Huron qui a servi à préparer l'eau de forage, ayant pour résultat des conditions de forage presque aseptiques.

Le contenu en PLFA a été quantifié pour tous les intérieurs des échantillons rocheux. Les densités cellulaires obtenues étaient de $\sim 1 - 3 \times 10^5$ cellules/gramme de roche, soit approximativement un ordre de grandeur au-dessus de la limite calculée de détection pour l'analyse du contenu en PLFA (3×10^4 cellules/gramme de roche). Cette abondance en cellules correspond aux quantités les plus faibles signalées pour des systèmes oligotrophes, sauf dans le cas de certains rapports récents sur des sédiments oligotrophes marins. Les concentrations en PLFA pour les volumes rocheux estimatifs échantillonnés par rinçage des surfaces étaient comparables à celles de l'intérieur des échantillons, sauf dans deux cas, où les concentrations étaient d'un ou deux ordres de grandeur supérieures. Les répartitions de PLFA pour l'intérieur des échantillons et les échantillons de rinçage extérieur étaient uniques pour tous les échantillons analysés, ce qui est indicateur de sources distinctes en termes de profondeur d'échantillonnage et de méthode (rinçage extérieur et extraction de l'intérieur des carottes). De même, les répartitions uniques des molécules organiques présentes comme alcanes et/ou mélanges complexes indéterminés dans chaque échantillon indiquent une distinction entre les échantillons de lithologies distinctes. Par contre, contrairement à l'analyse de la concentration en PLFA, les études basées sur des techniques d'amplification d'ADN (gène 16S rARN) n'ont pas

permis de détecter des preuves de la présence de microorganismes indigènes à partir des échantillons d'eau de forage ou de roche. Ces échantillons contenaient soit de l'ADN microbien à des quantités inférieures aux limites de détection (ou en étaient entièrement exempts) ou possédaient une caractéristique qui dégradait ou fixait l'ADN libre, empêchant donc sa détection. Par des procédés optimisés d'extraction de l'ADN et des protocoles d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) intensifs (par exemple, des nombres élevés de cycles de PCR, PCR nichée dans certains cas, ou l'utilisation d'amorces hautement dégénérées pour le séquençage des pyrotags), des traces amplifiées d'ADN bactérien ont été détectées à partir de tous les échantillons, y compris les échantillons témoins. Des comparaisons exhaustives de 454 pyrotags et de résultats de clonothèques traditionnelles ont révélé que cet ADN était sans doute le résultat d'une faible contamination des réactifs. Une telle amplification des réactifs/contaminants liés aux procédés posera une difficulté dont il faudra toujours tenir compte au cours de l'analyse des roches à faible biomasse. L'inhibition de la récupération d'ADN a également été observée dans ces échantillons puisque les étalonnages des limites de détection basés sur l'ajout de cellules bactériennes indiquaient que l'ADN ne pouvait être récupérée des échantillons contenant 4×10^5 cellules/gramme ou plus. La cause de cette inhibition n'a pu être déterminée. Les faibles limites de détection de l'ADN liées à nos travaux étaient peut-être attribuables à la sorption élevée de l'ADN par les particules d'argile ou à la présence de composés organiques inhibant l'amplification de l'ADN.

Globalement, les résultats obtenus à partir de cet ensemble d'échantillons indiquent que ces roches à faible porosité contiennent, tout au plus, de très faibles teneurs en biomasse, comparables aux densités cellulaires observées dans les sédiments marins oligotrophes. Toutefois, deux mises en garde doivent être faites. En premier lieu, les faibles limites de détection observées dans le cas des méthodes à base d'ADN par rapport aux résultats de PLFA signifient que les deux méthodes ne peuvent être directement comparées dans le cadre de cette étude. Une optimisation supplémentaire des protocoles d'extraction et de purification de l'ADN pourrait contribuer à surmonter cette contrainte. En second lieu, les estimations du nombre de cellules faites à partir des PLFA sont basées sur les taux de renouvellement utilisés dans le cadre d'études expérimentales réalisées en surface et dans des systèmes à faible profondeur. Les taux de renouvellement des PLFA caractéristiques de ces milieux souterrains profonds à faible biomasse, à salinité élevée et à faible porosité restent à déterminer. Si les taux de renouvellement des PLFA sont beaucoup plus faibles dans ces systèmes, les densités cellulaires estimées constitueraient une exagération du nombre de cellules viables présentes. Au-delà des caractéristiques de cet échantillon précis, l'approche expérimentale et analytique élaborée pour cette étude permet d'évaluer efficacement les systèmes à faible biomasse et devrait aider à élaborer les futurs plans d'investigation de sites destinés à détecter et à caractériser la vie au sein de milieux peu perméables à faible biomasse envisagés pour l'établissement d'un dépôt géologique en profondeur.