

RÉSUMÉ

Titre : Mise au point de techniques de caractérisation microbiologique pour la roche cristalline
Rapport n° : NWMO-TR-2018-05
Auteurs : Greg F Slater¹, Josh Neufeld² et Barbara Sherwood Lollar³
Société : ¹Université McMaster ²Université de Waterloo ³Université de Toronto
Date : Avril 2018

Résumé

La mise au point de techniques de caractérisation des communautés microbiennes indigènes potentielles dans les milieux de roche cristalline a été entreprise en utilisant des carottes forées sur le site de Grimsel, en Suisse. D'après des rapports antérieurs, on prévoyait trouver de faibles abondances des microorganismes (10^3 - 10^4 cellules/ml) dans les échantillons d'eau. L'hypothèse avancée était que la matrice rocheuse inaltérée serait stérile, ce qui permettrait d'évaluer de manière efficace les limites de détection. Les approches utilisées ont été adaptées de méthodes mises au point antérieurement pour des carottes de roche sédimentaire (NWMO-TR-2013-17). Une combinaison d'approches basées sur le dénombrement des cellules, l'analyse des acides gras phospholipides (PLFA) et l'analyse de génétique moléculaire ont été utilisées pour caractériser des échantillons d'eau filtrée et de carotte rocheuse. Les échantillons d'eau ont été recueillis avant, pendant et après les activités de forage et comprenaient des échantillons de fluide de forage et d'eaux souterraines. Une carotte rocheuse a été extraite et des échantillons prélevés sur les surfaces extérieures et dans la partie intérieure inaltérée ont été caractérisés. Des échantillons inaltérés de la carotte ont été recueillis en retirant 0,5 à 1 cm de la surface externe de la carotte, puis en pulvérisant des segments intérieurs de la carotte dans des conditions stériles. Étant donné la quantité faible de biomasse attendue relativement pour ces échantillons, un programme exhaustif d'essais à blanc et de comparaisons de contrôle a été appliqué.

Les résultats de l'analyse des PLFA et de l'analyse génétique moléculaire ont fourni pour tous les échantillons rocheux des indices négligeables de biomasse microbienne, ce qui est conforme à l'hypothèse de la stérilité. Le dénombrement des cellules n'a pas été appliqué aux échantillons solides. Les limites de détection de l'analyse des PLFA ont été repoussées relativement aux travaux antérieurs (NWMO-TR-2013-17) par l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse avec détection à ionisation de flamme (CPG-DIF). Le blanc analytique de laboratoire a été caractérisé ainsi : 435 ± 235 pmol de PLFA pour 100 microlitres, ce qui, d'après les facteurs de conversion standard, est équivalent à une limite de détection de $1,8$ à $4,3 \times 10^4$ cellules/g pour une extraction de 400 g. Les essais procéduraux à blanc indiquent qu'en dépit des meilleurs efforts, la manipulation et le traitement des masses importantes (approximativement 400 g de roche pulvérisée) ont donné lieu à une augmentation légère de la teneur en biomasse des blancs équivalant à 700 à 1 400 pmol, ou 2 à 4×10^5 cellules/g. L'analyse des triplicats d'échantillons de roche pulvérisée a révélé des concentrations de PLFA conformes ou inférieures à celles des blancs procéduraux. Par conséquent, il n'a pas été possible d'interpréter avec assurance que ces échantillons portaient une biomasse bactérienne viable. Une analyse de

génétiq ue moléculaire de sous-échantillons de la même roche pulvérisée a révélé une quantité très faible de biomasse, en de   de la limite de détection de la trousse hautement sensible d'analyse de l'ADNdb Qubit. Les résultats pour le gène ARNr 16S n'ont révélé la présence d'aucune unité taxonomique opérationnelle commune dans les doublons extraits. La quantité d'ADN récupérée était trop faible pour générer des données robustes et reproductibles de s qu n age du gène ARNr 16S propres à chacun des échantillons. Les résultats sont considérés comme inférieurs aux limites de détection, ce qui empêche de tirer des conclusions fiables sur les communautés microbiennes que peuvent abriter ces échantillons rocheux.

Aucun PLFA n'a été détecté à partir des filtres à eau en comparaison avec les échantillons blancs extraits sur le terrain. Le calcul des limites de détection basé sur les volumes d'eau indique que cette non-détection équivaut à une teneur en biomasse inférieure à $0,7 \text{ à } 1,7 \times 10^4$ cellules/ml. L'extraction d'ADN et l'analyse du gène ARNr 16S ont confirmé que la concentration de biomasse était faible dans les échantillons d'eau souterraine et de fluide de forage. L'analyse d'un seul échantillon (eau souterraine provenant du sondage 13.001) a révélé que les quantités d'ADN étaient suffisantes pour permettre une quantification à l'aide de la trousse hautement sensible d'analyse de l'ADNdb Qubit. Lorsque l'ADN a été extrait de seulement 60 à 150 ml de fluide de forage, les résultats du s qu n age du gène ARNr 16S n'étaient pas suffisamment fiables pour permettre de plus amples analyses et la teneur de ces échantillons en ARNr 16S fut par conséquent considérée comme inférieure à la limite de détection. La filtration de liquide de forage ou de sondage semble essentielle pour recevoir une biomasse suffisante pour générer des données robustes et reproductibles de s qu n age du gène ARNr 16S propres à chacun des échantillons. Les résultats de cette étude démontrent qu'une quantité très faible de biomasse est présente dans ces échantillons, soit moins de $2 \text{ à } 4 \times 10^5$ cellules/g. D'après les approches actuelles, ces valeurs peuvent être considérées comme les limites de détection pour ces matrices. Les limites de détection des trois approches utilisées (PLFA, analyse de g n tiq ue moléculaire, dénombrement des cellules)  taient comparables. Ce fait indique que dans les systèmes où les volumes d'eau présents sont faibles et/ou les fluides introduits lors des opérations de forage ont probablement contaminé de façon importante l'eau *in situ*, l'analyse des carottes rocheuses pourrait constituer une technique supplémentaire importante pour évaluer la présence potentielle de biomasse vivant dans les microfissures ou les espaces interstitiels.