

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

CHRISTINE GUAY

DÉGRADATION DE COMPOSÉS AROMATIQUES PAR DES ALGUES
MICROSCOPIQUES

NOVEMBRE 1996

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	ix
SOMMAIRE	xi
INTRODUCTION	1
REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
1. Introduction	5
2. La photosynthèse chez les algues	5
2.1. Description du chloroplaste	6
2.2. Biochimie de la photosynthèse	7
3. Les algues en environnement	8
3.1. Traitement des eaux usées municipales	8
3.2. Enlèvement des nitrates et des phosphates	9
3.3. Enlèvement des métaux	10
3.4. Enlèvement des composés organiques	11
4. La biodégradation des composés aromatiques	14
4.1. Biodégradation par les algues	14
4.1.1. Dégradation partielle	14
4.1.2. Source d'azote	15
4.1.3. Minéralisation	16
4.1.4. Co-oxydation	17
4.1.5. Produits extra-cellulaires et cellules brisées	17
4.1.6. Acclimatation	20
4.2. Biodégradation par des chloroplastes isolés	20
4.3. Biodégradation par les bactéries	21
4.3.1. Cyanobactéries	22
4.3.2. Bactéries phototrophes	22

5.	La dégradation abiotique des composés utilisés	23
5.1.	Pentachlorophénol	23
5.2.	Autres composés employés	24
6.	La méthodologie	25
6.1.	Milieux de culture	25
6.2.	Illumination	25
6.3.	Aération	26
6.4.	Agitation	27
6.5.	Température	27
6.6.	pH	27
 MATÉRIEL ET MÉTHODES		29
1.	Algues utilisées	30
2.	Milieux de culture	30
3.	Obtention de biomasse	33
3.1.	Étapes de la culture en réacteur	33
3.2.	Conditions d'incubation des réacteurs	36
4.	Protocole pour les essais de dégradation	36
4.1.	Préparation	36
4.2.	Incubation	38
4.3.	Essais de dégradation	39
4.4.	Suivi	39
4.4.1.	Croissance des algues	40
4.4.2.	Produits et métabolites	41
4.4.2.1.	Chromatographie liquide à haute performance CLHP	41
4.4.2.2.	Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse CG/SM	42
5.	Description détaillée des essais	44
5.1.	Pentachlorophénol	44
5.2.	2,4-dinitrophénol	45
5.3.	4-nitroaniline	46

5.4.	Acide 4-aminobenzoïque	46
5.5.	Phénol	47
5.6.	<i>p</i> -crésol	47
RÉSULTATS		48
1.	Pentachlorophénol	49
1.1.	Contrôles abiotiques	49
1.1.1.	Milieu O à la lumière	51
1.1.2.	Milieu O à l'obscurité	51
1.1.3.	Eau déminéralisée	52
1.1.4.	Surnageants de cultures	53
1.1.5.	Algues mortes à l'obscurité	53
1.2.	Dégradation du pentachlorophénol par les algues	54
1.3.	Métabolites produits	54
1.4.	Croissance des algues	56
2.	2,4-dinitrophénol	56
2.1.	Contrôles abiotiques	56
2.2.	Dégradation du 2,4-dinitrophénol par les algues	59
2.3.	Croissance des algues	61
3.	4-nitroaniline	61
4.	Acide 4-aminobenzoïque	61
4.1.	Contrôles abiotiques	62
4.2.	Dégradation de l'acide 4-aminobenzoïque par les algues	62
4.3.	Métabolites produits	64
4.4.	Croissance des algues	70
5.	Phénol	71
5.1.	Contrôles abiotiques	71
5.2.	Dégradation du phénol par les algues	72
5.3.	Croissance des algues	74
6.	<i>p</i> -crésol	77
6.1.	Contrôles abiotiques	77
6.2.	Dégradation du <i>p</i> -crésol par les algues	78

6.3. Croissance des algues	79
DISCUSSION	81
1. Choix des algues	82
2. Variantes dans la méthodologie	82
3. Contamination	84
4. Pentachlorophénol	88
5. 2,4-dinitrophénol	89
6. 4-nitroaniline	91
7. Acide 4-aminobenzoïque	91
8. Phénol	93
9. <i>p</i> -crésol	94
CONCLUSION	96
REMERCIEMENTS	99
BIBLIOGRAPHIE	101

LISTE DES TABLEAUX

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Gradient pour l'acide 4-aminobenzoïque en chromatographie liquide à haute performance 42

RÉSULTATS

2. Récupération moyenne du pentachlorophénol dans les contrôles abiotiques à la lumière 51
3. Récupération moyenne du pentachlorophénol dans les contrôles abiotiques à l'obscurité 52
4. Récupération moyenne du pentachlorophénol dans de l'eau déminéralisée 52
5. Récupération moyenne du pentachlorophénol dans les surnageants de cultures 53
6. Récupération moyenne du pentachlorophénol incubé avec les algues 55
7. Récupération moyenne du 2,4-dinitrophénol dans les contrôles abiotiques 58
8. Récupération moyenne du 2,4-dinitrophénol dans de l'eau déminéralisée 58
9. Récupération moyenne de l'acide 4-aminobenzoïque dans les contrôles abiotiques 62
10. Récupération moyenne de l'acide 4-aminobenzoïque dans les cultures de *Chlorella* sp. 63
11. Récupération moyenne de l'acide 4-aminobenzoïque et de l'acide 4-acétamidobenzoïque pour *Chlorella* sp. 70
12. Récupération moyenne du phénol dans les contrôles abiotiques 72

13.	Récupération moyenne du phénol pour <i>Chlorella</i> sp.	73
14.	Récupération moyenne du phénol pour <i>Scenedesmus obliquus</i>	73
15.	pH moyen des échantillons des essais PHÉ V et PHÉ VI incubés à la lumière	76
16.	Récupération moyenne du p-crésol dans les contrôles abiotiques	77
17.	Récupération moyenne du p-crésol pour <i>Chlorella</i> sp.	78
18.	Récupération moyenne du p-crésol pour <i>Scenedesmus obliquus</i>	79

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Représentation schématique d'un thylakoïde 7
2. Voie de dégradation du phénol par *Ochromonas danica* 18

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3. Milieu O : milieu de culture liquide pour la production de biomasse algale ainsi que pour les essais de biodégradation 32
4. Schéma du montage des réacteurs de 4 L utilisés pour générer de fortes densités de biomasse algale 34

RÉSULTATS

5. Récupération moyenne du pentachlorophénol dans les contrôles abiotiques 50
6. Croissance de *Scenedesmus obliquus* dans les essais PCP IX et PCP XII ainsi que la récupération du pentachlorophénol 57
7. Pourcentage de récupération du 2,4-dinitrophénol dans l'essai DNP XVII pour *Scenedesmus obliquus* 60
8. Résumé de la transformation de l'acide 4-aminobenzoïque en acide 4-acétamidobenzoïque 65
9. Chromatogramme de CLHP d'une culture de *Chlorella* sp. après 12 jours d'incubation avec de l'acide 4-aminobenzoïque 66
10. Chromatogramme de CLHP d'acide 4-acétamidobenzoïque authentique 67
11. Chromatogramme et spectre de masse de l'acide 4-acétamidobenzoïque obtenu à partir d'une culture de *Chlorella* sp. 68

12.	Chromatogramme et spectre de masse d'acide 4-acétamidobenzoïque authentique	69
13.	Estimation de la croissance des algues dans les essais avec le phénol	75
14.	Estimation de la croissance des algues dans les essais avec le <i>p</i> -crésol	80

DISCUSSION

15.	Photographie au microscope photonique (400X) d'une culture contaminée de <i>Scenedesmus obliquus</i> avec coloration de Gram	86
-----	---	----

SOMMAIRE

Certaines algues sont connues pour leur potentiel d'utilisation en bioremédiation, particulièrement pour l'enlèvement des nitrates et des phosphates. Toutefois, seulement quelques études ont démontré qu'elles pouvaient dégrader certains produits aromatiques. Les hypothèses suggèrent l'utilisation de ces produits comme sources d'azote ou de carbone ou encore leur transformation indirecte due au système photosynthétique.

La présente étude porte sur la dégradation de certains produits aromatiques par deux algues microscopiques d'eau douce bien connues : *Scenedesmus obliquus* (ATCC #11457) et *Chlorella* sp. (ATCC #7516). Elles ont été exposées à plusieurs polluants aromatiques dont le pentachlorophénol, le 2,4-dinitrophénol, le phénol, et le *p*-crésol et ce, dans diverses conditions. Des essais ont été effectués avec différentes quantités de biomasse, différentes concentrations de produits et différentes conditions d'éclairage. Le suivi de la croissance (par densité optique et mesure du pH) a été fait parallèlement au suivi du produit par chromatographie liquide à haute performance.

Dans ces conditions, les algues tolèrent assez bien les produits testés : la croissance est peu affectée, mais dans plusieurs cas, les produits ne sont pas utilisés, ni transformés par les algues. Par contre, les deux espèces d'algues dégradent le phénol et le *p*-crésol. De plus, *Chlorella* sp. transforme une partie de l'acide 4-aminobenzoïque en acide 4-acétamidobenzoïque.

INTRODUCTION

Les algues, étant autotrophes, s'avèrent intéressantes pour les traitements de bioremédiation puisque pour qu'il y ait croissance et maintien des activités physiologiques, aucune source de carbone supplémentaire ne doit leur être fournie si elles sont exposées à la lumière et s'il y a une aération suffisante. De plus, les algues microscopiques sont en général assez résistantes aux composés xénobiotiques retrouvés dans l'environnement.

Plusieurs études ont été effectuées quant à la dégradation de nombreux composés aromatiques par celles-ci. Il y a souvent dégradation de ces produits, mais les mécanismes impliqués dans ces réactions ont été peu étudiés. Toutefois, quelques publications concernent le mécanisme de réduction de composés aromatiques par des chloroplastes d'épinards isolés et illuminés.

À partir de ces deux groupes de travaux, nous avons établi l'hypothèse que la dégradation de certains composés aromatiques par les algues pourrait impliquer leur système photosynthétique. Une réduction des composés serait effectuée par la chaîne de transport des électrons dans le chloroplaste.

Ainsi, des groupements chlorés ou nitrés de composés aromatiques pourraient être réduits par les algues, rendant ces composés plus facilement dégradables par les systèmes enzymatiques des algues ou de bactéries.

Ce projet avait deux objectifs : d'une part, vérifier l'hypothèse mentionnée précédemment et d'autre part, confirmer les résultats publiés quant à la biodégradation de composés phénolés par des algues.

Les essais de dégradation ont été faits en laboratoire avec deux algues vertes microscopiques, *Chlorella* sp. et *Scenedesmus obliquus*. Toutes les essais de dégradation ont été faits en flacons contenant 100 mL de culture pendant une période maximale de 12 à 42 jours.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Introduction

Les algues microscopiques ne font l'objet de recherches plus intensives que depuis les cinquante dernières années. On s'intéresse à leurs qualités nutritionnelles pour les animaux, les êtres humains et aussi pour les plantes (en tant qu'engrais). On les étudie aussi pour en tirer différents colorants, vitamines, antibiotiques et autres composés d'intérêt médical. Elles sont employées depuis plusieurs années dans des tests de toxicité de composés xénobiotiques. Plus récemment, on désire les exploiter dans des procédés de biotraitement des eaux et des sols contaminés. De plus, selon les traitements qui sont requis, il peut parfois être possible de combiner différentes utilisations pour les algues. Par exemple, après avoir épuisé les nitrates et les phosphates d'eaux usées non toxiques, elles peuvent être récupérées pour l'alimentation animale (Cannell, 1990 ; de la Noüe et de Pauw, 1988).

2. La photosynthèse chez les algues

Les algues sont toutes eucaryotes, puisque les cyanobactéries (autrefois appelées algues bleu-vert) sont désormais incluses dans le groupe des bactéries. Les algues microscopiques sont très variées: elles peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires ; être mobiles ou immobiles ; contenir différents pigments photosynthétiques ; croître en eau douce ou en environnement marin ; etc.

Les algues ont toutes un point commun : l'avantage d'être autotrophes, c'est-à-dire qu'elles peuvent fabriquer leurs sucres à partir de matière inorganique, et ce, grâce à la photosynthèse, qui permet la conversion du gaz carbonique en glucides en présence de lumière.

Il y a deux étapes à la photosynthèse. Premièrement, les photosystèmes captent l'énergie lumineuse en formant de l'adénosine triphosphate (ATP) et en réduisant le nicotiamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Deuxièmement, le cycle de Calvin, dans le stroma, fixe le CO_2 en formant des molécules de sucres.

2.1. Description du chloroplaste

La photosynthèse a toujours lieu dans le (ou les) chloroplaste(s). Ces organites sont entourés d'une double membrane et l'intérieur est appelé stroma. Le stroma contient un ensemble de membranes photosynthétiques qui sont repliées pour former de petits sacs : les thylakoïdes. La membrane des thylakoïdes contient différents pigments photosynthétiques dont les chlorophylles qui varient selon les espèces d'algues. Ces pigments, ainsi que les composés accepteurs d'électrons, sont regroupés en amas qui se nomment des photosystèmes (PS). Il y a deux photosystèmes impliqués dans la photosynthèse : un dont le pic d'absorption de la lumière est à 700 nm (PS I) et l'autre à 680 nm (PS II).

2.2. Biochimie de la photosynthèse

Un photon frappe une molécule de chlorophylle du PS I et entraîne la libération d'un électron. Une chaîne de molécules transporte l'électron pour réduire le NADP^+ en $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

Un autre photon frappe le PS II et celui-ci fournit un électron pour remplacer celui perdu par le PS I. Puis le PS II scindera une molécule d'eau en $1/2 \text{O}_2$ et 2H^+ pour récupérer un électron. L'oxygène sera libéré par l'algue et les protons générés forment un réservoir qui servira de gradient pour la phosphorylation de l'ADP en ATP (figure 1).

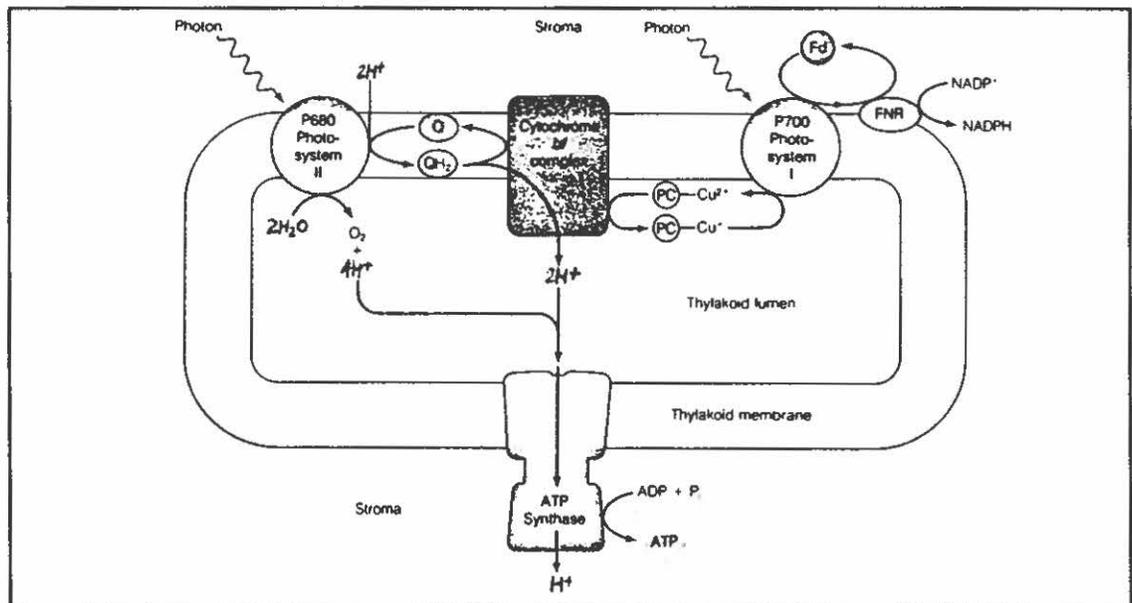


Figure 1. Représentation schématique d'un thylakoïde (Mathews et van Holde, 1990)

Le NADPH et l'ATP servent au cycle de Calvin, qui consiste en la fixation du CO_2 au ribulose diphosphate. Puis par une succession d'étapes, on obtient des hexoses qui servent de réserves glucidiques pour l'algue et il y a régénération du catalyseur, le ribulose diphosphate.

3. Les algues en environnement

Les traitements environnementaux potentiellement effectués par les algues sont variés. Elles sont utilisées pour la dégradation de toutes sortes de substrats avec plus ou moins d'efficacité. Ces traitements sont principalement axés sur l'épuration des eaux usées ou pour l'enlèvement de certains composés dans divers effluents. La possibilité d'appliquer certains de ces traitements au Québec a été démontrée par des essais extérieurs faits pendant l'été (Van Coillie *et al.*, 1990).

3.1. Traitement d'eaux usées municipales

Les algues facilitent le traitement des eaux usées en fournissant de l'oxygène aux bactéries qui dégradent la matière organique (Palmer, 1980). De plus, les algues vont indirectement accélérer la destruction des coliformes et des microorganismes pathogènes par

une augmentation du pH de l'eau car selon la source d'azote qui est présente, les algues peuvent alcaliniser sensiblement le milieu (Oswald, 1992).

3.2. Enlèvement des nitrates et phosphates

Les algues, en général, ont tendance à croître démesurément dans les cours d'eau où l'équilibre des nitrates et des phosphates est débalancé, ce qui accélère le processus d'eutrophisation, puisque suite à cette explosion de croissance, les algues vont mourir à cause de l'épuisement du milieu. Leur dégradation subséquente, par des bactéries aérobies, va amener une raréfaction de l'oxygène dans l'eau, causant l'asphyxie des autres organismes.

L'eutrophisation est un processus naturel, mais il est grandement amplifié par les industries humaines. Ainsi, certains effluents industriels, en agriculture ou en production alimentaire par exemple, de même que les eaux usées municipales peuvent contenir beaucoup trop de nitrates et de phosphates pour être déversées directement dans l'environnement. Par conséquent, les algues qui utilisent les nitrates et les phosphates pour croître peuvent servir à un traitement tertiaire de ces eaux et ensuite elles sont récupérées avant que l'eau ne soit évacuée dans les cours d'eaux (de la Noüe et de Pauw, 1988 ; Hammouda *et al.*, 1995)

3.3. Enlèvement des métaux

On rapporte dans la littérature, l'enlèvement de nombreux métaux et autres cations par les algues. On parle d'enlèvement de chrome, d'uranium, d'or, d'argent, de cuivre, de cobalt, de fer, de manganèse, de plomb, de strontium, de mercure, de nickel, de cadmium, d'arsenic, de zinc, de calcium et de magnésium par différentes espèces d'algues d'eau douce (Aziz et Ng, 1993 ; Chan *et al.*, 1991 ; Mouchet, 1986 ; Oswald, 1992 ; Robinson et Wilkinson, 1994 ; Wong et Pak, 1992). Le taux d'enlèvement est variable selon les algues impliquées, les ions à enlever et les conditions du milieu (Hammouda *et al.*, 1995).

Les membranes cytoplasmiques des algues possèdent des charges négatives qui sont dues aux groupements phosphates de phospholipides (Rai *et al.*, 1994). Cette charge de surface leur confère une bonne affinité pour les métaux lourds qui sont généralement chargés positivement. De plus, lorsque le pH est basique, les ions ont tendance à être adsorbés dans les floccs d'algues et à se déposer au fond des bassins de traitement (Oswald, 1992).

Selon les travaux de Chan *et al.* (1991) et aussi ceux de Hammouda *et al.* (1995), l'adsorption passive n'est pas le seul mécanisme impliqué pour l'enlèvement des métaux. Il y aurait aussi une absorption active et métabolique des ions par les algues. Elle serait plus rapide que le mécanisme passif selon Chan *et al.* (1991) alors que les travaux de Hammouda *et al.* (1995) indiquent qu'elle serait plus lente. Wehrheim et Wettern (1994) ont montré que des

cellules entières de *Chlorella fusca* accumulent toujours plus de métaux (cadmium, cuivre et plomb) que des parois isolées.

En plus des mécanismes de sorption, l'enlèvement des métaux peut se faire selon d'autres mécanismes : ils peuvent être complexés par des substances sécrétées par les algues ou encore bioaccumulés par celles-ci (Mouchet, 1986).

La bioaccumulation est favorisée chez les algues à cause de leur rapport surface-volume qui est grand, ce qui amène une plus grande surface de contact. Dépendamment de l'hydrophobicité des produits, on peut observer une concentration de produit dans les algues qui peut être beaucoup supérieure à celle dans l'eau. Ce phénomène de bioaccumulation s'applique aussi aux composés organiques.

3.4. Enlèvement des composés organiques

Les composés organiques peuvent avoir divers effets sur les algues. S'ils ne sont pas trop toxiques, les algues peuvent les accumuler, les métaboliser partiellement et même les minéraliser.

La bioaccumulation de composés aromatiques par des algues vivantes est fréquente telle que rapportée par Vance et Drummond (1969) pour les pesticides : les composés Aldrin,

Dieldrin, Endrin et *p-p'*-DDT sont 120 à 270 fois plus concentrés dans les algues que dans le milieu. Geyer *et al.* (1981) notent aussi des facteurs de bioaccumulation importants pour *Chlorella fusca*: 1250 pour le pentachlorophénol, 51 pour le 2, 4, 6-trichlorophénol et 11 pour le *p*-nitrophénol. Cette bioaccumulation est liée au coefficient de partition octanol/eau (K_{ow}) du composé (Swackhamer et Skoglund, 1993), aux espèces d'algues et à la température (Koelmans et Jiménez, 1994).

Des cultures de *Chlamydomonas reinhardtii*, une algue verte, ont été acclimatées aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents sur des particules générées par la combustion de diesel. Après trois jours d'incubation, une diminution de la concentration de sept composés a été observée, soit pour le phénanthrène, le 9-H-fluorène-9-one, le 4-méthylbenzo[c]cinnoline, deux isomères de méthylantracène et deux isomères de diméthylphénanthène. Cette diminution n'est pas observée dans les contrôles abiotiques et de plus, les expériences ont démontré qu'il ne s'agissait pas d'adsorption (Liebe et Fock, 1992).

Une culture mixte de *Chlorella* sp. et de *Scenedesmus obliquus* a été étudiée pour l'enlèvement du chlorobenzène ou du 2,4-dichlorophénol. La culture en mode discontinu montre un enlèvement complet de 50 mg/L des deux produits en un jour. Si la concentration des produits est plus élevée, la durée du traitement est augmentée. En réacteurs, la culture mixte prend quatre à six jours pour enlever 1000 mg/L de chlorobenzène et six à huit jours pour

la même quantité de 2,4-dichlorophénol, le temps nécessaire à une dégradation complète variant selon le débit d'entrée de l'effluent (Wu et Kosaric, 1991).

Il a été démontré que deux espèces d'algues vertes, en cultures denses, dégradent complètement jusqu'à 1000 mg/L de phénol en moins de six jours si auparavant, elles ont été exposées à 400 mg/L de phénol (Klekner et Kosaric, 1992a). Les mêmes auteurs ont montré que le 2,4-diméthylphénol est dégradé par *Chlorella* sp. et qu'il y a apparition de diméthylcatéchol dans le milieu de culture. Dans la même publication, 70 mg/L de 2,4-dinitrophénol sont dégradés par *Chlorella* sp. après une période d'adaptation de 20 jours alors que *Scenedesmus obliquus* dégrade rapidement 190 mg/L de ce composé après une adaptation de seulement 5 jours.

Un autre problème d'ordre environnemental et esthétique est la couleur de certains effluents. Dans le cas d'effluents de pâtes et papiers de type Kraft, la coloration est due à la lignine et à certains groupements dérivés qu'elle contient. Selon Lee *et al.* (1978), les algues permettent de faire un enlèvement partiel de la couleur de ce type d'effluent. Toutefois la teneur totale en carbone organique ne diminue pas, ce qui implique que les algues transforment les produits colorés sans les utiliser comme source de carbone ou d'énergie.

Aziz et Ng (1993) ont observé l'enlèvement de plus de 90% du violet brillant 5R, un colorant azo, en 70 jours pour des concentrations initiales de 10 à 15 mg/L par un mélange d'algues locales.

4. La biodégradation de composés aromatiques

4.1. Biodégradation par les algues

Il n'est souvent question que de bioaccumulation en ce qui concerne les algues, mais en laboratoire, des mécanismes de transformation ou de dégradation des produits ont été élucidés.

4.1.1. Dégradation partielle

Warshawsky *et al.* (1995) ont montré que le benzo[a]pyrène est métabolisé en cis-dihydrodiols par *Selenastrum capricornutum*, une algue verte, par l'intermédiaire d'un système de dioxygénase semblable à celui des procaryotes hétérotrophes. Le benzo[a]pyrène (BaP) et d'autres HAP sont phototoxiques pour les algues probablement à cause de leur transformation en quinones. Le spectre de longueur d'onde utilisé influence le type et la quantité de quinones produites. Les meilleurs résultats de dégradation ont été obtenus en utilisant des fluorescents

“Gold” qui émettent peu dans l’ultraviolet. Ainsi dans ces conditions, après trois jours d’incubation d’une culture de *Selenastrum capricornutum*, on retrouve seulement 1% du BaP dans le milieu, pour une concentration initiale de 160 $\mu\text{g/L}$ et 89,5% sous forme de dihydrodiols.

Parmi 31 espèces de Chlorococcales, quatre présentent une bonne croissance en présence d’alcanes sur milieu solide. *Chlorella vulgaris* Beijerinck (No. 397) métabolise certains alcanes en culture liquide. Cette espèce ne dégrade les alcanes qu’en présence de lumière, ou à l’obscurité, à condition qu’il y ait du glucose dans le milieu de culture (Schröder et Rehm, 1981a).

Une étude comprenant 18 algues représentant les cinq groupes principaux a été effectuée par Cerniglia *et al.* (1980) pour vérifier l’oxydation du naphthalène. Après 24 heures, toutes les cultures ont produit plusieurs métabolites du naphthalène dont ce qui semble être du 1-naphtol.

4.1.2. Source d’azote

Luther (1990) a voulu montrer que *Scenedesmus obliquus* est capable d’utiliser des composés aromatiques nitrés ou aminés comme sources d’azote. Le taux de croissance et la

concentration des pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) des algues seraient proportionnels à la quantité de nitrates disponibles pour les algues. Ainsi, par exemple, dans un milieu de culture où l'acide 4-aminonaphtalène-1-sulfonique est la seule source d'azote, une croissance élevée des algues et une augmentation de la concentration des pigments a été démontrée.

4.1.3. Minéralisation

Les travaux de Ellis en 1977 ont montré que six espèces d'algues d'eau douce minéralisent le catéchol et que quatre d'entre elles font aussi la minéralisation du phénol. De plus, *Scenedesmus basiliensis* ne minéralise le phénol que s'il y a préalablement été exposé. Cette espèce est la seule parmi celles étudiées dont le rendement s'améliore après des expositions successives. L'auteur a émis l'hypothèse qu'il y aurait une sélection de la population capable de faire la minéralisation ou encore une induction de la production d'enzymes de dégradation.

Semple et Cain (1996) ont démontré la minéralisation du phénol par *Ochromonas danica*, une algue brune. Des essais d'une durée de 180 minutes, ont été faits avec du phénol marqué au ^{14}C et 60 à 65% de la radioactivité a été retrouvée sous forme de CO_2 . De plus, ils ont montré la voie de dégradation du phénol par cette algue qui peut croître avec ce produit

comme seule source de carbone si elle est exposée à la lumière (figure 2). Cette algue utilise la même voie de dégradation pour le *p*-crésol.

4.1.4. Co-oxydation

Klekner et Kosaric (1992b) ont émis l'hypothèse que la dégradation des chloro et méthylphénols par *Chlorella* sp. peut être améliorée par la co-oxydation. Leurs essais ont montré des taux de dégradation des chloro- et méthylphénols utilisés qui sont égaux ou inférieurs à ceux obtenus si ces composés avaient été incubés individuellement avec les algues. De plus, la dégradation du phénol s'est avérée plus lente quand les algues ont été incubées avec du 2,4-diméthylphénol ou du 2,4-dichlorophénol en plus du phénol.

4.1.5. Produits extracellulaires et cellules brisées

Des algues tuées à la chaleur phototransforment certains produits (comme l'aniline et le Parathion) à un taux qui est égal ou supérieur à celui d'une culture vivante. Si le surnageant d'une culture vivante est utilisé seul, le taux de la photoréaction diminue. Les contrôles dans le noir ne présentent pas de dégradation. La dégradation observée ne serait pas le fait du

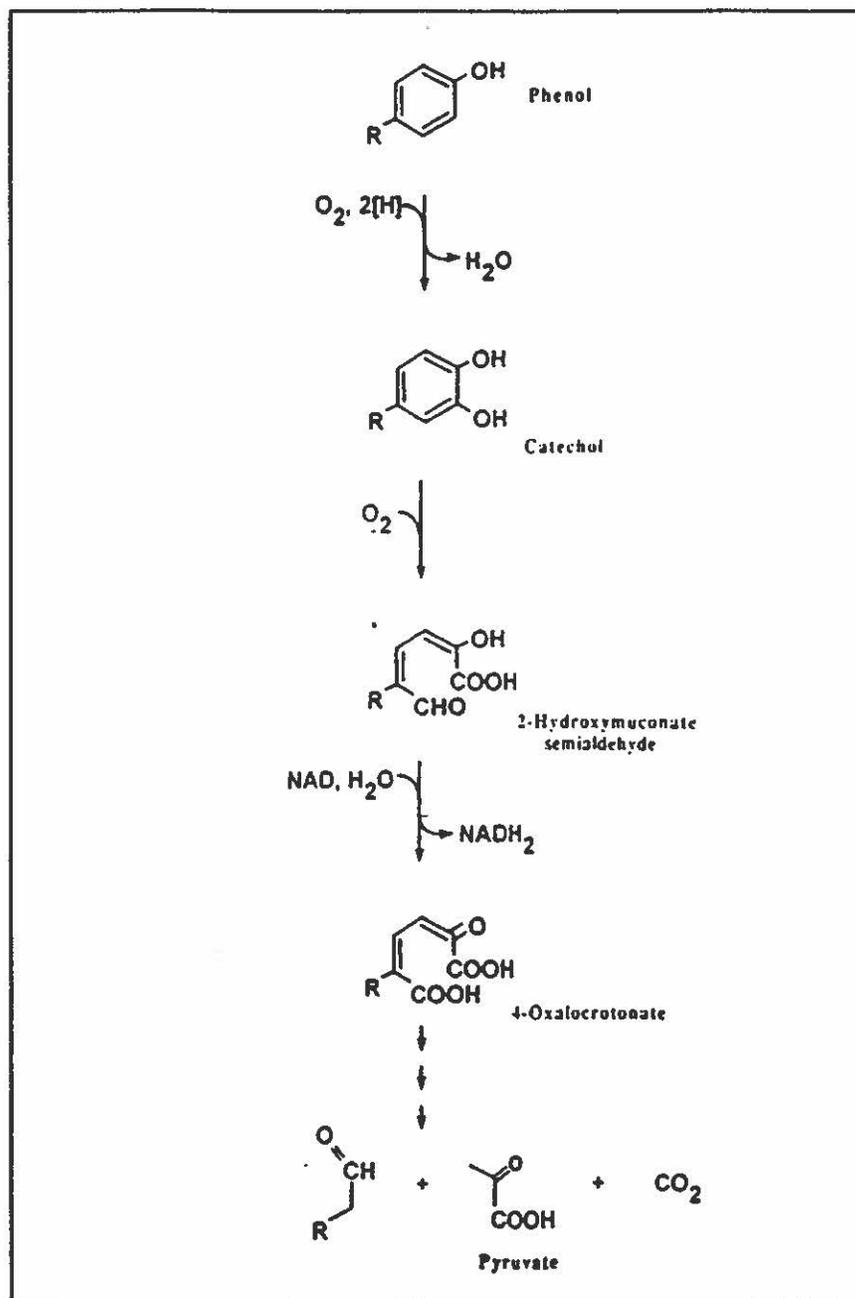


Figure 2. Voie de dégradation du phénol par *Ochromonas danica* (Semple et Cain, 1996)

système photosynthétique des algues puisque les suspensions éclairées par une source lumineuse n'émettant qu'à 665 nm ne présentent pas de dégradation (Zepp et Schlotzhauer, 1983).

La méthode d'inactivation des cellules peut favoriser l'adsorption des produits. Par exemple, les changements de surface occasionnés par une inactivation à l'autoclave causent deux à six fois plus d'adsorption (Amy *et al.*, 1988).

Schröder et Rehm (1981b) ont montré que des cellules brisées de *Chlorella vulgaris* Beijerinck (No. 397) dégradent des alcanes, tel que le n-dodécane, que les cellules en croissance ne dégradent pas. De plus pour les alcanes que les algues vivantes dégradent, on remarque une production d'alcools et de cétones deux fois plus grande si les cellules sont brisées.

Stom *et al.* (1978) ont étudié la dégradation de composés aromatiques (tels que le phénol, le pyrocatechol, l'hydroquinone, le guaiacol et le *p*-crésol) par des plantes et des algues macroscopiques dont l'algue *Nitella* sp.. Un homogénat de cette algue transforme le pyrocatechol à un taux deux fois plus élevé que les cellules entières. Des enzymes contenant du cuivre seraient impliquées dans cette transformation. Des cultures qui ont subi un pré-traitement avec du KCN, qui est un inhibiteur de ce genre d'enzymes, n'ont pas montré un taux de transformation significatif du pyrocatechol.

4.1.6. Acclimatation

Selon les espèces d'algues et les composés impliqués, l'acclimatation peut améliorer ou encore ne pas affecter les rendements de dégradation.

D'après les travaux d'Ellis (1977), *Scenedesmus obliquus* est la seule espèce parmi les six étudiées dont le rendement s'améliore sensiblement après plusieurs expositions aux produits. Liebe et Fock (1992) ont démontré que des algues acclimatées tolèrent 2,5% v/v de HAP extraits de particules générées par la combustion de diesel, alors que le maximum pour des algues non acclimatées est de 0,125%. Il faut aussi ajouter Klekner et Kosaric (1992a) qui montrent que leurs algues dégradent 1000 mg/L de phénol si, auparavant, elles ont été exposées à 400 mg/L. Par contre, Lee *et al.* (1978) n'ont pas vu d'amélioration du taux d'enlèvement de la couleur des effluents de pâtes et papiers après acclimatation des cellules.

4.2. Biodégradation par des chloroplastes isolés

Wessels (1965) a montré que le 2,4-dinitrophénol peut être réduit en 2-amino 4-nitrophénol par des chloroplastes d'épinards isolés. La réaction a lieu à la lumière et le rendement est amélioré en présence de NH_4Cl et aussi en présence de ferrédoxine. D'après l'auteur, comme la ferrédoxine a un rôle important, il est probable que le PS I soit impliqué.

La réduction peut aussi avoir lieu à l'obscurité en anaérobiose, s'il y a du NADPH et de la ferrédoxine. Ces résultats ont été confirmés par del Campo *et al.* (1966). Ils ont montré que le 2,4-dinitrophénol peut être réduit en 2-amino 4-nitrophénol par des chloroplastes d'épinards isolés en présence de lumière ou dans le noir, par l'hydrogène, sans chloroplastes, mais avec une hydrogénase et de la ferrédoxine.

Des essais préliminaires à ce projet ont été effectués par Lépine et Carpentier (résultats non publiés). Ils ont montré que le pentachlorophénol est dégradé très rapidement par des chloroplastes d'épinards isolés et exposés à la lumière.

4.3. Biodégradation par les bactéries

Il y a beaucoup de bactéries qui sont connues pour leur potentiel de dégradation de composés aromatiques. Mais dans le cadre de ce projet, celles qui sont les plus intéressantes sont celles qui utilisent la lumière pour croître. Il y en a deux types : les cyanobactéries et les bactéries phototrophes.

4.3.1. Cyanobactéries

La capacité des cyanobactéries à dégrader des composés aromatiques a été démontrée, mais les mécanismes de dégradation, tout comme chez les algues eucaryotes, sont peu connus.

Les cyanobactéries ont parfois été incluses dans les expériences citées précédemment, comme dans l'étude de Cerniglia *et al.* (1980) par exemple où il a étudié la dégradation du naphthalène par 18 algues dont plusieurs cyanobactéries. Les travaux de Klekner et Kosaric (1992a) montrent que *Spirulina maxima* dégrade les mêmes produits que les algues vertes. L'équipe de Warshawsky *et al.* en 1995 a observé que *Anabaena flos-aquae*, une cyanobactérie, métabolise le benzo[a]pyrène, mais à un taux beaucoup plus lent que les algues vertes étudiées en même temps.

4.3.2. Bactéries phototrophes

Les bactéries phototrophes ont besoin de la lumière pour leur croissance, mais utilisent un autre composé que l'eau comme donneur d'électron et par conséquent, elles ne dégagent pas d'oxygène.

Blasco et Castillo (1992) ont travaillé avec *Rhodobacter capsulatus*, qui est une bactérie phototrophe, anaérobie. Elle dégrade des produits nitrés dont le 2,4-dinitrophénol qui sera

dégradé seulement si l'azote est limitant et s'il y a une autre source de carbone. Toutefois, les mononitrophénols sont utilisés comme sources d'énergie et de carbone.

Kamal et Wyndham (1990) rapportent qu'une bactérie phototrophe dominante dans un consortium anaérobie minéralise le 3-chlorobenzoate en présence de benzoate.

5. La dégradation abiotique des composés utilisés

5.1. Pentachlorophénol

Le pentachlorophénol, en solution aqueuse, est photodégradable. Il peut y avoir deux types de mécanismes lors de la photolyse : une photolyse directe par laquelle le composé absorbe les rayons ultraviolets et une indirecte lorsque l'énergie est absorbée par d'autres substances dissoutes dans l'eau qui vont ensuite la transmettre au composé. Sa demi-vie en eau douce à 3,8 cm de profondeur est de 2,4 heures. La photolyse des phénols polychlorés est cependant négligeable à des profondeurs supérieures à 20 cm en eau douce (Hwang *et al.*, 1986). Selon Mansour *et al.* (1989), la demi-vie du pentachlorophénol en eau distillée est de 2,5 heures et en eau de rivière de 1,5 heures, mais plusieurs facteurs influencent la photodégradation dont la composition, la turbidité et la profondeur de l'eau. La photolyse du pentachlorophénol en

eau distillée produit des tétrachlorophénols, trichlorophénols, dihydroxybenzènes ainsi que des fragments non aromatiques (Hwang *et al.*, 1986).

La photodécomposition du pentachlorophénol est très influencée par le pH : par exemple, une solution de 100 mg/L de pentachlorophénol aura un temps de demi-vie de 100 heures si le pH est de 3,3 et de 3,5 heures si le pH est de 7,3 (Wong et Crosby, 1981). Une solution de pentachlorophénol fermée hermétiquement et placée au soleil pour deux à trois semaines ne contiendra plus de pentachlorophénol, ni aucun des intermédiaires de photodégradation.

Finalement, la vitamine B₁₂ activée [Co(I)] catalyse la déchloration du pentachlorophénol (et de plusieurs autres chloroaromatiques). En 24 heures, 88% du pentachlorophénol est dégradé avec formation de tétra et trichlorophénols par l'enlèvement de chlores en position para ou méta (Smith et Woods, 1994).

5.2. Autres composés employés

Aucune publication concernant une dégradation abiotique importante des autres composés employés n'a été trouvée.

6. La méthodologie

6.1. Milieux de culture

On retrouve dans la littérature un très grand nombre de milieux de culture différents pour les algues. Certains traités de base sur les algues discutent du rôle et de la quantité nécessaire de chacun des éléments qui sont véritablement requis pour une croissance optimale des algues (Becker, 1994 ; Borowitzka et Borowitzka, 1992 ; Richmond, 1986).

6.2. Illumination

Les algues ont besoin de lumière pour faire de la photosynthèse. Mais l'intensité lumineuse utilisée dans la littérature est extrêmement variable. Toutes les études de laboratoire ont complété ou remplacé la lumière du jour par des sources lumineuses supplémentaires. L'illumination des algues peut se faire en continu pour maximiser la productivité des algues ou avec un cycle jour / nuit, habituellement de 16 h / 8 h. Ceci imite un peu les conditions naturelles et permet la respiration nocturne et la division cellulaire. Toutefois, l'incubation des algues peut être effectuée à l'obscurité lorsque le produit doit servir de seule source de carbone (Ellis, 1977).

6.3. Aération

En plus de la lumière, les algues ont besoin de CO₂ pour accomplir la photosynthèse. Les publications ne forment pas non plus de consensus sur ce point : certains n'emploient que l'agitation pour permettre l'incorporation du CO₂ dans le milieu, alors que d'autres incorporent aux cultures un mélange gazeux contenant du CO₂ en proportion variable de façon continue ou ponctuelle. Par exemples, Javanmardian et Palsson (1991) fournissent aux algues un mélange de gaz composé de 20% O₂, 5% CO₂ et 75% N₂ à un taux de 300 mL par minute; Wu et Kosaric (1991) utilisent un mélange 3:1 de CO₂ qui est barboté dans le milieu de culture une fois par jour pendant 1 ou 2 heures à un débit de 8 cm³/min et Hosono *et al.* (1994) utilisent de l'air contenant 5% de CO₂ à un débit de 165 mL/min/L. Cependant, de la Noüe *et al.* (1984) rapportent que le barbotage avec de l'air enrichi de 5% de CO₂ n'offre pas un meilleur rendement au niveau de la biomasse algale produite que de l'air non enrichi. Ils utilisent toutefois un débit de barbotage plus élevé que la majorité des auteurs cités. Enfin, Pesheva *et al.* (1994) étudient l'effet d'un changement rapide et radical de la concentration de CO₂ pour la croissance d'une algue marine. Si la concentration de CO₂ passe à 40%, il y a une phase de latence de la croissance due à la suppression de l'activité du PS II alors que l'activité du PS I augmente beaucoup.

6.4. Agitation

L'agitation est liée aux deux facteurs précédents, c'est-à-dire qu'elle influence la quantité de lumière qui parvient à chaque algue et elle permet la distribution du CO₂ partout dans la culture. La majorité des auteurs consultés préfèrent une agitation continue de 100 à 200 rpm sur un agitateur giratoire alors que quelques-uns n'agitent pas ou encore profitent de la turbulence causée par le barbotage de l'air dans la culture.

6.5. Température

La température est un facteur qui est propre à chaque espèce d'algues, toutefois, on remarque qu'il est profitable d'abaisser la température pendant la nuit. De cette façon, la quantité de biomasse obtenue est plus grande, mais aussi la température optimale de croissance, le jour, sera plus élevée (Richmond, 1986).

6.6. pH

Les valeurs optimales dépendent des espèces, mais le pH varie de façon cyclique pendant la journée et la nuit sur ces mesures dont il faut tenir compte. Selon Picot *et al.* (1993),

l'activité des algues atteint son maximum un peu après la mi-journée et les pH les plus bas s'observent en fin d'après-midi et pendant la nuit à cause d'une plus grande quantité de CO₂ excrétée par les algues. De plus, de la Noüe et Ní Eidhin (1988) mentionnent que *Scenedesmus obliquus* développe typiquement un pH très basique, soit près de 10,5, en début de la phase stationnaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Algues utilisées

Les algues utilisées sont des algues vertes microscopiques d'eau douce. Elles ont été achetées auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) : il s'agit de *Chlorella* sp. (ATCC #7516), de *Scenedesmus obliquus* (ATCC #11457) et de *Chlorella vulgaris* (ATCC #30581).

2. Milieux de culture

Les algues ont été reçues lyophilisées et leur repiquage a été fait sur le milieu solide #5, recommandé par l'ATCC pour *Chlorella* sp. et *Scenedesmus obliquus* et sur le milieu #817, recommandé par l'ATCC pour *Chlorella vulgaris*. La composition de ces milieux de culture est décrite dans le catalogue de l'ATCC (ATCC, 1991).

Au cours du projet, ces milieux de culture ont été employés régulièrement afin de vérifier la viabilité et la pureté des cultures. Malgré le fait qu'ils contenaient des sources de carbone, ces milieux ont été incubés à la lumière, permettant ainsi une croissance plus rapide et plus typique des algues.

De plus, pour confirmer l'absence de bactéries, les cultures d'algues ont été régulièrement striées sur le milieu solide PCA ("Plate Count Agar" : préparation #0479-17-3 de Difco). C'est un milieu riche qui est destiné à favoriser la croissance des bactéries.

Les essais de dégradation et la production de biomasse ont été faits en milieu liquide parce que la distribution des polluants est meilleure et aussi parce que les algues ont une croissance plus rapide en milieu liquide.

Pour établir ce milieu de culture, plusieurs traités de base sur les algues (Becker, 1994; Borowitzka et Borowitzka, 1992 ; Richmond, 1986) ont été consultés afin de déterminer les éléments qui étaient véritablement requis pour une croissance optimale des algues. De plus, la plupart des milieux de culture publiés sont destinés à des tests de toxicité qui sont généralement de courte durée (moins d'une semaine) alors que nos essais de dégradation pouvaient durer jusqu'à six semaines. Suite à cela, le milieu de culture développé par Klekner et Kosaric (1992a) ainsi que celui de Wu et Kosaric (1991) ont été combinés et modifiés légèrement afin de pallier à leurs carences respectives. Ce nouveau milieu de culture a été nommé milieu O (voir figure 3). C'est ce milieu de culture qui a généralement servi pour les réacteurs et aussi pour les essais de dégradation.

Milieu O

955 mL eau déminéralisée
 0,05 g EDTA
 10 mL solution KNO_3 (20 g / 200 mL)
 10 mL solution Na_2HPO_4 (13 g / 200 mL, bien dissoudre)
 10 mL solution $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4 g / 200 mL)
 10 mL solution $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,8 g / 200 mL)
 1 mL solution Traces I*
 1 mL solution Traces II*
 0,1 mL solution $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,4 g / 100 mL)

Autoclaver

Ajuster le pH entre 6,9 et 7,1 avec du HCl 0,1N

Ajouter les vitamines :

1 mL thiamine stérilisée par filtration (10 mg / 100 mL)
 1 mL biotine stérilisée par filtration (10 mg / 100 mL)
 1 mL vitamine B_{12} stérilisée par filtration (10 mg / 100 mL)

* Trace I :

2,86 g H_3BO_3
 2,86 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 0,22 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 0,08 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 0,04 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Compléter à 1 L avec eau déminéralisée.

* Trace II :

0,025 g KI
 0,0009 g LiCl
 0,0035 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Compléter à 1 L avec eau déminéralisée.

Figure 3. Milieu O : milieu de culture liquide pour la production de biomasse algale ainsi que pour les essais de biodégradation

3. Obtention de biomasse

Après avoir essayé différents modèles de réacteurs, des réacteurs de 4 L branchés en série ont finalement été choisis afin d'obtenir de grands volumes de culture dans le même état physiologique et aussi de fortes densités de biomasse. Généralement, quatre réacteurs étaient en fonction en même temps : ils étaient reliés deux à deux en prenant soin de ne pas mélanger les espèces, puis ils étaient tous reliés ensemble pour le branchement à la sortie d'air comprimé (figure 4). De petits erlenmeyers, branchés aux réacteurs, servaient de trappes pour le liquide qui pouvait s'échapper en même temps que l'air, protégeant ainsi la stérilité des filtres de sortie. Les réacteurs décrits ci-dessus n'ont été employés dans ce projet que vers la fin des essais avec le pentachlorophénol. Au cours des essais précédant l'expérience PCP IX, ce sont des algues provenant de plusieurs cultures en petits volumes (agitées à l'aide de barreaux magnétiques et de plaques agitatrices) et mises ensemble qui ont été utilisées.

3.1. Étapes de la culture en réacteur

Les algues ont été soumises à deux passages de 10 à 15 jours sur les milieux solides recommandés par l'ATCC. Une colonie isolée provenant de ces ensemencements, a été inoculée dans une éprouvette de 25 mL, avec bouchon de métal, contenant 5 mL de milieu O. Il a fallu inoculer 18 éprouvettes pour chaque réacteur. Les éprouvettes ont été placées à la

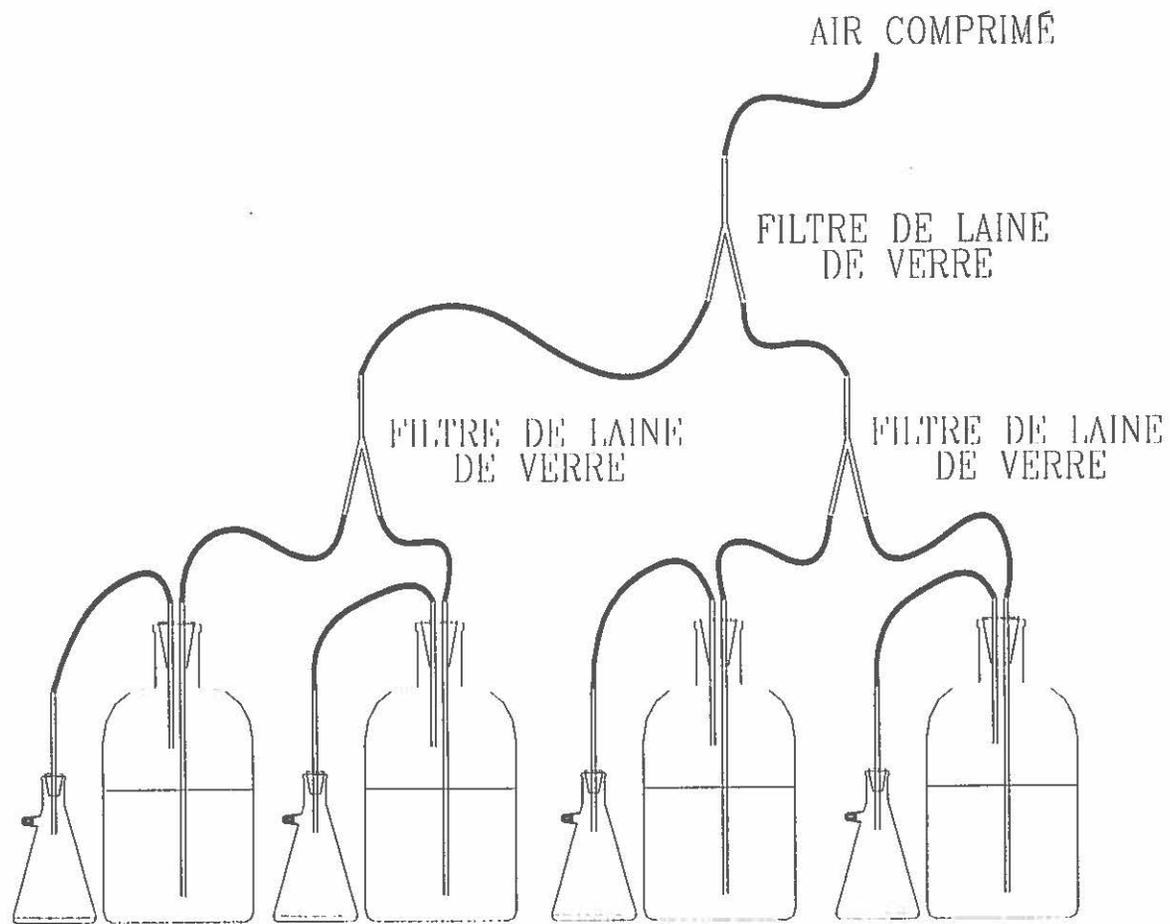


Figure 4. Schéma du montage des réacteurs de 4 L utilisés pour générer de fortes densités de biomasse algale

lumière (à près de 8000 lux) pour environ deux semaines et elles ont été agitées à l'aide d'un vortex de trois à quatre fois par semaine. Après quelques jours, une goutte de chaque éprouvette a été striée sur une fraction de boîte de Petri contenant du PCA. Ces boîtes ont été incubées à l'obscurité à la température de la pièce pour 10 à 14 jours. Après ce délai, les éprouvettes dont les PCA correspondants étaient contaminés, ont été éliminées. Ensuite, de l'acide chlorhydrique a été ajouté au contenu des éprouvettes pour abaisser le pH à moins de 2 pour une durée d'environ deux heures. Selon Becker (1994), de cette façon, les protozoaires qui contaminent les cultures d'algues seraient éliminés. D'après des essais faits avec des cultures volontairement contaminées avec *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, il est justifié de croire que cette technique élimine au moins un certain nombre de bactéries qui ne sont pas résistantes à un pH si bas et ce, sans trop affecter les algues. Enfin, les éprouvettes ont été transvidées dans les réacteurs contenant 3 L de milieu 0. Toutes ces étapes ont été faites de façon aseptique et avec du matériel stérile. Avant de démarrer le premier lot, les montages ont été testés avec du bouillon nutritif (Difco #0003-17-8) pour quatre jours dans les conditions d'incubation des algues, puis ils ont été placés à 30°C pour 24 heures et un ensemencement sur PCA a été fait. Après 14 jours, ces boîtes de Petri ne présentaient pas de contamination.

3.2. Conditions d'incubation des réacteurs

Les réacteurs ont été placés dans une pièce dont la température n'était pas contrôlée avec précision, mais dont la moyenne se situait à environ 25°C le jour en incluant la chaleur produite par les sources d'éclairage. Ce sont deux fluorescents doubles Sylvania "daylight" de 30W qui ont servi de source de lumière pour les réacteurs. Un éclairage continu leur a été fourni puisque le but était d'obtenir de grands volumes avec de fortes concentrations de biomasse en peu de temps. L'intensité lumineuse était d'environ 8000 lux (l'intensité lumineuse a été mesurée avec un posemètre Sekonic, modèle L-28C2). Les réacteurs ont été aérés par de l'air comprimé, filtré à deux reprises par de la laine de verre, qui barbotait continuellement au fond des bouteilles avec un faible débit.

4. Protocole pour les essais de dégradation

4.1. Préparation

Les essais de dégradation ont été faits dans des erlenmeyers de 250 mL stériles, fermés par des bouchons d'ouate sauf pour les essais de dégradation du pentachlorophénol où des bouchons en mousse ont été employés. Tous les erlenmeyers avaient préalablement été rincés

avec du méthanol, de l'acétone et de l'hexane afin d'éliminer toute trace des composés utilisés précédemment qui auraient pu résister au lavage.

Le protocole a été modifié plusieurs fois au début des expériences, mais la méthode qui est ressortie est celle qui comporte un volume total de 100 mL incluant les algues, le milieu de culture frais et le composé à tester. Pour les premiers essais, le volume employé était de 50 mL et le contenu de la fiole était extrait en entier. Il y avait donc un erlenmeyer pour chaque temps de prélèvement. Après quelques expériences, il a été conclu qu'un prélèvement à chaque temps était représentatif du contenu total et cela a facilité la comparaison des résultats mesurés à chaque temps. Le volume a été augmenté à 100 mL afin de conserver toujours un niveau minimal de liquide.

Le milieu de culture employé lors des essais de dégradation était, en général, le milieu O. Cependant, lors des essais où les polluants devaient être utilisés comme source d'azote, le KNO_3 a été enlevé et du KCl a été ajouté en quantité molaire équivalente de potassium tel que recommandé par Luther (1990). De plus, certains essais ont été faits dans de l'eau déminéralisée uniquement, comme le précise le protocole de Klekner et Kosaric (1992a).

La concentration et la condition des algues employées étaient variables d'un lot à l'autre. De plus, des essais ont aussi été faits avec diverses quantités d'algues afin d'optimiser les méthodes de travail.

Les composés utilisés ont toujours été ajoutés dans les erlenmeyers après les algues et le milieu de culture. Des solutions-stock concentrées ont été faites pour chaque composé : des masses connues ont été solubilisées dans de l'eau déminéralisée et ces solutions ont ensuite été autoclavées et conservées à l'abri de la lumière. Du NaOH a dû être ajouté à la solution de 2,4-dinitrophénol, puisque ce composé était difficile à solubiliser à haute concentration dans l'eau.

4.2. Incubation

Les conditions d'incubation en erlenmeyers n'étaient pas les mêmes que pour les réacteurs de 4 L. Deux fluorescents doubles Philips F40CW/RS/EWII de 40 W fournissaient environ 2000 lux. Un cycle jour / nuit, 16h / 8h, a été instauré pour permettre la respiration nocturne et la division cellulaire. L'agitation, sur un agitateur giratoire New Brunswick Scient. Co. modèle 010, était d'environ 100 rpm, trois fois 30 minutes par jour, parce que l'agitation continue brisait les algues et que s'il n'y avait pas d'agitation, les algues se déposaient au fond, limitant la diffusion du CO₂ et perdant de la lumière. Cette diffusion du CO₂ était d'autant plus importante que les erlenmeyers des essais de dégradation n'étaient aérés que par l'air diffusant dans le liquide. Cependant, l'emploi de bouchons d'ouate, plus perméables à l'air que ceux de mousse, a amélioré l'aération des cultures.

4.3. Essais de dégradation

Tous les essais ont été faits en duplicata. De plus, pour tous les essais, différents flacons contrôles ont été utilisés dont au moins des contrôles abiotiques (le milieu de culture avec le composé à dégrader) et des témoins (des cultures d'algues sans le composé) afin d'avoir un point de repère de la croissance normale des algues. Parfois, d'autres contrôles ont été ajoutés (ils seront décrits dans les sections appropriées).

4.4. Suivi

Les algues ont été incubées avec les composés pour des durées variables et des prélèvements ont été faits régulièrement pour mesurer la concentration résiduelle du composé ainsi que la croissance des algues.

Périodiquement, les erlenmeyers ont été pesés et un échantillon a été prélevé pour faire des analyses chimiques ainsi que le suivi de la croissance. L'évaporation n'étant pas négligeable, les fioles ont été pesées et cette mesure a permis d'estimer l'évaporation qui a eu lieu au cours de la période d'incubation et ainsi de corriger en conséquence toutes les valeurs mesurées.

4.4.1. Croissance des algues

Le suivi de la croissance consistait à mesurer la densité optique et le pH et à faire un comptage des cellules. La densité optique était obtenue par la lecture de l'absorbance à 500 nm avec un spectrophotomètre Philips PU 8630 UV/VIS à l'aide de cuvettes de polystyrène jetables contre les contrôles abiotiques ou de l'eau. Les échantillons étaient dilués avec de l'eau déminéralisée, de façon à obtenir une valeur d'absorbance comprise entre 0,100 et 1,000. Le pH était mesuré avec un appareil Fisher Accumet 805MP, calibré avec un tampon à pH 7,00 ou 10,00 selon les besoins. Les comptages cellulaires ont été faits avec un hématimètre Levy Ultraplane Neubauer (1/400 mm² et 1/10 mm d'épaisseur) à un grossissement de 400X au microscope Leitz Laborlux D. Les deux chambres de l'hématimètre étaient comptées pour chaque échantillon afin d'obtenir une valeur moyenne. Toutefois à cause du nombre important d'échantillons, ces comptages ont dû être abandonnés au cours du projet. Des ensemencements ont été faits par striations sur les deux types de milieux de culture solides. Le PCA, qui favorise la croissance des bactéries, était employé pour vérifier la pureté des cultures et il était incubé à l'obscurité pour 14 jours. Quant aux milieux #5 ou #847 (selon les espèces), ils étaient employés pour vérifier la viabilité des cultures et comme ils étaient destinés aux algues, ils étaient donc incubés à la lumière (à environ 4000 lux) pendant 14 jours. Ils étaient cependant protégés de la déshydratation par un parafilm.

4.4.2. Produits et métabolites

Des échantillons ont été congelés à -18°C au cours de l'expérience et à la fin de celle-ci, tous les échantillons de l'expérience étaient analysés en même temps, éliminant ainsi des erreurs dues aux variations des appareils dans le temps.

4.4.2.1. Chromatographie liquide à haute performance

De routine, les analyses ont été faites par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Les échantillons étaient dilués pour se trouver à l'intérieur des marges de la courbe de calibration préalablement préparée. De la phase mobile était ensuite ajoutée pour que les échantillons aient la même composition que la phase mobile au début du gradient. Ils étaient ensuite centrifugés à 14 926 g une centrifugeuse de table Biofuge A de Canlab pendant 5 minutes. Les surnageants des échantillons étaient ensuite transférés dans des micro-tubes Waters de 1 mL puis injectés grâce à un injecteur automatique (Millipore Waters 717 plus) dans un CLHP Millipore Waters modèle 510 avec une colonne à phase inversée Nova Pak C_{18} . Le volume injecté était de $200\ \mu\text{L}$. Les deux constituants de la phase mobile étaient l'eau et l'acétonitrile contenant tous les deux 0,1% d'acide acétique. Le gradient de solvant variait pour chaque composé. La détection des pics a été faite avec un spectrophotomètre UV Millipore Waters Lambda Max, modèle 481 dont la longueur d'onde était ajustée en fonction du

composé étudié. Un ordinateur gérait toutes les données, mais l'intégration des pics a été faite manuellement.

Le tableau 1 est un exemple de gradient employé au CLHP : il était destiné à l'acide 4-aminobenzoïque et la détection se faisait à 266 nm.

Tableau 1. Gradient pour l'acide 4-aminobenzoïque en chromatographie liquide à haute performance

Temps (minutes)	Débit (mL/min)	% Eau	% Acétonitrile	Type de courbe*
0,0	2,0	100	0	
4,0	2,0	79	21	+6
4,1	2,0	40	60	0
5,0	2,0	100	0	+9
7,0	2,0	100	0	

* -9 signifie concave ; 0, linéaire et +9, convexe avec tous les intermédiaires entre ces valeurs.

4.4.2.2. Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse

Lorsqu'un composé disparaissait significativement ou qu'un nouveau pic apparaissait, des analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG/SM) étaient effectuées pour confirmer ces résultats et identifier les métabolites. Le

spectre obtenu était comparé à des spectres connus d'une banque de données. La technique pour extraire les échantillons ainsi que les conditions chromatographiques au CG/SM dépendaient du composé initial. En général, une extraction acide à l'éther ou à l'acétate d'éthyle était effectuée et la phase organique contenant le composé était asséchée par des passages dans du Na_2SO_4 . Du *N,O*-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) était ensuite ajouté et l'échantillon injecté dans un chromatographe en phase gazeuse 3500 de la compagnie Varian avec une colonne capillaire DB-5 et muni d'un détecteur de spectrométrie de masse Finnigan Mat 800. La température de l'injecteur était de 250°C , celle de la ligne transfert ainsi que celle de la trappe ionique étaient de 270°C . Le gaz vecteur employé était l'hélium. La pression de la colonne était gardée constante à 24,7 psi pendant toute la durée de l'analyse et le débit, à 70°C , était de 2,3 mL d'hélium par minute. Le volume d'injection était de 1 μL et l'injection était faite en mode "splitless" et après 30 secondes en mode "split" dans un rapport 50 pour 1.

Les conditions chromatographiques étaient typiquement les suivantes :

Température initiale : 70°C
Temps d'équilibre : 0 minute
Programmation de température : $10^\circ\text{C}/\text{min}$
Hausse de température jusqu'à 125°C
Plateau : 7 minutes
Programmation de la température : $8^\circ\text{C}/\text{min}$
Hausse de température jusqu'à 235°C
Programmation de la température : $30^\circ\text{C}/\text{min}$
Hausse de température jusqu'à 310°C
Plateau : 1 minute
Fenêtre de masses utilisée : 70 à 550 u.a.

5. Description détaillée des essais

Les essais sont présentés dans l'ordre dans lequel ils ont été faits. Le phénol, le *p*-crésol et l'acide 4-aminobenzoïque ont été testés simultanément. Les résultats obtenus chacun des composés étudiés ont influencé la suite des essais, entraînant un ajustement du nombre d'essais effectués.

5.1. Pentachlorophénol (PCP)

En tout, treize essais ont été effectués avec le pentachlorophénol : la quantité de biomasse et la durée des essais ont été variées ; *Chlorella* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* et aussi un mélange de *Chlorella* sp. et de *Scenedesmus obliquus* ont été utilisés. Le pentachlorophénol a été utilisé sous forme de sel de sodium (hydrate, 90% Aldrich) afin d'améliorer sa solubilité. La concentration employée était de 5 mg/L.

Comme contrôles supplémentaires, le pentachlorophénol a été incubé avec de l'eau déminéralisée ; des surnageants obtenus de cultures typiques filtrées à 0,45 μm ; des algues mortes dans le noir et à la lumière et aussi avec des algues vivantes dans le noir.

5.2. 2,4-dinitrophénol (DNP)

Les concentrations utilisées de 2,4-dinitrophénol (BDH 99%) ont été approximativement de 30, 60 et 150 mg/L. De nombreuses expériences ont été faites avec ce composé. *Chlorella* sp. et *Scenedesmus obliquus* ont été étudiés ensemble et séparément. Les variantes comprenaient un ou plusieurs de ces facteurs : la durée des essais, l'âge des cultures, la quantité de biomasse, la concentration du composé, la quantité de nitrate dans le milieu et des traitements physiques et chimiques des algues.

Les traitements physiques et chimiques ont été faits dans le but de rendre les cellules plus perméables au composé. À chaque fois, le traitement était effectué sur les algues avant que le composé à dégrader soit ajouté et chaque culture d'algues n'a subi qu'un seul traitement. Un détergent, du SDS (sodium dodécylsulfate), a été ajouté aux concentrations de 0,1% et de 0,5% aux algues. D'autres algues ont été incubées à une température plus élevée que la normale, soit 34°C. L'irradiation gamma au ^{60}Co a été employée pour d'autres cultures (2 kGy, Gamma Cell 220). D'autres algues ont été passées au Stomacher, modèle Lab Blender 400, pendant 2 minutes. D'autres encore ont été fouettées avec un mélangeur Osterizer Sunbeam pendant 2 minutes. Et enfin des passages glace sèche/65°C de deux fois 20 minutes par étapes ont été faits.

Les contrôles complémentaires effectués étaient les algues mortes dans le noir et à la lumière et aussi les algues vivantes dans le noir.

5.3. 4-nitroaniline (4-NA)

Un seul essai a été fait avec le 4-nitroaniline (99+% Aldrich) et cela n'incluait que les contrôles standards. La concentration utilisée était de 100 mg/L.

5.4. Acide 4-aminobenzoïque (4-AB)

L'acide 4-aminobenzoïque (99% Aldrich) a été utilisé lors d'essais en "suites", c'est-à-dire que lorsqu'une expérience se terminait, du milieu O frais était ajouté à tous les erlenmeyers pour compenser l'évaporation ainsi que les prélèvements, puis davantage d'acide 4-aminobenzoïque était ajouté. Ces essais ont été faits avec du milieu de culture sans KNO_3 . Deux séries de "suites" ont été effectuées. Les concentrations utilisées dans la première, étaient d'environ 100, 200 et 400 mg/L (l'ajout de milieu frais associé avec la dégradation du composé, s'il y en avait, faisaient que les concentrations étaient approximatives et généralement inférieures aux valeurs prédites). Alors que pour la deuxième série, faite avec un lot d'algues différent, les concentrations d'acide 4-aminobenzoïque étaient d'environ 100 mg/L.

Des contrôles comprenant des cultures moins denses et des cultures dans le noir ont aussi été étudiés.

5.5. Phénol (PHÉ)

Le phénol (>99,5% Biochemika) a été employé dans des expériences en séries, les "suites", tout comme l'acide 4-aminobenzoïque. Deux séries indépendantes ont été étudiées. Les concentrations utilisées étaient approximativement de 100, 200 et 400 mg/L. Les contrôles supplémentaires consistaient à comparer différentes quantités de biomasse ainsi que des algues incubées à l'obscurité.

5.6. *p*-crésol (*p*-CRÉ)

Quant au *p*-crésol (Baker), il a été employé selon le même principe que les essais avec le phénol. Ces deux composés ont été testés simultanément à partir des mêmes cultures et les contrôles d'algues sans produit ont servi aux deux essais. Les deux concentrations de *p*-crésol employées étaient 100 mg/L et environ 200 mg/L.

RÉSULTATS

1. Pentachlorophénol

Dans le cas des premiers essais, les méthodes qui ont été utilisées étaient légèrement différentes de celles utilisées subséquemment et pour cette raison, certains résultats relatifs à la récupération du produit sont différents. Par exemple, à chaque temps, un erlenmeyer au complet était extrait lors des premiers essais. Afin de faciliter les comparaisons, les données ont été transformées en pourcentage, mais les concentrations de pentachlorophénol utilisées étaient toujours d'environ 5 mg/L.

1.1. Contrôles abiotiques

Plusieurs types de contrôles abiotiques ont été effectués. Chacun de ces contrôles abiotiques est décrit et les résultats sont présentés dans les tableaux 2, 3, 4 et 5. La figure 5 résume la récupération moyenne du pentachlorophénol dans tous les contrôles abiotiques.

Récupération moyenne du PCP dans les contrôles abiotiques

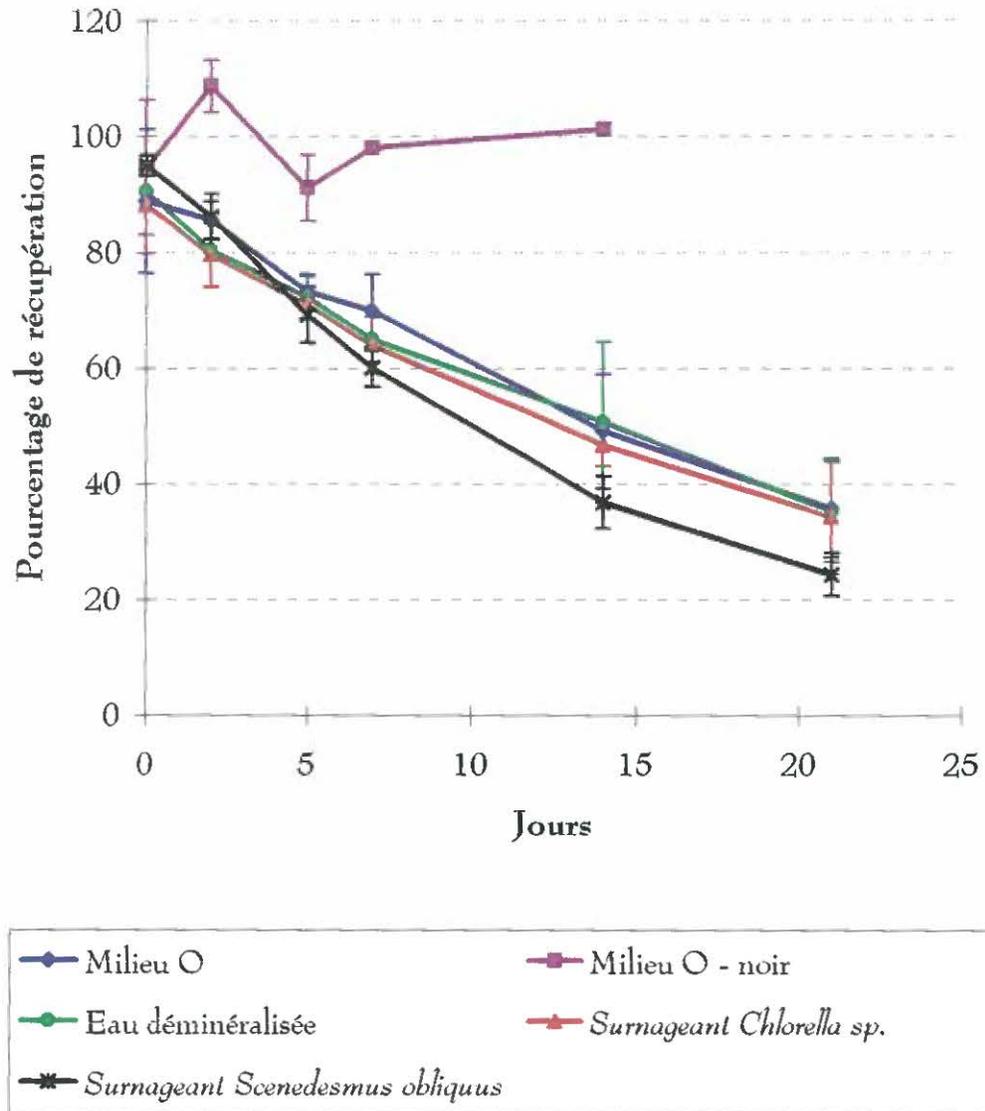


Figure 5. Récupération moyenne du pentachlorophénol dans les contrôles abiotiques

1.1.1. Milieu O à la lumière

Les résultats de récupération du pentachlorophénol dans les contrôles abiotiques standards, c'est-à-dire le milieu de culture incubé comme les cultures d'algues, sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Récupération moyenne du pentachlorophénol dans les contrôles abiotiques à la lumière

Milieu O	Récupération moyenne du PCP (%)					
	Jour 0	Jour 2	Jour 5	Jour 7	Jour 14	Jour 21
Lumière	89	86	73	70	49	36
(6 ≤ n ≤ 14)	± 12	± 3	± 3	± 6	± 10	± 8

n : nombre d'échantillons

1.1.2. Milieu O à l'obscurité

Suite à ces résultats, un autre type de contrôle a été fait. Il s'agit de contrôles abiotiques incubés dans les mêmes conditions que précédemment sauf que les erlenmeyers ont été recouverts de papier d'aluminium afin d'empêcher l'entrée de lumière. Les pourcentages de récupération dans ces contrôles se trouvent dans le tableau 3.

Tableau 3. Récupération moyenne du pentachlorophénol dans les contrôles abiotiques à l'obscurité

Milieu O	Récupération moyenne du PCP (%)				
	Jour 0	Jour 2	Jour 5	Jour 7	Jour 14
Obscurité (n=2)	95 ± 12	109 ± 5	91 ± 6	98 ± 0	101 ± 1

1.1.3. Eau déminéralisée

Dans le cas de d'autres contrôles abiotiques incubés à la lumière, le milieu de culture a été remplacé par de l'eau déminéralisée afin de vérifier si la dégradation abiotique du produit est liée à la composition du milieu O. Les résultats de ces essais sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Récupération moyenne du pentachlorophénol dans de l'eau déminéralisée

Eau déminéralisée	Récupération moyenne du PCP (%)					
	Jour 0	Jour 2	Jour 5	Jour 7	Jour 14	Jour 21
Lumière (3 ≤ n ≤ 4)	90 ± 3	80 ± 6	72 ± 4	65 ± 4	51 ± 14	35 ± 9

1.1.4. Surnageants de cultures

Des surnageants de cultures d'algues n'ayant jamais été exposées au pentachlorophénol ont servi de contrôles pour vérifier si des produits excrétés par les algues agissaient sur le pentachlorophénol (tableau 5). Ces échantillons ont été incubés dans les conditions de culture normales.

Tableau 5. Récupération moyenne du pentachlorophénol dans les surnageants de cultures

Surnageants	Récupération moyenne du PCP (%)					
	Jour 0	Jour 2	Jour 5	Jour 7	Jour 14	Jour 21
<i>Chlorella</i> sp. (n=2)	88 ± 8	80 ± 6	71 ± 1	64 ± 5	47 ± 4	34 ± 10
<i>Scenedesmus obliquus</i> (n=4)	95 ± 2	86 ± 4	69 ± 5	60 ± 3	37 ± 4	24 ± 4

1.1.5. Algues mortes à l'obscurité

Des algues qui ont été autoclavées ont été incubées avec le pentachlorophénol pour mesurer l'adsorption du produit. Après 7 jours d'incubation, la récupération du

pentachlorophénol est de 97,6% pour *Chlorella* sp., de 99,6% pour *Scenedesmus obliquus* et de 99,8% pour *Chlorella vulgaris*. Les densités d'algues employées étaient semblables ou supérieures à celles utilisées dans les autres essais.

1.2. Dégradation du pentachlorophénol par les algues

Les récupérations moyennes du pentachlorophénol pour les essais avec les algues sont présentées dans le tableau 6. Pour des raisons de commodité, les valeurs de récupération du pentachlorophénol pour les contrôles abiotiques y ont été répétées. De plus, seulement les essais qui sont exempts de contamination bactérienne y sont recensés.

1.3. Métabolites produits

Lorsqu'il y a eu disparition du pentachlorophénol, aucun métabolite n'a été détecté au CLHP malgré le fait que le gradient employé permettait la détection de tous les chlorophénols. L'analyse de ces échantillons par CG/SM n'a permis de détecter, comme intermédiaire potentiel de dégradation, que le tétrachlorocatéchol. Cependant ce composé n'a été observé qu'en très faible quantité.

Tableau 6. Récupération moyenne du pentachlorophénol incubé avec les algues

No d'exp.	Algue	Récupération moyenne du PCP (%)					
		Jour 0	Jour 2	Jour 5	Jour 7	Jour 14	Jour 21
PCP II	<i>Chlorella vulgaris</i>	90 n.a.	--	--	53 n.a.	40 ± 9	19 ± 3
	Contrôle abiotique	83 n.a.	--	--	61 n.a.	40 ± 1	34 ± 6
PCP VI	<i>Chlorella</i> sp.	69 ± 13	--	--	78 ± 4	35 ± 0	36 ± 3
	Contrôle abiotique	61 n.a.	--	--	76 ± 4	62 ± 10	40 ± 13
PCP VII	<i>Scenedesmus obliquus</i>	58 ± 4	--	--	42 ± 11	27 ± 2	19 ± 0
	Contrôle abiotique	65 ± 3	--	--	77 ± 5	62 ± 6	43 ± 2
PCP IX	<i>Scenedesmus obliquus</i>	88 ± 1	--	--	<7 ± 7	<4 -	<4 -
	Contrôle abiotique	94 ± 0	--	--	73 ± 2	51 ± 3	42 ± 14
PCP X	Mixte (<i>C. sp.</i> & <i>S. obliquus</i>)	91 ± 2	76 ± 1	57 ± 3	48 ± 0	30 ± 3	21 ± 4
	Contrôle abiotique	96 ± 1	89 ± 2	73 ± 2	67 ± 5	43 ± 2	25 ± 5
PCP XI	<i>Chlorella</i> sp.	93 ± 3	82 ± 5	78 ± 0	71 ± 1	58 ± 3	42 ± 5
	Contrôle abiotique	96 ± 1	86 ± 3	73 ± 2	66 ± 1	47 ± 2	36 ± 0
PCP XII	<i>Scenedesmus obliquus</i>	86 ± 3	79 ± 1	64 ± 2	65 ± 3	37 ± 1	22 ± 2
	Contrôle abiotique	96 ± 0	83 ± 1	74 ± 6	65 ± 6	40 ± 3	32 ± 6

n.a. : non applicable (moins de deux échantillons)

1.4. Croissance des algues

En général, la croissance des algues exposées au pentachlorophénol était semblable ou légèrement plus faible que celle obtenue dans les témoins. Il y a toutefois eu une exception : l'expérience PCP IX. C'est le seul essai où il y a eu une dégradation rapide et évidente du pentachlorophénol. Dans ce cas, toutes les cultures d'algues ont subi un important déclin, même dans les témoins en dépit de l'absence de pentachlorophénol (figure 6).

Quant au pH, son augmentation semblait suivre la croissance des algues et cette tendance semblait la même dans les cultures avec du pentachlorophénol que dans les témoins. L'expérience PCP IX avait encore un comportement différent, c'est-à-dire que le pH n'a pas augmenté normalement entre le jour 0 et le jour 7, il est resté stable, puis il s'est mis à augmenter de façon habituelle.

2. 2,4-dinitrophénol

2.1. Contrôles abiotiques

Les tableaux 7 et 8 montrent la récupération moyenne du 2,4-dinitrophénol dans les contrôles abiotiques. Le 2,4-dinitrophénol a été incubé dans le milieu O et aussi dans de l'eau déminéralisée à la lumière.

**Croissance de *S. obliquus* (mesurée par
hématimètre) et récupération
correspondante du PCP**

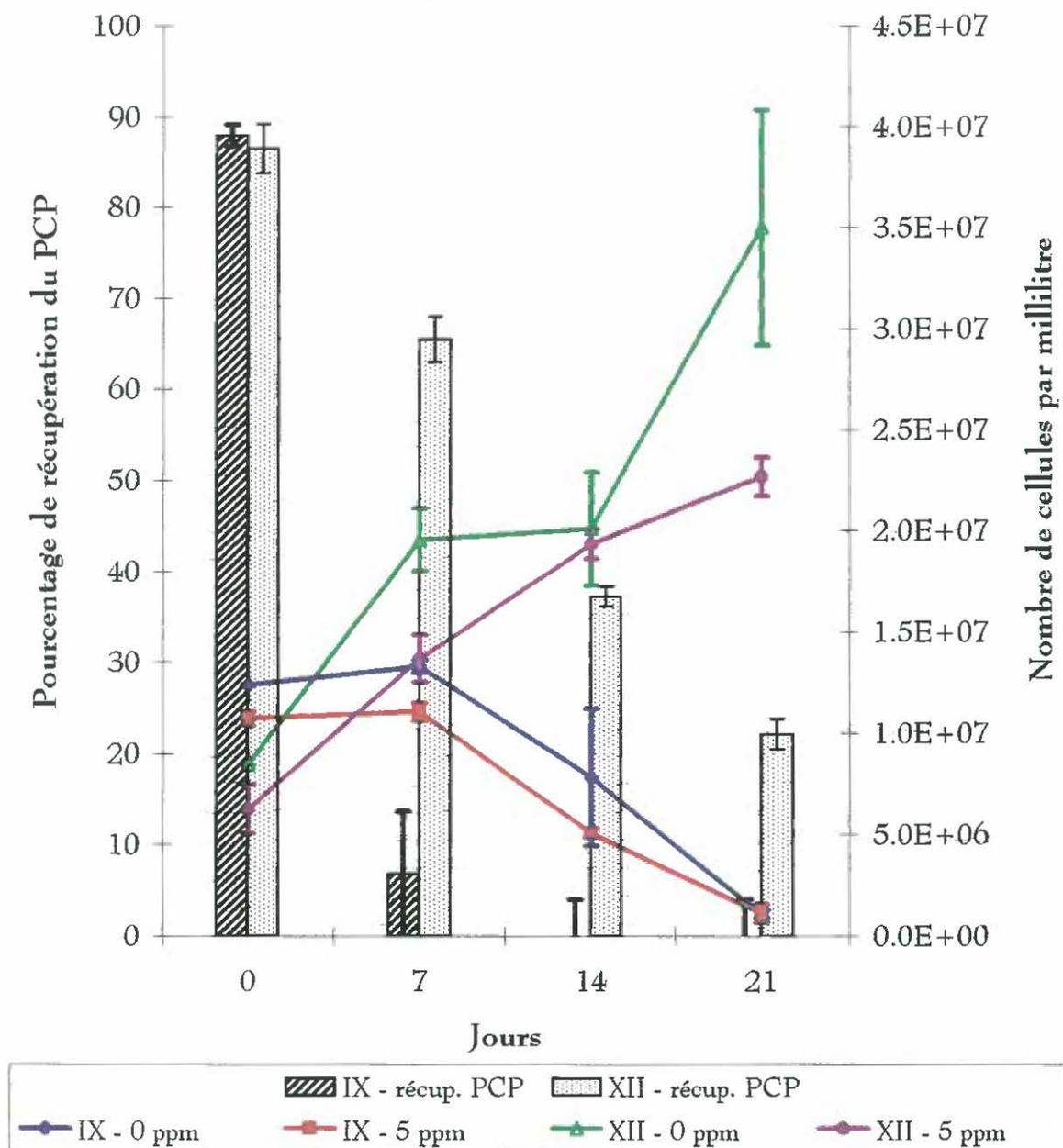


Figure 6. Croissance de *Scenedesmus obliquus* dans les essais PCP IX et PCP XII ainsi que la récupération du pentachlorophénol correspondante

Comme ce composé n'a pas présenté de dégradation significative et reproductible à la lumière ou avec les algues, des contrôles contenant les surnageants de cultures ou incubés à l'obscurité n'étaient pas requis.

Tableau 7. Récupération moyenne du 2,4-dinitrophénol dans les contrôles abiotiques

Milieu O	Récupération moyenne du DNP (mg/L)									
	Jour 0	Jour 4	Jour 7	Jour 8	Jour 12	Jour 14	Jour 21	Jour 28	Jour 35	Jour 42
2<n≤7	32,8 ± 1,7	32,7 ± 1,8	32,5 ± 2,0	34,7 ± 2,7	34,0 ± 1,7	32,5 ± 2,1	33,0 ± 1,9	34,2 ± 1,2	33,1 ± 1,3	34,9 ± 0,9

Tableau 8. Récupération moyenne du 2,4-dinitrophénol dans de l'eau déminéralisée

Eau déminéralisée	Récupération moyenne du DNP (mg/L)					
	Jour 0	Jour 7	Jour 14	Jour 21	Jour 28	Jour 35
4<n≤7	29,1 ± 3,2	30,4 ± 2,1	30,4 ± 1,9	30,6 ± 1,6	30,9 ± 1,7	32,0 ± 0,7

Des cultures d'algues autoclavées ont été incubées avec 30 mg/L de 2,4-dinitrophénol, selon les conditions typiques d'expérience et aussi à l'obscurité, afin de vérifier s'il y avait adsorption du produit et de mesurer la récupération du composé selon nos méthodes

d'extraction. La récupération pour *Chlorella* sp., incubée à la lumière, a été de 111,5% et à l'obscurité, de 102,6%. Dans le cas de *Scenedesmus obliquus*, la récupération obtenue à la lumière a été de 113,0% et de 99,0% à l'obscurité.

2.2. Dégradation du 2,4-dinitrophénol par les algues

En général, malgré la contamination microbienne, aucune dégradation significative du 2,4-dinitrophénol par les algues n'a été observée. Il y a eu trois exceptions, mais les résultats de ces trois essais n'ont pas été reproductibles et les cultures utilisées étaient contaminées par des bactéries. Tous ces essais contenaient l'algue *Scenedesmus obliquus* alors que *Chlorella* sp., étudiée en parallèle, n'a dégradé le produit qu'une fois, mais pas en duplicata. La figure 7 montre la récupération du 2,4-dinitrophénol pour l'essai DNP XVII (traitements physiques) de *Scenedesmus obliquus* dont tous les échantillons étaient contaminés par un actinomycète. Toutefois, des contaminants semblables ont aussi été rencontrés avec *Chlorella* sp. lors d'une expérience ultérieure, sans dégradation du 2,4-dinitrophénol.

Lorsqu'il y a eu dégradation du 2,4-dinitrophénol, aucun métabolite n'a été détecté par CLHP. Les intermédiaires recherchés étaient ceux mentionnés dans les publications concernant la dégradation de ce composé par des chloroplastes d'épinard isolés.

Récupération du 2,4-dinitrophénol dans l'essai DNP XVII pour *Scenedesmus obliquus*

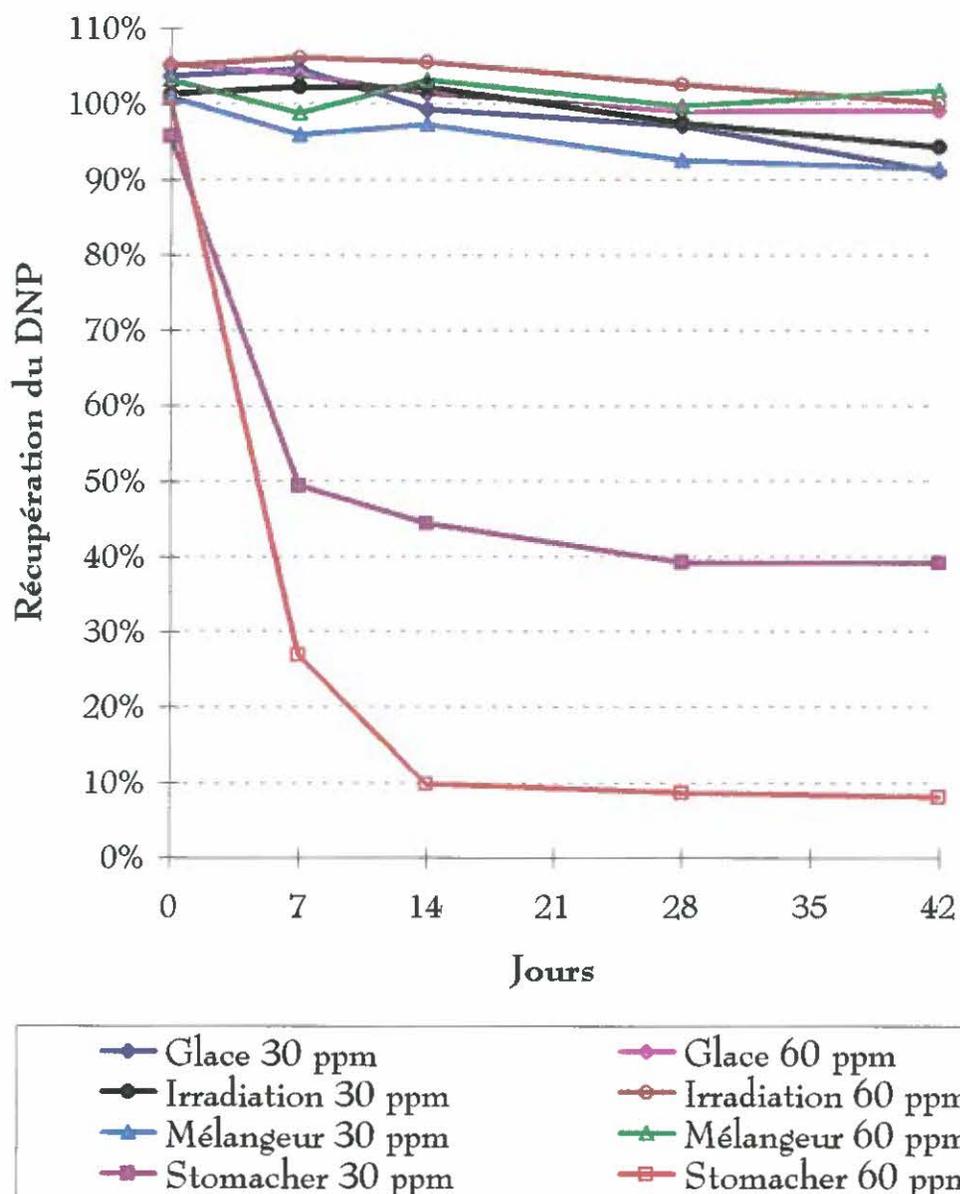


Figure 7. Pourcentage de récupération du 2,4-dinitrophénol dans l'essai DNP XVII pour *Scenedesmus obliquus*

2.3. Croissance des algues

La croissance des algues mesurée par absorbance à 500 nm et par hématimètre suivait la même tendance dans tous les échantillons malgré la présence du 2,4-dinitrophénol. Même les échantillons soumis à 150 ppm de 2,4-dinitrophénol ne semblaient pas affectés : il y a eu de la croissance avec le 2,4-dinitrophénol pour 42 jours, la couleur des cultures semblait normale et il y avait croissance sur milieu solide, donc viabilité.

3. 4-nitroaniline

Un seul essai de biodégradation a été effectué avec le 4-nitroaniline. Lors de cet essai, une contamination bactérienne importante (six à sept types de colonies sur PCA) a été observée. Malgré tout, après 12 jours d'incubation à la lumière, aucune dégradation n'a été observée dans ces cultures, ni dans les contrôles abiotiques.

4. Acide 4-aminobenzoïque

Parmi les deux séries de "suites" effectuées, seule la deuxième, constituée de 4-AB IV et 4-AB V, est présentée dans cette section car elle n'était pas contaminée par des bactéries.

4.1. Contrôles abiotiques

La récupération de l'acide 4-aminobenzoïque dans les contrôles abiotiques était stable (tableau 9). Les deux essais sont présentés séparément parce qu'ils n'avaient pas la même concentration initiale de produit. Avec le temps, une faible coloration brune est apparue dans tous les échantillons contenant de l'acide 4-aminobenzoïque et, parallèlement un très petit pic est aussi apparu en CLHP.

Tableau 9. Récupération moyenne de l'acide 4-aminobenzoïque dans les contrôles abiotiques

Milieu O	Récupération moyenne de l'acide 4-aminobenzoïque (mg/L)			
	Jour 0	Jour 4	Jour 8	Jour 12
4-AB IV (n=2)	113,0 ± 3,6	112,1 ± 4,9	110,9 ± 6,6	108,4 ± 4,6
4-AB V (n=2)	81,3 ± 3,2	79,9 ± 3,5	79,1 ± 1,7	78,6 ± 2,5

4.2. Dégradation de l'acide 4-aminobenzoïque par les algues

La concentration de l'acide 4-aminobenzoïque n'a pas diminué beaucoup au cours du temps dans les cultures de *Chlorella* sp.. Cependant, l'apparition d'un nouveau produit a été

remarquée en plus de celui provenant de la dégradation abiotique. Ce composé n'était pas présent dans les contrôles abiotiques, ni dans les cultures d'algues sans acide 4-aminobenzoïque. L'algue *Scenedesmus obliquus*, étudiée en parallèle lors des trois premiers essais dans la première série de "suites", n'a pas démontré de dégradation significative du composé, ni de synthèse de nouveaux produits. C'est pourquoi, d'autres essais ont été effectués seulement avec *Chlorella* sp.. Les résultats de récupération de l'acide 4-aminobenzoïque pour *Chlorella* sp. sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10. Récupération moyenne de l'acide 4-aminobenzoïque dans les cultures de *Chlorella* sp.

<i>Chlorella</i> sp.	Récupération moyenne de l'acide 4-aminobenzoïque (mg/L)				Variation entre le jour 0 et le jour 12
	Jour 0	Jour 4	Jour 8	Jour 12	
4-AB IV - lumière (n=2)	113,7 ± 1,8	109,3 ± 1,8	105,6 ± 0,0	102,9 ± 0,5	- 10,9 ± 2,3
4-AB IV - obscurité (n=2)	114,0 ± 0,4	113,2 ± 0,8	112,7 ± 0,8	111,5 ± 1,6	- 2,6 ± 2,1
4-AB V - lumière (n=2)	74,8 ± 0,4	73,6 ± 0,0	72,3 ± 0,1	69,8 ± 0,4	- 5,1 ± 0,8
4-AB V - obscurité (n=2)	83,5 ± 0,8	83,5 ± 0,5	83,9 ± 1,3	83,8 ± 0,9	+ 0,3 ± 1,8

4.3. Métabolites produits

Le nouveau produit formé par *Chlorella* sp. était l'acide 4-acétamidobenzoïque (figure 8). Ce produit a été identifié par comparaison de son temps de rétention en CLHP et en CG/SM avec un échantillon authentique d'acide 4-acétamidobenzoïque (figures 9 à 12). Les spectres de masse des dérivés silylés du produit pur et du composé observé dans les cultures de *Chlorella* sp. ont confirmé ces résultats puisqu'ils étaient identiques (figures 11 et 12). Le tableau 11 indique les quantités moyennes d'acide 4-aminobenzoïque et d'acide 4-acétamidobenzoïque mesurées à chaque temps.

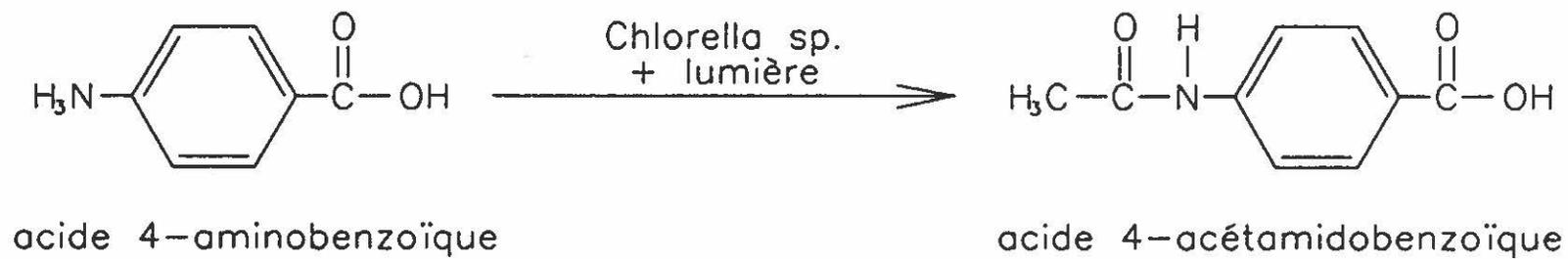


Figure 8. Résumé de la transformation de l'acide 4-aminobenzoïque en acide 4-acétamidobenzoïque

Sample: cs 100ppm j12B Channel: detector 1
Filename: 18mara24
Acquired: 18-MAR-96 20:25 Method: C:\MAX\DATA\1CHR\CPABA_3 66
Operator: Chr
Comments: 4-AB IV (Chlorella sp.)

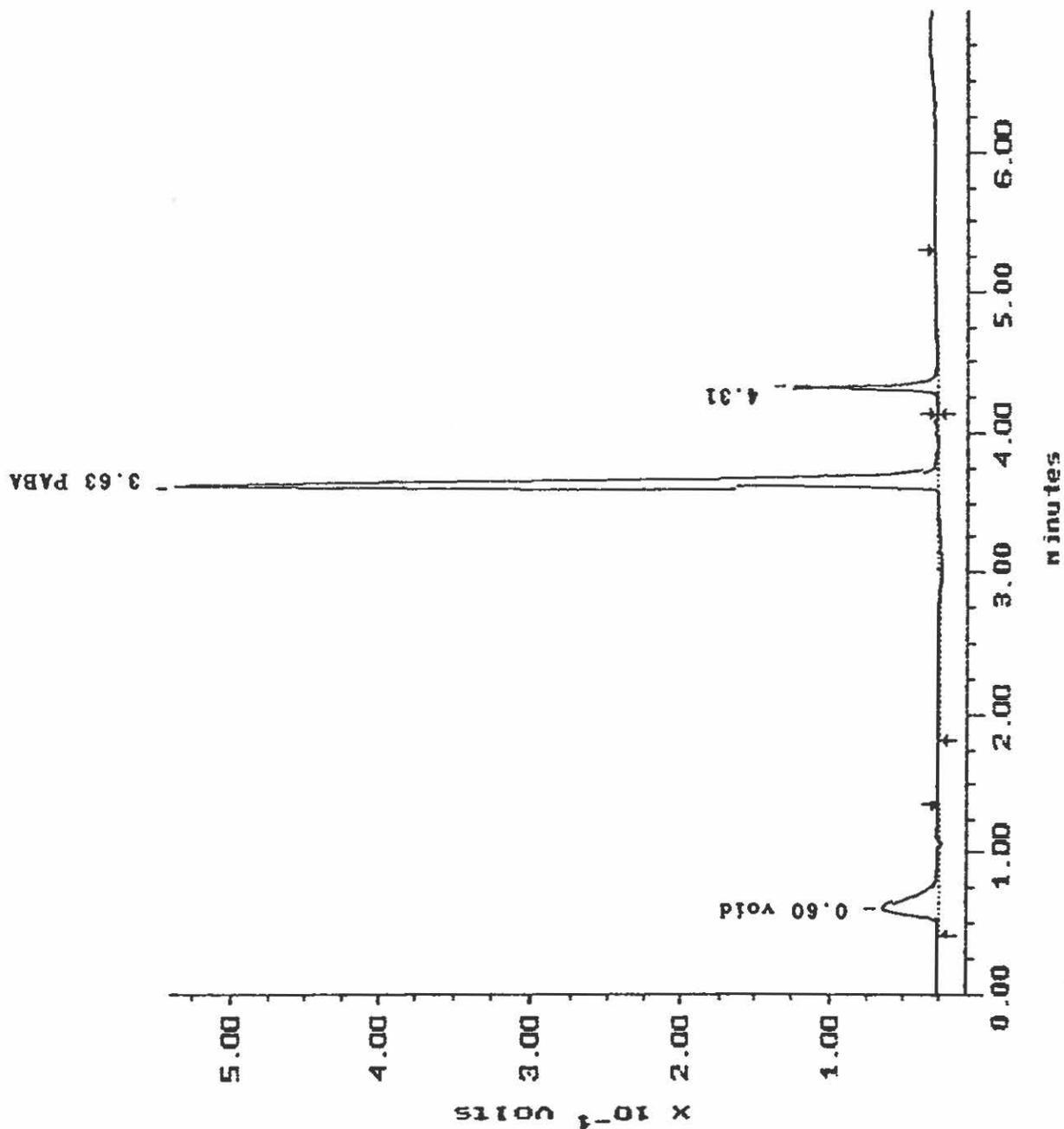


Figure 9. Chromatogramme de CLHP d'un échantillon de culture de *Chlorella* sp. après 12 jours d'incubation avec l'acide 4-aminobenzoïque

Sample: 6.25 ppm Channel: detector 1
Filename: 18mar3
Acquired: 18-MAR-96 15:16 Method: C:\MAX\DATA1\CHR\CPABA_3
Operator: Chr
Comments: Courbe de calibration de l'acide 4-acetamidobenzoïque

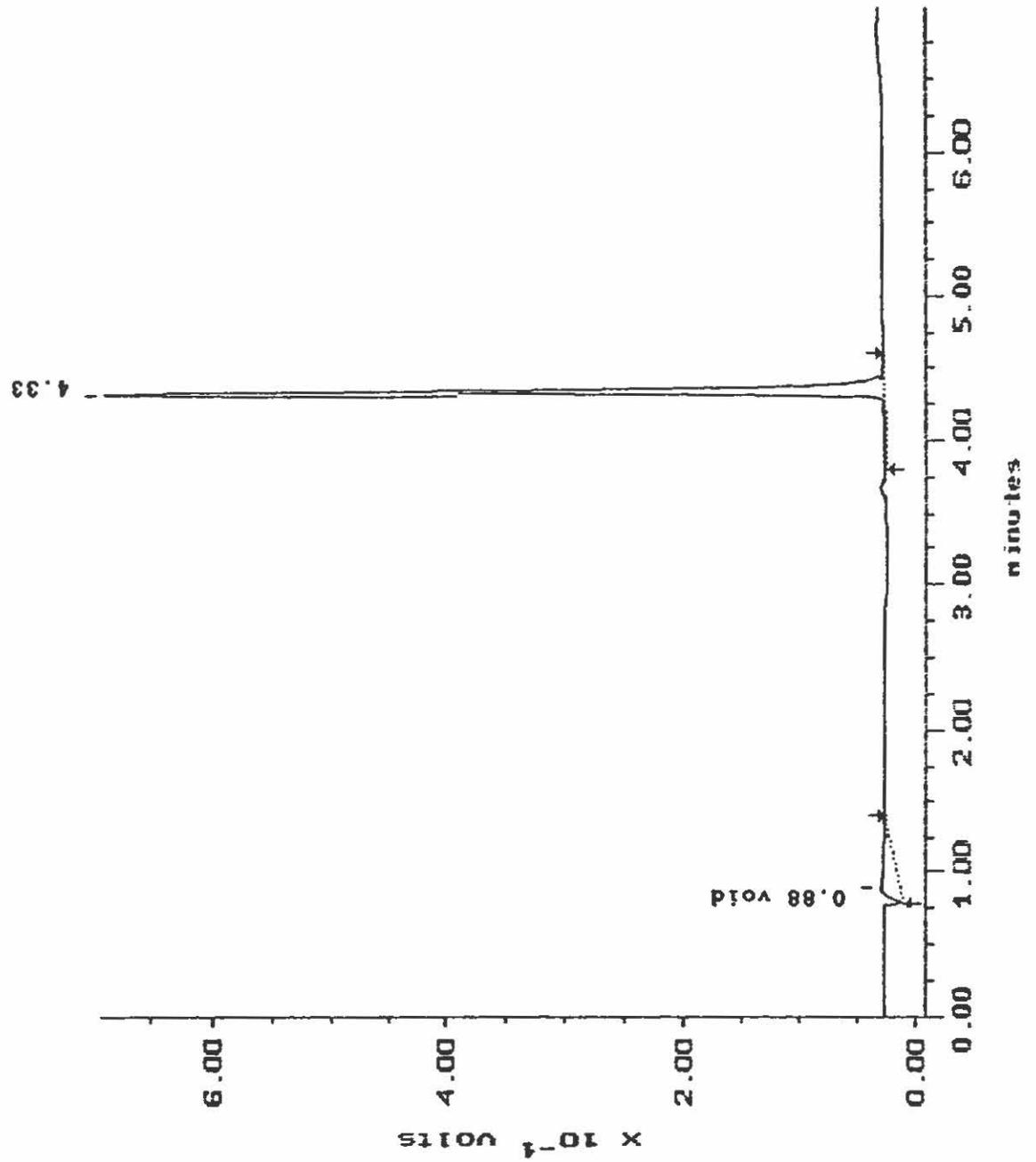


Figure 10. Chromatogramme de CLHP d'acide 4-acétamidobenzoïque authentique

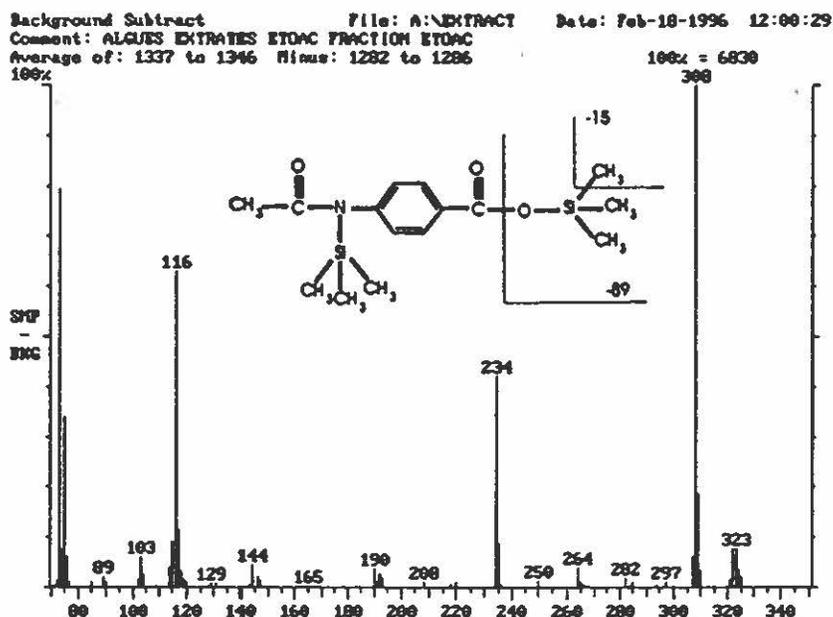
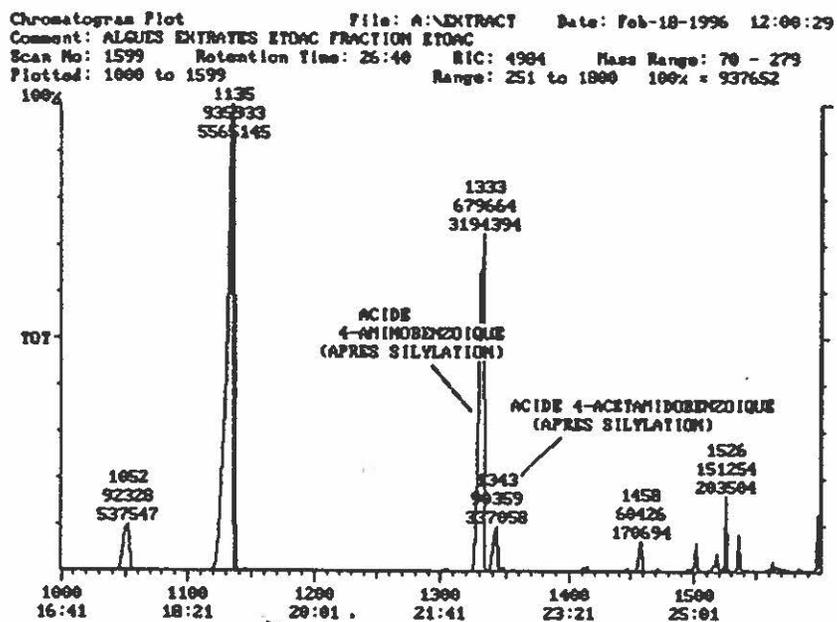


Figure 11. Chromatogramme et spectre de masse de CG/SM de l'acide 4-acétamidobenzoïque obtenu à partir d'une culture de *Chlorella* sp. exposée à l'acide 4-aminobenzoïque pendant 12 jours

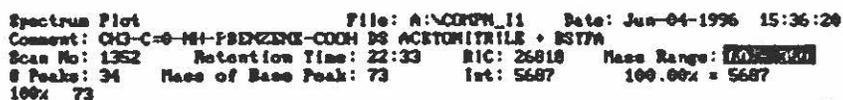
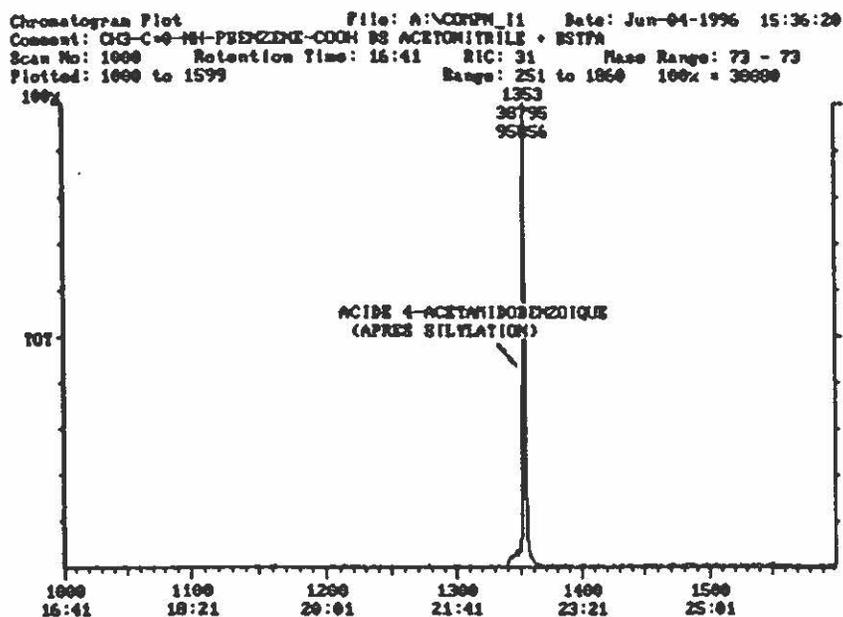


Figure 12. Chromatogramme et spectre de masse de CG/SM d'acide 4-acétamidobenzoïque authentique

Tableau 11. Récupération moyenne de l'acide 4-aminobenzoïque et de l'acide 4-acétamidobenzoïque pour *Chlorella* sp.

Acide benzoïque avec groupement...		Récupération moyenne des composés (mmoles/L)			
		Jour 0	Jour 4	Jour 8	Jour 12
4-AB IV lumière	Amino	0,83 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,77 ± 0,00	0,75 ± 0,00
	Acétamido	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00
	Bilan	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,81 ± 0,00	0,80 ± 0,00
4-AB IV obscurité	Amino	0,83 ± 0,00	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,81 ± 0,01
	Acétamido	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
	Bilan	0,83 ± 0,00	0,83 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,01
4-AB V lumière	Amino	0,55 ± 0,00	0,54 ± 0,00	0,53 ± 0,00	0,51 ± 0,00
	Acétamido	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00
	Bilan	0,59 ± 0,00	0,59 ± 0,00	0,59 ± 0,00	0,57 ± 0,00
4-AB V obscurité	Amino	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,00	0,61 ± 0,01	0,60 ± 0,01
	Acétamido	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01
	Bilan	0,62 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,62 ± 0,01

4.4. Croissance des algues

L'acide 4-aminobenzoïque a tendance à brunir en présence de lumière, mais cela n'affecte pas les lectures au spectrophotomètre à 500 nm. La croissance des algues ne semblait pas affectée par ce produit puisque l'absorbance des cultures exposées au produit et des témoins suivait la même tendance au cours du temps. Par contre, l'acide 4-aminobenzoïque a acidifié un peu les cultures et le pH est resté assez stable dans le temps dans tous ces échantillons.

5. Phénol

Les trois premiers essais utilisant le phénol ont subséquemment révélé une contamination par des souches bactériennes. Une de ces souches, en culture pure, a dégradé rapidement ce produit. L'identification de cette bactérie, un court bâtonnet Gram-positif sporulé, n'a pas été faite. Ces essais n'étaient donc pas concluants quant à l'activité de dégradation des algues. Toutefois, la série suivante n'était pas contaminée par d'autres microorganismes et les résultats présentés dans cette section correspondent aux deux essais qui la composaient, soient PHÉ V et PHÉ VI.

5.1. Contrôles abiotiques

Le phénol a été incubé dans le milieu O dans les mêmes conditions que les essais avec les algues et sa concentration est restée stable au cours de la durée de l'expérience (tableau 12).

Tableau 12. Récupération moyenne du phénol dans les contrôles abiotiques

Milieu O	Récupération moyenne du phénol (mg/L)			
	Jour 0	Jour 4	Jour 8	Jour 12
Concentration théorique: 100 mg/L (n=4)	94,0 ± 5,2	93,7 ± 7,0	94,6 ± 8,0	93,9 ± 6,4
Concentration théorique: 200 mg/L (n=4)	159,2 ± 6,2	155,1 ± 8,0	157,1 ± 6,8	151,2 ± 10,0
Concentration théorique: 400 mg/L (n=2)	469,3 ± 5,0	472,1 ± 8,3	463,9 ± 6,6	430,4 ± 48,2

5.2. Dégradation du phénol par les algues

Les tableaux 13 et 14 présentent la récupération moyenne du phénol dans les essais PHÉ V et PHÉ VI.

D'après les chromatogrammes de CLHP, aucun intermédiaire de dégradation, ni produit de transformation du phénol n'a été détecté.

Tableau 13. Récupération moyenne du phénol pour *Chlorella* sp.

<i>Chlorella</i> sp.	Récupération moyenne du phénol (mg/L)				Variation entre le jour 0 et le jour 12
	Jour 0	Jour 4	Jour 8	Jour 12	
PHÉ V - lumière (n=2)	96,4 ± 4,1	101,5 ± 7,2	90,3 ± 8,3	80,9 ± 3,1	- 15,5 ± 9,2
PHÉ V - obscurité (n=2)	101,2 ± 9,7	93,4 ± 2,5	102,2 ± 4,4	98,9 ± 5,4	- 2,3 ± 15,1
PHÉ VI - lumière (n=2)	159,2 ± 5,0	151,0 ± 1,5	129,3 ± 1,8	115,3 ± 2,9	- 43,9 ± 7,9
PHÉ VI - obscurité (n=2)	160,8 ± 15,9	151,5 ± 9,9	154,5 ± 10,2	161,2 ± 21,0	+ 0,5 ± 36,9

Tableau 14. Récupération moyenne du phénol pour *Scenedesmus obliquus*

<i>Scenedesmus obliquus</i>	Récupération moyenne du phénol (mg/L)				Variation entre le jour 0 et le jour 12
	Jour 0	Jour 4	Jour 8	Jour 12	
PHÉ V - lumière (n=2)	105,9 ± 14,3	95,7 ± 8,5	81,8 ± 14,2	84,2 ± 5,0	- 21,7 ± 19,3
PHÉ V - obscurité (n=2)	102,3 ± 4,4	98,9 ± 3,7	98,0 ± 1,2	102,0 ± 7,1	- 0,3 ± 11,5
PHÉ VI - lumière (n=2)	165,2 ± 9,0	159,7 ± 11,1	154,4 ± 10,1	135,7 ± 3,9	- 29,5 ± 12,9
PHÉ VI - obscurité (n=2)	168,3 ± 6,5	160,1 ± 5,5	162,0 ± 9,2	160,2 ± 4,8	- 8,1 ± 11,3

5.3. Croissance des algues

Les cultures d'algues qui ont été exposées longtemps au phénol ont subi un noircissement progressif de leurs surnageants. Ils sont passés d'incolore à orangé puis à noir. Ce noircissement a faussé les lectures d'absorbance puisque les contrôles abiotiques qui ont servi de témoins n'ont pas subi cette variation de couleur tout comme les algues sans produit.

La figure 13 montre la croissance moyenne des algues dans les essais PHÉ V et PHÉ VI d'après leur absorbance à 500 nm.

Le pH des cultures d'algues contenant du phénol semblait suivre une tendance semblable à celle des cultures sans phénol, mais à un taux un peu plus lent. Cependant, lors de l'essai VI avec *Chlorella* sp., le pH n'a pas augmenté normalement dans les échantillons contenant du phénol (tableau 15).

Estimation de la croissance des algues dans les essais avec le phénol

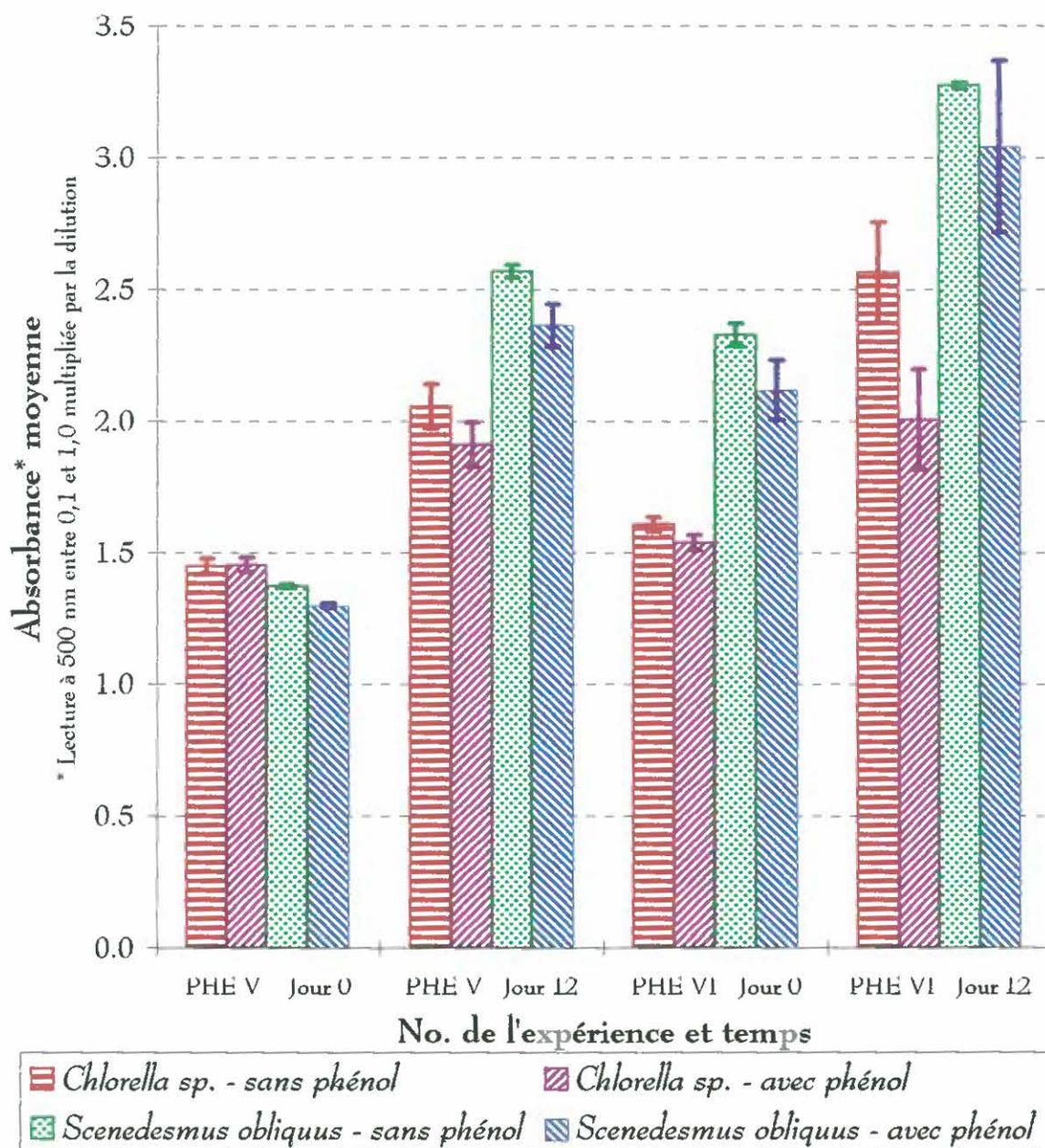


Figure 13. Estimation de la croissance des algues dans les essais avec le phénol

Tableau 15. pH moyen des échantillons PHÉ V et PHÉ VI incubés à la lumière

No. d'expérience	Algues	pH	
		Jour 0	Jour 12
PHÉ V - sans phénol (n=2)	<i>Chlorella</i> sp.	7,40 ± 0,01	7,87 ± 0,02
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	7,72 ± 0,06	10,10 ± 0,05
PHÉ V - avec phénol (n=2)	<i>Chlorella</i> sp.	7,38 ± 0,01	7,64 ± 0,00
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	7,85 ± 0,02	9,81 ± 0,12
	Contrôles abiotiques	7,09 ± 0,01	7,13 ± 0,01
PHÉ VI - sans phénol (n=2)	<i>Chlorella</i> sp.	7,67 ± 0,01	8,45 ± 0,07
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	9,47 ± 0,07	9,83 ± 0,04
PHÉ VI - avec phénol (n=2)	<i>Chlorella</i> sp.	7,51 ± 0,00	7,36 ± 0,00
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	9,12 ± 0,09	9,67 ± 0,08
	Contrôles abiotiques	7,16 ± 0,01	7,06 ± 0,01

6. *p*-crésol

Les deux essais effectués avec le *p*-crésol ne comportaient pas de contamination microbienne.

6.1. Contrôles abiotiques

Les résultats de récupération du *p*-crésol dans les contrôles abiotiques (milieu O exposé à la lumière pour 12 jours) sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16. Récupération moyenne du *p*-crésol dans les contrôles abiotiques

Milieu O	Récupération moyenne du <i>p</i> -crésol (mg/L)			
	Jour 0	Jour 4	Jour 8	Jour 12
Concentration théorique: 100 mg/L (n=2)	105,4 ± 4,2	103,4 ± 3,1	99,0 ± 0,1	97,2 ± 0,5
Concentration théorique: 200 mg/L (n=2)	166,4 ± 5,6	166,1 ± 0,0	167,8 ± 3,7	162,4 ± 11,5

6.2. Dégradation du *p*-crésol par les algues

Les tableaux 17 et 18 montrent la récupération obtenue pour le *p*-crésol après son incubation avec les algues. Aucun métabolite n'a été détecté par CLHP.

Tableau 17. Récupération moyenne du *p*-crésol pour *Chlorella* sp.

<i>Chlorella</i> sp.	Récupération moyenne du <i>p</i> -crésol (mg/L)				Variation entre le jour 0 et le jour 12
	Jour 0	Jour 4	Jour 8	Jour 12	
<i>p</i> -CRÉ I - lumière (n=2)	101,1 ± 2,9	100,2 ± 3,9	99,5 ± 3,5	97,4 ± 4,1	- 3,7 ± 7,0
<i>p</i> -CRÉ I - obscurité (n=2)	106,6 ± 1,5	101,6 ± 4,6	103,6 ± 2,3	104,1 ± 3,0	- 2,5 ± 4,5
<i>p</i> -CRÉ II - lumière (n=2)	155,6 ± 27,5	156,2 ± 13,5	150,1 ± 11,0	148,1 ± 14,4	- 7,5 ± 41,9
<i>p</i> -CRÉ II - obscurité (n=2)	173,6 ± 8,6	170,1 ± 8,3	173,9 ± 3,1	170,2 ± 2,3	- 3,2 ± 10,9

Tableau 18. Récupération moyenne du *p*-crésol pour *Scenedesmus obliquus*

<i>Scenedesmus obliquus</i>	Récupération moyenne du <i>p</i> -crésol (mg/L)				Variation entre le jour 0 et le jour 12
	Jour 0	Jour 4	Jour 8	Jour 12	
<i>p</i> -CRÉ I - lumière (n=2)	102,7 ± 0,7	97,1 ± 1,5	85,3 ± 2,1	79,0 ± 4,1	- 23,7 ± 4,8
<i>p</i> -CRÉ I - obscurité (n=2)	99,6 ± 5,3	99,6 ± 4,0	97,0 ± 4,3	98,5 ± 3,9	- 1,1 ± 9,2
<i>p</i> -CRÉ II - lumière (n=2)	148,6 ± 1,7	141,3 ± 2,9	123,9 ± 3,7	110,4 ± 8,5	- 38,2 ± 10,2
<i>p</i> -CRÉ II - obscurité (n=2)	166,4 ± 8,3	168,7 ± 3,7	171,6 ± 3,5	150,4 ± 21,8	- 16,0 ± 30,1

6.3. Croissance des algues

Le *p*-crésol a eu un effet significatif sur la croissance de *Chlorella* sp., mais pas sur celle de *Scenedesmus obliquus* comme le démontre la figure 14.

De plus, tout comme pour le phénol, après une longue exposition au *p*-crésol ou une exposition à une concentration plus grande de ce composé, le pH dans les cultures de *Chlorella* sp. n'augmentait plus contrairement aux témoins.

Estimation de la croissance des algues dans les essais avec le *p*-crésol

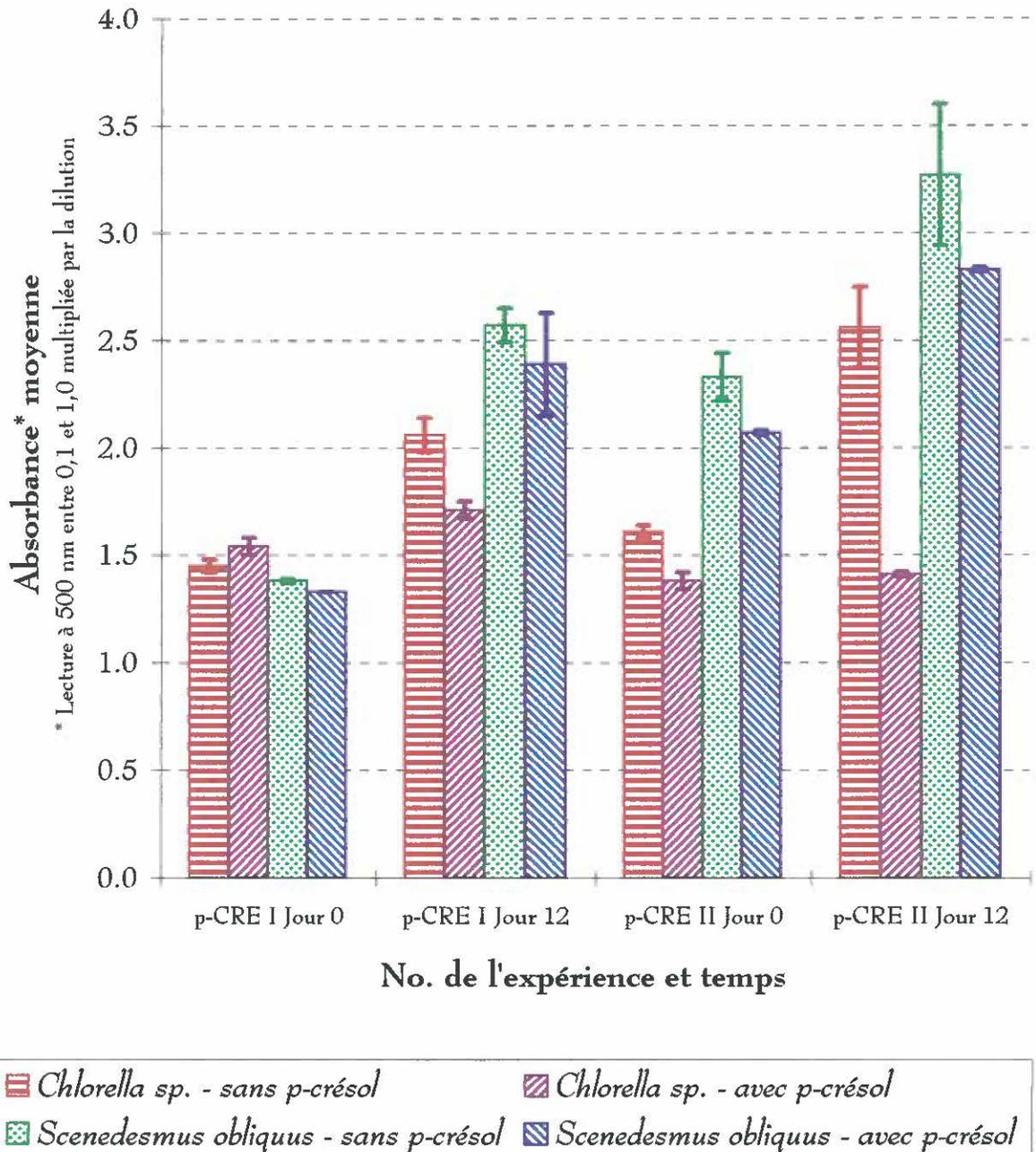


Figure 14. Estimation de la croissance des algues dans les essais avec le *p*-crésol

DISCUSSION

1. Choix des algues

Pour les essais de dégradation, il était préférable de choisir des algues dont les besoins physiologiques étaient connus et qui n'étaient pas trop sensibles aux composés à tester. Par conséquent, les genres *Chlorella* et *Scenedesmus* qui sont très étudiés semblaient un bon choix surtout que plusieurs travaux ont été faits avec eux quant à la toxicité ou à la dégradation de certains composés aromatiques.

Trois espèces de ces deux genres ont été choisies. Elles ont été achetées auprès de l'ATCC afin d'éviter de devoir les isoler ce qui aurait demandé un travail long et rigoureux et aussi pour s'assurer de leur identification. Toutefois, une d'entre elles, *Chlorella vulgaris*, a été éliminée très tôt car elle avait une croissance beaucoup plus lente que les deux autres dans les conditions choisies.

2. Variantes dans la méthodologie

Lors des expositions des algues aux divers composés, certaines variantes méthodologiques ont été utilisées. Le milieu de culture a été remplacé par de l'eau déminéralisée pour suivre le protocole décrit par Klekner et Kosaric (1992a) et aussi pour confirmer que les éléments composant le milieu O n'interagissaient pas abiotiquement avec les

composés à tester. Les algues ont aussi été incubées dans du milieu O contenant moins de nitrate (0% ou 10% de la concentration de KNO_3) afin de vérifier si certains composés pouvaient être utilisés comme sources d'azote. Des cultures, dans du milieu O régulier, ont aussi été incubées à l'obscurité pour vérifier si, en absence de photosynthèse, les composés pouvaient être utilisés comme source de carbone.

Dans les cas où il y avait eu dégradation, des essais ont été faits avec des surnageants de culture afin de vérifier si des produits sécrétés par les algues influençaient la dégradation photochimique du composé testé, tel que mentionné par Zepp et Schlotzhauer (1983). Cependant, il a été difficile de conclure suite à ces essais puisqu'ils n'étaient pas toujours faits en parallèle avec les essais de dégradation et les lots d'algues étaient différents.

Les quantités de biomasse ont aussi été variées puisque Klekner et Kosaric (1992a) concluent que leurs taux de dégradation sont élevés parce qu'ils emploient des cultures extrêmement concentrées. Des cultures de faibles densités optiques ont été utilisées dans certains essais, tout comme de très concentrées, mais en général, la concentration de biomasse employée était intermédiaire. Quand les cultures d'algues étaient très diluées et qu'un composé toxique était ajouté, souvent aucune phase exponentielle n'était observée. Cela est expliqué par les travaux de Stratton et Giles (1990) qui montrent que le volume total utilisé ainsi que le nombre de cellules par millilitre influencent la toxicité des composés. Et quant aux cultures extrêmement concentrées, elles exigeaient de grands volumes de culture et de longs

temps de production pour obtenir les fortes quantités de biomasse requises, ce qui accroissait les risques de contamination des cultures par d'autres microorganismes.

3. Contamination

Les premiers lots d'algues reçus de l'ATCC étaient contaminés et ils ont gracieusement été remplacés. La contamination microbienne a été rencontrée plusieurs fois au cours des essais, mais la méthode de culture qui a été adoptée à la fin et qui est décrite dans la section "Matériel et méthodes" a permis très souvent d'éviter ou du moins de détecter plus tôt toute contamination. Le contrôle régulier de la stérilité du matériel utilisé, plusieurs ensemencements sur milieux solides avec une incubation minimale de 14 jours ainsi que l'acidification du contenu des éprouvettes ont contribué à diminuer les risques de contamination du lot final. Mais ce qui a surtout été important, ce fut de faire les manipulations sous une hotte laminaire qui était exclusivement destinée aux algues (auparavant la hotte était partagée avec un autre projet impliquant de nombreuses bactéries sporulées). À partir de ce moment, les cultures-stock n'ont plus été contaminées.

Les microorganismes contaminants rencontrés sont nombreux : bactéries, moisissures, levures, actinomycètes. Ils n'ont pas été identifiés, mais d'après l'aspect des colonies et les colorations de Gram qui ont été faites, il y a peu de contaminants qui ont été aperçus dans des

lots différents, à l'exception d'une bactérie qui semblait associée à *Scenedesmus obliquus* qui a été rencontré trois ou quatre fois (figure 15). Ce contaminant n'était pas toujours présent, cela devait dépendre de culture-mère dont les algues étaient issues. C'était un bâtonnet Gram-négatif qui avait une croissance très lente à la température de la pièce (au moins 14 jours sur PCA et il n'a jamais été vu sur milieu #5). Les colonies étaient transparentes et se situaient sous celles des algues. Lorsque l'incubation était prolongée, elles pouvaient alors être observées autour des colonies vertes. Dans la littérature, des cas de parasitisme des algues sont rapportés, mais ils concernent essentiellement les protozoaires (Becker, 1994). Le mémoire de Forgues (1992) traite de la façon d'éliminer des bactéries qui contaminent des cultures de cyanobactéries. Ce document rapporte que les bactéries sont souvent liées aux algues par des polysaccharides. Mouget *et al.* (1995) ont aussi émis l'hypothèse que les bactéries aérobies pourraient favoriser la croissance des algues en réduisant la pression d'oxygène qui pourrait inhiber la photosynthèse.

Il y a plusieurs raisons qui peuvent expliquer des contaminations si fréquentes. Premièrement, il y a la croissance lente des algues et la nécessité d'obtenir de grandes quantités de biomasse. Les méthodes de production de biomasse utilisées initialement, étaient moins efficaces et leurs rendements étaient plus faibles, ce qui impliquait le cumul de plusieurs lots pour obtenir de grandes quantités de biomasse. Ceci est un facteur qui a accru les risques de contamination des cultures. La dernière méthode de production de biomasse en réacteur de 4L



Figure 15. Photographie au microscope photonique (400X) d'une vieille culture contaminée de *Scenedesmus obliquus* avec coloration de Gram

était meilleure, c'est-à-dire que la croissance des algues était plus rapide, mais aussi que les volumes obtenus étaient plus grands. Les cultures pouvaient donc être concentrées en les laissant décanter et en jetant une partie du surnageant. Deuxièmement, les cultures employées étaient des cultures fraîches qui n'avaient pas séjourné à 4°C en attendant la confirmation des tests de pureté. Une fois qu'un réacteur était ouvert, son contenu était immédiatement transféré pour éviter une contamination due aux manipulations du système. Les ensemencements sur PCA pour confirmer l'axénicité des cultures nécessitaient au moins 14 jours d'incubation, donc les essais étaient souvent terminés avant même que la pureté des cultures ait été confirmée. Pour ces essais, les résultats des ensemencements au temps initial étaient la seule source d'information quant à la non contamination des réacteurs.

Il aurait probablement été possible de limiter la contamination bactérienne en ajoutant des antibiotiques aux cultures. Cependant, vu la diversité des contaminants, il aurait fallu utiliser plusieurs antibiotiques différents ou trouver des antibiotiques à très large spectre. De plus, comme la composition du milieu de culture était minimale, les antibiotiques auraient pu affecter les algues ou interférer comme source d'azote ou de carbone lors des essais de dégradation.

De plus, suite aux multiples problèmes de contamination rencontrés lors de nos essais: assumer que les algues ne sont pas facilement contaminables, tel que l'avancent Klekner et Kosaric (1992a), et ne faire qu'un examen à l'état frais des cultures au départ, permet de

douter que les cultures qu'ils ont employées étaient exemptes de contamination bactérienne. Ainsi les résultats de dégradation qu'ils ont obtenus et qui sont vraiment supérieurs à tous ceux publiés antérieurement ne sont peut-être pas l'oeuvre des algues seules.

4. Pentachlorophénol

Le pentachlorophénol en solution aqueuse se dégradait de façon abiotique lorsqu'il était exposé à la lumière, tel que démontré dans le tableau 2. Les éléments composant le milieu O n'avaient pas d'interactions avec le produit, qui auraient pu amener sa dégradation puisque le même taux de dégradation était remarqué lorsque le pentachlorophénol était incubé dans de l'eau déminéralisée stérile exposée à la lumière (tableau 4). De plus, si le pentachlorophénol était incubé dans le milieu O à l'obscurité, il n'y avait pas de dégradation (tableau 3). Ce taux élevé de dégradation abiotique impliquait que pour pouvoir observer une dégradation par les algues, la biodégradation devait être élevée et se faire très rapidement. Ainsi dans les conditions employées généralement, il semble que les algues utilisées ne dégradent pas le pentachlorophénol puisque sa récupération dans les échantillons d'algues n'était pas significativement différente de celle obtenue dans les contrôles abiotiques.

Les résultats obtenus lors de l'essai PCP IX ont démontré une dégradation du pentachlorophénol par les algues, mais cela incluait un facteur externe inconnu qui a entraîné

beaucoup de mortalité chez les algues. Les cultures qui étaient habituellement vert foncé étaient blanches et elles n'étaient pas viables. Toutefois cette mortalité n'était pas due au pentachlorophénol puisque les témoins ne contenant pas de PCP se sont comportés de la même façon (figure 6). Il ne s'agit pas non plus d'une substance ayant agi directement sur le pentachlorophénol, puisque les contrôles abiotiques n'ont pas été affectés. Les seuls facteurs qui ont pu différer sont le lot d'algues (origine et état physiologique) et la température d'incubation. L'incubation a eu lieu dans une pièce dont la température n'était pas contrôlée et des fluctuations importantes de la température ont été observées. Ainsi une grande augmentation de température aurait pu survenir et agir de façon défavorable sur les algues. Néanmoins, cette expérience a permis d'observer une dégradation rapide du PCP par *Scenedesmus obliquus*, mais dans des conditions différentes de celles employées.

5. 2,4-dinitrophénol

Contrairement au pentachlorophénol, le 2,4-dinitrophénol n'a pas démontré de dégradation abiotique dans les conditions de cultures utilisées. De plus, il ne semblait pas facilement biodégradable car malgré la contamination fréquente, le produit n'a pas été dégradé souvent.

Seulement trois expériences ont montré une dégradation du 2,4-dinitrophénol et aucun n'offrait la certitude d'avoir été exempt de contamination. Il y avait un essai préliminaire qui n'incluait pas toutes les vérifications de croissance et de contamination. Il était donc possible que cet essai fût contaminé. Tous les échantillons de l'essai DNP XVII étaient contaminés et ils ont été soumis à différents traitements physiques, pourtant seulement les échantillons traités au Stomacher ont montré des résultats positifs de dégradation (figure 7). Aucun des traitements employés ne semblait faire varier la densité des cultures, ni la proportion algues/bactéries sauf les passages dans la glace sèche en combinaison avec des passages à 70°C qui occasionnaient une très grande mortalité de tous les organismes. Le traitement au Stomacher a été refait plus tard dans des conditions similaires, mais avec un lot d'algues différent, aucune dégradation du DNP n'a été observée. Le Stomacher est un appareil qui exerce des pressions sur ce qui est placé à l'intérieur et peut-être que ce traitement a amélioré la perméabilité cellulaire pendant une courte période après le traitement. Mais un examen à l'état frais d'algues soumises à cet appareil ne montrait pas de modifications de l'apparence des cultures. Comme ces traitements physiques n'ont pas amélioré de façon reproductible les taux de dégradation obtenus, ils n'ont pas été repris lors des essais avec les autres composés.

6. 4-nitroaniline

Lorsque le 4-nitroaniline a été incubé avec les algues et plusieurs espèces bactériennes les contaminant, aucune dégradation n'a été observée. Ce composé semblait donc difficilement biodégradable dans les conditions employées, c'est pourquoi il a été abandonné après seulement un essai. De plus, ce composé est peu soluble dans l'eau, ce qui rend difficile la production de solutions stock concentrées et ce qui impliquait une grande dilution des algues. Finalement, Luther (1990) l'a étudié comme source d'azote pour les algues et c'est un des composés qui sont les moins bien assimilés par les algues, tel que démontré par les densités optiques et les rapports C/N qu'il a mesurés.

7. Acide 4-aminobenzoïque

De façon abiotique, une solution d'acide 4-aminobenzoïque brunissait, mais ce composé n'était pas dégradé autant que le pentachlorophénol. *Chlorella* sp. transformait l'acide 4-aminobenzoïque en acide 4-acétamidobenzoïque. La quantité d'acide 4-aminobenzoïque transformée par *Chlorella* sp. était faible, mais elle était entièrement transformée en acide 4-acétamidobenzoïque. Ce n'était pas un effet de la lumière ou de l'air puisque ce métabolite n'était pas retrouvé dans les contrôles abiotiques. De plus, ce composé n'était pas excrété de façon habituelle par les algues puisqu'il n'a pas été observé dans les témoins sans acide 4-

aminobenzoïque. Cette transformation semblait avoir une certaine spécificité puisque *Scenedesmus obliquus* ne produisait pas d'acide 4-acétamidobenzoïque, non plus. De la lumière ou de la croissance étaient nécessaires à *Chlorella* sp. pour transformer l'acide 4-aminobenzoïque car à l'obscurité la production d'acide 4-acétamidobenzoïque étant presque nulle (la quantité mesurée pouvait probablement être attribuée au moment des manipulations où les cultures étaient exposées à la lumière pour quelques instants ou encore lors de la décongélation des échantillons).

Luther (1990) suggère que la croissance observée dans ses essais est une preuve que l'acide 4-aminobenzoïque est utilisé par les algues puisqu'il n'y a pas d'autre source d'azote dans le milieu de culture employé. Toutefois, tous nos essais avec l'acide 4-aminobenzoïque, effectués dans un milieu de culture sans autre source d'azote, montraient une augmentation progressive de l'absorbance des cultures, même s'il n'y avait pas de dégradation. Les témoins sans acide 4-aminobenzoïque, incubés dans le même milieu de culture, ont aussi montré une augmentation d'absorbance au cours du temps. L'augmentation observée de la densité optique est plus importante que celle rapportée par Luther (1990) même si les valeurs initiales dans nos essais étaient plus de dix fois plus élevées et donc supposaient moins de possibilités de croissance exponentielle. Il est vrai qu'à un certain stade de croissance, la mesure de densité optique n'est pas nécessairement représentative de l'augmentation de la population puisque c'est un agrandissement des cellules qui est observé plutôt qu'un doublement (de la Noüe *et al.*,

1989). Néanmoins, il est reconnu que les algues accumulent de l'azote et qu'elles peuvent croître quand même en période de carence (Nyholm et Källqvist, 1989). Cette accumulation d'azote aurait pu jouer un rôle important surtout que l'augmentation de population recherchée par Luther (1990) est faible.

8. Phénol

Lors des essais effectués avec *Chlorella* sp. et *Scenedesmus obliquus*, une dégradation du phénol a été démontrée. Après une exposition au phénol, une acclimatation des algues était déjà constatée entraînant de meilleures performances de biodégradation. Ainsi dans ce cas, la sélection des espèces et des individus est importante. Il aurait été préférable d'isoler des algues d'un lieu contaminé, en espérant qu'elles posséderaient déjà le bagage enzymatique nécessaire.

Un des contaminants bactériens rencontré était très efficace pour dégrader le phénol, et il semblait s'acclimater assez rapidement car les taux de dégradation s'amélioraient. Les algues en cultures pures dégradent aussi ce produit, mais à un taux beaucoup moins élevé. On peut donc s'inquiéter de certains excellents résultats de dégradation publiés alors que la contamination par des microorganismes n'a pas été vérifiée (Klekner et Kosaric, 1992a).

Des essais ont été faits à l'obscurité et à la lumière pour voir si le phénol pouvait remplacer le CO₂ et la photosynthèse comme source de carbone, mais la dégradation du phénol a eu lieu seulement à la lumière par conséquent, il ne pouvait être utilisé par les algues comme seule source de carbone dans ces conditions.

Les résultats publiés par Ellis (1977) ont été partiellement confirmés puisque *Scenedesmus obliquus* dégrade le phénol et qu'il démontre une acclimatation à ce composé. Mais à l'obscurité, aucune dégradation du phénol n'a été mesurée. Toutefois la quantité de phénol dégradé à l'obscurité rapportée par Ellis (1977) est inférieure à la limite de détection de nos méthodes parce qu'il utilisait une méthode de marquage au ¹⁴C.

9. *p*-crésol

Les algues employées, mais particulièrement *Scenedesmus obliquus*, peuvent dégrader le *p*-crésol lorsqu'elles sont exposées à la lumière. De plus, une acclimatation des algues est observée : une plus grande quantité de composé est dégradée par les algues pour une même période de temps.

Ce composé n'a pas été étudié très souvent auprès des algues, mais Semple et Cain (1996) ont montré que chez *Ochromonas danica*, la voie de dégradation du *p*-crésol est la même

que celle du phénol. Ce composé étant plus toxique que le phénol surtout pour *Chlorella* sp., la période d'acclimatation aurait dû être plus importante pour obtenir des résultats semblables.

CONCLUSION

Au terme de ce projet, on ne peut conclure quant à l'hypothèse de départ qui était que la dégradation de certains composés aromatiques nitrés ou chlorés, par des algues, était effectuée par leur système photosynthétique. Dans les conditions employées, le 2,4-dinitrophénol n'a jamais été dégradé par une culture d'algues non contaminée. Et pour ce qui est du pentachlorophénol, un seul essai, avec l'algue *Scenedesmus obliquus*, a montré un taux de dégradation significativement différent de ceux obtenus lors de la dégradation abiotique de ce composé.

Le mécanisme qui a permis la dégradation rapide du pentachlorophénol par *Scenedesmus obliquus* peut impliquer ou non le système photosynthétique. Néanmoins, il ressort qu'une culture non contaminée de cette algue peut dégrader rapidement le pentachlorophénol, mais dans des conditions d'incubation différentes de celles décrites dans ce document. Ainsi en établissant le ou les facteurs impliqués dans cet essai, les expériences pourraient être approfondies afin de vérifier l'hypothèse.

Par contre, ce projet a confirmé le potentiel de dégradation de d'autres composés aromatiques moins substitués par des algues microscopiques. Les algues *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella* sp., en cultures pures, dégradent le phénol et le *p*-crésol lorsqu'elles sont incubées à la lumière. De plus, *Chlorella* sp. incubée dans un milieu de culture sans autre source d'azote, transforme une partie de l'acide 4-aminobenzoïque en acide 4-acétamidobenzoïque.

Dans les cas du phénol, du *p*-crésol et de l'acide 4-aminobenzoïque, une acclimatation des algues aux composés a été remarquée par des taux de biodégradation plus élevés. Par conséquent, selon les résultats obtenus, si les expériences avaient été poursuivies les quantités de polluants dégradés par les deux algues étudiées, principalement le phénol, auraient probablement augmenté.

Enfin, ce travail a démontré que si des mesures importantes de contrôle de la qualité ne sont pas prises, les cultures d'algues peuvent être facilement contaminées par d'autres microorganismes et ces contaminants risquent de passer inaperçus.

REMERCIEMENTS

Ma reconnaissance va à mon directeur M.François Lépine ainsi qu'à mon co-directeur M.Raymond Charbonneau pour leur appui et leurs conseils précieux tout au long de ces deux dernières années.

Je tiens à remercier aussi des agents de recherche qui ont été d'inestimables collaborateurs, partageant sans compter temps et connaissances : Mme Chantal Thibault, M.Sylvain Milot et M.Guy McSween.

Merci aussi aux étudiants qui ont fait un stage dans notre laboratoire et qui ont travaillé à mon projet, permettant ainsi la réalisation d'un plus grand nombre d'essais : Mme Caroline Langlois, Mme Sonia Fortin et M.Sylvain Gravel.

Merci au FCAR pour m'avoir offert une bourse pendant la dernière année de ma maîtrise.

Enfin, au revoir et merci à tous les étudiants côtoyés pendant ce séjour à l'Institut Armand-Frappier.

BIBLIOGRAPHIE

Amy, G. L., C. W. Bryant, B. C. Alleman et W. A. Barkley. 1988. "Biosorption of organic halide in a kraft mill generated lagoon." *J Water Pollut Control Fed* 60:1445-1453.

ATCC. 1991. *ATCC Catalog of Protists*. American Type Culture Collection.

Aziz, M. A. et W. J. Ng. 1993. "Industrial wastewater treatment using an activated algae-reactor." *Wat Sci Technol* 28:71-76.

Becker, E. W. 1994. *Microalgae - Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press.

Blasco, R. et F. Castillo. 1992. "Light-dependent degradation of nitrophenols by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1." *Appl Environ Microbiol* 58:690-695.

Borowitzka, M. A. et L. J. Borowitzka 1992. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press.

Cannell, R. J. P. 1990. "Algal biotechnology." *Appl Biochem Biotechnol* 26:85-106.

Cerniglia, C. E., D. T. Gibson et C. Van Baalen. 1980. "Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae." *J Gen Microbiol* 116:495-500.

Chan, S. S., H. Chow et M. H. Wong. 1991. "Microalgae as bioabsorbents for treating mixture of electroplating and sewage effluent." *Biomed and Environ Sci* 4:250-261.

de la Noüe, J., L. Cloutier-Mantha, P. Walsh et G. Picard. 1984. "Influence of agitation and aeration modes on biomass production by *Oocystis* sp. grown on wastewaters." *Biomass* 4:43-58.

- de la Noüe, J. et D. Ní Eidhin. 1988. "Improved performance of intensive semicontinuous cultures of *Scenedesmus* by biomass recirculation." *Biotechnol Bioeng* 31:397-406.
- de la Noüe, J., R. van Coillie, L. Brunel et Y. Pouliot. 1989. "Traitement des eaux usées par culture de micro-algues : influence de la composition du milieu sur la croissance de *Scenedesmus* sp." *Annls Limnol* 25:197-203.
- de la Noüe, J. et N. de Pauw. 1988. "The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae." *Biotechnol Adv* 6:725-770.
- del Campo, F. F., J. M. Ramírez, A. Paneque et M. Losada. 1966. "Ferredoxin and the dark and light reduction of dinitrophenol." *Biochem Biophys Res Commun* 22:547-553.
- Ellis, B. E. 1977. "Degradation of phenolic compounds by fresh-water algae." *Plant Sci Lett* 8:213-216.
- Forgues, P. 1992. "Etude de l'interaction entre une cyanobactérie filamenteuse et deux bactéries associées." Mémoire de maîtrise. Université Laval.
- Geyer, H., R. Viswanathan, D. Freitag et F. Korte. 1981. "Relationship between water solubility of organic chemicals and their bioaccumulation by the alga *Chlorella*." *Chemosphere* 10:1307-1313.
- Hammouda, O., A. Gaber et N. Abdel-Raouf. 1995. "Microalgae and wastewater treatment." *Ecotoxicol and Environ Safety* 31:205-210.
- Hosono, H., I. Uemura, T. Takumi, T. Nagamune, T. Yasuda, M. Kishimoto, H. Nagashima, N. Shimomura, M. Natori et I. Endo. 1994. "Effect of culture temperature shift on the cellular sugar accumulation of *Chlorella vulgaris* SO-26." *J Ferment Bioeng* 78:235-240.

- Hwang, H.-M., R. E. Hodson et R. F. Lee. 1986. "Degradation of phenol and chlorophenols by sunlight and microbes in estuarine water." *Environ Sci Technol* 20:1002-1007.
- Javanmardian, M. et B. O. Palsson. 1991. "High-density photoautotrophic algal cultures: design, construction, and operation of a novel photobioreactor system." *Biotechnol Bioeng* 38:1182-1189.
- Kamal, V. S. et R. C. Wyndham. 1990. "Anaerobic phototrophic metabolism of 3-chlorobenzoate by *Rhodospseudomonas palustris* WS17." *Appl Environ Microbiol* 56:3871-3873.
- Klekner, V. et N. Kosaric. 1992a. "Degradation of phenols by algae." *Environ Technol* 13:493-501.
- Klekner, V. et N. Kosaric. 1992b. "Degradation of phenolic mixtures by *Chlorella*." *Environ Technol* 13:503-506.
- Koelmans, A. A. et C. S. Jiménez. 1994. "Temperature dependency of chlorobenzene bioaccumulation in phytoplankton." *Chemosphere* 28:2014-2048.
- Lee, E. G.-H., J. C. Mueller et C. C. Walden. 1978. "Decolorization of bleached kraft mill effluents by algae." *Tappi* 61:59-62.
- Liebe, B. et H. P. Fock. 1992. "Growth and adaptation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* on diesel exhaust particle extracts." *J Gen Microbiol* 138:973-978.
- Luther, M. 1990. "Nitro- and amino- substituted aromatic compounds as nitrogen sources for the green alga *Scenedesmus obliquus*." *Chemosphere* 21:231-242.

- Mansour, M., E. Feicht et P. Méallier. 1989. "Improvement of the photostability of selected substances in aqueous medium." *Toxicol Environ Chem* 20-21:139-147.
- Mathews, C. K. et K. E. van Holde. 1990. "Biochemistry." Redwood City, California: Benjamin/Cummings.
- Mouchet, P. 1986. "Revue des réactions des algues aux micropolluants minéraux et organiques: conséquences écologiques et possibilités d'applications industrielles." *Water Res* 20:399-412.
- Mouget, J.-L., A. Dakhama, M. C. Lavoie et J. de la Noüe. 1995. "Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved?" *FEMS Microbiol Ecol* 18:35-44.
- Nyholm, N. et T. Källqvist. 1989. "Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae" *Environ Toxicol Chem* :689-703.
- Oswald, W. J. 1992. *Micro-algal biotechnology*, M. A. Borowitzka et L. J. Borowitzka, éditeurs. Cambridge: Cambridge University Press.
- Palmer, C. M. 1980. *Algae and water pollution*. England: Castle House Publications Ltd.
- Pesheva, I., M. Kodama, M. L. Dionisio-Sese et S. Miyachi. 1994. "Changes in photosynthetic characteristics induced by transferring air-grown cells of *Chlorococcum littorale* to high-CO₂ conditions." *Plant Cell Physiol* 35:379-387.
- Picot, B., S. Moersidik, C. Casellas et J. Bontoux. 1993. "Using diurnal variations in a high rate algal pond for management pattern." *Wat Sci Technol* 28:169-175.

- Rai, P. K., N. Mallick et L. C. Rai. 1994. "Effect of nickel on certain physiological and biochemical behaviors of an acid tolerant *Chlorella vulgaris*." *BioMetals* 7:193-200.
- Richmond A. 1986. *Handbook of microalgal mass culture*. United States: CRC.
- Robinson, P. K. et S. C. Wilkinson. 1994. "Removal of aqueous mercury and phosphate by gel-entrapped *Chlorella* in packed-bed reactors." *Enzyme Microb Technol* 16:802-807.
- Schröder, E. et H. J. Rehm. 1981a. "Degradation of long chain n-alkanes by Chlorococcales." *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 12:36-38.
- Schröder, E. et H. J. Rehm. 1981b. "Degradation of long chain n-alkanes by disrupted cells of *Chlorella vulgaris*." *Eur J Appl Microbiol and Biotechnol* 13:188-190.
- Semple, K. T. et R. B. Cain. 1996. "Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*." *Appl Environ Microbiol* 62:1265-1273.
- Smith, M. H. et S. L. Woods. 1994. "Regiospecificity of chlorophenol reductive dechlorination by vitamin B12s." *Appl Environ Microbiol* 60:4111-4115.
- Stom, D. I., S. S. Timofeeva, L. I. Belykh et V. V. Butorov. 1978. "Role of Charophyte and other aquatic plants in the degradation of phenolic compounds." *Vodn Resur* 105-111.
- Stratton, G. et J. Giles. 1990. "Importance of bioassay volume in toxicity tests using algae and aquatic invertebrates" *Bull Environ Contam Toxicol* 44:420-427.
- Swackhamer, D. L. et R. S. Skoglund. 1993. "Bioaccumulation of PCBs by algae: kinetics versus equilibrium." *Environ Toxicol Chem* 12:831-838.

- Van Coillie, R., J. de la Noüe, C. Thellen et Y. Pouliot. 1990. "Traitement tertiaire d'eaux usées municipales par culture de *Scenedesmus* sp. en installation pilote." *Rev Sci Eau* 3:441-456.
- Vance, B. D. et W. Drummond. 1969. "Biological concentration of pesticides by algae." *J Am Wat Works Assoc* 61:360-362.
- Warszawsky, D., T. Cody, M. Radike, R. Reilman, B. Schumann, K. LaDow et J. Schneider. 1995. "Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light." *Chem-Biol Interact* 97:131-148.
- Wehrheim, B. et M. Wettren. 1994. "Biosorption of cadmium, copper and lead by isolated mother cell walls and whole cells of *Chlorella fusca*." *Appl Microbiol Biotechnol* 41:725-728.
- Wessels, J. S. C. 1965. "Mechanism of the reduction of organic nitro compounds by chloroplasts." *Biochim Biophys Acta* 109:357-371.
- Wong, A. S. et D. G. Crosby. 1981. "Photodecomposition of pentachlorophenol in water." *J Agric Food Chem* 29:125-130.
- Wong, M. H. et D. C. H. Pak. 1992. "Removal of Cu and Ni by free and immobilized microalgae." *Biomed Environ Sci* 5:99-108.
- Wu, X. F. et N. Kosaric. 1991. "Removal of organochlorine compounds in an upflow flocculated algae photobioreactor." *Wat Sci Technol* 24:221-232.
- Zepp, R. G. et P. F. Schlotzhauer. 1983. "Influence of algae on photolysis rates of chemicals in water." *Environ Sci Technol* 17:462-468.