

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

**PAR
PATRICIA LIRETTE**

**OPTIMISATION DE LA BIODÉGRADATION DES
HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES**

FÉVRIER 1996

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----|
| TABLE DES MATIERES | ii |
| LISTE DES TABLEAUX | v |
| LISTE DES FIGURES | vi |
| LISTE DE ABRÉVIATIONS | ix |
| SOMMAIRE | xii |
| INTRODUCTION | 1 |
| REVUE BIBLIOGRAPHIQUE | 6 |
| 1. CONTAMINATION DES SOLS | 7 |
| 1.1 Sources de contamination | 7 |
| 1.2 Contamination par les hydrocarbures | 7 |
| 2. HYDROCARBURES | 8 |
| 2.1 Généralités | 8 |
| 2.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques | 9 |
| 3. NORMES | 12 |
| 4. TRAITEMENTS BIOLOGIQUES DES SOLS | 14 |
| 4.1 Traitements <i>in situ</i> | 15 |
| 4.2 Traitements <i>ex situ</i> | 16 |
| 5. MICROORGANISMES DÉGRADANT LES HYDROCARBURES | 19 |
| 5.1 Généralités | 19 |
| 5.2 Microorganismes dégradant les HAPs | 22 |
| 5.2.1 Biodégradation des HAPs | 22 |
| 5.2.2 Isolement | 25 |
| 5.2.3 HAPs légers | 27 |
| 5.2.4 HAPs lourds | 29 |
| 6. VOIES MÉTABOLIQUES DES HAPs | 30 |
| 6.1 Généralités | 30 |
| 6.2 Fluorène | 32 |
| 6.3 Phénanthrène | 33 |
| 6.4 Pyrène | 35 |
| 6.5 Chrysène | 37 |
| 7. OPTIMISATION DE LA BIODÉGRADATION DES HAPs | 39 |
| 7.1 Généralités | 39 |
| 7.2 Température | 40 |
| 7.3 pH | 41 |
| 7.4 Humidité | 42 |
| 7.5 Oxygène | 42 |
| 7.6 Nutriments | 44 |
| 7.6.1 C:N:P | 44 |
| 7.6.2 Autres nutriments | 46 |
| 7.7 Inoculation de microorganismes adaptés | 48 |
| 7.8 Surfactants | 50 |

| | | |
|---------|---|-----------|
| 8. | DÉGRADATION DES HAPs DANS LE SOL DE LA SABLIÈRE THOUIN | 53 |
| | MATÉRIEL ET MÉTHODES | 55 |
| 1. | SOL DE LA SABLIÈRE THOUIN | 56 |
| 1.1 | Échantillonnage et conservation du sol | 56 |
| 1.2 | Caractérisation du sol | 56 |
| 1.2.1 | pH | 56 |
| 1.2.2 | Humidité | 56 |
| 1.2.3 | Rapport C:N:P | 57 |
| 1.2.3.1 | Carbone total | 57 |
| 1.2.3.2 | Azote total | 57 |
| 1.2.3.3 | Phosphore total | 58 |
| 1.2.4 | Quantification des métaux lourds | 58 |
| 1.2.5 | Huiles et graisses | 59 |
| 1.3 | Caractérisation microbiologique | 60 |
| 1.3.1 | Dénombrement des bactéries totales | 60 |
| 1.3.2 | Dénombrement des bactéries dégradant les HAPs | 61 |
| 2. | BIODÉGRADATION EN MILIEUX LIQUIDES | 62 |
| 2.1 | Inoculum | 62 |
| 2.2 | Cultures et conditions | 63 |
| 2.3 | Suivi de la croissance des populations bactériennes | 65 |
| 2.4 | Extractions et analyses | 66 |
| 2.5 | Identification des intermédiaires de dégradation | 68 |
| 3. | ÉTUDE D'UNE SOUCHE ISOLÉE DU SOL DE LA SABLIÈRE THOUIN | 70 |
| 3.1 | Isolement, identification et conservation | 70 |
| 3.2 | Spectre d'activité de la souche bactérienne isolée | 71 |
| 4. | ÉTUDE D'UN CHAMPIGNON ISOLÉ DU SOL DE LA SABLIÈRE THOUIN | 72 |
| 4.1 | Isolement et conservation | 72 |
| 4.2 | Essais en milieu liquide | 72 |
| 5. | BIODÉGRADATION DES HAPs EN MICROCOSMES | 73 |
| 5.1 | Conditions de cultures | 73 |
| 5.2 | Suivi des populations bactériennes | 74 |
| 5.3 | Extractions et analyses | 74 |
| 5.4 | Inoculation de la souche <i>Alcaligenes</i> en sol | 76 |
| 6. | MINÉRALISATION | 76 |
| 7. | ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ SURFACTANTE ET ÉMULSIFIANTE | 78 |

| | |
|--|-----|
| | iv |
| RÉSULTATS | 80 |
| 1. CARACTÉRISATION DU SOL | 81 |
| 1.1 Chimique | 81 |
| 1.2 Microbiologique | 81 |
| 2. CULTURES EN MILIEUX LIQUIDES | 83 |
| 2.1 Optimisation de la biodégradation | 83 |
| 2.1.1 Cultures en erlenmeyers de 500 mL | 83 |
| 2.1.2 Cultures en erlenmeyers de 250 mL | 89 |
| 2.2 Identification d'intermédiaires de dégradation | 97 |
| 3. ÉTUDE D'UNE SOUCHE BACTÉRIENNE ISOLÉE | 100 |
| 4. OPTIMISATION DE LA BIODÉGRADATION EN MICROCOSMES | 107 |
| 5. MINÉRALISATION | 122 |
| 5.1 Fluorène | 122 |
| 5.2 Phénanthrène | 122 |
| 5.3 Pyrène | 124 |
| DISCUSSION | 125 |
| 1. CARACTÉRISATIQUES DU SOL | 126 |
| 2. OPTIMISATION DE LA BIODÉGRADATION DES HAPs | 128 |
| 2.1 Milieux liquides | 130 |
| 2.1.1 HAPs légers | 130 |
| 2.1.1.1 Erlenmeyers de 500 mL | 130 |
| 2.1.1.2 Erlenmeyers de 250 mL | 132 |
| 2.1.2 HAPs lourds | 137 |
| 2.1.3 Intermédiaires de dégradation | 140 |
| 2.1.4 Potentiel de dégradation de la souche <i>Alcaligenes</i> sp. | 141 |
| 2.2 Microcosmes sol | 143 |
| 2.2.1 HAPs légers | 143 |
| 2.2.2 HAPs lourds | 150 |
| 2.2.3 Inoculation de la souche <i>Alcaligenes</i> en microcosmes. | 151 |
| 3. MINÉRALISATION DES HAPs | 153 |
| CONCLUSION | 154 |
| REMERCIEMENTS | 158 |
| BIBLIOGRAPHIE | 160 |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|------------|--|-----|
| Tableau 1. | Critères indicatifs de la contamination des sols pour les HAPs (Anonyme, 1988). | 13 |
| Tableau 2. | Liste des genres et des espèces bactériennes isolées pour quelques HAPs (Cerniglia, 1992). | 23 |
| Tableau 3. | Caractérisation du sol de la Sablière Thouin. | 82 |
| Tableau 4. | Caractéristiques de la souche <i>Alcaligenes</i> sp.. | 101 |
| Tableau 5. | Observation de la formation de halos et/ou de coloration sur milieu BH 0.025 par la souche <i>Alcaligenes</i> sp.. | 105 |
| Tableau 6. | Enlèvement du fluorène, du phénanthrène, du pyrène et du chrysène par la souche <i>Alcaligenes</i> sp. en milieu liquide BH. | 106 |
| Tableau 7. | Pourcentages d'enlèvement des quatre HAPs à l'étude dans les microcosmes avec le milieu BH supplémenté ou non après 30 jours d'incubation. | 108 |
| Tableau 8. | Pourcentages d'enlèvement du pyrène et du chrysène en milieu BH supplémenté ou non d'extrait de levures après 60 jours d'incubation. | 111 |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|-----------|--|----|
| Figure 1. | Structures chimiques de quelques HAPs (Wilson et Jones, 1993). | 10 |
| Figure 2. | Schéma représentatif d'un traitement en biopile (Samson, 1994b). | 18 |
| Figure 3. | Voie métabolique générale utilisée par les bactéries pour l'oxydation des HAPs (Cerniglia, 1984). | 31 |
| Figure 4. | Voie métabolique du fluorène proposée chez <i>Pseudomonas</i> F274. I, fluorène; II, 9-hydroxy-fluorène; III, 9-fluorènone; IV, 1,1a-dihydroxy-1-hydro-9-fluorènone; VI, 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin; VII, acide phtalique; VIII, 4,5-dihydroxyphtalate; IX, protocatéchuate; X, 2-hydroxy-4-carboxy-cis,cis-muconique semialdéhyde. (Grifoll <u>et al.</u> , 1994). | 34 |
| Figure 5. | Voie métabolique de phénanthrène chez <i>Pseudomonas</i> (Cerniglia, 1984). | 36 |
| Figure 6. | Voie métabolique du pyrène proposée chez <i>Rhodococcus</i> sp. UW1. I, pyrène; IIa, 1,2-dihydroxy-pyrène; IIb, 4,5-dihydroxypyrène; IIIa, acide cis-2-hydroxy-3-(périnaphtène)-propénique; IIIb, acide 2-hydroxy-2-(phénanthren-5-one-4-enyl)-acétique; IVa,b, métabolite I. (Walter <u>et al.</u> , 1991). | 38 |
| Figure 7. | Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène en erlenmeyers de 500 mL. | 84 |
| Figure 8. | Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du pyrène (a) et du chrysène (b) par la microflore indigène en erlenmeyers de 500 mL. | 85 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figure 9. | Courbe de croissance en milieux liquides de la population bactérienne totale et celle dégradant potentiellement le phénanthrène en erlenmeyers de 500 mL. | 87 |
| Figure 10. | Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène en erlenmeyers de 250 mL. | 90 |
| Figure 11. | Courbe de croissance en milieux liquides de la population bactérienne totale et celle dégradant potentiellement le phénanthrène en erlenmeyers de 250 mL. | 92 |
| Figure 12. | Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène en erlenmeyers de 250 mL. | 93 |
| Figure 13. | Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène en erlenmeyers de 250 mL. | 94 |
| Figure 14. | Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène inoculée selon la procédure modifiée en erlenmeyers de 250 mL. | 96 |
| Figure 15. | Cinétique d'enlèvement en milieu liquide BHEL.5 du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène à différentes concentrations initiales de bactéries totales. | 98 |
| Figure 16. | Cinétique d'enlèvement en milieu liquide BHEL.5 du pyrène par la microflore indigène à différentes concentrations initiales de bactéries totales. | 99 |
| Figure 17. | Microscopie électronique de la souche <i>Alcaligenes</i> sp. en coloration négative. La barre représente 1 μ m. | 102 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Figure 18. | Cinétique d'enlèvement en microcosmes du fluorène (a) et du phénanthrène (b), sous agitation à 300 rpm une fois par jour. | 110 |
| Figure 19. | Chromatogrammes obtenus en chromatographie en phase gazeuse à partir de l'éther d'extraction de microcosmes en milieu BH après zéro (a) et 60 (b) jours d'incubation. | 113 |
| Figure 20. | Cinétique d'enlèvement en microcosmes du fluorène (a) et du phénanthrène (b), sous agitation à 300 rpm quatre fois par jour (sauf indications contraires). | 115 |
| Figure 21. | Cinétique d'enlèvement en microcosmes du pyrène (a) et du chrysène (b), sous agitation à 300 rpm quatre fois par jour (sauf indications contraires). | 117 |
| Figure 22. | Cinétique d'enlèvement en microcosmes du fluorène (a) et du phénanthrène (b), sous agitation à 300 rpm quatre fois par jour. | 118 |
| Figure 23. | Cinétique d'enlèvement en microcosmes du pyrène sous agitation à 300 rpm quatre fois par jour. | 119 |
| Figure 24. | Cinétique d'enlèvement en microcosmes du phénanthrène (a) et courbe de croissance de la population bactérienne totale et de celle dégradant potentiellement le phénanthrène (b) en milieu BHEL.5 sous agitation à 300 rpm quatre fois par jour. | 121 |
| Figure 25. | Production de CO ₂ marqué (¹⁴ C) et pourcentage résiduel du fluorène (a), du phénanthrène (b) et du pyrène (c), en microcosmes contenant le milieu BHEL.5. | 123 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|----------|---|
| AM | : Amidon |
| BH | : Milieu Bushnell-Haas |
| BH 0.025 | : Milieu BH solide supplémenté de 0.025% (p/v) de protéose peptone, d'extrait de levures et d'amidon. |
| BHALEL.1 | : Milieu BH supplémenté d'alcanes (AL) (300 ppm) et de 0.1%(p/v) d'extrait de levures (EL). |
| BHEL.1 | : Milieu BH supplémenté de 0.1% (p/v) d'extrait de levures. |
| BHEL.25 | : Milieu BH supplémenté de 0.25% (p/v) d'extrait de levures. |
| BHEL.5 | : Milieu BH supplémenté de 0.5% (p/v) d'extrait de levures. |
| BHLIS.2 | : Milieu BH supplémenté de 0.2% (v/v) de lisier de porc. |
| BHLIS1 | : Milieu BH supplémenté de 1.0% (v/v) de lisier de porc. |
| BHSAL | : Milieu BH supplémenté de salicylate (100ppm). |
| BHTWEL.1 | : Milieu BH supplémenté de Tween 80 (TW) (200 ppm) et de 0.1% (p/v) d'extrait de levures. |
| BHVITMIN | : Milieu BH supplémenté d'un mélange de vitamines (VIT) et de minéraux (MIN). |
| CMC | : Concentration critique des micelles |
| CPM | : Coups par minute |
| EL | : Extrait de levures |
| HAM | : Hydrocarbure aromatique monocyclique |
| HAP | : Hydrocarbure aromatique polycyclique |
| MEF | : Ministère de l'Environnement et de la Faune |

PCA : Plate Count Agar

PP : Protéose peptone

SOMMAIRE

Suite à la caractérisation chimique et microbiologique du sol de la Sablière Thouin, la microflore indigène a été récupérée suivant une première méthode pour être ensuite inoculée en milieu liquide BH en présence des quatre HAPs fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène à raison de 100 mg/L chacun. Des pourcentages d'enlèvement significatifs ont été obtenus sous ces conditions pour les HAPs légers fluorène (85%) et phénanthrène (90%) après 16 jours d'incubation, mais aucun enlèvement significatif des HAPs lourds (pyrène et chrysène) n'a été obtenu. Le milieu liquide BH supplémenté d'extrait de levures à 0.5% (p/v) a permis d'obtenir un enlèvement plus rapide du fluorène et du phénanthrène. Le suivi de la population bactérienne totale a été effectué sur ces cultures et a démontré une population plus élevée lorsque le milieu BH était supplémenté d'extrait de levures (10^9 à comparer à 10^7 UFC/mL) qu'en milieu BH. Des résultats semblables ont été obtenus pour la population bactérienne dégradant potentiellement le phénanthrène. De plus, la concentration d'extrait de levures a pu être réduite à des valeurs en-dessous de 0.5% (p/v), à condition que du surfactant Tween (200 ppm) ou un mélange d'alcane (300 ppm) soit ajouté au milieu. L'ajout de lisier de porc a permis d'obtenir des résultats comparables

à ceux obtenus avec l'ajout d'extrait de levures.

Une modification de la méthode de récupération des microorganismes a été effectuée, de sorte à obtenir un inoculum plus important et plus représentatif. Cette modification a permis l'enlèvement d'un HAP lourd, soit le pyrène. Des résultats semblables ont été obtenus avec l'inoculation d'une plus forte concentration de bactéries indigènes, soit 10^6 UFC/mL.

Une souche bactérienne indigène du sol a été isolée à partir d'une culture liquide en milieu BH et a démontré la capacité de former un halo et/ou une coloration typique de la présence d'intermédiaires en présence de plusieurs HAPs soit le fluorène, le phénanthrène, le pyrène, l'acénaphthylène, le dibenzofurane, le dibenzothiophène, l'anthracène, le fluoranthène, le biphényl, le naphthalène et le benzanthracène. Son activité d'enlèvement du fluorène et du phénanthrène a été confirmé en milieu liquide BH avec ces HAPs comme seule source de carbones. Par contre, l'inoculation de cette souche en microcosmes n'a pas permis d'optimiser l'enlèvement des HAPs.

La recherche d'intermédiaires de dégradation du fluorène et du phénanthrène a été effectuée en milieu liquide BH supplémenté de 0.5% (p/v) d'extrait de levures et inoculés avec

la microflore indigène. Cependant, aucun intermédiaire potentiel n'a été identifié suite à ces expériences.

En microcosmes, la microflore indigène du sol est capable de dégrader presque entièrement le fluorène et le phénanthrène, après 30 jours d'incubation avec une agitation quotidienne à 300 rpm pendant 5 minutes. Sous ces conditions, le pyrène et le chrysène ont été enlevés à 60 et 33%, respectivement, après 60 jours d'incubation. Une augmentation du pourcentage d'enlèvement des quatre HAPs a été observée en microcosmes contenant le milieu BH et agités quatre fois par jours à 300 rpm pendant 5 minutes.

Cependant, l'ajout d'extrait de levures à 0.5% (p/v) au milieu BH en microcosmes a ralenti, voir même complètement inhibé, l'enlèvement du fluorène, du pyrène et du chrysène. De plus, ce ralentissement a été proportionnel à la concentration d'extrait de levures ajoutée. Toutefois, l'extrait de levures n'a pas influencé l'enlèvement du phénanthrène de façon significative. L'ajout de lisier de porc (1% (v/v)), de Tween 80 (200 ppm) ou de salicylate (100 ppm), n'a pas permis d'optimiser l'enlèvement des HAPs en microcosmes.

Le remplacement du milieu BH par de l'eau distillée dans un sol avec le rapport C:N ajusté à 100:10, a permis de

démontrer que les éléments présents dans ce milieu ne sont pas essentiels pour l'enlèvement du fluorène et du phénanthrène, mais qu'ils le sont pour l'enlèvement du pyrène et du chrysène. La réduction du volume de milieu BH (double concentration) à 12 mL au lieu de 27 mL a conduit à l'inhibition quasi complète de l'enlèvement des quatre HAPs à l'étude.

Le suivi de la population bactérienne totale et de celle dégradant potentiellement le phénanthrène en microcosmes contenant le milieu BH supplémenté de 0.5% (p/v) d'extrait de levures, a été effectué. Les résultats obtenus, après 30 jours d'incubation, indiquent une augmentation de la population totale de 10^5 à 10^7 UFC/g, en plus d'un enrichissement de la population dégradant le phénanthrène, qui est passée de 19 à 40% de la population totale.

Des microcosmes ont été incubés en présence des HAPs fluorène, phénanthrène ou pyrène, marqués radioactivement au carbone 14. Ces expériences ont permis de démontrer une minéralisation de ces HAPs jusqu'au CO_2 , après 30 ou 60 jours d'incubation. Toutefois, cette minéralisation a été beaucoup moins intense pour le pyrène.

INTRODUCTION

La contamination d'un sol cause de graves problèmes à l'écosystème dont il fait partie. Le biotraitement est maintenant reconnu parmi les procédés de restauration de ces sols contaminés. Le biotraitement est en fait la stimulation des microorganismes indigènes dégradant les composés xénobiotiques (Bourquin, 1990). Sans cette stimulation, le temps nécessaire pour obtenir une biodégradation efficace peut être long. Le but du biotraitement est donc de réduire la durée de cette période en optimisant les paramètres (Morgan et Watkinson, 1989).

Les composés les plus importants dans la contamination des sols sont les hydrocarbures (Anonyme, 1990). Les hydrocarbures forment une famille de composés comprenant, entre autres, les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAPs. Les HAPs sont en général des composés très toxiques, avec des propriétés cancérigènes et mutagènes (Cerniglia, 1993; Jacob et al., 1986; Miller et Miller, 1981). De par leur composition chimique, les HAPs sont d'autant plus récalcitrants que le nombre de noyaux aromatiques est élevé (Leahy et Colwell, 1990). Même si plusieurs microorganismes sont capables de dégrader les HAPs, leur taux de biodégradation dans le sol est lent (Manilal et Alexander, 1991; Jones et al., 1989; Bossert et al., 1984). Ce faible taux de dégradation dans le sol suggère que l'activité microbienne y est restreinte. Cependant, peu d'informations

sont connues sur ce sujet et les résultats rapportés dans la littérature sont parfois contradictoires. Il semble que plusieurs facteurs peuvent affecter le rendement d'un biotraitement, et il est évident que mieux connaître les microorganismes impliqués dans ce processus ainsi que leurs besoins, est essentiel.

La littérature rapporte quelques microorganismes, par exemple le genre *Pseudomonas*, capables d'utiliser les HAPs comme le fluorène et le phénanthrène. Par contre, ces microorganismes sont souvent incapables de dégrader un mélange complexe de polluants tel que l'on en retrouve dans les sols contaminés (Cutright et Sunggyu, 1994). Étant donné que les produits de dégradation des HAPs d'un microorganisme peuvent servir de source de carbone et d'énergie pour un autre grâce au co-métabolisme ou la complémentarité des voies métaboliques, l'usage de cultures mixtes est un avantage (Cutright et Sunggyu, 1994).

L'optimisation de la biodégradation des HAPs peut se faire par l'intermédiaire de plusieurs paramètres, incluant l'humidité, le pH, l'oxygène et l'ajout de nutriments ou de microorganismes adaptés (Brodkorb et Legge, 1992; Sims, 1990). Parmi les nutriments utilisés, on retrouve l'extrait de levures, le protéose peptone et le glucose (Keuth et Rehm,

1991). A notre connaissance, aucune étude ne rapporte l'utilisation de lisier de porc comme source d'azote afin de rendre le rapport C:N favorable aux microorganismes et ainsi optimiser la biodégradation des HAPs.

L'utilisation de microcosmes sol, c'est-à-dire de modèles miniatures de bioréacteurs, est importante afin de mieux évaluer les rendements préliminaires obtenus par inoculation en milieux liquides de la microflore indigène récupérée du sol. En effet, il est reconnu que la capacité de dégradation en sol peut être différente de celle obtenue en culture liquide (Manilal et Alexander, 1991). Le suivi de la population microbienne totale et de celle dégradant potentiellement les HAPs est aussi importante. A notre connaissance, aucune étude ne rapporte un suivi détaillé d'une population microbienne mixte en sol conjointement à une étude de dégradation d'un mélange d'HAPs.

Dans ce travail, l'objectif principal était d'optimiser la dégradation aérobie des HAPs par la microflore indigène d'un sol contaminé par des hydrocarbures, en l'occurrence celui de la Sablière Thouin. L'étude des différents paramètres a été effectuée dans l'optique de pouvoir transposer nos connaissances à un éventuel traitement par biopile. Dans un premier temps, nous avons effectué une caractérisation

chimique et microbiologique du sol de la sablière Thouin. La microflore indigène a ensuite été récupérée pour être inoculée dans différents milieux liquides. A partir d'une de ces cultures, une souche bactérienne a été isolée et son potentiel de dégradation des HAPs a été déterminé. La recherche d'intermédiaires de dégradation de certains HAPs a aussi été effectuée en milieu liquide. Finalement, des microcosmes ont été utilisés sous différentes conditions se rapprochant des conditions retrouvées dans les biotraitement de sols à grande échelle. L'acquisition de connaissances concernant la biodégradation des HAPs est indispensable pour le développement éventuel d'un biotraitement optimal.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. CONTAMINATION DES SOLS

1.1 Sources de contamination

L'origine de la contamination des sols est multiple. La production de déchets, l'activité industrielle, comme par exemple les industries pétrolières et de pâtes et papiers, l'épandage de pesticides et le déversement de diverses substances dangereuses sont des sources importantes de pollution. De plus, l'intensification de l'activité humaine complique la situation. Différents polluants sont ainsi répertoriés dans les sols contaminés tels des métaux, des composés phénolés, des pesticides, des composés aromatiques monocycliques volatils, des hydrocarbures chlorés et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Anonyme, 1988).

1.2 Contamination par les hydrocarbures.

Chaque année, des quantités importantes de pétrole et de produits pétroliers sont déversées accidentellement dans l'environnement. La contamination des sols par les hydrocarbures peut aussi résulter du raffinement, du transport et de l'entreposage du pétrole (Anonyme, 1990; Heitkamp, 1987; Bossert et al., 1984). En 1993, le Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec (MEF) répertoriait plus de 800 terrains contaminés dont 60% par des hydrocarbures (Samson, 1994a). Parmi les classes d'hydrocarbures, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont les principaux

contaminants et ce, dans les 2/3 de ces sites. Récemment, le Ministère des Ressources Naturelles évaluait à plus de 50 000 le nombre de réservoirs enfouis au Québec; plus du tiers d'entre-eux laisseraient échapper des hydrocarbures (Samson, 1994a). Les hydrocarbures représentent donc la source la plus importante de contamination des sols. Des cas de sols contaminés par les hydrocarbures ont aussi été signalés dans le Grand Nord Québécois (Anonyme, 1990).

2. HYDROCARBURES.

2.1 Généralités

Les hydrocarbures représentent un ensemble de composés regroupés en quatre classes: les aliphatiques, les asphaltènes, les résines et les aromatiques (Leahy et Colwell, 1990; Walker et Colwell, 1976). Les aliphatiques sont des composés à longues chaînes de carbones linéaires, ramifiés ou cycliques et sont considérés comme les composés les plus rapidement éliminés par les microorganismes (Atlas, 1981). Les asphaltènes sont des composés à longue chaîne de carbones de haut poids moléculaire. Ils regroupent des acides carboxyliques, des cétones, des esters et des porphyrines. Ils sont considérés comme étant plus récalcitrants à l'attaque microbienne. Les résines regroupent entre autres des pyridines, des sulfoxides et des amides (Walker et Colwell, 1976).

Les hydrocarbures aromatiques sont caractérisés par la présence de un ou plusieurs noyaux aromatiques. On parle d'hydrocarbures aromatiques monocycliques lorsqu'il n'y a qu'un seul noyau et de polycycliques ou HAPs lorsqu'il y a 2 noyaux et plus. Ils peuvent être disposés de façon linéaire, en angle ou en amas (Figure 1) (Wilson et Jones, 1993; Cerniglia, 1992; Cerniglia, 1984; Sims et Overcash, 1983). Ils peuvent aussi contenir des substituants alkylés et azotés ou être considérés comme des molécules hétérocycliques par la substitution d'un atome de carbone dans le noyau aromatique par un azote, un oxygène ou un soufre. (Cerniglia, 1984).

Le nombre de noyaux aromatiques permet de les classer en deux sous-groupes soit les HAPs légers de trois noyaux aromatiques et moins, et les HAPs lourds de quatre noyaux aromatiques et plus.

2.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les HAPs sont des composés universels résultant de la combustion de la matière organique (Cerniglia, 1984) mais aussi de différents procédés industriels. Les principales sources d'HAPs sont donc les feux de forêts et de prairies, les cendres volcaniques, les émissions des moteurs des véhicules, les rejets industriels tels que les effluents des industries pétrochimiques, le pétrole brut, la pollution urbaine, la fumée

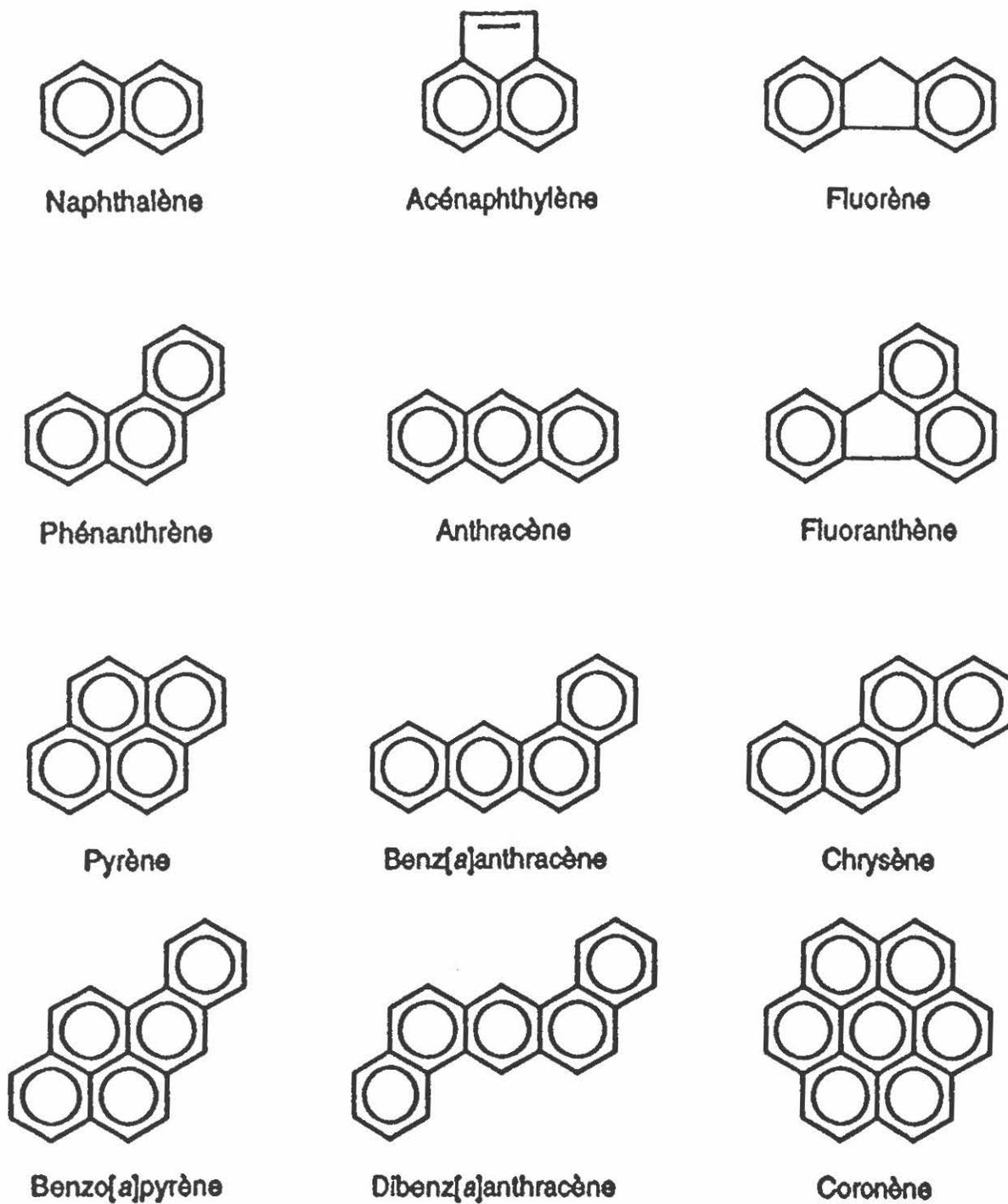


Figure 1.

Structures chimiques de quelques HAPs
(Wilson et Jones, 1993).

de tabac et de cigarettes, la nourriture fumée ou cuite sur charbon, l'incinération des déchets, le créosote et autres préservatifs du bois ainsi que la transformation, l'entreposage, la combustion et le déversement accidentel du pétrole (Wilson et Jones, 1993; Cerniglia, 1992; Heitkamp, 1987; Cerniglia, 1984; Sims et Overcash, 1983; LaFlamme et Hites, 1978; Giger et Blumer, 1974).

Avec l'augmentation de l'utilisation du charbon et des hydrocarbures par l'homme, les concentrations de ces composés dans l'environnement - spécifiquement les HAPs de trois à cinq noyaux - ont augmenté. Les hydrocarbures sont maintenant considérés comme des polluants communs (Grosser et al., 1995).

Les HAPs sont des composés hydrophobes qui ont tendance à s'accumuler dans l'environnement (Cerniglia, 1992; Heitkamp, 1987; MacKay et Shiu, 1977). De plus, plusieurs HAPs sont génotoxiques, cancérigènes et possèdent des capacités mutagènes (Cerniglia, 1993; Jacob et al., 1986; Miller et Miller, 1981). Ces caractéristiques s'amplifient avec l'augmentation du nombre de noyaux aromatiques, principalement pour ceux ayant quatre cycles aromatiques et plus (Cerniglia, 1992). Ceci explique la présence des HAPs sur la liste des polluants prioritaires dans "The Canadian Environmental Protection Act (CEPA)" et dans "l'U.S. Environmental Protection Agency" (Meek et al., 1994).

Une fois dans l'environnement, les HAPs peuvent être altérés par la volatilisation, la photooxydation, l'oxydation chimique, la bioaccumulation, l'adsorption à la matière organique du sol et la biodégradation (Cerniglia, 1992). La biodégradation est basée sur la capacité des microorganismes d'utiliser les xénobiotiques comme source de carbone et d'énergie (Murray *et al.*, 1994; Lewis, 1993; Atlas, 1990). Elle est reconnue comme étant le processus clé de la dégradation des HAPs dans l'environnement (Cerniglia, 1992; Atlas, 1990). Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés spécifiquement à la biodégradation des HAPs.

3. NORMES

Le MEF a établi des critères indicatifs de contamination des sols. Ces critères portent sur la concentration des métaux, des polluants minéraux, des pesticides, des huiles et graisses, des composés aromatiques monocycliques volatils, des composés phénoliques, des hydrocarbures chlorés et des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces critères permettent de classer les sols sous les valeurs-seuils A, B et C, et ainsi déterminer trois plages d'intervention A-B, B-C et C (Anonyme, 1988).

Le Tableau 1 représente la grille des critères indicatifs pour les HAPs et illustre les valeurs-seuils A, B et C pour ce type de composés. Les concentrations pour le seuil A sont les

Tableau 1 : Critères indicatifs de la contamination des sols pour les HAPs.

| HAPs | Concentration mg/Kg de matière sèche | | |
|-------------------------|---|----|-----|
| | A | B | C |
| Chrysène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Benzo(a)anthracène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Dibenzo(a,h)anthracène | < 0.1 | 1 | 10 |
| 3-méthylcholanthrène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Benzo(b)fluoranthène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Benzo(j)fluoranthène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Benzo(k)fluoranthène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Benzo(g,h,i)pérylène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Benzo(c)phénanthrène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Benzo(a)pyrène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Dibenzo(a,h)pyrène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Dibenzo(a,i)pyrène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Dibenzo(a,l)pyrène | < 0.1 | 1 | 10 |
| Indéno(1,2,3,c,d)pyrène | | | |
| Naphtalène | < 0.1 | 5 | 50 |
| Phénanthrène | < 0.1 | 5 | 50 |
| Acénaphène | < 0.1 | 10 | 100 |
| Acénaphthylène | < 0.1 | 10 | 100 |
| Anthracène | < 0.1 | 10 | 100 |
| Fluoranthène | < 0.1 | 10 | 100 |
| Fluorène | < 0.1 | 10 | 100 |
| Pyrène | < 0.1 | 10 | 100 |

(Anonyme, 1988)

plus faibles, soit inférieures à 0.1 ppm, et elles atteignent les valeurs les plus élevées, soit de 10 à 100 ppm, pour le seuil C. La plage A-B regroupe des sols faiblement contaminés où des travaux de décontamination ne seront pas nécessaires. Ces sols peuvent convenir à des constructions de type résidentiel. La plage B-C regroupe des sols contaminés qui feront l'objet de travaux de décontamination seulement s'il y a un impact des contaminants sur la nappe phréatique (Anonyme, 1988). Ces sols peuvent être utilisés tels quels pour des usages industriels ou commerciaux. Finalement, la plage C regroupe des sols qui sont plus fortement contaminés et où tous les usages y sont restreints, c'est-à-dire qu'ils devront obligatoirement être décontaminés avant d'être utilisés.

4. TRAITEMENTS BIOLOGIQUES DES SOLS

Les composés xénobiotiques et toxiques que l'on croyait résistants à l'attaque microbienne et aux processus naturels sont maintenant reconnus comme étant biodégradables depuis plusieurs années. L'intérêt de procéder à un biotraitement des sols contaminés a, du même coup, beaucoup augmenté. Les biotraitements, contrairement aux traitements physiques et chimiques, sont économiques et surtout respectueux envers l'écosystème déjà en place. Ils offrent donc une solution permanente en transformant les polluants en composés moins toxiques, pouvant aller jusqu'à leur minéralisation complète en

CO₂ et H₂O (dégradation aérobie) et parfois en CH₄ (dégradation anaérobie) (Providenti et al., 1993; Morgan et Watkinson, 1989).

Seulement aux États-Unis, une centaine de sites contaminés font l'objet de projets de biotraitement. Au Québec, la politique de réhabilitation des terrains contaminés favorise les solutions définitives, c'est-à-dire qui permettent l'élimination du contaminant (Anonyme, 1990). Cependant, la complexité d'un mélange de polluants peut affecter le rendement du biotraitement.

Les procédés biologiques de décontamination peuvent s'appliquer *ex situ* et *in situ*. Les technologies *in situ* sont utilisées sur le site même, c'est-à-dire sans aucune excavation, tandis que les technologies *ex situ* nécessitent l'excavation des sols. Dans ce cas, le biotraitement peut avoir lieu sur le site même ou ailleurs (Samson, 1994a).

4.1 Traitements *in situ*

Les biotechnologies *in situ* doivent nécessairement être utilisées lorsqu'il y a risques de contamination de la nappe phréatique ou lorsqu'il est impossible d'excaver le sol. Les traitements possibles peuvent se faire en milieu saturé d'eau, en milieu sec ou par percolation. Étant donné que ce type de biotraitement n'est pas le propos de ce travail, nous nous

contenterons de suggérer les références suivantes : Samson (1994a), Wilson et Jones (1993), Morgan et Watkinson (1992, 1990, 1989) et Sims (1990).

4.2 Traitements ex situ

Il y a cinq principaux traitements *ex situ*, soit l'épandage contrôlé, la bioventilation, les bioréacteurs de type "boues activées", les bioréacteurs à sol statique et le traitement en biopiles (Samson, 1994b).

L'épandage contrôlé consiste à étendre le sol contaminé sur une surface imperméable et de favoriser l'activité des microorganismes présents dans le sol par l'ajout de nutriments (azote et phosphore). Le sol est aéré par mélange mécanique.

La bioventilation sert à extraire les hydrocarbures légers de sols contaminés par aspiration d'air à travers la pile et à les acheminer par la suite à un biofiltre (ex.:tourbe ou compost) où se produisent les réactions de biodégradation.

Les bioréacteurs avec boues activées utilisent le sol contaminé mélangé à l'eau dans des bassins. Différents éléments y sont ajoutés (ex.: O₂, nutriments, agents tensioactifs). Cependant, ce type de biotraitement produit beaucoup d'effluents qu'il faut traiter par la suite, ce qui augmente

son coût d'opération.

Les bioréacteurs à sol statique ne contiennent pas de phases liquides. Ce sont des contenants rotatifs où le sol est amendé de nutriments et d'agents structurants (brans de scie, tourbe, etc...) pour réduire l'agglomération des particules. L'humidité est aussi contrôlée. Cette technologie est coûteuse et surtout utilisée en Europe. Cependant, elle a l'avantage d'être utile en climats nordiques car on peut contrôler la température.

Le traitement en biopile est simplement la mise en pile du sol excavé sur une surface imperméable. L'aération se fait en aspirant l'air à travers le sol. L'eau et les nutriments sont ajoutés par arrosage. La Figure 2 illustre les différents éléments impliqués dans la formation d'une biopile. Le traitement par biopile est le moins coûteux et il est relativement efficace. Cependant, les limitations de cette méthode font que l'obtention de concentrations d'HAPs rencontrant les normes en vigueur demandent un temps significativement plus long. L'optimisation de la biodégradation des HAPs, particulièrement les HAPs lourds, devient essentielle afin de rendre la méthode par biopile plus compétitive. L'étude en laboratoire que nous avons effectuée avait comme objectif de préciser certains paramètres

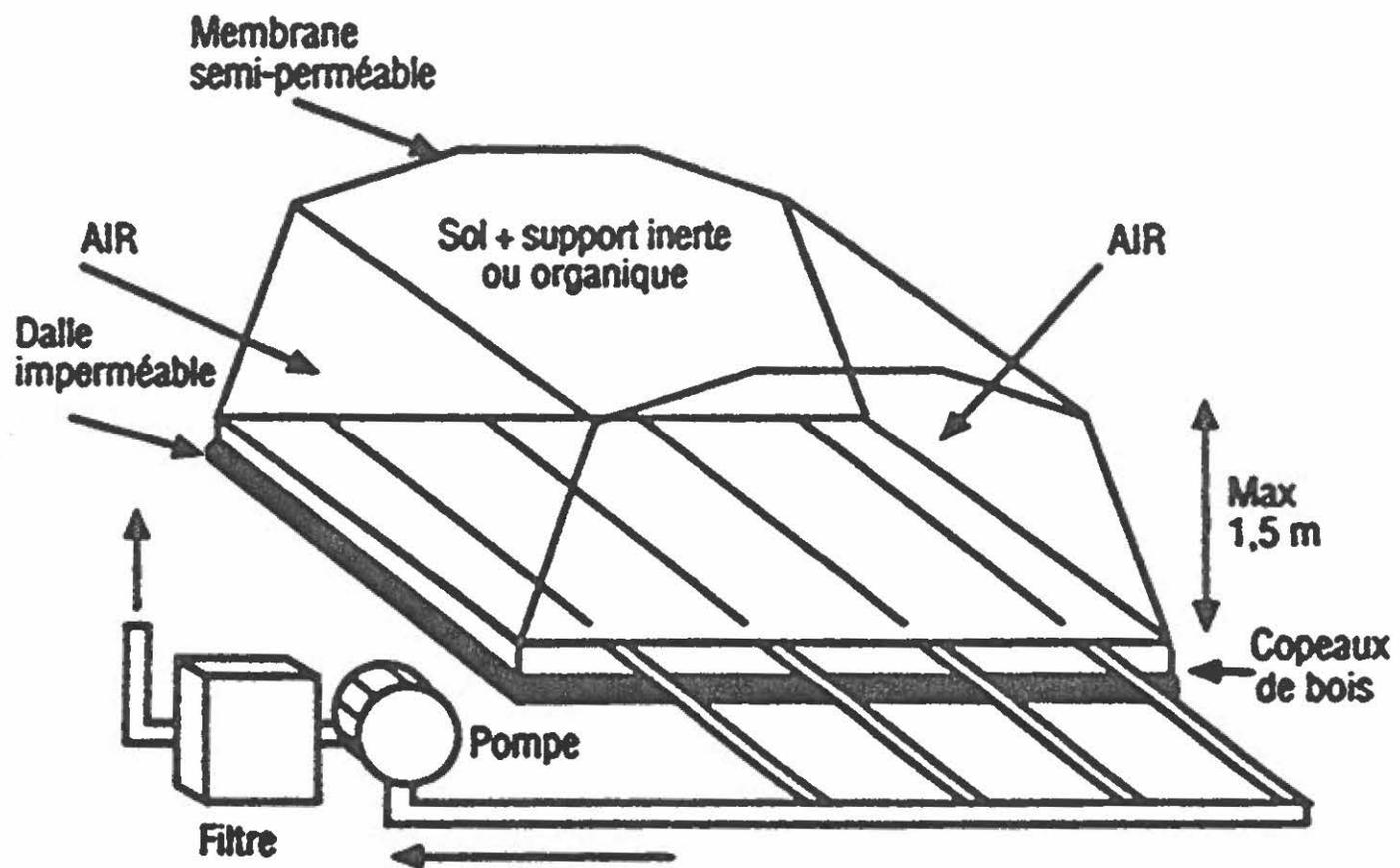


Figure 2. Schéma représentatif d'un traitement en biopile (Samson, 1994b).

applicables à un traitement en biopile afin de permettre une dégradation optimale des HAPs.

5.0 MICROORGANISMES DÉGRADANT LES HYDROCARBURES

5.1 Généralités

Le biotraitement d'un sol contaminé est basé sur la capacité des microorganismes du sol à utiliser les polluants comme source de carbone et d'énergie. Parfois certains microorganismes peuvent procéder par co-métabolisme, c'est-à-dire que certains composés ne sont métabolisés qu'en présence d'autres sources de carbone. Ces réactions co-métaboliques sont dues à l'attaque de ces molécules par des enzymes de faible spécificité. Certains auteurs ont aussi démontré une acclimatation croisée, c'est-à-dire que l'exposition à un composé entraîne un accroissement du métabolisme envers un autre composé (Bauer et Capone, 1988; Kerr et Capone, 1988).

La population microbienne influence directement le succès d'un biotraitement d'un sol contaminé par les HAPs. La proportion des microorganismes capables d'utiliser les HAPs varie d'un sol à l'autre dépendamment des sources de carbones disponibles et des propriétés physico-chimiques de ce sol. La proportion de la population microbienne métaboliquement active dans un sol est relativement faible. Les bactéries constituent les principaux microorganismes actifs. Pour la population

totale, des valeurs de 10^6 à 10^9 bactéries par gramme de sol sont fréquemment observées (Kerry, 1993; Morgan et Watkinson, 1989). La proportion de bactéries dégradant les hydrocarbures varie selon les conditions du sol et se situe généralement à des valeurs entre 5 et 50% de la population totale (Grosser et al., 1995; Bogardt et Hemmingsen, 1992; Oudot et al., 1987)

La proportion et la diversité des microorganismes utilisant les hydrocarbures par rapport à la flore indigène peuvent augmenter suite à la contamination du sol par des hydrocarbures. On rapporte dans plusieurs études que la microflore indigène a la capacité de s'adapter et ainsi d'augmenter son potentiel de dégradation des hydrocarbures (Tabak et al., 1991; Leahy et Colwell, 1990; Spain et al., 1980). La proportion de microorganismes utilisant les hydrocarbures reflète donc généralement le degré de contamination d'un écosystème.

Les bactéries, les cyanobactéries, les algues et les champignons jouent un rôle important dans le métabolisme des hydrocarbures dans les sols et les environnements aquatiques (Cerniglia, 1984). Cependant, peu d'études relatent l'étendue de la participation de chacun de ces groupes dans la biodégradation des hydrocarbures. Les variations sont dues aux différents écosystèmes et à l'environnement local. Il est

reconnu, par contre, que les hydrocarbures sont dégradés majoritairement par les bactéries et les champignons (Leahy et Colwell, 1990). Les champignons sembleraient être plus efficaces dans la dégradation des hydrocarbures car ils s'adaptent mieux aux conditions extrêmes de pH et de déficience en eau et en nutriments que l'on retrouve souvent dans le sol. De plus, des valeurs de pH acide sélectionnent les champignons mais, sous des conditions plus neutres, la contamination en hydrocarbures favorise la croissance bactérienne (Morgan et Watkinson, 1989).

Dans le sol, les genres bactériens les plus importants sont *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* et *Mycobacterium* (Cerniglia, 1993; Leahy et Colwell, 1990; Atlas, 1981). Dans le cas des champignons dégradant les hydrocarbures, ce sont les genres *Trichoderma*, *Mortierella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phanerochaete* et *Cunninghamella* que l'on retrouve le plus fréquemment (Barr et Aust, 1994; Brodkorb et Legge, 1992; Leahy et Colwell, 1990; Atlas, 1981). Des levures telles que *Candida* et *Rhodotorula* ont aussi été identifiées (Leahy et Colwell, 1990; Sirvins et Tramier, 1985; Atlas, 1981).

5.2 Microorganismes dégradant les HAPs

5.2.1 Biodégradation des HAPs

Généralement, le taux de dégradation des HAPs est inversement proportionnel au nombre de noyaux aromatiques (Cerniglia, 1992). L'isolement de microorganismes dégradant des HAPs légers tel que le naphthalène, le phénanthrène et l'acénaphthène, de même que les voies métaboliques utilisées ont été rapportés (Cerniglia, 1992; Pothuluri et al., 1986; Cerniglia, 1984; Gibson et Subramanian, 1984; Shocken et Gibson, 1984). Par contre, il y a peu d'informations sur les microorganismes capables de métaboliser les HAPs de hauts poids moléculaires comme le chrysène, le pyrène et le benzopyrène (Kelley et Cerniglia, 1991; Walter et al., 1991; Mueller et al., 1990; Weissenfels et al., 1990,1991; Heitkamp et Cerniglia, 1988a,1989; Heitkamp et al., 1988; Barnsley, 1975). La liste des genres et des espèces bactériennes qui ont été isolées pour quelques HAPs est présentée au Tableau 2. La différence de la dégradabilité des HAPs lourds et légers est reflétée par le nombre d'espèces bactériennes isolées pour ces deux types de HAPs. Par exemple, leur nombre est de beaucoup inférieur pour le pyrène et le chrysène, qui sont deux HAPs plus résistants à l'attaque microbienne, par rapport au naphthalène qui n'a que deux noyaux aromatiques (Cerniglia, 1992).

Tableau 2: Hydrocarbures aromatiques polycycliques oxydés par différentes espèces bactériennes.

| Composés | Organismes | Références |
|--------------|--|--|
| Phénanthrène | <i>Aeromonas</i> sp., <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Arthrobacter polychromogenes</i> , <i>Beijerinckia</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Vibrio</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Streptomyces griseus</i> , <i>Acinetobacter</i> sp. | Kiyohara <i>et al.</i> 1976,1982,1990; Weissenfels <i>et al.</i> 1990,1991; Keuth et Rehm 1991; Jerina <i>et al.</i> 1976; Colla <i>et al.</i> 1959; West <i>et al.</i> 1984; Kiyohara et Nagao 1978; Heitkamp et Cerniglia 1988a; Guerin et Jones 1988,1989; Treccani <i>et al.</i> 1965; Foght et Westlake 1988; Mueller <i>et al.</i> 1990; Sutherland <i>et al.</i> 1990; Ghosh et Mishra 1983; Savino et Lollini 1977; Trower <i>et al.</i> 1988; Barnsley 1983 |
| Fluoranthène | <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>Pseudomonas capacia</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. | Kelley et Cerniglia 1991; Walter <i>et al.</i> 1991; Weissenfels <i>et al.</i> 1991; Foght et Westlake 1988; Mueller <i>et al.</i> 1989,1990 |
| Pyrène | <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp. | Heitkamp <i>et al.</i> 1988; Walter <i>et al.</i> 1991; Weissenfels <i>et al.</i> 1991; Grosser <i>et al.</i> 1991 |
| Chrysène | <i>Rhodococcus</i> sp. | Walter <i>et al.</i> 1991 |

(Cerniglia, 1992)

Beaucoup d'études en laboratoire sur la biodégradation des HAPs ont utilisé des composés purs pour minimiser le nombre de variables. Peu de choses sont connues à propos de l'effet d'un HAP sur la biodégradabilité d'un autre. Cela est d'autant plus important étant donné que les HAPs existent sous forme de mélanges complexes dans les environnements contaminés (Tiehm et Fritzsche, 1995). L'utilisation d'un HAP comme substrat pour la croissance en présence d'autres HAPs a été rapportée chez quelques microorganismes (Boldrin et al., 1993; Weissenfels et al., 1990).

La compétition métabolique entre différents HAPs chez des souches de *Pseudomonas* suggère que ce phénomène serait commun chez plusieurs microorganismes (Stringfellow et Aitken, 1994). Quand le fluorène, le phénanthrène et le pyrène sont ensemble dans une culture pure de *Mycobacterium* sp., une dégradation simultanée se produit (Tiehm et Fritzsche, 1995). Cependant, cette dégradation se fait selon des cinétiques différentes par rapport aux HAPs étudiés individuellement. De plus, dans le sol, un HAP de haut poids moléculaire est plus résistant à la dégradation quand il est seul plutôt que dans un mélange complexe de composés (Sims, 1990).

Jusqu'à présent, la dégradation des HAPs a principalement été étudiée en conditions aérobies. L'oxygène moléculaire sert

non seulement d'accepteur d'électrons mais est aussi incorporé au cycle aromatique. Cependant, la biodégradation des HAPs sous des conditions anoxiques ou anaérobiques retient de plus en plus l'attention car plusieurs environnements pollués contiennent peu d'oxygène et les processus aérobies y sont alors inhibés (Leahy et Colwell, 1990). La biodégradation des HAPs peut survenir en conditions dénitrifiantes, comme l'ont démontré Mihelcic et Luthy (1988) avec le naphthalène et l'acénaphène.

La revue de littérature portera entièrement sur la biodégradation aérobie car notre étude a été effectuée sous ces conditions.

5.2.2 Isolement

Étant donné que dans notre projet nous nous sommes intéressés principalement à la flore bactérienne, nous rapporterons dans les lignes suivantes les connaissances concernant ces microorganismes. L'isolement de la flore bactérienne dégradant les HAPs peut se faire de différentes façons. Certains auteurs utilisent une technique d'enrichissement en milieu liquide pour sélectionner, parmi la microflore indigène, les microorganismes dégradant les HAPs. Ceci est dû au fait que ces microorganismes ne sont généralement pas dominants dans le sol. De plus, plusieurs de

ces microorganismes isolés du sol sont à croissance lente (Horowitz et al., 1975). Les microorganismes sont cultivés en présence du HAP agissant comme pression sélective. Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers et réinoculés dans le même milieu frais. Après un certain nombre de passages, il y aura possibilité d'augmentation de la proportion de microorganismes dégradant ce composé (Weissenfiels et al., 1990; Stucki et Alexander, 1987).

Une autre technique consiste à inoculer les microorganismes du sol sur une gélose et d'y vaporiser le HAP préalablement solubilisé dans un solvant volatil. Après quelques jours d'incubation, la formation de zones d'éclaircissement autour des colonies qui utilisent ce HAP est observée (Kiyohara et al., 1982). Cette technique est efficace et aussi plus rapide pour isoler des microorganismes intéressants. Elle permet aussi d'effectuer le dénombrement de la population microbienne présente dans le sol. Cependant, MacGillivray et Shiaris (1993) ont observé que la formation d'un halo n'indique pas nécessairement que le microorganisme est capable de minéraliser le HAP en question. En effet, sur 13 levures formant des halos en présence de phénanthrène, seulement 5 étaient capables de minéraliser le phénanthrène marqué au carbone 14. Ils ont aussi observé que la capacité de formation d'un halo sur HAP peut ne pas se conserver après

repiquages successifs sur milieu solide.

Une modification de cette technique consiste à incorporer l'inoculum de microorganismes et le HAP solubilisé dans une couche d'agar qui est déposée sur la surface d'un milieu minéral solide (Bogardt et Hemmingsen, 1992). Cependant, les techniques sur milieu solide peuvent sous-estimer la population de microorganismes présents puisqu'il est reconnu qu'environ 5% seulement des microorganismes peuvent former des colonies sur milieu gélosé (Frostegard et al., 1993; Cerniglia, 1993).

5.2.3 HAPs légers

La revue de littérature se limitera au fluorène et au phénanthrène qui sont les deux HAPs légers que nous avons utilisés dans cette étude. Le fluorène est un HAP tricyclique dont l'un des cycles a cinq liens. L'utilisation du fluorène comme seule source de carbone a souvent été rapportée dans la littérature. Des souches bactériennes pures ont même été isolées de différents environnements contaminés aux hydrocarbures et/ou aux HAPs, pour leur capacité à dégrader ce HAP. Ces dernières ont été identifiées comme *Pseudomonas* sp. F274, *Pseudomonas vesicularis*, *Staphylococcus auriculans* et *Arthrobacter* sp. F101 (Grifoll et al., 1994; Monna et al., 1993; Grifoll et al., 1992; Weissenfels et al., 1990). Le fluorène est aussi utilisé par co-métabolisme par deux souches

de *Mycobacterium* sp. et par une souche de *Rhodococcus* sp. (Bouchez et al., 1995; Tiehm et Fritzsche, 1995; Boldrin et al., 1993). Kastner et al. (1994) ainsi que Stieber et al. (1994) ont rapporté la dégradation du fluorène dans différents sols contaminés par ce composé. Récemment, cinq souches de *Sphingomonas* sp. obtenues de l'"American Type Culture Collection" ont démontré leur capacité de former des zones d'éclaircissement sur le fluorène (Fredrickson et al., 1995).

Le phénanthrène est un HAP à trois noyaux aromatiques largement répandu dans l'environnement (Cerniglia, 1984). Sa solubilité dans l'eau est de 1.3 mg/L. Sa structure de base est retrouvée dans plusieurs HAPs beaucoup plus problématiques comme le benzanthrène. Il sert donc souvent de modèle pour l'étude de la biodégradation des HAPs (Okpokwasili et al., 1986; Sims et Overcash, 1983). La demi-vie du phénanthrène en sol se situe généralement entre 4 et 18 semaines (Cerniglia, 1992). Les microorganismes dégradant le phénanthrène comme source de carbone ou par co-métabolisme sont nombreux (Sherrill et Sayler, 1980). Plusieurs genres bactériens tels que *Pseudomonas*, *Beijerinckia*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Bacillus* et *Mycobacterium*, pour n'en nommer que quelques uns, sont rapportés dans la littérature (Yang et al., 1994; Singleton, 1994; Heitkamp, 1987; Sims et Overcash, 1983; Kiyohara et al., 1982; Wodzinski

et Johnson, 1968).

5.2.4 HAPs lourds

La revue de littérature se limitera au pyrène et au chrysène qui sont les deux HAPs lourds que nous avons utilisés dans cette étude. Comme nous l'avons déjà mentionné, il existe beaucoup moins de bactéries isolées dégradant les HAPs de quatre noyaux et plus. Le pyrène et le chrysène sont deux HAPs lourds possédant quatre noyaux mais avec des propriétés chimiques très différentes. Le pyrène est un HAP de quatre noyaux aromatiques ayant une très faible solubilité dans l'eau, soit 0.141 mg/L. Sa demi-vie en sol est beaucoup plus longue et se situe entre 34 et 90 semaines (Cerniglia, 1992). Les quelques souches bactériennes isolées dégradant le pyrène comme seule source de carbone sont *Mycobacterium* sp. Pyr-1, *Rhodococcus* sp. UW1, *Alcaligenes denitrificans*, *Crinipellis stipitaria*, *Mycobacterium* sp., *Mycobacterium* sp. VF 1 et *Gordona* sp. BP 9 (Tiehm et Fritzsche, 1995; Kastner et al., 1994; Lambert et al., 1994; Boldrin et al., 1993; Grosser et al., 1995; Walter et al., 1991; Heitkamp et al., 1988). La dégradation par co-métabolisme a aussi été démontrée chez une souche de *Rhodococcus* sp. (Bouchez et al., 1995).

Le chrysène est aussi un HAP à quatre noyaux aromatiques mais sa solubilité dans l'eau (0.002 mg/L) est de beaucoup

inférieure à celle du pyrène (0.141 mg/L). Une seule souche bactérienne, identifiée comme *Rhodococcus* sp. UW1, a été testée pour sa capacité à dégrader le chrysène (Walter et al., 1991).

6. VOIES METABOLIQUES DES HAPs

6.1 Généralités

Chez les bactéries, la première étape de la voie métabolique générale consiste en une oxydation de la molécule d'HAP par une dioxygénase qui incorpore deux atomes d'oxygène moléculaire sur un cycle pour former un cis-dihydrodiol (Figure 3). Une déhydrogénase conduit par la suite à la molécule de cathécol, puis une dioxygénase provoque l'ouverture du noyau aromatique en position ortho ou méta (Dagley, 1981). De cette façon, les bactéries peuvent oxyder une grande variété de composés aromatiques allant du benzène au benzopyrène (Cerniglia, 1993, 1984). La voie métabolique la plus connue est celle du naphthalène, un HAP à deux noyaux aromatiques. Par exemple, chez *Pseudomonas putida* PpG7, les gènes codant pour les enzymes impliquées dans cette voie métabolique sont situés sur un plasmide contenant deux opérons: l'opéron *nah* et l'opéron *sal*. Le premier opéron comprend les gènes de la première partie de la voie métabolique soit du naphthalène au salicylate et le deuxième opéron comprend les gènes pour la deuxième partie qui oxyde le salicylate en catéchol. L'induction de ces deux opérons *nah* et *sal* est contrôlée par le

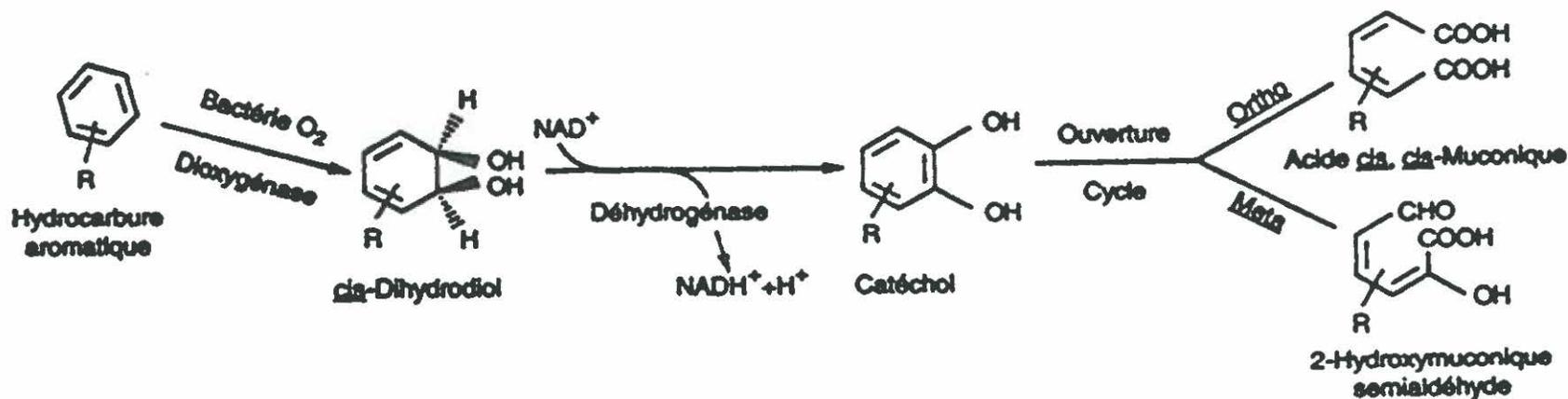


Figure 3.

Voie métabolique générale utilisée par les bactéries pour l'oxydation des HAPs (Cerniglia, 1984).

salicylate (Cerniglia, 1993; Zylstra et Gibson, 1991; Haigler et Gibson, 1990). Cette voie est donc aussi nommée la voie du salicylate.

Étant donné que la structure de base, soit le noyau aromatique, est la même pour tous les HAPs, il est probable que les voies métaboliques soient similaires. En effet, si une bactérie utilise un HAP de quatre noyaux aromatiques comme le pyrène, des HAPs de moins de quatre noyaux pourraient être dégradés par cette dernière (Kiyohara et al., 1992; Kiyohara et Nagao, 1978).

A titre de comparaison, les champignons oxydent les HAPs via le cytochrome P-450 monooxygénase et l'époxyde hydrolase catalyse la réaction jusqu'au trans-dihydrodiol (Cerniglia, 1984). Il semblerait que les champignons hydroxylent les HAPs pour conduire à une détoxification tandis que les bactéries oxydent les HAPs en molécules dihydroxylées pour conduire à la fission du cycle et à l'assimilation de la molécule (Dagley, 1981).

6.2 Fluorène

La voie métabolique du fluorène chez *Arthrobacter* F101 transforme le fluorène en 9-fluorénol et ensuite en 9H-fluorènone. Ce dernier intermédiaire s'accumule dans le milieu.

Une autre voie supporterait la croissance cellulaire en procédant à une coupure d'un noyau aromatique en méta conduisant au 3,4-dihydrocoumarin (Grifoll *et al.*, 1992). La suite de la voie métabolique peut suivre la voie générale des HAPs. Chez la souche *Pseudomonas* F274 (Figure 4), la première étape de la voie métabolique suggérée est une monohydroxylation à la position 9 pour donner le 9-hydroxyfluorène qui est ensuite déhydrogéné en une cétone correspondante, soit le 9-fluorénone. Une dioxygénase le transforme en 1,1a-dihydroxy-1-hydro-9-fluorénone, un alcool tertiaire. Il ne peut donc pas y avoir de déhydrogénation comme on s'y attendrait. Cette souche procède alors à une coupure du cycle à cinq liens entre les deux noyaux aromatiques pour finalement obtenir le phtalate. Selon les auteurs, ce dernier serait ensuite dioxygéné et décarboxylé en protocatéchuate. Une autre dioxygénase transformerait ensuite le protocatéchuate en 2-hydroxy-4-carboxy-cis,cis-muconic semialdéhyde (Grifoll *et al.*, 1994; Ribbons et Evans, 1962). Puis, la dégradation du fluorène suit la voie métabolique générale des HAPs.

6.3 Phénanthrène

La voie métabolique du phénanthrène chez les bactéries a fait l'objet de plusieurs études, particulièrement chez *Pseudomonas*. L'oxydation du phénanthrène se fait soit en position ortho (carbones 3 et 4) ou en position méta (carbones

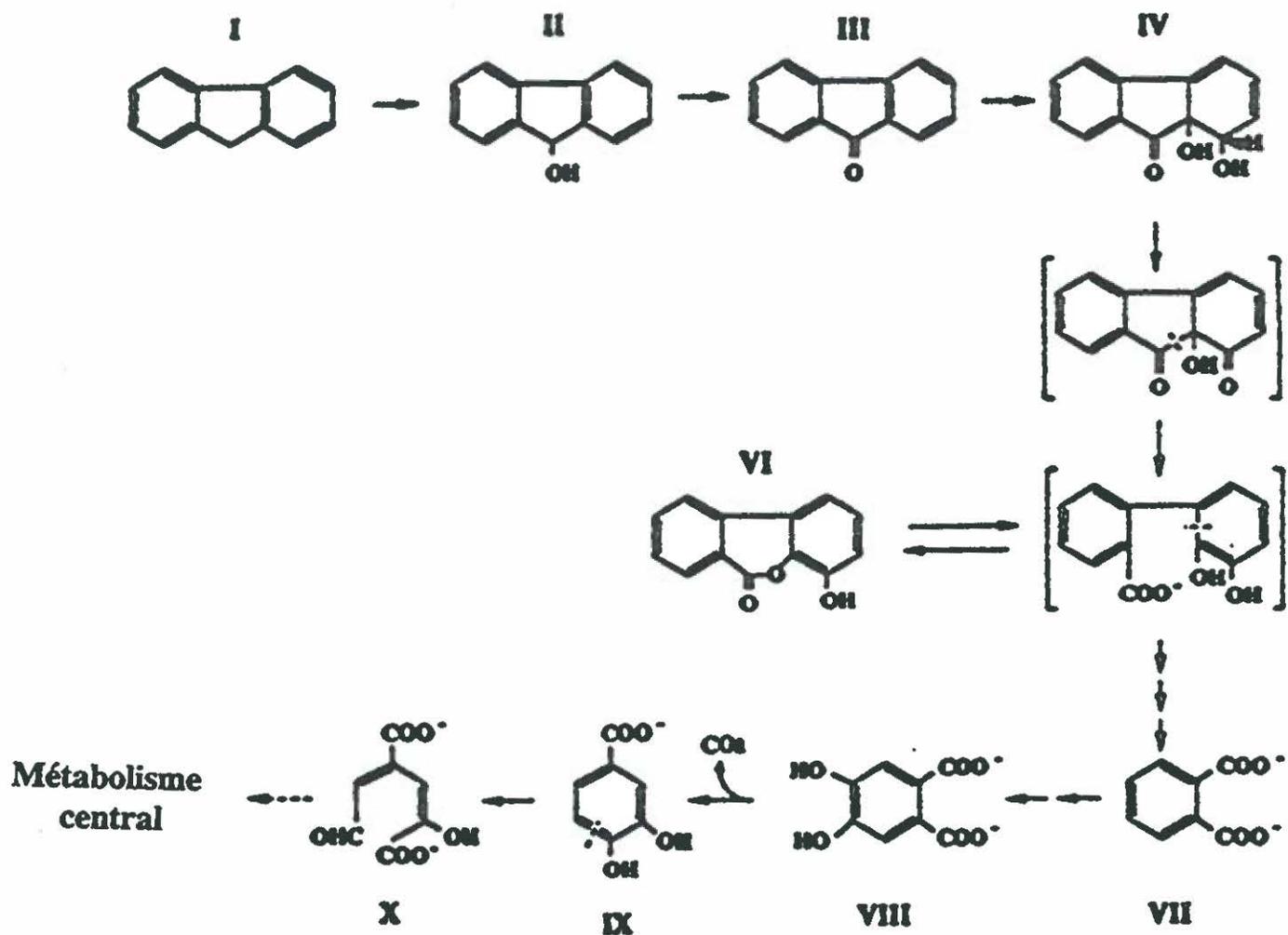


Figure 4.

Voie métabolique du fluorène proposée chez *Pseudomonas* F274. I, fluorène; II, 9-hydroxyfluorène; III, 9-fluorénone; IV, 1,1a-dihydroxy-1-hydro-9-fluorénone; VI, 8-hydroxy-3,4-benzocoumarin; VII, acide phtalique; VIII, 4,5-dihydroxyphthalate; IX, protocatéchuete; X, 2-hydroxy-4-carboxy-cis,cis-muconic semialdéhyde. (Grifoll *et al.*, 1994).

1 et 2) pour former soit le *cis*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophénanthrène ou le *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrophénanthrène (Figure 5) (Cerniglia, 1984; Jerina *et al.*, 1976; Evans *et al.*, 1965). Une déhydrogénase transforme le 3,4-dihydrophénanthrène en 3,4-dihydroxyphénanthrène qui est métabolisé en acide 1-hydroxy-2-naphtoïque. Une décarboxylase le transforme en 1,2-dihydroxynaphtalène qui suit la voie métabolique du naphtalène conduisant au catéchol (Cerniglia, 1984). Certaines souches bactériennes tel que *Aeromonas*, utilisent une autre voie convertissant l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque à l'acide protocatéchuïque (Kiyohara et Nagao, 1978).

6.4 Pyrène

Jusqu'à maintenant, seulement deux études ont porté sur l'élucidation de la voie métabolique du pyrène. La première a été effectuée avec une souche de *Mycobacterium* sp. (Heitkamp *et al.*, 1988). Ces auteurs ont identifié le pyrène-4,5-dihydrodiol comme un produit initial de l'oxydation du pyrène et l'acide 4-phénanthroïque comme le métabolite majeur de dégradation. Aucun intermédiaire possédant un cycle ouvert n'a été identifié (Heitkamp *et al.*, 1988).

La voie métabolique du pyrène chez *Rhodococcus* sp. UW1 débute avec une dihydroxylation en position 1 et 2 ou en

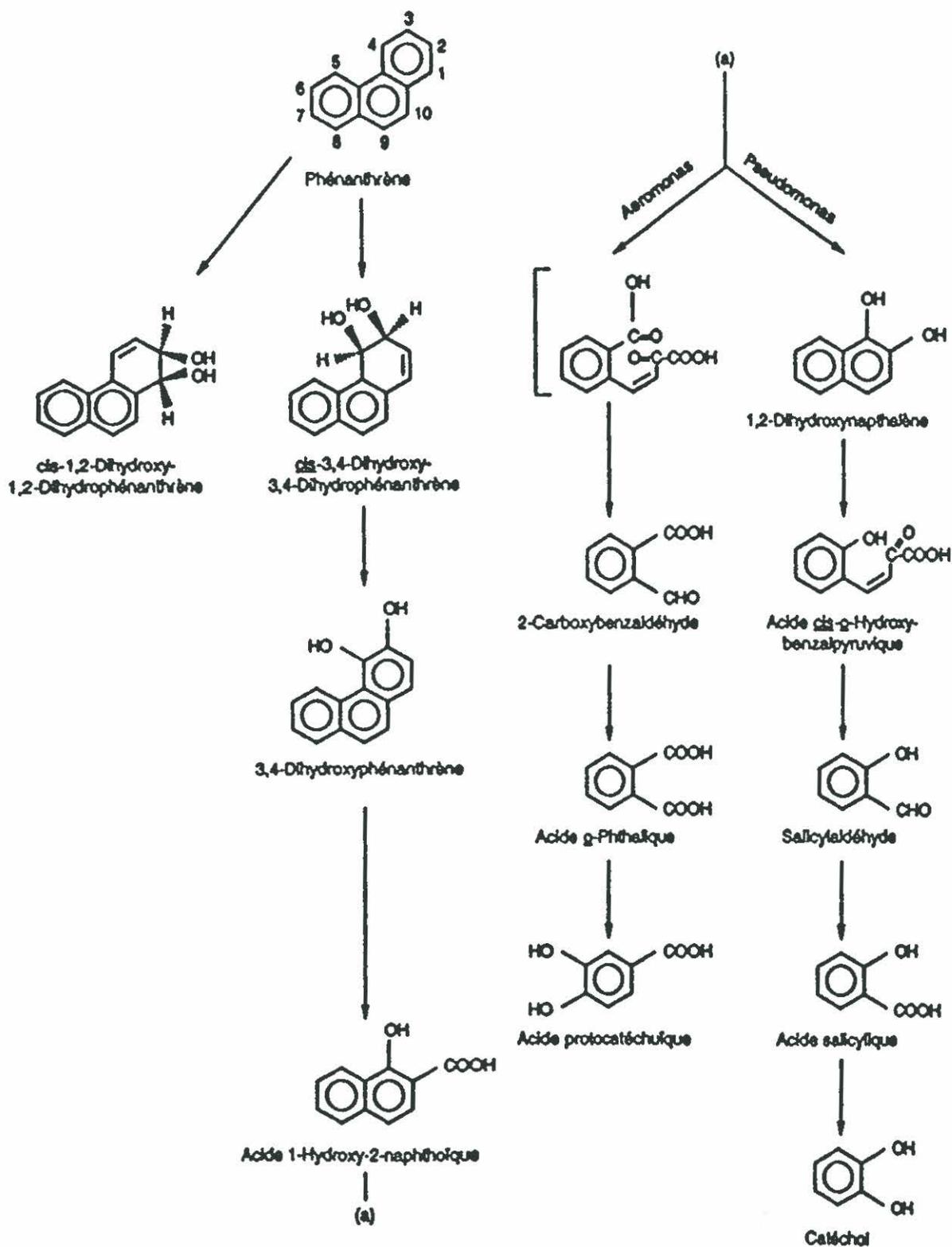


Figure 5.

Voies métaboliques du phénanthrène chez *Pseudomonas* (Cerniglia, 1984).

position 4 et 5 pour former le dihydroxypyrene (Figure 6) (Walter et al., 1991). Cette étape est analogue à celle du phénanthrène par une souche de *Pseudomonas* (Evans et al., 1965). Il peut donc y avoir deux positions possibles pour l'attaque par la dioxygénase étant donné que la structure du pyrene est très symétrique et compacte. C'est cette faible spécificité de la dioxygénase qui permettrait à cette bactérie de dégrader plusieurs autres HAPs comme le chrysène. La suite de la voie métabolique transforme le dihydroxypyrene en effectuant la coupure du cycle entre les deux groupements hydroxy (Walter et al., 1991). Cependant, ces intermédiaires n'ont pas été identifiés. Cela suppose qu'ils seraient métabolisés rapidement. La suite de cette voie métabolique n'est pas encore élucidée (Walter et al., 1991). On peut supposer qu'elle suivrait la voie métabolique générale des HAPs pour en arriver au cathécol et finalement à la minéralisation.

6.5 Chrysène

Aucun intermédiaire n'a été isolé afin d'élucider la voie métabolique du chrysène chez les bactéries. Le chrysène ayant une structure semblable au phénanthrène, on peut supposer que la voie métabolique du chrysène suivrait des étapes similaires à celles de la voie métabolique du phénanthrène.

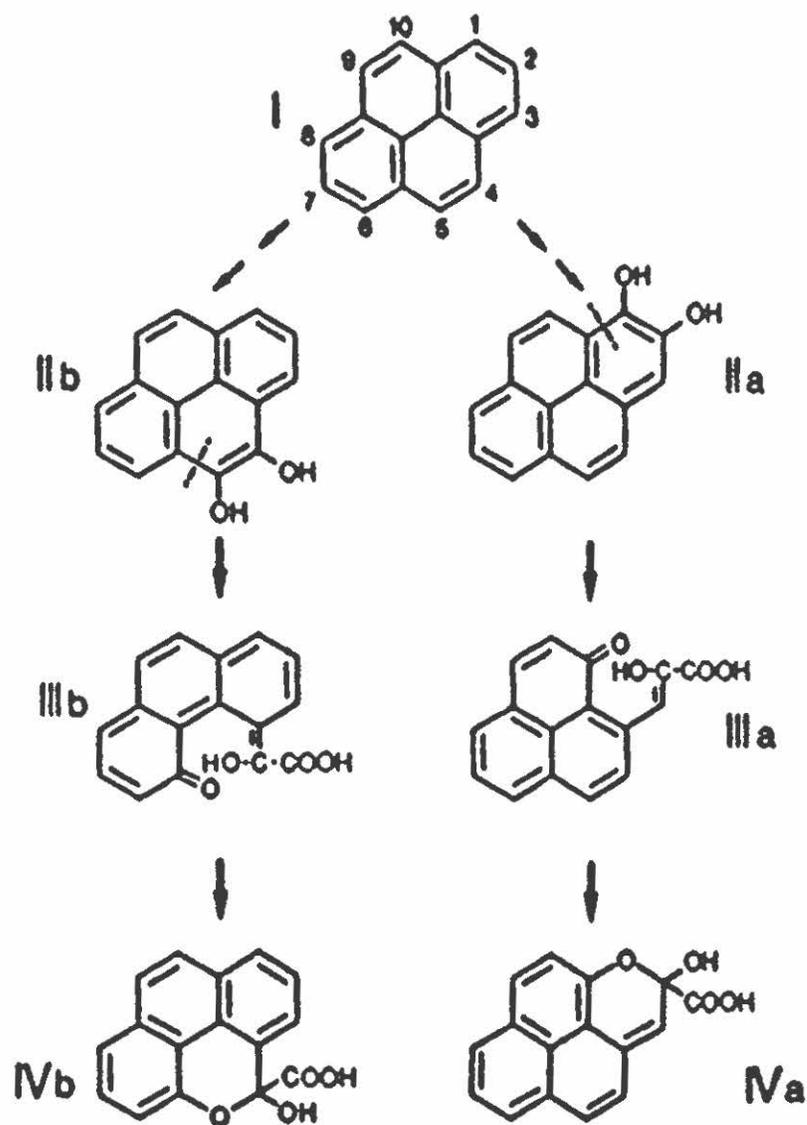


Figure 6. Voie métabolique du pyrène proposée chez *Rhodococcus* sp. UW1. I, pyrène; IIa, 1,2-dihydroxy-pyrène; IIb, 4,5-dihydroxypyrene; IIIa, acide cis-2-hydroxy-3-(périnaphténone)-propénique; IIIb, acide 2-hydroxy-2-(phénanthren-5-one-4-enyl)-acétique; IVa,b, métabolite I. (Walter *et al.*, 1991).

7.0 OPTIMISATION DE LA BIODEGRADATION DES HAPs

7.1 Généralités

Même si plusieurs microorganismes ont déjà été isolés pour leur capacité de dégrader les HAPs, le taux de biodégradation de ces composés dans le sol et les sédiments est lent (Manilal et Alexander, 1991; Jones et al., 1989; Bossert et al., 1984). Cela suggère que dans de tels environnements, l'activité microbienne est limitée. Bien que le biotraitement de sites contaminés avec des résidus pétroliers soit possible, l'optimisation de la biodégradation est encore au stade du développement (Providenti et al., 1993). Le concept d'optimisation par un seul facteur ne semble pas être favorable dans le cas d'une population hétérogène de microorganismes étant donné qu'il est possible que plusieurs espèces soient requises pour dégrader entièrement un composé. Il est important de prendre en considération que chacune d'elles a ses besoins spécifiques de croissance (Sundaram et al., 1994; Swindoll et al., 1988).

Même si la population microbienne est capable de dégrader les polluants comme les HAPs, le temps nécessaire pour que la population soit assez nombreuse pour être efficace peut être long (Corseuil et Weber, 1994). Les critères fondamentaux requis pour la croissance cellulaire doivent être satisfaits pour permettre quelque dégradation que ce soit. Il est donc

essentiel d'optimiser les paramètres influençant la croissance afin de s'assurer que l'activité métabolique est maximale (Lapinskas, 1989).

Plusieurs facteurs peuvent influencer la biodégradation des HAPs. La température, le pH, l'humidité, les nutriments incluant l'azote et le phosphore, les microorganismes adaptés à la dégradation de ces polluants et les agents tensioactifs (Grosser et al., 1995; Zhou et Crawford, 1995; Singleton, 1994; Providenti et al., 1993; Wilson et Jones, 1993; Brodkorb et Legge, 1992; Cerniglia, 1992; Leahy et Colwell, 1990; Morgan et Watkinson, 1989; Atlas, 1981,1977).

7.2 Température

La température influence le métabolisme microbien et la composition de la microflore. Peu d'études ont porté sur l'influence de la température sur la biodégradation des HAPs en sol. En général, le taux de dégradation diminue avec l'abaissement de la température. La température optimale de la dégradation des HAPs se situe entre 20 et 30°C. Ces températures favorisent les microorganismes mésophiles. Coover et Sims (1987) ont étudié l'influence de la température sur la dégradation de 16 HAPs dans un sol et ont démontré que l'augmentation de la température de 10 à 30°C favorisait la dégradation des HAPs légers mais avait peu d'effets sur la

dégradation des HAPs lourds. Une autre étude a démontré que la dégradation du fluorène et du pyrène ajoutés dans un sol est favorisée en augmentant la température de 10 à 25°C (Maliszewska-Kordybach, 1992). Toutefois, une étude norvégienne a situé la température optimale aux environs de 18°C (Oudot et al., 1987). Cependant, il existe quand même des microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures à des températures plus basses. Cela suggère qu'il pourrait y avoir un changement de la population active à travers les saisons (Atlas, 1981; Atlas et Bartha, 1973). La température affecte aussi la nature physique des HAPs comme par exemple leur viscosité et leur volatilisation (Atlas, 1981).

7.3 pH

Il a été démontré que la minéralisation des hydrocarbures s'effectue plus rapidement à des valeurs de pH entre 6.5 et 8.0 (Morgan et Watkinson, 1989; Dibble et Bartha, 1979; Jones et al., 1970). Selon les nutriments métabolisés, le pH peut varier pendant l'incubation. Une diminution ou une augmentation rapide du pH peut diminuer ou même inhiber complètement la population dégradant les HAPs (Erickson et al., 1993). Cela s'explique par la détérioration des enzymes dans la cellule. Grâce à son contenu en carbonate généralement élevé, le sol est reconnu comme ayant un bon pouvoir tampon à pH neutre (Brodkorb et Legge, 1992). Le pH influence aussi la solubilité des HAPs et

l'adsorption aux particules de sol (Providenti, 1993). Le pH doit donc être bien contrôlé.

7.4 Humidité

L'eau est un des éléments les plus importants. Le degré de saturation en eau d'un sol influence la probabilité pour un microorganisme d'entrer en contact avec la molécule de substrat. De plus, un manque d'hydratation inhibe les métabolismes enzymatiques et limite ainsi la dégradation des HAPs. Le transport des HAPs dans un sol peu hydraté est aussi très réduit (Providenti et al., 1993). Etant donné que les HAPs sont accessibles aux microorganismes seulement quand ils sont solubilisés dans l'eau et que cette solubilité est très faible, la dégradation des HAPs est directement influencée par l'humidité du sol. Des valeurs se situant entre 30 et 90% de saturation du sol en eau permettent d'obtenir un taux de dégradation optimal (Cooney, 1984). La dégradation des HAPs par la méthode en bioréacteur de type "boues activées", tel que mentionné précédemment, consiste à mettre généralement 20% de sol et 80% d'eau et permet une dégradation plus rapide des HAPs (Samson, 1994b). Cependant, ces conditions s'éloignent de celles retrouvées sur le terrain.

7.5 Oxygène

Les premières étapes dans le métabolisme des HAPs chez les

bactéries et les champignons impliquent l'oxydation par des oxygénases nécessitant l'oxygène moléculaire (Leahy et Colwell, 1990). La disponibilité de l'oxygène dans le sol est dépendante du taux de consommation de l'oxygène par les microorganismes, du type de sol, de l'humidité du sol et de la présence de substrats pouvant libérer l'oxygène (Bossert et Bartha, 1984; Britton, 1984).

La concentration d'oxygène a été identifiée comme la variable limitante dans la biodégradation du pétrole dans le sol (von Wedel et al., 1988). L'aération du sol stimule donc la biodégradation des HAPs par les microorganismes. Une valeur optimale de 40% d'oxygène dans l'air est suggérée dans la littérature (Bauer et Capone, 1993). Par contre, l'usage d'air saturé d'eau ou même l'utilisation d'oxygène pur ne peuvent pas toujours satisfaire les besoins de la biodégradation des HAPs en conditions aérobies, dû à l'intensité de l'activité microbienne (Morgan et Watkinson, 1992). Manilal et Alexander (1991) ont aussi démontré que la minéralisation du phénanthrène (10 ppm) à 45% s'effectuait plus rapidement dans un sol aéré, soit après 6 jours d'incubation, comparativement à 40 jours sans aération.

Le peroxyde d'hydrogène est parfois utilisé comme source d'oxygène en remplacement de l'aération (Wilson et Jones, 1993;

Barenschee et al., 1990). Il est reconnu comme pouvant libérer une plus grande quantité d'oxygène dans le sol. Par contre, ce composé est très réactif et peut être toxique (Wilson et Jones, 1993). Morgan et Watkinson (1992) ont utilisé le peroxyde d'hydrogène comme source d'oxygène et ont démontré que des concentrations de plus de 100 mg par litre réduisaient la perméabilité du sol. L'utilisation du peroxyde d'hydrogène se fait donc principalement quand l'aération du sol est problématique.

7.6 Nutriments

7.6.1 C:N:P

Étant donné que les microorganismes ont besoin d'azote et de phosphore pour leur croissance, la disponibilité de ces nutriments dans les sols contaminés est essentielle afin de pouvoir procéder à un biotraitement. Cela est d'autant plus important étant donné que les sols contaminés avec de fortes concentrations d'HAPs ont un rapport C:N:P très élevé (Chakrabarty, 1976). Ce rapport doit donc être ajusté afin d'optimiser la biodégradation des HAPs (Jones et Alexander, 1988; Lewis et al., 1986; Jobson et al., 1974). Le rapport C:N:P optimal pour l'activité microbienne en général est approximativement de 120:10:1 (Wilson et Jones, 1993). Des valeurs optimales de rapports C:N de 60:1, 50:1 ou de C:P de 800:1 ont été rapportées pour la dégradation des HAPs dans la

littérature (Zhou et Crawford, 1995; Manilal et Alexander, 1991; Dibble et Bartha, 1979). L'ajout d'une source d'azote organique (ex: urée, octylphosphate) ou inorganique (ex: phosphate d'ammonium, nitrate d'ammonium) stimule la biodégradation (Leahy et Colwell, 1990; Atlas et Bartha, 1973). De plus, l'ajustement du rapport C:N du sol avec une source d'azote organique, comme le lisier de porc, pourrait aussi être envisagé afin d'optimiser la biodégradation des polluants. Du même coup, nous pourrions valoriser ce résidu important de l'industrie Québécoise. Cependant, aucune publication ne mentionne l'ajout de lisier de porc à un sol contaminé afin d'optimiser la biodégradation des polluants. Le phosphore, quant à lui, est le plus souvent ajusté avec des polyphosphates (Downey et al., 1988).

La disponibilité des nutriments inorganiques est problématique à cause des interactions de ces ions avec les éléments du sol. Les nutriments inorganiques sont aussi plus facilement lessivés (Leahy et Colwell, 1990). L'azote inorganique sous forme de nitrate NO_3^- est plus accessible que l'ammonium NH_4^+ . Les ions ammoniums peuvent réagir par des réactions d'échanges de cations dans le sol et les ions phosphates peuvent précipiter sous forme de sels pouvant causer le blocage des pores du sol et inhiber par le fait même la biodégradation des HAPs (Morgan et Watkinson, 1992). Une étude

a démontré que l'ajout d'azote inorganique dans un sol inhibait la minéralisation du glucose et du phénanthrène (Morgan et Watkinson, 1992). Selon Manilal et Alexander (1991), la minéralisation du phénanthrène (10 ppm) à 45% se fait plus rapidement dans un sol aéré (3 jours au lieu de 6 jours) si l'on ajoute 150 ppm de phosphate (K_2HPO_4). Par contre, le nitrate (140 ppm $NaNO_3$) inhibe la minéralisation du phénanthrène en causant une baisse du pH.

7.6.2 Autres nutriments

Quelques suppléments ont été rapportés dans la littérature comme pouvant influencer la biodégradation des HAPs. Les différentes variations que l'on y retrouve sont dues aux exigences spécifiques (ex: co-métabolisme) des souches bactériennes étudiées. Il a été démontré que la présence d'une autre source de carbone dans le sol peut diminuer le taux de dégradation des hydrocarbures. Il y a alors une utilisation préférentielle de la source la plus facilement assimilable (Dibble et Bartha, 1979; Morgan et Watkinson, 1989). Une autre étude a aussi démontré que l'ajout de glucose à un sol contaminé aux hydrocarbures inhibait la minéralisation du phénanthrène (Manilal et Alexander, 1991).

Une source de carbone alternative n'inhibe pas nécessairement la biodégradation. Elle peut n'avoir aucun

effet, ou bien elle peut augmenter le taux de dégradation, dépendamment des conditions de culture (Providenti et al., 1993; Oldenhuis et al., 1989; Kim et Maier, 1986). Dans une étude sur la minéralisation du phénanthrène chez *Arthrobacter polychromogenes*, Keuth et Rehm (1991) ont démontré que l'ajout de glucose à faible concentration (0.45 g L^{-1}) est bénéfique mais qu'il y avait inhibition à concentration plus élevée (3 g L^{-1}). Trzesicka-Mlynarz et Ward (1995) ont aussi effectué des essais sur l'ajout de différentes sources de carbones à un milieu liquide inoculé d'un mélange de bactéries provenant d'un sol contaminé aux HAPs. Dans ce cas, le maximum de dégradation du fluoranthène, un HAP à quatre noyaux, a été obtenu dans un milieu supplémenté d'extrait de levures, de protéose peptone et de glucose à 1 g/L chacun. L'ajout de peptone et d'extrait de levures (0.7% (p/v) chacun) en plus de 0.14% (p/v) d'urée augmente la dégradation d'huile brute par des souches de *Bacillus* (Ijah et Ukpe, 1992). Lehtomaki et Niemela (1975) et Griffol et al. (1992) ont rapporté que l'ajout d'extrait de levures augmente la dégradation des hydrocarbures en sol. Dans ces deux cas, ce supplément a probablement ajouté des éléments essentiels en quantité suffisante dans ce sol ou a stimulé la croissance de la population microbienne résultant en une augmentation rapide de la population bactérienne utilisant les hydrocarbures (Morgan et Watkinson, 1989).

L'extrait de levures est généralement utilisé entre autre comme source de vitamines dans les cultures microbiennes. La littérature rapporte donc des cas où la dégradation des HAPs est favorisée par l'ajout d'un mélange de vitamines et de minéraux (Bouchez et al., 1995; Kastner et al., 1994). L'ajout de la vitamine B₁₂ a aussi été rapporté comme étant nécessaire à la dégradation du fluorène par *Arthrobacter* sp. et *Pseudomonas vesicularis* (Grifoll et al., 1992; Weissenfels et al., 1990). L'ajout d'alcane comme source de carbone alternative peut aussi augmenter la dégradation des HAPs (Wang et al., 1990).

Il est possible de favoriser une voie métabolique en induisant certains enzymes de cette voie. Le salicylate est un intermédiaire fréquemment retrouvé dans la dégradation des HAPs. Il contrôle les deux opérons *nah* et *sal* responsables des gènes codant pour les enzymes dégradant le naphthalène. Ogunseitan et Olson (1993) ont démontré que la minéralisation du naphthalène en présence de salicylate augmentait significativement.

7.7 Inoculation de microorganismes adaptés

L'ajout à un sol contaminé de microorganismes que l'on sait capables de dégrader les HAPs porte le nom général de bioaugmentation. Les souches inoculées par bioaugmentation

doivent posséder les caractéristiques suivantes : grande capacité de dégradation, stabilité génétique, croissance rapide, haut niveaux d'activité enzymatique, capacité de compétitionner avec les microorganismes indigènes du sol, non pathogènes et finalement non productrice de métabolites toxiques (Atlas, 1977). L'éventail de composés pouvant être dégradés peut aussi être élargie en introduisant différents microorganismes dans les environnements naturels (Leahy et Colwell, 1990). L'optimisation de la dégradation du phénanthrène a ainsi été rendue possible en inoculant une souche d'*Alcaligenes* sp. et une souche de *Phanerochaete chrysosporium* (Moller et Ingvorsen, 1993; Brodkorb et Legge, 1992). Une souche de *Mycobacterium* sp. a aussi été réinoculée dans un sol contaminé aux HAPs et a permis ainsi d'augmenter significativement la minéralisation du pyrène (Grosser et al., 1995). Une autre étude a indiqué que l'ajout de microorganismes indigènes à des niveaux supérieurs à 10^5 cellules par gramme de sol permet d'augmenter le taux de dégradation des hydrocarbures (Weber et Corseuil, 1994). Cependant, les études portant sur l'inoculation de microorganismes n'ont pas toutes fonctionné (Gunulan et Fournier, 1993; Goldstein et al., 1985). Les raisons suggérées sont que la concentration d'HAPs était trop faible, que les microorganismes étaient susceptibles à différentes toxines ou à différents prédateurs naturels, que les microorganismes utilisaient préférentiellement d'autres

sources en carbones que les HAPs ou bien que le transport des nutriments et des microorganismes dans le sol était limité (Singleton, 1994).

7.8 Surfactants

La faible solubilité des HAPs dans l'eau est un facteur limitant leur biodégradation, particulièrement dans le cas des HAPs lourds. Les HAPs sont reconnus comme étant métabolisés seulement dans la phase aqueuse, sous leur forme solubilisée, libre ou dans des micelles (Singleton, 1994; Miller et Bartha, 1989; Wodzinski et Coyle, 1974). En effet, la dégradation des HAPs solubilisés n'est pas limitée par l'accessibilité du substrat (Tiehm, 1994). Sous forme de cristaux, le taux de dégradation des HAPs dépend du taux de transfert de masse de la phase solide à la phase aqueuse (Volkering et al., 1992). Le taux de dégradation des HAPs comme le phénanthrène chez deux souches de *Nocardia* et *Pseudomonas* a été relié à leur degré de solubilité dans l'eau (Providenti et al., 1993; Wodzinski et Johnson, 1968).

Les surfactants ont des composantes hydrophiles et hydrophobes qui font le lien entre les phase immiscibles. L'addition de surfactants augmente la concentration des composés hydrophobes dans l'eau par solubilisation ou émulsion. La solubilisation se produit quand la concentration est au-

dessus de la concentration critique des micelles (CMC) où les molécules de surfactants s'aggrègent en micelles. La capacité des surfactants d'augmenter la concentration des composés hydrophobes dans l'eau suggère que la dégradation des HAPs pourrait être accélérée par l'addition de surfactants (Tiehm, 1994).

Les surfactants biologiques et synthétiques peuvent augmenter la solubilité des HAPs dans l'eau favorisant ainsi leur accessibilité aux microorganismes (Singleton, 1994). Guerin et Jones (1988) ont observé une augmentation de la biodégradation du phénanthrène par une souche de *Mycobacterium* sp. avec l'ajout de surfactants synthétiques comme les composés Tween. Cependant, des résultats contraires ont été obtenus en sol envers le phénanthrène dus à la toxicité des surfactants non-anioniques synthétiques utilisés, comme par exemple l'octylglucoside, le CHAPS, les alkylethoxylates et deux composés Tween (Laha et Luthy, 1992,1991). Ces inhibitions se sont produites quand les surfactants étaient à des concentrations supérieures à leur concentration critique pour la formation des micelles (CMC) créant ainsi une limitation au niveau du phénanthrène qui était fortement stabilisé dans les micelles. En diminuant la concentration de surfactants en bas de la CMC, l'effet de limitation s'est renversé. Une autre étude a démontré que des surfactants non-ioniques synthétiques

(Alfonic 810-60, Novel II 1412-56 à des concentrations de 10 ug/ml) peuvent augmenter la minéralisation du phénanthrène en sol par les microorganismes indigènes et des microorganismes réinoculés (Aronstein et Alexander, 1993; Aronstein et al., 1991). Gray et al. (1994) ont démontré que le Tween 80 à une concentration de 0.1% (v/v) augmentait la solubilisation de l'anthracène en milieu liquide. Janiyani et al. (1993) ont obtenu des résultats similaires pour la dégradation des hydrocarbures provenant de boues pétrolières. Une étude a aussi démontré que l'ajout de surfactants synthétiques non toxiques comme le Triton X-102, le Sapogenat T-300 et le Brij 35 à des concentrations de moins de 10 mM augmentaient la dégradation entre autres du fluorène, du phénanthrène et du pyrène (Tiehm, 1994). Les surfactants synthétiques peuvent par contre être utilisés comme source de carbones par les microorganismes et ainsi nuire à la dégradation des HAPs (Sundaram et al., 1994).

Il a aussi été démontré que les microorganismes peuvent produire eux-même des biosurfactants ou bioémulsifiants. Un des avantages est leur moins grande toxicité. Jain et al. (1992) ont démontré que l'ajout de 100 µg/g sol d'un biosurfactant (rhamnolipide) produit par *Pseudomonas aeruginosa* UG2 augmentait la dégradation de certains hydrocarbures moins solubles comme le tétradécane.

8. DEGRADATION DES HAPs DANS LE SOL DE LA SABLIERE THOUIN

La première phase du projet de décontamination du sol de la sablière Thouin a permis de démontrer que les microorganismes indigènes présents dans ce sol sont capables de dégrader les hydrocarbures. Par contre, le traitement par la méthode de biopiles s'est avéré lent. En laboratoire, les résultats obtenus après 250 jours d'incubation en réacteur mimant une biopile ont indiqué que les hydrocarbures légers sont fortement dégradés (95% pour les alcanes de 9-14 carbones, 80% pour les alcanes de 15-20 carbones, 83% pour les HAPs à 2 noyaux aromatiques et 60% pour les HAPs à 3 noyaux aromatiques) et que les hydrocarbures lourds le sont plus faiblement (50% pour les alcanes de 21-26 carbones, <1% pour les alcanes de 27-32 carbones et 15% pour les HAPs à 4 noyaux aromatiques). Ces travaux démontrent clairement le besoin d'optimiser la dégradation des HAPs, particulièrement des HAPs lourds, afin d'augmenter l'efficacité du biotraitement. Ainsi, l'optimisation de la biodégradation des HAPs en sol serait possible grâce à l'ajout de différents suppléments ou en modifiant les conditions de croissance des microorganismes, qui sont les ouvriers des biotraitements. De plus, une meilleure connaissance des processus de biodégradation des HAPs en sol et des facteurs impliqués dans celle-ci est primordiale afin d'obtenir des résultats satisfaisants.

Notre projet constituait la poursuite de ces travaux. Toutefois, contrairement aux études portant sur la biodégradation des HAPs, nous avons travaillé avec l'ensemble de la microflore du sol et ce, en présence non pas d'un mais de quatre HAPs simultanément. Dans un premier temps, nous avons tenté d'optimiser la biodégradation, à l'aide de cultures en milieux liquides de quatre HAPs représentatifs de ceux retrouvés dans la sablière Thouin. Le milieu liquide a été utilisé dans la but de faciliter le travail compte tenu que certaines contraintes reliées au sol pouvaient être éliminées comme par exemple son hétérogénéité et la faible dissolution des HAPs. Puis, des microcosmes sol ont été utilisés pour la suite de notre étude sur l'optimisation. Ces travaux avaient pour but ultime de proposer des améliorations au traitement par biopiles du sol de la sablière Thouin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. SOL DE LA SABLIERE THOUIN

1.1 Échantillonnage et conservation du sol

Le sol contaminé provient de la sablière Thouin située à l'Assomption, au nord de Montréal (Québec). Le mélange R20-27 de ce sol a constitué le lot de référence pour toute cette étude. Ce mélange, datant de juillet 1993, a été effectué à l'aide de sols peu et fortement contaminés afin d'obtenir une concentration finale d'environ 10 000 ppm d'huiles et graisses. Ce lot de référence a été entreposé à 4°C en absence de lumière.

1.2 Caractérisation chimique du sol

1.2.1 pH

Le pH du sol a été déterminé selon la technique de Dibble et Bartha (1979). Le sol a été mélangé à l'eau distillée dans une proportion de 1:1 (p/v) puis agité (vortex) pendant 2 minutes. Le pH a été mesuré à partir du surnageant à l'aide d'un pH mètre modèle pHM62 (Radiometer Copenhagen, Copenhagen, Danemark) muni d'une électrode combinée Microprobe (Fisher, Pittsburg). Le papier pH pHydrion (Micro Essential Laboratory Inc., Brooklin, N.Y.) a été utilisé quand la quantité de liquide récupéré était limitée.

1.2.2 Humidité

La détermination du pourcentage d'humidité du sol a été

effectuée en s'inspirant de la méthode standard 2.200 de l'"Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists" (1984). Dans un premier temps, dix grammes de sol ont été déposés dans un creuset. Puis, après avoir noté le poids du contenant avec le sol, le tout a été placé dans un four à vide à 95°C pendant 24 heures. Après cette période, la différence de poids représente la quantité d'eau dans l'échantillon et celle-ci a été exprimée comme le pourcentage d'humidité du sol.

1.2.3 Rapport C:N:P

La détermination du rapport C:N:P a été faite selon des techniques standards par la compagnie Analex Inc., Laval, Québec.

1.2.3.1 Carbone total

Le carbone total du sol de la sablière Thouin a été quantifié par la méthode LECO, qui consiste à chauffer à très haute température l'échantillon de sol de sorte à produire du CO₂. Ce dernier est quantifié par mesure de la pression générée par ce gaz (LECO Instruments Ltée, Longueuil).

1.2.3.2 Azote total

L'azote total du sol a été quantifié par la méthode Kjeldahl (4500-NorgB) tirée de "Standard Methods for the

Examination of Water and Wastewater" (APHA, 1989). En présence d'acide sulfurique, de sulfate de potassium et de sulfate de mercure, les groupements amino de plusieurs composés organiques ainsi que les ions ammoniums et l'ammoniaque sont transformés en sulfate d'ammonium. Le mélange réactionnel a ensuite été distillé en milieu alcalin, puis absorbé avec de l'acide borique. L'azote a ensuite été titré avec de l'acide sulfurique 0.02 N.

1.2.3.3 Phosphore total

Le phosphore total présent dans le sol de la sablière Thouin a été quantifié par la méthode normalisée numéro EI-PT10 (Analex inc.). L'échantillon de sol est pyrolysé à 550°C, ce qui a pour effet de dégrader toutes les formes du phosphore en orthophosphate. Ces derniers sont quantifiés par colorimétrie au bleu de molybdène et spectrométrie.

1.2.4 Quantification des métaux lourds

La méthode de spectrophotométrie à absorption atomique muni d'une flamme air-acétylène (3111B) a été utilisée pour le dosage de tous les métaux lourds par Analex Inc., à l'exception du mercure (APHA, 1989). Le principe de la méthode est le suivant: l'échantillon est atomisé par une flamme et un rayon ayant une longueur d'onde spécifique à chaque métal traverse la flamme. La quantité de lumière absorbée par l'échantillon

atomisé est dosée à l'aide d'un spectrophotomètre modèle AA-1275 (Varian, Mulgrave, Australie). La quantité de chaque métal est déterminée en comparant le résultat de l'échantillon à une courbe standard. Les solutions standards proviennent de BDH (Toronto, Canada).

La compagnie Analex Inc. a effectué le dosage du mercure par la méthode d'absorption à vapeur froide 3112 (APHA, 1989). A la différence de la méthode précédente, ce n'est pas l'échantillon lui-même qui est atomisé mais plutôt la vapeur formée par une aération forcée de l'échantillon.

1.2.5 Huiles et graisses

Les huiles et les graisses présentes dans le sol de la sablière Thouin ont été quantifiées selon une variante de la méthode standard de partition gravimétrique 5520E (APHA, 1989). Un échantillon d'environ 20 grammes de sol a été acidifié avec de l'acide chloridrique 10 N pour obtenir un pH de 2. L'échantillon a ensuite été agité vigoureusement en présence de 25 mL de trichlorotrifluoroéthane (fréon 113) (Anachemia, New-York) et la phase organique a été prélevée après décantation. Cette étape a été répétée trois fois et les quatre volumes de fréon extrait ont été rassemblés. L'eau (traces) a été enlevée du fréon en y ajoutant du sulfate d'ammonium anhydre. Par la suite, le fréon a été transféré dans

un ballon et a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif RE 121 (Buchi, Suisse). Le ballon a ensuite été placé sous vide pendant 12 heures. La différence de poids entre le ballon propre au départ et après évaporation du fréon, représente la quantité totale d'huiles et graisses présente dans l'échantillon de sol. Cette méthode, dans nos conditions, est avantageuse par rapport à la méthode du Soxhlet qui, suite à plusieurs essais, a démontré beaucoup de variabilité et ne serait donc pas représentative (Sylvain Milot, communication personnelle).

1.3 Caractérisation microbiologique

1.3.1 Dénombrement des bactéries totales

L'énumération de la microflore bactérienne totale s'est faite selon la technique mise au point par Bogardt et Hemmingsen (1992). Un gramme de sol (déterminé selon le poids sec) a été ajouté à 24 ml de solution saline stérile tamponnée au phosphate (PBS). Ce mélange a été agité vigoureusement pendant 5 minutes puis sédimenté pendant 2 minutes. Des dilutions décimales ont été préparées dans le PBS à partir du surnageant et un aliquot de 0.1 mL de chaque dilution a été étalé sur un milieu solide "Plate Count Agar" (Difco, Détroit). Ce milieu, relativement riche, sera dorénavant appelé PCA. Les cultures ont ensuite été incubées à la température de la pièce pendant 5 à 7 jours. Le dénombrement des colonies a alors été

effectué et exprimé en unités formatrices de colonies (UFC) par gramme de sol.

1.3.2 Dénombrement des bactéries enlevant les HAPs

L'énumération de la population bactérienne ayant un potentiel de dégradation des HAPs a été effectuée suite à la technique de vaporisation sur milieu solide (Kiyohara et Nagao, 1978; Sylvestre, 1980). La méthode de récupération de la microflore indigène du sol est identique à celle décrite précédemment pour l'énumération de la population bactérienne totale. Le milieu solide utilisé cette fois a été le milieu minéral Bushnell-Haas (BH) (Difco, Détroit) contenant 1.5% (p/v) d'agar no.1 (Oxoid, England) et enrichi à 0.025% (p/v) de chacun des éléments suivants: protéose peptone (PP) (Difco, Détroit), extrait de levures (EL) (Grand Island Biological Company, New-York) et amidon (AM) (Fisher Scientific Company, New Jersey). Ce milieu sera dorénavant appelé BH 0.025. Les géloses ont été inoculées avec 0.1 mL de chacune des dilutions et incubées pendant 24 heures à la température de la pièce. Des solutions de fluorène ou de phénanthrène à 2% (p/v) dans l'acétone ont ensuite été vaporisées sur les milieux solides. L'incubation s'est effectuée à la température de la pièce, en absence de lumière, pendant 7 jours ou jusqu'à l'apparition de zones d'éclaircissement (halos) autour de certaines colonies. Le nombre de colonies ayant produit un halo a été exprimé en

unités formatrices de colonies par gramme de sol.

2. BIODEGRADATION DES HAPs EN MILIEUX LIQUIDES

2.1 Inoculum

L'inoculum a été préparé selon deux méthodes relativement semblables à celle utilisée précédemment pour effectuer le dénombrement de la microflore bactérienne du sol. La première consiste à peser 1 gramme de sol (poids sec) que l'on ajoute à 24 mL de milieu BH. Après agitation vigoureuse pendant 5 minutes, le sol a été sédimenté pendant 2 minutes. Le surnageant contenant les microorganismes a ensuite été récupéré et débarrassé des particules de sol restantes par centrifugation à 2 000 X g pendant 5 minutes. Puis, le surnageant a été centrifugé à 10 000 X g pendant 10 minutes pour récupérer les microorganismes. Le culot bactérien a été lavé deux fois en ajoutant le milieu BH. Les milieux de cultures ont étéensemencés avec cet inoculum à raison de 10% (v/v).

La deuxième méthode est sensiblement la même à la différence que 10 grammes de sol ont été utilisés pour 100 mL de milieu de culture BH non supplémenté. Le tout a été vigoureusement agité pendant 20 minutes au lieu de 5 minutes comme précédemment. De cette façon, la quantité de sol est plus représentative du lot de référence et l'inoculum est plus concentré en microorganismes. Les étapes suivantes sont

identiques à la première méthode.

L'évaluation de la population microbienne de l'inoculum a été déterminée par dénombrement des colonies sur milieu solide PCA ou par dosage au spectrophotomètre modèle PU8630 (Phillips, Cambridge, Angleterre) à une longueur d'onde de 600 nm. Dans ce dernier cas, une courbe standard a été effectuée au préalable en transposant la valeur d'absorbance à 600 nm en UFC/mL et a donc permis de dénombrer les bactéries.

2.2 Cultures et conditions

Des essais à l'aide de différents milieux de cultures liquides ont été effectués dans le but d'optimiser la biodégradation des HAPs par la microflore indigène du sol de la sablière Thouin. Le milieu de culture de base est le Bushnell-Haas (BH). Un ou plusieurs suppléments y ont été ajoutés à différentes concentrations. Ils comprennent les éléments suivants : extrait de levures (EL) (Grand Island Biological Company, New-York), protéose peptone (PP) (Difco, Détroit), amidon (AM) (Fisher Scientific Company, New Jersey), alcanes (tétradécane, nonadécane et tétracosane) (Aldrich), lisier de porc (Ferme J.-M. Guillemette, St-Janvier, Québec), salicylate (Aldrich) et Tween 80 (Fisher Scientific). Un mélange de vitamines (5 mL/L) et de minéraux (10 mL/L) a aussi été utilisé. La composition du mélange de vitamines était la

suivante: biotine (2 mg/L), acide folique (2 mg/L), pyridoxine (10 mg/L), riboflavine (5 mg/L), thiamine (5 mg/L), acide nicotinique (5 mg/L), acide pantothénique (5 mg/L), vitamine B-12 (0.1 mg/L), acide p-aminobenzoïque (5 mg/L), acide thiotique (5 mg/L) (Wolin et al., 1963). La composition du mélange de minéraux était la suivante: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0.1 g/L), $ZnCl_2$ (0.1 g/L), $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.1 g/L), H_2BO_3 (0.1 g/L) et $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.1 g/L) (Boyd et al., 1983). La méthode utilisée est inspirée de celle mise au point par Grifoll et al. (1992). Des erlenmeyers stériles de 250 ou 500 mL munis de bouchons de ouate et contenant respectivement 22.5 ou 45 mL du milieu de culture ont été utilisés. Les quatre HAPs fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène (Aldrich, Milwaukee) ont été solubilisés dans le dichlorométhane (Anachemia, New-York) et ajoutés dans les erlenmeyers pour obtenir une concentration initiale de 100 ppm chacun. Dans certains cas, le chrysène a été ajouté à l'état solide. Après avoir laissé évaporer tout le dichlorométhane (48 heures), l'ensemencement a été effectué à raison de 2.5 mL d'inoculum dans 22.5 mL de milieu pour les erlenmeyers de 250 mL et 5 mL d'inoculum dans 45 mL de milieu pour les erlenmeyers de 500 mL. L'incubation a été effectuée à température de la pièce et les cultures ont été agitées à 100 rpm dans un agitateur modèle G 25 de New Brunswick (New Jersey). Le rouge phénol (J.T. Baker Chemical, New Jersey) à 0.011 g/L a été utilisé comme indicateur de pH dans ces cultures. Le pH a été

réajusté au besoin, dans un écart variant de 6.8 à 7.5, à l'aide de solutions stériles de HCl 1.0 N ou de NaOH 0.5 N, selon les besoins. Afin de palier au phénomène d'évaporation, les volumes ont été ajustés tout au long de l'incubation avec le milieu BH.

Des contrôles abiotiques identiques aux cultures précédentes mais sans inoculum, ont été prévus pour fin de prélèvement à chaque temps d'incubation choisis. Étant donné que tout le contenu de l'erlenmeyer a été extrait afin de minimiser les variations des résultats, une culture liquide inoculée de même qu'une culture abiotique ont été sacrifiées à chaque prélèvement. Le pourcentage de dégradation a été évalué par rapport au contrôle abiotique correspondant qui est considéré comme la valeur de référence.

Pour les cultures où du lisier de porc a été ajouté, un contrôle contenant le lisier de porc sans l'inoculum des microorganismes de la sablière Thouin a été ajouté afin d'éliminer la possibilité de dégradation des HAPs par la microflore indigène présente dans le lisier de porc.

2.3 Suivre de la croissance des populations bactériennes

Afin de suivre l'évolution des populations bactériennes dans les cultures liquides, un prélèvement de 0.5 mL de la

culture inoculée à été effectué à différents temps d'incubation avant de procéder à l'analyse des HAPs présents. Des dilutions décimales de ce prélèvement ont été effectuées dans une solution saline PBS et 0.1 mL de chaque dilution a été inoculé sur deux milieux solides : le PCA pour la détermination de la microflore totale et le BH 0.025 qui par la suite a été vaporisé avec le phénanthrène pour déterminer la microflore dégradant ce HAP. Les résultats des différents dénombrements sont exprimés en UFC par mL.

2.4 Extractions et analyses

Le contenu entier de l'erlenmeyer a été extrait en procédant en premier lieu à une acidification à pH <3.0 avec du HCl 10 N. Le solvant d'extraction était le diéthyl éther (Anachemia, New-York) et il a été ajouté en proportion de 1:1 au volume de la culture à extraire. Cela a été fait en trois étapes successives de volume égal pour les cultures de 25 mL et 1/2, 1/4, 1/4 pour les cultures de 50 mL. Le premier volume d'éther ajouté contient le standard interne à raison de 150 mg/L. Le standard interne, du biphényl (American Chemicals, Montréal) dans ce cas-ci, sert à quantifier les HAP solubilisés dans le solvant d'extraction et à corriger les pertes possibles lors de l'extraction. Après chaque ajout de solvant, le mélange est agité une minute dans une ampoule à décantation. La phase organique est prélevée et maintenue sur glace pour prévenir

l'évaporation. Parfois, la présence d'une émulsion très stable causant des problèmes lors de la récupération de l'éther a été observée. Des telles solutions ont alors été centrifugées à 2000 X g pendant une minute dans une centrifugeuse de table Damon-IEC Clinical Centrifuge (U.S.A) afin de briser l'émulsion et conséquemment de faciliter la récupération de l'éther. Les trois volumes de diéthyl éther ont été prélevés de la même façon et combinés. Du Na₂SO₄ anhydre a été ajouté au solvant récupéré afin d'éviter toutes traces d'eau.

L'analyse des HAPs a été effectuée par la technique de chromatographie en phase gazeuse munie d'un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) modèle 5890 (Hewlett-Packard, Avondale). La colonne capillaire était de type ULTRA 2 non polaire (Hewlett-Packard) et ses dimensions étaient de 25 m x 0.2 mm x 0.33 um et elle contenait 5% de diphényl et 95% de diméthyl polysiloxane. Le gaz porteur était l'hélium. Les injections ont été effectuées en mode "split" et le programme d'intégration était le HPCHEM version 3365 Analyzer 1 (Hewlett-Packard). Le volume d'injection était de deux microlitres. La programmation du four était comme suit: une température initiale de 70°C suivie d'une phase d'augmentation de 20°C/minute jusqu'à 290°C puis d'une augmentation de 10°C/minute jusqu'à 315°C et maintient de cette température pendant 13.5 minutes pour obtenir un temps total de 27 minutes. Une courbe

standard des quatre HAPs fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène en présence du standard interne biphenyl a été effectuée et a permis d'évaluer la concentration résiduelle d'HAPs.

Le pourcentage d'enlèvement des HAPs dans les cultures a été calculé par rapport à la valeur obtenue pour la culture abiotique à chaque temps d'incubation. Un pourcentage d'enlèvement de plus de 20% a été considéré comme significatif étant donné le pourcentage d'erreur de la méthode d'extraction et du GC-FID.

2.5 Identification des intermédiaires de dégradation

La recherche des intermédiaires de dégradation du fluorène et du phénanthrène a été effectuée à partir de cultures liquides inoculées avec la microflore indigène provenant du sol et où un seul HAP était ajouté à raison de 100 mg/L. Les cultures ont été extraites à l'éther par la technique décrite précédemment. Une extraction en conditions basiques a ensuite été effectuée en ajoutant 1 mL d'eau distillée pH 10.0 à 1 mL de l'éther extrait. Après avoir agité pendant une minute, la phase organique, devant contenir tous les composés possédant des groupements hydroxy (intermédiaires possibles), a été prélevée. Un volume de 150 uL a alors été transféré dans un vial conique et évaporé sous jet d'azote. Le vial a été scellé

immédiatement et son contenu a par la suite été dérivé par la technique de silylation avec le N,O-bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA) (Pierce Chemicals, Rockford, Illinois). Pour ce faire, un volume de 150 μ l d'un mélange 1:4 de BSTFA:acétonitrile a été ajouté puis le tout a été incubé pendant 30 minutes à 70°C. Deux microlitres ont été injectés au chromatographe en phase gazeuse Varian 3500 couplé à un spectromètre de masse de modèle Ion Trap 800 (Finnigan). La colonne capillaire était de type DB-5 (30 m x 0.3 mm x 0.25 μ m). L'hélium a servi de gaz porteur. Le débit à la tête de la colonne était de 2.4 mL/min et la pression de 24.7 PSI. Un microlitre d'échantillon a été injecté en mode "split" et le spectre de masse a été enregistré par balayages répétitifs à une vitesse de 1 s/décade de 70 à 400 daltons. Le programme d'intégration était le ITDS version 3.0 (Finnigan). La programmation du four était la suivante: une température initiale de 40°C suivie d'une augmentation de 10°C/minute jusqu'à 100°C puis de 3°C/minute jusqu'à 200°C, de 6°C/minute jusqu'à 290°C et de 20°C/minute jusqu'à 310°C. Cette température a été maintenue pendant 5 minutes. L'identification a été effectuée par comparaison des temps de rétention et des spectres de masse des produits extraits avec ceux des standards.

3. ETUDE D'UNE SOUCHE ISOLEE DU SOL DE LA SABLIERE THOUIN

3.1 Isolement, identification et conservation

Une souche bactérienne a été isolée à partir d'un prélèvement d'une culture liquide BH inoculée avec la microflore indigène provenant du sol de la sablière Thouin. Elle a ensuite été purifiée par repiquages successifs sur des milieux solides BH 0.025 vaporisés avec le phénanthrène et PCA sans phénanthrène. Les milieux ont été incubés tel que décrit précédemment. De plus, l'observation au microscope photonique (Leitz Wetzlar, Allemagne) de la souche pure a été faite après avoir procédé à une coloration de Gram.

Les observations au microscope électronique à transmission ont été effectuées en collaboration avec Robert Alain de l'Institut Armand-Frappier. Une suspension de la bactérie pure a été obtenue à partir de la biomasse croissant sur milieu solide BH 0.025 après raclage et transfert dans du milieu liquide BH. L'échantillon pour l'observation microscopique a été préparé selon la technique de Alain et al. (1987). L'échantillon a d'abord été transféré dans un microtube (240 uL) où une grille de cuivre a ensuite été déposée. L'échantillon a ensuite été ultracentrifugé à 120 000 X g pendant cinq minutes de façon à faire adhérer les bactéries à la grille. La grille a alors été récupérée, rincée à l'eau distillée et asséchée sur un papier buvard. La coloration

négative a été réalisée à l'aide de l'acide phosphotungstique (PTA 3% p/v, pH 6.0) pour une période de 30 secondes. Après l'avoir asséchée à nouveau avec un papier buvard, la grille a été observée au microscope électronique à transmission Hitachi modèle 7100. L'identification plus précise de la souche bactérienne a été effectuée à l'aide des galeries API 20E selon les recommandations du fabricant (Sherwood Medical, New York).

La souche purifiée a été conservée à -70°C dans du milieu BH 0.025 contenant 10% (v/v) de glycérol (Fisher Scientific, New Jersey).

3.2 Spectre d'activité de la souche bactérienne isolée

La souche isolée a été étalée par striation jusqu'à épuisement sur milieux solides BH 0.025 et ceux-ci ont été par la suite vaporisés par la technique décrite à la section 1.3.2. Les HAPs utilisés ont été: biphényl, dibenzothiophène, acénaphène, acénaphylène, fluoranthène, naphthalène, dibenzofurane, fluorène, phénanthrène, benzo(a)pyrène, anthracène, pyrène et benzanthracène (Aldrich). La présence de halos d'éclaircissement et/ou de pigmentation autour des colonies suggérait que la souche dégrade potentiellement le HAP vaporisé.

Une expérience a été effectuée en milieu liquide BH avec

les quatre HAPs fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène combinés, selon les méthodes décrites précédemment. Parallèlement, des cultures en milieu BH en présence d'un seul HAP ont été effectuées, pour chacun des quatre HAPs à l'étude. Le suivi de la croissance bactérienne a été effectué en mesurant la densité optique (D.O.) à 600 nm tel que décrit précédemment.

4.0 ÉTUDE D'UN CHAMPIGNON ISOLE DU SOL DE LA SABLIERE THOUIN

4.1 Isolement et conservation

Un champignon a été isolé à partir d'un prélèvement d'une culture liquide BH supplémentée d'amidon à 0.5% (p/v) inoculée avec la microflore indigène provenant du sol de la sablière Thouin. Il a ensuite été purifié et conservé par repiquages successifs sur des milieux solides BH 0.025 en absence d'HAPs. Les milieux ont été incubés tel que décrit précédemment.

4.2 Essais en milieu liquide

Une expérience en milieu liquide BH supplémenté d'amidon à 0.5% (p/v) et inoculé avec le champignon purifié a été effectuée en présence des quatre HAPs à l'étude, selon les méthodes décrites précédemment.

5. BIODEGRADATION DES HAPs EN MICROCOSMES

5.1 Conditions de culture

Les microcosmes utilisés dans cette étude ont été conçus de façon à ce qu'un mince film de liquide recouvre le sol. Pour ce faire, un volume de 27 mL de milieu de culture liquide a été ajouté par erlenmeyer stérile de 500 mL. Le milieu BH additionné de suppléments semblables à ceux utilisés précédemment dans les cultures en milieux liquides a été utilisé pour optimiser l'enlèvement des HAPs en microcosmes. Les quatre HAPs fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène ont été ajoutés au milieu liquide, à raison de 100 mg par kilogramme de sol dans une solution de dichlorométhane (ou par pesée pour le chrysène). Après évaporation complète du dichlorométhane (48 heures), 50 grammes de sol (poids sec) ont été ajoutés aux cultures et ont aussi servi d'inoculum. Les microcosmes ont été incubés à la température de la pièce, en absence de lumière. L'agitation s'est faite soit manuellement une fois par jour, soit à l'aide d'un agitateur New Brunswick (New Jersey) ajusté à 300 rpm à raison de 5 minutes une ou plusieurs fois par jour. Les pH ont été contrôlés à des valeurs entre 6.8 et 7.5 avec des solutions stériles de HCl 1 N ou de NaOH 0.5 N, selon les besoins. Le volume de liquide a été réajusté tout au long de l'incubation par addition du milieu BH de base.

Un contrôle abiotique pour chacune des cultures a été effectué, sauf celles prélevées au temps zéro. Ces contrôles sont identiques aux cultures biotiques à la différence que 5 mL d'une solution de 400 mg/L de chlorure de mercure et 5 mL d'HCl 10 N ont été ajoutés afin d'inhiber la microflore indigène du sol.

5.2 Suivie des populations bactériennes

Dans certaines expériences, des cultures identiques aux cultures biotiques ont été prévues pour chaque temps d'incubation afin d'évaluer la population bactérienne totale et celle dégradant les HAPs. Pour ce faire, le volume de liquide a été complété à 100 mL avec le milieu correspondant. Le tout a été agité vigoureusement pendant 20 minutes puis les particules de sol ont été sédimentées pendant 2 minutes. Le surnageant a été prélevé et les étapes suivantes ont été identiques à celles utilisées pour la détermination des populations bactériennes en milieu liquide (voir 2.3).

5.3 Extractions et analyses

Le contenu de l'erlenmeyer a été extrait en entier à l'aide d'une méthode semblable à celle utilisée pour les cultures liquides. Tout d'abord, le contenu de l'erlenmeyer a été acidifié à pH 3.0 avec du HCl 10 N et 50 mL d'eau distillée ont été ajoutés pour faciliter les manipulations. Le solvant

d'extraction, le diéther, a été ajouté en trois volumes successifs de 30, 10 et 10 mL. Le standard interne 9-méthylanthracène (Aldrich) est contenu seulement dans le premier volume de solvant à raison de 666.7 mg/L afin d'obtenir une concentration finale du standard de 400 mg/L. Ce standard a été choisi car il n'est pas présent dans le sol de la sablière Thouin et son temps de rétention au GC-FID est différent de ceux des quatre HAPs utilisés. Le mélange avec le solvant a été agité vigoureusement pendant 1 minute puis décanté dans une ampoule. La phase organique a été prélevée à chaque fois et transférée dans un erlenmeyer propre et maintenu sur de la glace. L'émulsion a été brisée par centrifugation à 2000 x g pendant 1 minute. Du Na₂SO₄ anhydre a été ajouté pour déshydrater l'éther recueilli. L'extrait a ensuite été transféré dans un ballon jaugé et le volume a été ajusté à 50 mL avec de l'éther.

L'analyse des HAPs a été effectuée par la même méthode que pour les extractions en milieu liquide, soit au GC-FID. La programmation du four était différente dans ce cas afin d'obtenir une meilleure séparation des quatre HAPs à l'étude et qui étaient déjà présents dans le sol de la sablière Thouin. La programmation du four était la suivante: une température initiale de 70°C, suivie d'une augmentation de 20°C/minute jusqu'à 240°C et maintient à cette température pendant 7

minutes, puis une augmentation de 10°C/minute jusqu'à 280°C, maintient pendant 5 minutes et suivie d'une augmentation de 20°C/minute jusqu'à 310°C et maintient pendant 3 minutes.

5.4 Inoculation de la souche *Alcaligenes* en sol

La souche bactérienne isolée a été inoculée dans le sol selon le principe de la bioaugmentation. Pour ce faire, une suspension de 1×10^7 UFC/mL de la bactérie a été préalablement préparée en milieu BH liquide. Deux millilitres de cette suspension ont ensuite été inoculés dans des microcosmes contenant le milieu BH, qui ont été préparés et incubés de la même façon que décrite précédemment. Des contrôles abiotiques identiques à ceux déjà décrits ont aussi été jumelés à chaque temps d'incubation.

6. MINERALISATION

Des microcosmes contenant 10 g de sol ainsi que 5.4 mL de milieu liquide BH supplémenté d'extrait de levures (0.5% (p/v)) ont été effectués dans des bouteilles sérologiques de 100 mL fermées hermétiquement par des valves Minivert en téflon (Supelco, Oakville, Ontario). La minéralisation des HAPs fluorène, phénanthrène et pyrène a été étudiée séparément. Le HAP non-marqué correspondant a été ajouté à raison de 100 mg/L à partir d'une solution de dichlorométhane. Ce solvant a été évaporé pendant 48 heures avant d'ajouter le sol. Les trois

HAPs marqués uniformément au ^{14}C ont été ajoutés dans des bouteilles distinctes, en duplicata, pour obtenir un compte de 110 000 dpm par 10 grammes de sol. Le [9- ^{14}C]-phénanthrène (8.3 mCi/mmol), le ^{14}C -fluorène (14.55 mCi/mmol) et le ^{14}C -pyrène (32 mCi/mmol) ont été utilisés (Sigma, St-Louis). Une trappe à CO_2 formée d'un tube contenant 0.5 mL de KOH 1M a été placée dans chaque bouteille. Les microcosmes ont été incubés à la température pièce, en absence de lumière et agités manuellement pendant 10 secondes une fois par jour.

Les prélèvements de KOH ont été effectués à l'aide d'aiguilles et de seringues stériles à chaque temps d'incubation choisis. Le volume entier de KOH (0.5 mL) a été transféré dans un vial à scintillation. Un volume égal de KOH frais a été ajouté afin de rincer le tube. Ce deuxième volume de KOH a été combiné au premier et 0.5 mL de KOH frais a finalement été redéposé dans la trappe pour la poursuite de l'incubation. Un volume de 5 mL de liquide à scintillation Ultima Gold TM XR (Packard Instrument, Meriden) a été ajouté au KOH prélevé. Les résultats ont été déterminés par comptage de la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation modèle 3375 (Packard, U.S.A). Les valeurs obtenues ont été exprimées en coups par minute ^{14}C (cpm ^{14}C) à l'aide d'une courbe standard. De l'oxygène (40 mL) a été injecté après chaque prélèvement ou ouverture de la valve afin d'éviter que ce paramètre devienne

limitant pour la croissance des microorganismes.

Pour chaque temps d'incubation, une autre bouteille sérologique identique aux précédentes mais ne contenant pas de composés radioactifs a été extraite avec le diéthyl éther selon la même technique décrite précédemment en respectant toutefois les proportions de quantité de solvant et de standard interne pour 10 grammes de sol. Des contrôles abiotiques (HgCl_2 , $\text{pH} < 3.0$) ont été jumelés aux cultures à chaque temps d'incubation autant pour les microcosmes contenant les HAPs radioactifs que ceux destinés à l'extraction.

7.0 EVALUATION DE L'ACTIVITE SURFACTANTE ET EMULSIFIANTE

L'activité surfactante présente dans la portion liquide de certains microcosmes a été évaluée par une technique modifiée de Jain et al. (1991). Le couvercle d'une plaque Elisa (comprenant 60 puits) a été recouvert d'un film d'huile à chauffage constituant une surface hydrophobe. L'échantillon (150 uL) de la culture à analyser a été déposé dans l'un des puits et la déformation de la goutte ainsi formée a été notée. La présence d'une activité surfactante est suggérée lorsque la goutte a tendance à se répandre.

L'activité émulsifiante de la portion liquide de certains microcosmes a aussi été évaluée selon la méthode de Bertrand et

a. (1994). Dix millilitres d'eau distillée ont été versés dans un tube de 15 mL, où 150 μ L d'huile à chauffage ont été ajoutés afin de former une couche hydrophobe au-dessus de l'eau. Deux cent microlitres de l'échantillon à analyser ont été ajoutés puis le tube a été agité (vortex) pendant 10 secondes. Une activité émulsifiante est suggérée par la formation de fines gouttelettes dans l'eau.

RÉSULTATS

1. CARACTÉRISATION DU SOL

1.1 Chimique

Le lot de référence du sol que nous avons utilisé contient 4.9% (p/p) d'humidité (Tableau 3). Le pH de ce sol est près de la neutralité soit une valeur de 6.98. Le contenu en huiles et graisses est de 7786 ppm ce qui est supérieur au critère B du MEF. Le rapport C:N:P du sol a été évalué à 100:2:22, ce qui est loin du rapport 120:10:1 recommandé. Le sol utilisé pour les microcosmes a donc été ajusté à un rapport C:N de 100:10 avant tout amendement. Pour sa part, le phosphore n'a pas été ajusté étant donné que sa concentration est au-dessus de la valeur souhaitée. Les hydrocarbures identifiés et quantifiés par GC/MS comprennent les alcanes, les HAMS ainsi que les HAPs. La valeur obtenue pour ces derniers, soit 509.12 ppm, se situe nettement au-dessus du critère C. La concentration des métaux lourds argent, arsenic, barium, cadmium, chrome, cobalt, cuivre, étain, mercure, molybdène, nickel, plomb, sélénium et zinc a été évaluée en-dessous des normes à respecter pour le critère C.

1.2 Microbiologique

Des échantillons de sol provenant du lot de référence ont été prélevés et les concentrations de bactéries indigènes totales et ayant potentiellement la capacité de

Tableau 3 : Caractérisation du sol de la sablière Thouin

| Caractéristiques | Valeurs obtenues ^a Lot de référence R20-27 | Normes ppm (critère C) |
|---|--|------------------------------|
| Chimiques: | | |
| Humidité | 4.9 % (p/p) | |
| pH | 6.98 | |
| C:N:P | 100 : 2 : 22 | |
| Huiles et graisses | 7786.0 mg/Kg | 5000 |
| Alcanes | 89.1 mg/Kg | |
| HAM | 13.0 mg/Kg | |
| HAP | 509.2 mg/Kg | 200 |
| Métaux lourds: | | |
| Argent | < 2 mg/Kg | 40 |
| Arsenic | 0.7 mg/Kg | 50 |
| Barium | 23 mg/Kg | 2000 |
| Cadmium | <2 mg/Kg | 20 |
| Chrome | 26 mg/Kg | 800 |
| Cobalt | 5 mg/Kg | 300 |
| Cuivre | 6 mg/Kg | 500 |
| Étain | <2 mg/Kg | 300 |
| Mercure | 0.10 mg/Kg | 10 |
| Molybdène | <0.5 mg/Kg | 40 |
| Nickel | 9 mg/Kg | 500 |
| Plomb | 20 mg/Kg | 1000 |
| Sélénium | <0.1 mg/Kg | 10 |
| Zinc | 28 mg/Kg | 1500 |
| Microbiologique: | | |
| Microflore totale | 8.6 x 10 ⁶ UFC/g | |
| Microflore dégradant potentiellement : | | |
| Fluorène | 2.5 x 10 ⁵ UFC/g | |
| Phénanthrène | 7.5 x 10 ⁴ UFC/g | |

a : triplicata

dégrader les HAPs fluorène et phénanthrène ont été déterminées (Tableau 3). La population bactérienne totale a été évaluée à 8.6×10^6 UFC/g et celle dégradant potentiellement le fluorène ou le phénanthrène, représentait respectivement 2.9 et 0.9% de cette valeur.

2. CULTURES EN MILIEUX LIQUIDES

2.1 Optimisation de la biodégradation

2.1.1 Cultures en erlenmeyers de 500 mL

Des cinétiques d'enlèvement du fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène en milieux liquides (100 mg/L chacun) ont tout d'abord été effectuées en erlenmeyers de 500 mL sous agitation de 100 rpm (Figures 7 et 8). Le pourcentage de récupération de chacun des quatre HAPs dans les cultures au temps zéro a été d'au moins 80%. La microflore indigène de la sablière Thouin a été capable d'enlever 85% (par rapport au contrôle abiotique) du fluorène après 16 jours d'incubation dans le milieu liquide BH (Figure 7A). Lorsque ce milieu a été supplémenté avec 0.5% (p/v) d'extrait de levures, un pourcentage semblable d'enlèvement du fluorène a été obtenu après seulement 11 jours d'incubation. Le fluorène a été complètement enlevé en prolongeant l'incubation de ces cultures à plus de 20 jours. Des résultats similaires ont été obtenus pour le phénanthrène (Figure 7B). La microflore indigène n'a pas dégradé de

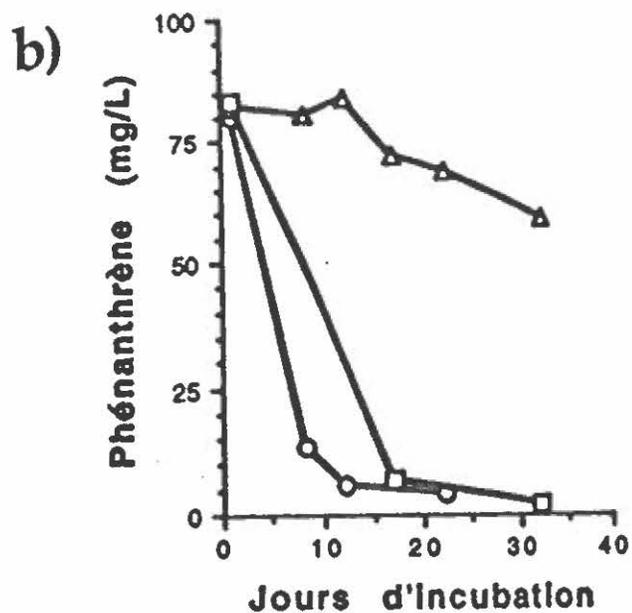
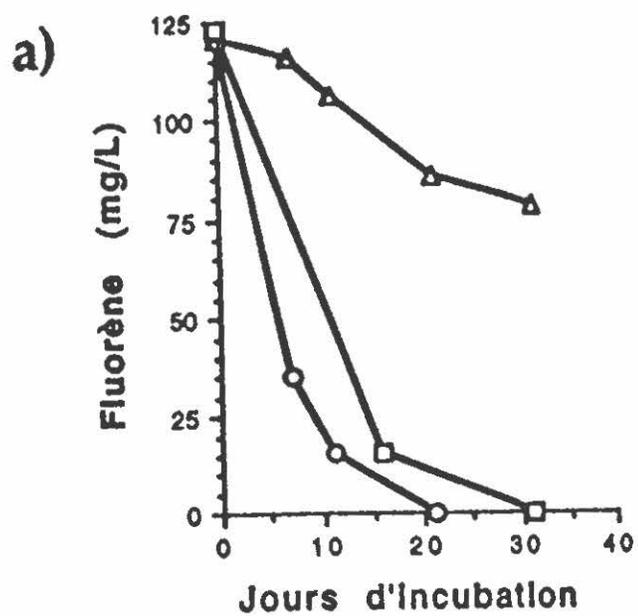


Figure 7.

Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène en erlenmeyers de 500 mL. BH (□); BHEL.5 (○); Contrôle abiotique (△).

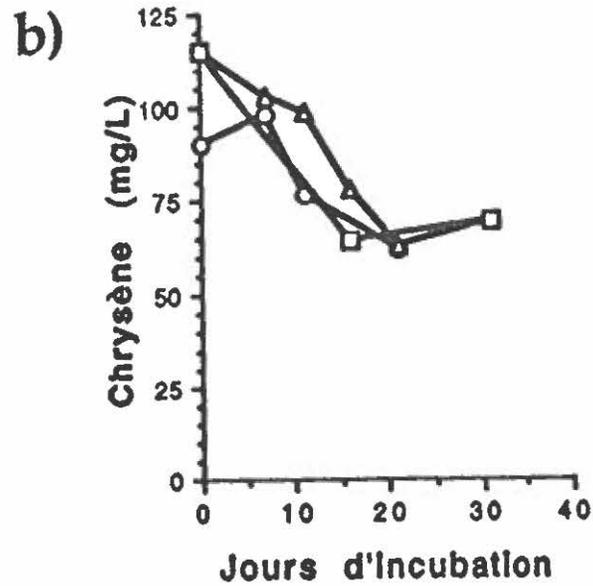
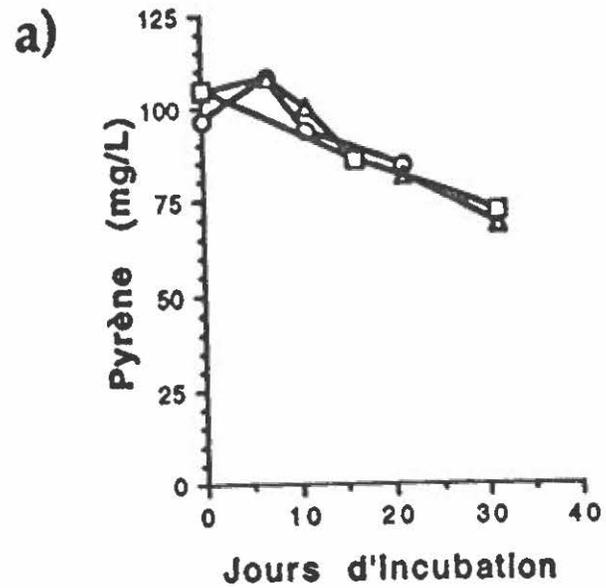


Figure 8. Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du pyrène (a) et du chrysène (b) par la microflore indigène en erlenmeyers de 500 mL. BH (□); BHEL.5 (○); Contrôle abiotique (△).

façon significative le pyrène et le chrysène après 30 jours d'incubation dans le milieu BH (Figure 8). L'addition d'extrait de levures dans ce milieu n'a pas entraîné une dégradation significative de ces HAPs après 20 jours d'incubation.

La population bactérienne totale de ces cultures au départ a été évaluée à 1.0×10^4 UFC/mL (Figure 9). Elle a augmenté plus rapidement en présence d'extrait de levures. En effet, une concentration de 1.0×10^9 UFC/mL a été obtenue après seulement 7 jours d'incubation dans le milieu BH supplémenté d'extrait de levures comparativement à 5.0×10^7 UFC/mL après 30 jours d'incubation dans le milieu BH sans ce supplément. La population dégradant potentiellement le phénanthrène est passée de 2.0×10^2 à 3.3×10^7 UFC/mL en milieu BH après 30 jours d'incubation soit de 1 à 66% de la population totale. En présence d'extrait de levures, il y a aussi eu enrichissement de cette population, qui a atteint 90% de la population totale après 7 jours d'incubation. La diversité des types de colonies sur milieu solide PCA a aussi été plus grande au temps zéro qu'après 20 à 30 jours d'incubation. En effet, le nombre de colonies d'aspect différent était d'environ 12 au départ et il a été réduit à moins de 5 après 20 jours d'incubation, dans les cultures avec et sans extrait de levures.

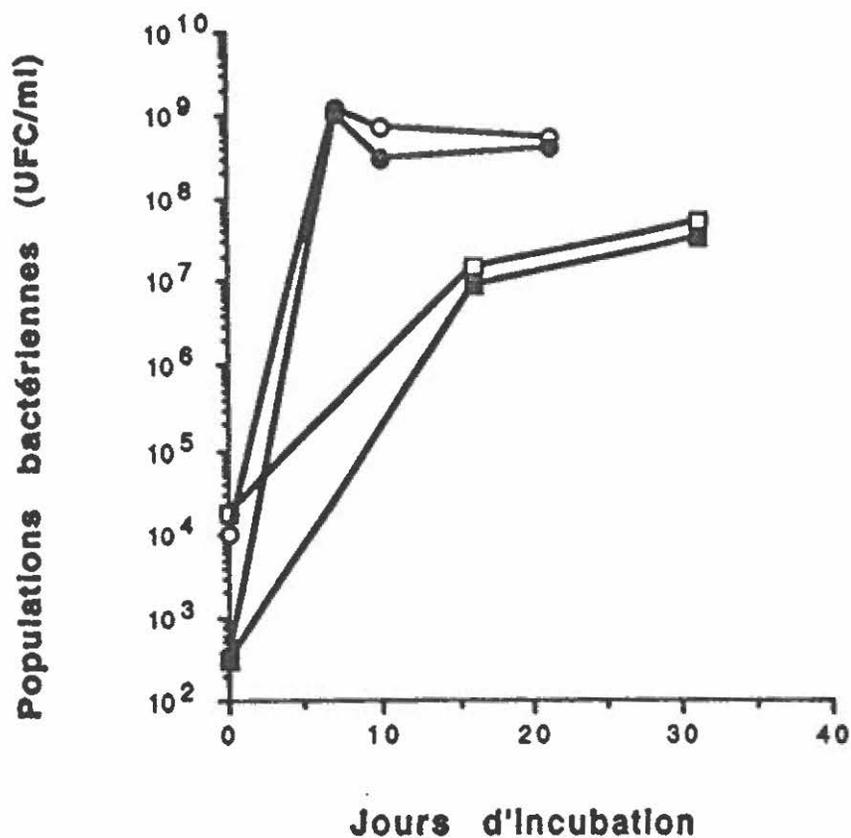


Figure 9.

Courbe de croissance en milieux liquides de la population bactérienne totale et celle dégradant potentiellement le phénanthrène en erlenmeyers de 500 mL. Population totale en milieu BH (□) et BHEL.5 (○); Population dégradant le phénanthrène en milieu BH (■) et BHEL.5 (●).

Le remplacement de l'extrait de levures par d'autres suppléments tel que le protéose peptone, l'amidon ou un mélange de protéose peptone, d'extrait de levures et d'amidon (0.5% (p/v) chacun) n'a pas représenté un avantage au niveau de l'enlèvement des HAPs (résultats non présentés). Cependant, le pH de ces cultures s'est comporté de façon différente dépendamment du supplément utilisé. Il y a eu alcalinisation du milieu à des valeurs de 7.5-10.0 avec l'extrait de levures et le protéose peptone, et acidification à 6.0-6.5 en absence de suppléments et à 3.0-5.0 en présence d'amidon. Le pH de ces cultures a été ajusté à 7.0 plusieurs fois par jour avec du HCl 1 N ou du NaOH 0.5 N.

L'ajout d'un mélange de vitamines et de minéraux au milieu BH en plus de l'extrait de levures n'a pas permis d'optimiser la dégradation du fluorène et du phénanthrène (résultats non présentés). De plus, aucun enlèvement significatif n'a été observé pour le pyrène et le chrysène sous ces conditions.

Il est à noter que dans certaines cultures où l'amidon a été utilisé comme supplément, une population dominante de champignons s'est développée. Après 17 jours d'incubation de ces cultures, 66% du fluorène, 56% du phénanthrène et

100% du chrysène ont été enlevés (résultats non présentés). Ce champignon a été isolé puis purifié par repiquages successifs sur milieu solide PCA en absence de chrysène. La souche résultante a été incapable de dégrader les HAPs ajoutés au milieu liquide BH supplémenté de 0.5% d'amidon.

2.1.2 Cultures en erlenmeyers de 250 mL

Compte tenu de l'espace d'agitation limité, il a été résolu d'effectuer des cultures en erlenmeyers de 250 mL au lieu de 500, ceci permettant un plus grand nombre de cultures pour un même espace. Le volume du milieu et de l'inoculum ont été réduits en conséquence soit à 22.5 et 2.5 mL respectivement. Sous ces nouvelles conditions, il n'y avait plus d'enlèvement significatif du fluorène et du phénanthrène dans le milieu BH après 33 jours d'incubation (Figure 10). Par contre, l'addition de 0.5% d'extrait de levures à ce milieu a permis un enlèvement de ces HAPs comparable à ce qui avait été obtenu dans les cultures en erlenmeyers de 500 mL. Tout comme précédemment, le pyrène et le chrysène n'ont pas été enlevés dans ces cultures effectuées en erlenmeyers de 250 mL (résultats non présentés).

La croissance de la population bactérienne totale et de celle dégradant potentiellement le phénanthrène dans le

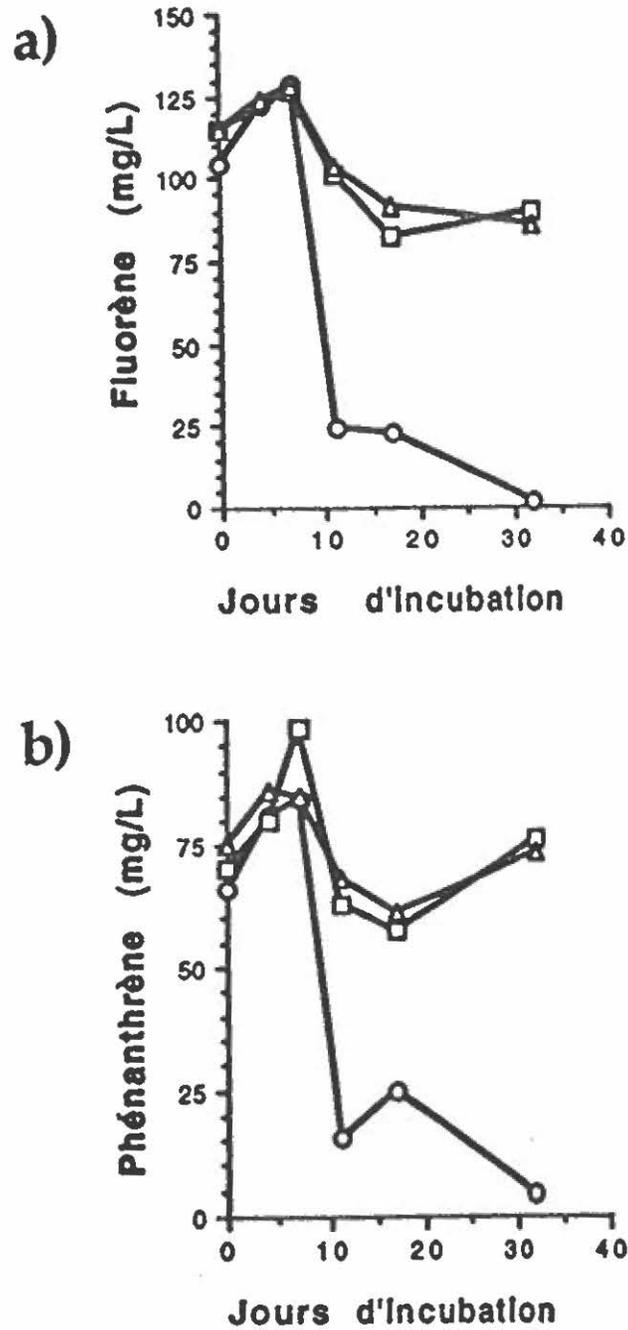


Figure 10.

Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène en erlenmeyers de 250 mL. BH (□); BHEL.5 (○); Contrôle abiotique (△).

milieu BH a été plus faible sous ces nouvelles conditions de culture (Figure 11). Par exemple, pour les bactéries totales, un maximum de seulement 9×10^5 UFC/mL a été obtenu après 30 jours d'incubation en milieu BH comparativement à 5×10^7 UFC/mL pour les cultures de 500 mL (Figure 9). Par contre, une telle différence n'a pas été observée en présence d'extrait de levures. En effet, la concentration maximale atteinte pour les populations bactériennes à l'étude a été voisine de 10^9 UFC/mL après seulement 7 jours d'incubation dans les cultures effectuées en erlenmeyers de 250 et 500 mL.

L'addition d'amidon 0.5% (p/v) en plus de l'extrait de levures au milieu BH n'a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats après 30 jours d'incubation (résultats non présentés). De plus, la concentration d'extrait de levures a pu être diminuée à 0.1% (p/v) tout en obtenant le même résultat soit l'enlèvement complet du fluorène et du phénanthrène après 33 jours d'incubation, en autant que du Tween 80 (200 ppm) ou un mélange de trois alcanes (300 ppm) ait été ajouté au milieu (Figure 12). Des résultats similaires ont aussi été obtenus lorsque l'extrait de levures a été remplacé par 1% (v/v) de lisier de porc (Figure 13). Par contre, l'ajout de salicylate (50 ppm) ou de lisier de porc à 0.2% (v/v) au milieu BH n'a pas permis

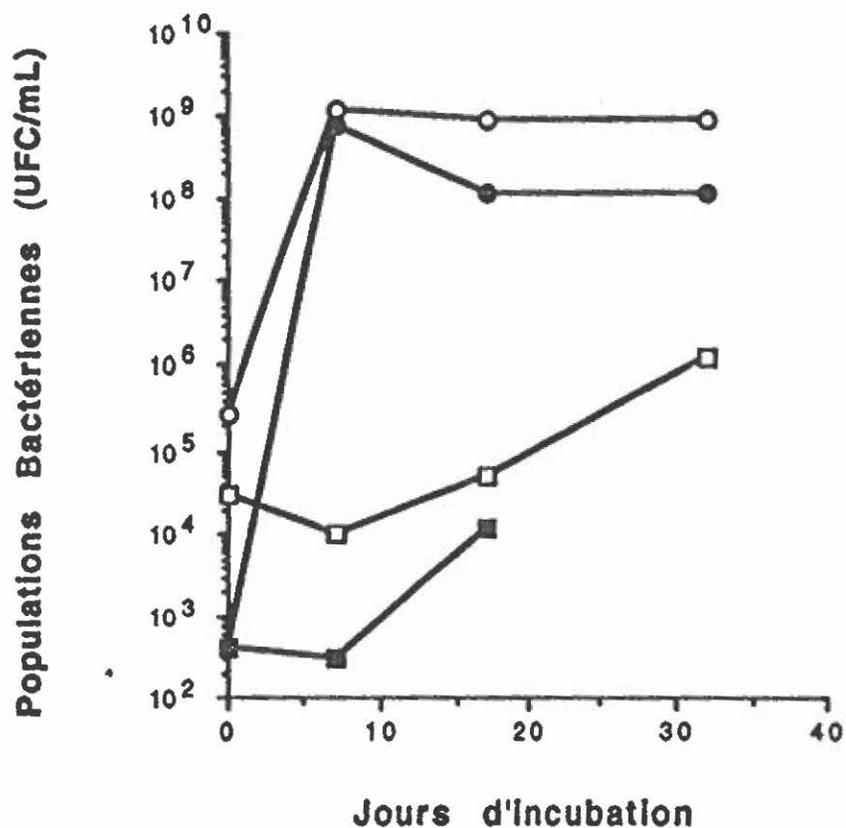


Figure 11.

Courbe de croissance en milieux liquides de la population bactérienne totale et celle dégradant potentiellement le phénanthrène en erlenmeyers de 250 mL. Population totale en milieu BH (□) et BHEL.5 (○); Population dégradant le phénanthrène en milieu BH (■) et BHEL.5 (●).

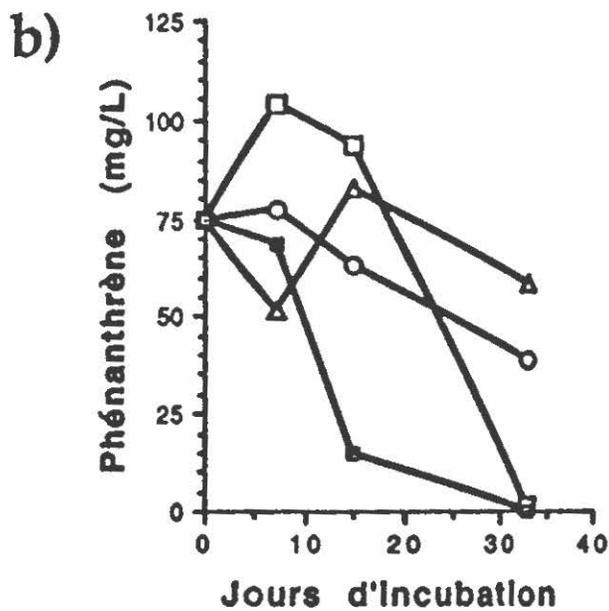
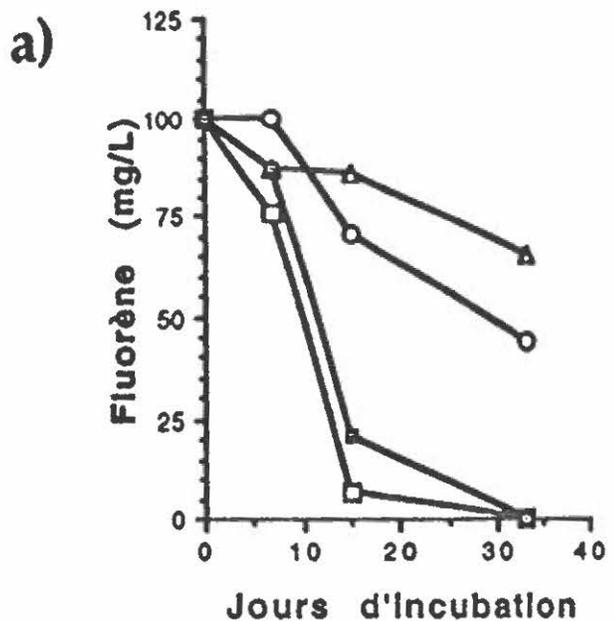


Figure 12.

Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène en erlenmeyers de 250 mL. BHEL.1 (○); BHTWEL.1 (□); BHALEL.1 (△); Contrôle abiotique (▲).

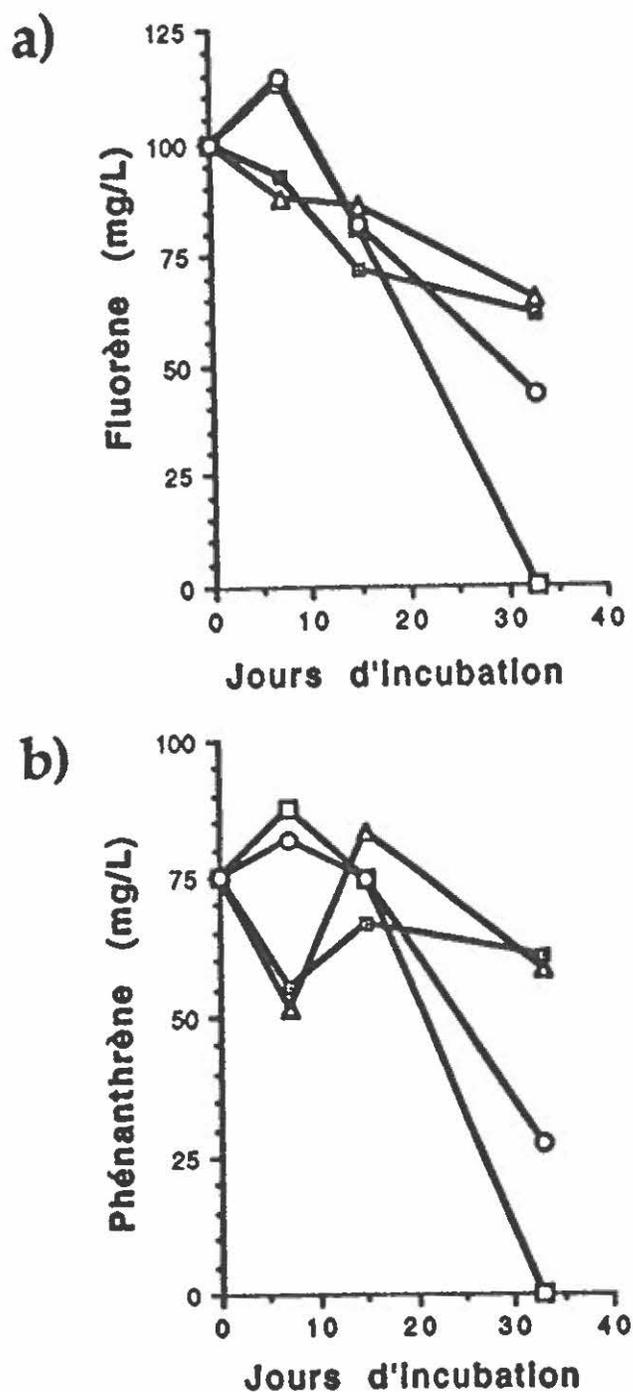


Figure 13.

Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène en erlenmeyers de 250 mL. BHSAL (■); BHLIS.2 (○); BHLIS1 (□); Contrôle abiotique (△).

d'obtenir de tels résultats. Le pyrène et le chrysène n'ont pas été enlevés dans aucune des cultures précédentes après 33 jours d'incubation (résultats non présentés).

La procédure de récupération des microorganismes du sol a été modifiée dans la préparation de l'inoculum de certaines expériences. En effet, une plus grande quantité de sol a été utilisée soit 10% (p/v) au lieu de 4%, puis le mélange a été agité pendant 20 minutes plutôt que 5 comme dans les préparations précédentes afin d'obtenir une meilleure représentativité des microorganismes présents dans le sol. Dans les milieux BHensemencés avec un tel inoculum, le fluorène et le phénanthrène ont été enlevés de façon importante (Figure 14) contrairement à ce qui avait été observé précédemment avec l'autre type d'inoculum. En présence d'extrait de levures, le degré d'enlèvement du fluorène a été légèrement ralenti tandis que l'enlèvement du phénanthrène a été comparable, et ce pour l'un et l'autre des types d'inoculums utilisés. Aucun enlèvement significatif du pyrène et du chrysène n'a été obtenu suite à l'utilisation du nouveau type d'inoculum (résultats non présentés). De plus, l'augmentation de la vitesse d'agitation à 150 et 200 rpm dans de telles cultures en présence ou en absence d'extrait de levures n'a pas permis d'optimiser la dégradation des quatre HAP à l'étude

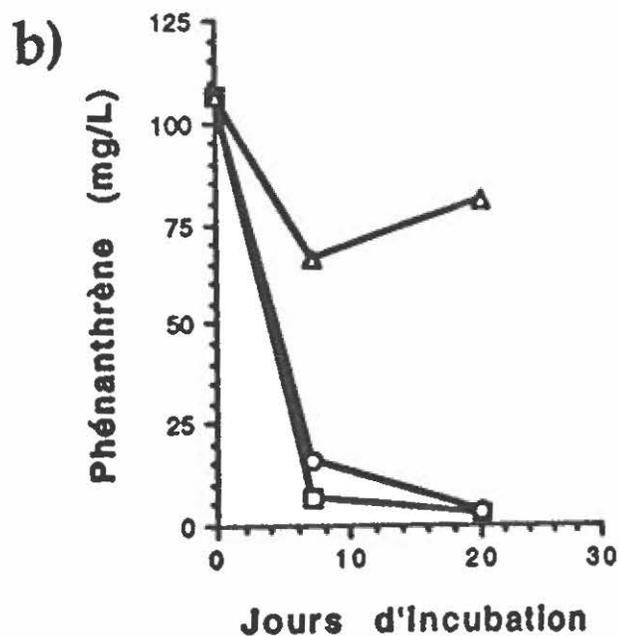
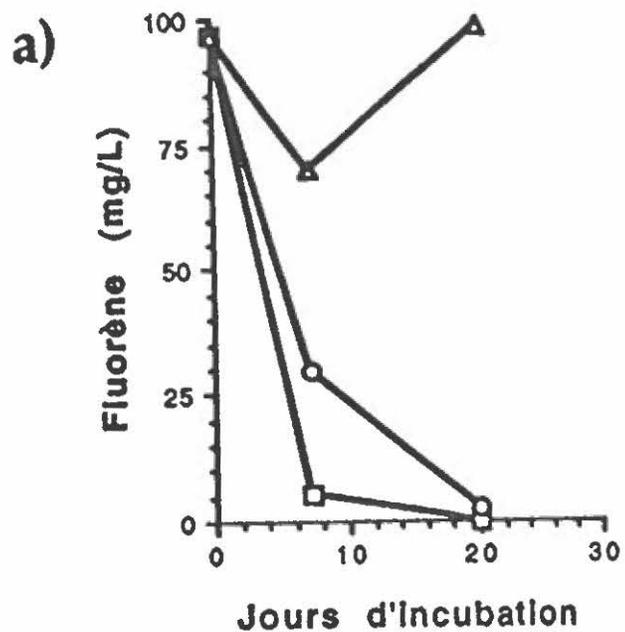


Figure 14.

Cinétique d'enlèvement en milieux liquides du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène inoculée selon la procédure modifiée en erlenmeyers de 250 mL. BH (□); BHEL.5 (○); Contrôle abiotique (△).

(résultats non présentés).

Suite à cette expérience, nous avons tenté de préciser l'influence de l'inoculum de départ sur l'enlèvement des HAPs. Dans des cultures en milieux BH supplémentés de 0.5% (p/v) d'extrait de levures, la microflore indigène a été inoculée de telle sorte à obtenir des populations de bactéries totales au départ de 10^3 , 10^4 et 10^6 UFC/mL (Figure 15). Pour chacune de ces concentrations, des pourcentages d'enlèvement de près de 100% ont été obtenus après 15 jours d'incubation pour le fluorène et le phénanthrène. Cependant, pour la concentration de bactéries totales au départ la plus faible, il y a eu un certain ralentissement de l'enlèvement de ces deux HAPs, tel que noté après 5 jours d'incubation. Le chrysène n'a pas été dégradé dans aucune de ces cultures (résultats non présentés). Par contre, après 30 jours d'incubation, le pyrène a été enlevé de façon significative soit 46% dans les cultures inoculées avec la plus forte concentration (Figure 16).

2.2 Identification d'intermédiaires de dégradation

Des cultures liquides contenant du milieu BH supplémenté de 0.5% (p/v) d'extrait de levures ont été incubées avec soit le fluorène ou le phénanthrène afin

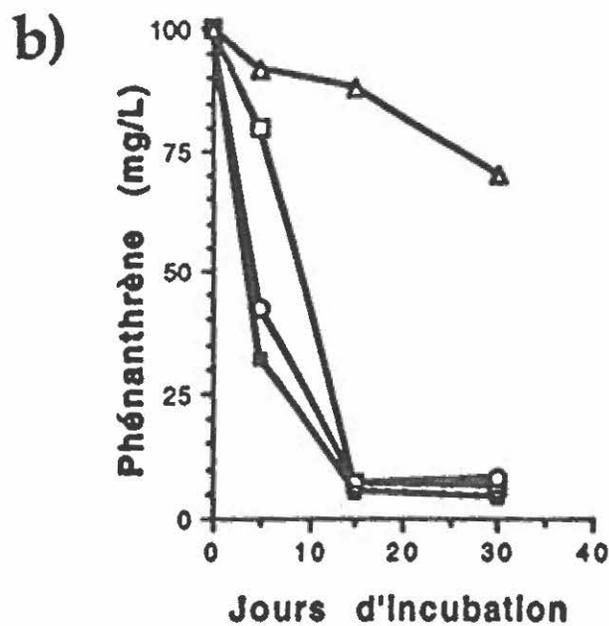
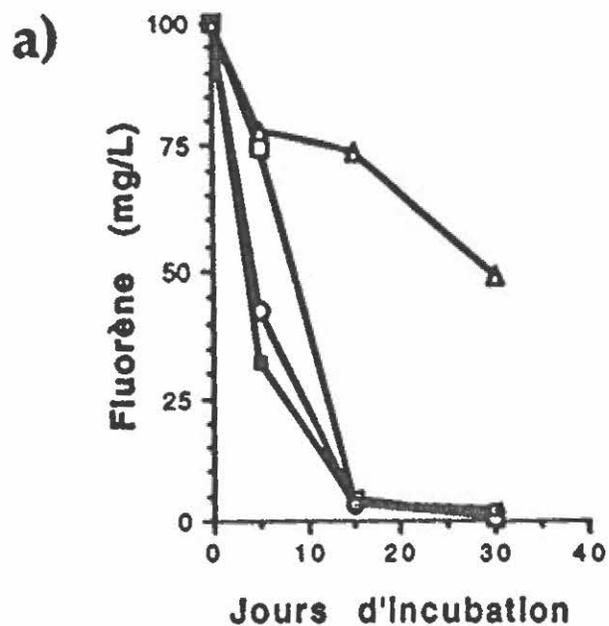


Figure 15.

Cinétique d'enlèvement en milieu liquide BHEL.5 du fluorène (a) et du phénanthrène (b) par la microflore indigène à différentes concentrations initiales de bactéries totales. 10^3 UFC/mL (□); 10^4 UFC/mL (○); 10^6 UFC/mL (■); Contrôle abiotique (△).

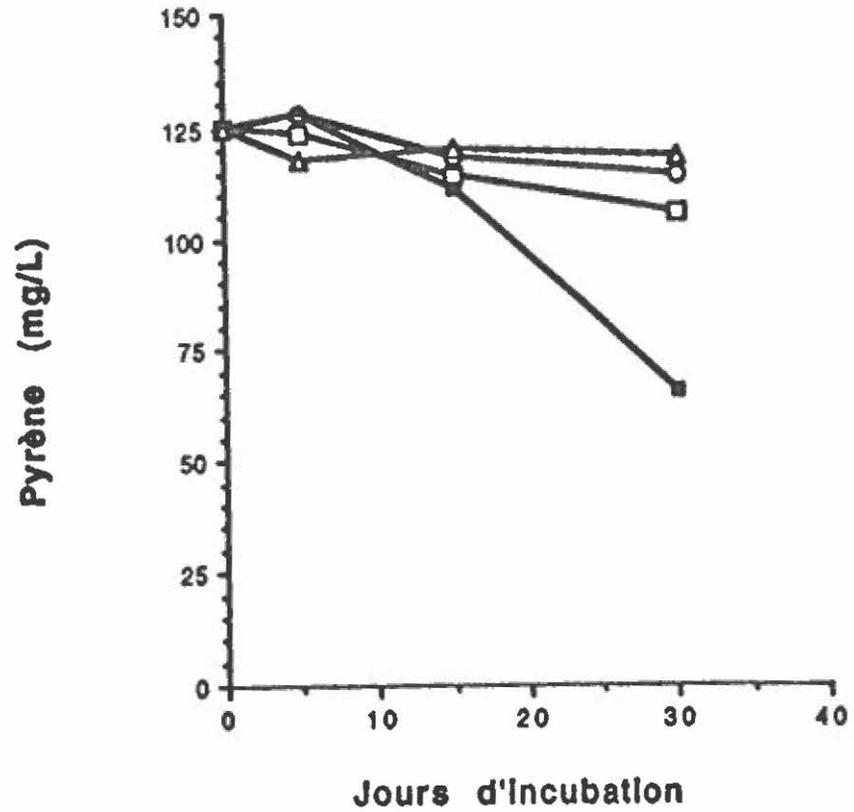


Figure 16. Cinétique d'enlèvement en milieu liquide BHEL.5 du pyrène par la microflore indigène à différentes concentrations initiales de bactéries totales. 10^3 UFC/mL (○); 10^4 UFC/mL (□); 10^6 UFC/mL (■); Contrôle abiotique (△).

d'observer l'apparition d'intermédiaires de dégradation. Dans ces cultures, le fluorène et le phénanthrène ont été enlevés à 32 et 71% respectivement après 6 jours d'incubation et à 100% après 9 jours d'incubation. Cependant, aucune accumulation de nouveaux composés en quantité détectable au GC/MS n'a été observée pour ces deux temps d'incubation. La recherche spécifique de l'acide 1,hydroxy-2,naphtoïque, qui est un intermédiaire connu du phénanthrène, n'a pas permis de démontrer sa présence dans les cultures contenant le phénanthrène.

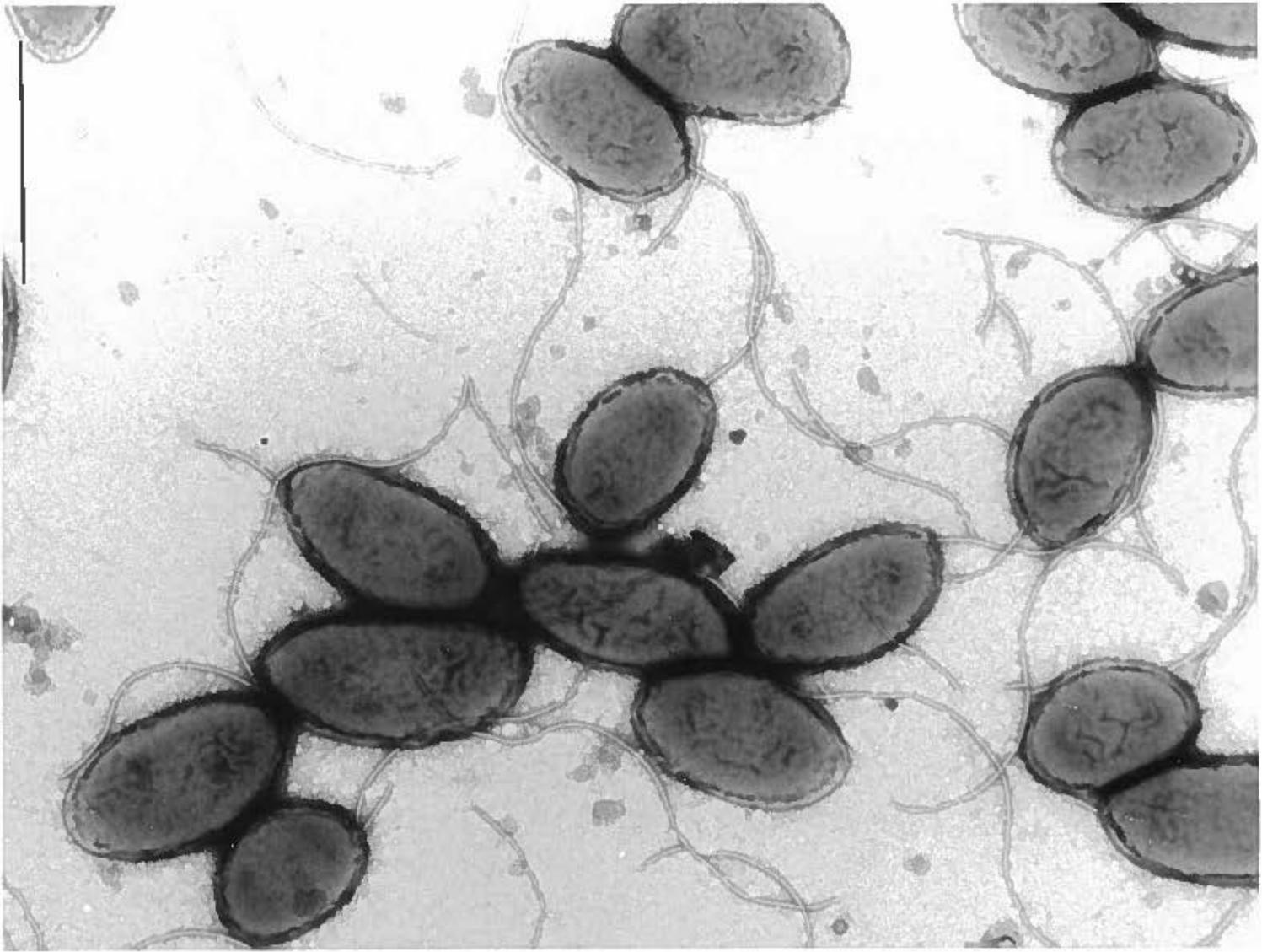
3.0 ÉTUDE D'UNE SOUCHE BACTÉRIENNE ISOLÉE

Une souche bactérienne a été isolée d'une culture liquide en milieu BH contenant les quatre HAPs. Elle a été sélectionnée compte tenu qu'elle formait un halo important sur milieu solide en présence du phénanthrène. Ses caractéristiques ont été déterminées par Galeries API et observations au microscope optique. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4. Elle a ainsi été identifiée comme étant une bactérie Gram négatif appartenant au genre *Alcaligenes* sp.. Son observation en microscopie électronique nous indique un seul flagelle polaire (Figure 17). Le spectre d'utilisation de certains HAPs par cette bactérie a été déterminé par la méthode de vaporisation de ces HAPs sur milieu solide BH 0.025. Les résultats sont

Tableau 4 : Caractéristiques de la souche *Alcaligenes* sp..

| Caractéristiques | Résultats |
|--------------------------------|-----------|
| <u>Tests bactériologiques:</u> | |
| Mobilité | + |
| Gram | négatif |
| <u>Tests biochimiques:</u> | |
| Bêta-galactosidase | - |
| Arginine dihydrolase | - |
| Ornithine décarboxylase | - |
| H ₂ S | - |
| Uréase | - |
| Tryptophane déaminase | - |
| Indole | - |
| Acétoïne | + |
| Gélatinase | - |
| Réduction nitrate | - |
| Oxidase | + |
| Amylase | - |
| <u>Tests d'utilisation:</u> | |
| Glucose | - |
| Mannose | - |
| Inositol | - |
| Sorbitol | - |
| Rhamnose | - |
| Saccharose | - |
| Arabinose | - |
| Citrate | + |

Figure 17. Microscopie électronique de la souche *Alcaligenes* sp. en coloration négative. La barre représente 1 μm .



présentés dans le Tableau 5. La formation de halo et/ou d'un pigment intense autour des colonies a été démontré après seulement 15 minutes en présence de biphényl, dibenzothiophène et dibenzofurane, après 12 heures pour le fluorène, fluoranthène et phénanthrène, après 24 heures pour l'acénaphthylène, naphthalène et anthracène et finalement après 96 heures pour le pyrène et le benzanthrène. Aucune coloration ou formation de halo n'a été observée pour les HAPs acénaphthène et benzo(a)pyrène.

Des essais d'enlèvement du fluorène, du phénanthrène, du pyrène ou du chrysène dans le milieu BH liquide inoculé avec la souche *Alcaligenes* sp. ont été effectués (Tableau 6). Le fluorène et le phénanthrène ont été enlevés complètement après 50 et 8 jours d'incubation, respectivement. Le pyrène et le chrysène n'ont pas été enlevés après 50 jours d'incubation. Lorsque les quatre HAPs ont été ajoutés à la même culture, il y a eu un retard dans l'enlèvement du phénanthrène et aucun changement significatif pour les trois autres HAPs. Les valeurs d'absorbance à 600 nm indiquent que la croissance a été supérieure dans les cultures où les quatre HAPs ont été ajoutés en mélange.

Tableau 5 : Observation de la formation de halos et/ou de coloration sur milieu BH0.025 par la souche *Alcaligenes* sp..

| Composés vaporisés | Présence de halos et/ou de coloration |
|--------------------|---------------------------------------|
| Biphényl | Positif |
| Naphtalène | Positif |
| Acénaphtylène | Positif |
| Acénaphène | Négatif |
| Dibenzothiophène | Positif |
| Dibenzofurane | Positif |
| Fluorène | Positif |
| Anthracène | Positif |
| Phénanthrène | Positif |
| Fluoranthène | Positif |
| Pyrène | Positif |
| Benzo(a)anthracène | Positif |
| Benzo(a)pyrène | Négatif |

Tableau 6 : Enlèvement du fluorène, du phénanthrène, du pyrène et/ou du chrysène par la souche *Alcaligenes* sp. en milieu liquide BH.

| HAPs | Concentration HAP (mg/L) (D.O. 600 nm) | | | | % Enlèvement ^a après 50 jours d'incubation |
|--------------------------------|---|------------------|------------------|------------------|---|
| | Jours d'incubation | | | | |
| | 0 | 8 | 16 | 50 | |
| Individuels: | | | | | |
| Fluorène | 100.00 (0.030) | 49.18 (0.036) | 25.55 (0.031) | 0.00 (0.035) | 100 |
| Phénanthrène | 80.00 (0.030) | 0.00 (0.100) | 0.00 (0.079) | 0.00 (N.D.) | 100 |
| Pyrène | 110.00 (0.030) | 93.57 (0.028) | 97.24 (N.D.) | 109.15 (N.D.) | 0 |
| Chrysène | 100.00 (0.030) | 84.38 (0.038) | 77.34 (N.D.) | 92.44 (N.D.) | 0 |
| Combinés: | | | | | |
| Fluorène | 100.00 | 45.42 | 18.72 | 2.21 | 90.6 |
| Phénanthrène | 80.00 | 39.56 | 0.00 | 0.00 | 100 |
| Pyrène | 110.00 | 116.23 | 111.43 | 105.89 | 0 |
| Chrysène | 100.00 | 95.01 | 74.92 | 94.08 | 0 |
| | (0.030) | (0.200) | (0.218) | (0.377) | |
| Contrôle abiotique: | | | | | |
| Fluorène | | 76.25 | 66.52 | 23.49 | |
| Phénanthrène | | 90.15 | 84.69 | 40.02 | |
| Pyrène | | 111.22 | 107.90 | 115.81 | |
| Chrysène | | 85.00 | 63.65 | 98.45 | |

a: calculé pour chacun des temps d'incubation par rapport au contrôle abiotique considéré comme valeur de référence soit 100%.

N.D.: Non déterminé

4.0 OPTIMISATION DE LA BIODÉGRADATION EN MICROCOSMES

Dans les premiers essais, les microcosmes ont été agités quotidiennement à la main pendant 10 secondes. Les résultats obtenus pour ces cultures contenant le milieu BH ont indiqué une dégradation significative seulement pour le fluorène (52%) et le phénanthrène (85%) après 30 jours d'incubation (Tableau 7). L'ajout d'extrait de levures (0.5% (p/v)) au milieu BH a permis d'obtenir un meilleur enlèvement pour le fluorène soit 85%. L'ajout de lisier de porc 1% (v/v) au milieu BH n'a pas permis d'optimiser l'enlèvement des HAPs. Il en a été de même en combinaison avec de l'extrait de levures. L'ajout de salicylate (100 ppm) ou du surfactant Tween 80 (200 ppm) au milieu BH n'a pas démontré d'avantages. Ce dernier a même entraîné un léger ralentissement de l'enlèvement du fluorène et du phénanthrène. Par contre, ce ralentissement n'a pas été observé en présence d'extrait de levures. L'absence d'activité surfactante et émulsifiante après 30 jours d'incubation dans la portion liquide des microcosmes additionnés de Tween 80 indique que ce dernier a été dégradé par la microflore indigène du sol.

Le pH des cultures contenant de l'extrait de levures a augmenté à des valeurs entre 8.0-10.0 tandis qu'une légère acidification (pH 6.0-6.5) a été observée dans les

Tableau 7 : Pourcentages d'enlèvement des quatre HAPs à l'étude dans les microcosmes avec le milieu BH supplémenté ou non après 30 jours d'incubation.

| Milieu ajouté au microcosme | Pourcentages ^a d'enlèvement | | | |
|--------------------------------|---|--------------|--------|----------|
| | Fluorène | Phénanthrène | Pyrène | Chrysène |
| BH | 52 | 85 | 0 | 16 |
| BHSA | 50 | 90 | 0 | 0 |
| BHTW | 37 | 64 | 0 | 17 |
| BHLIS-1 | 67 | 69 | 0 | 0 |
| BHEL.5 | 85 | 95 | 7 | 18 |
| BHLISEL.5 | 91 | 95 | 0 | 10 |
| BHTWEL.5 | 92 | 92 | 0 | 20 |

a: Calculé pour chacun des temps d'incubation par rapport au contrôle abiotique considéré comme valeur de référence soit 100%.

N.D. : Non déterminé

microcosmes contenant seulement le milieu BH (surtout pour les sept premiers jours). Le pH a donc été ajusté manuellement avec du HCl 1 N ou du NaOH 0.5 N plusieurs fois par jour.

Dans les nouveaux essais, les microcosmes ont été incubés pendant 60 jours et agités quotidiennement à 300 rpm pendant 5 minutes afin que l'oxygène ne soit pas un facteur limitant pour la croissance des microorganismes. Sous ces conditions, le pourcentage d'enlèvement du fluorène et du phénanthrène en présence de milieu BH a été de près de 100% après 30 jours d'incubation (Figure 18). Cependant, l'addition d'extrait de levures a entraîné dans ce cas le ralentissement de cet enlèvement. En effet, plus la concentration de ce supplément a été importante plus le ralentissement a été marqué. Par contre, ce ralentissement a été beaucoup moins prononcé dans le cas du phénanthrène (Figure 18B). Après 60 jours d'incubation, toutes ces cultures étaient semblables entre elles puisque la presque totalité du fluorène et du phénanthrène était enlevée.

Le pyrène, quant à lui, a été enlevé à 63% par la microflore indigène du sol en milieu BH après 60 jours d'incubation (Tableau 8). L'addition d'extrait de levures a entraîné un ralentissement (0.1 ou 0.25% (p/v)) et même

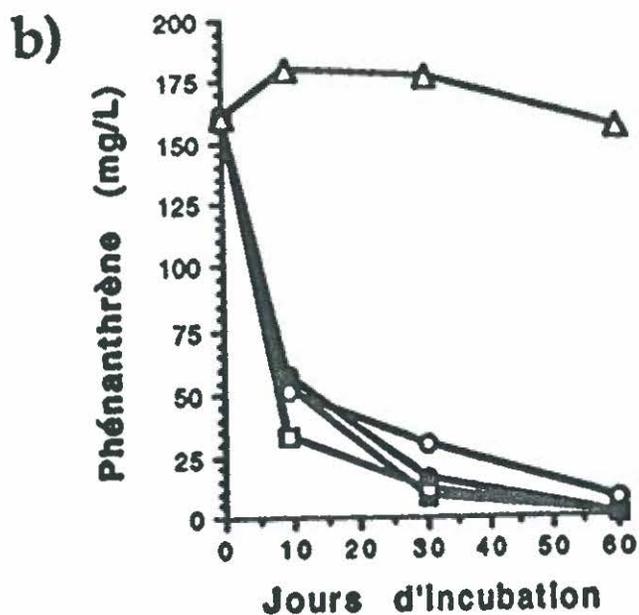
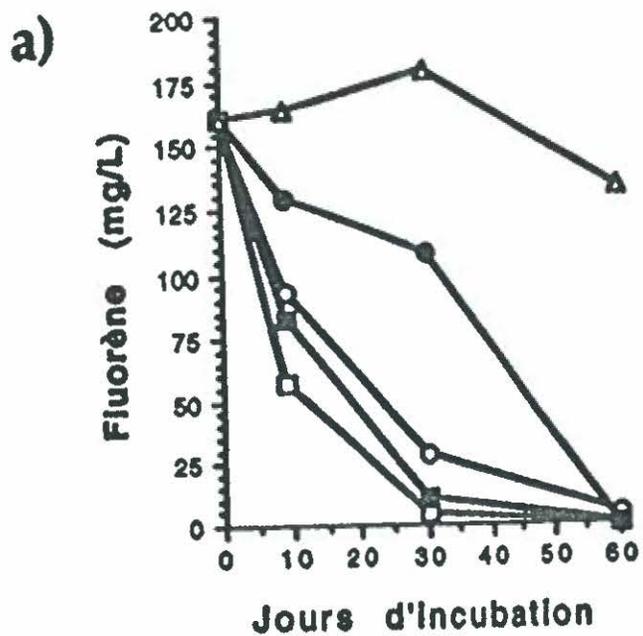


Figure 18.

Cinétique d'enlèvement en microcosmes du fluorène (a) et du phénanthrène (b), sous agitation à 300 rpm une fois par jour. BH (□); BHEL.1 (●); BHEL.25 (○); BHEL.5 (■); Contrôle abiotique (△).

Tableau 8 : Pourcentages d'enlèvement du pyrène et du chrysène en milieu BH supplémenté ou non de différentes concentrations d'extrait de levures après 60 jours d'incubation.

| Milieu ajouté au microcosme | Pourcentages ^a d'enlèvement | |
|-----------------------------|--|----------|
| | Pyrène | Chrysène |
| BH | 63 | 33 |
| BHEL.1 | 41 | N.D. |
| BHEL.25 | 37 | 0 |
| BHEL.5 | 0 | 13 |

a: calculé pour chacun des temps d'incubation par rapport au contrôle abiotique considéré comme valeur de référence soit 100%.

N.D.: Non déterminé

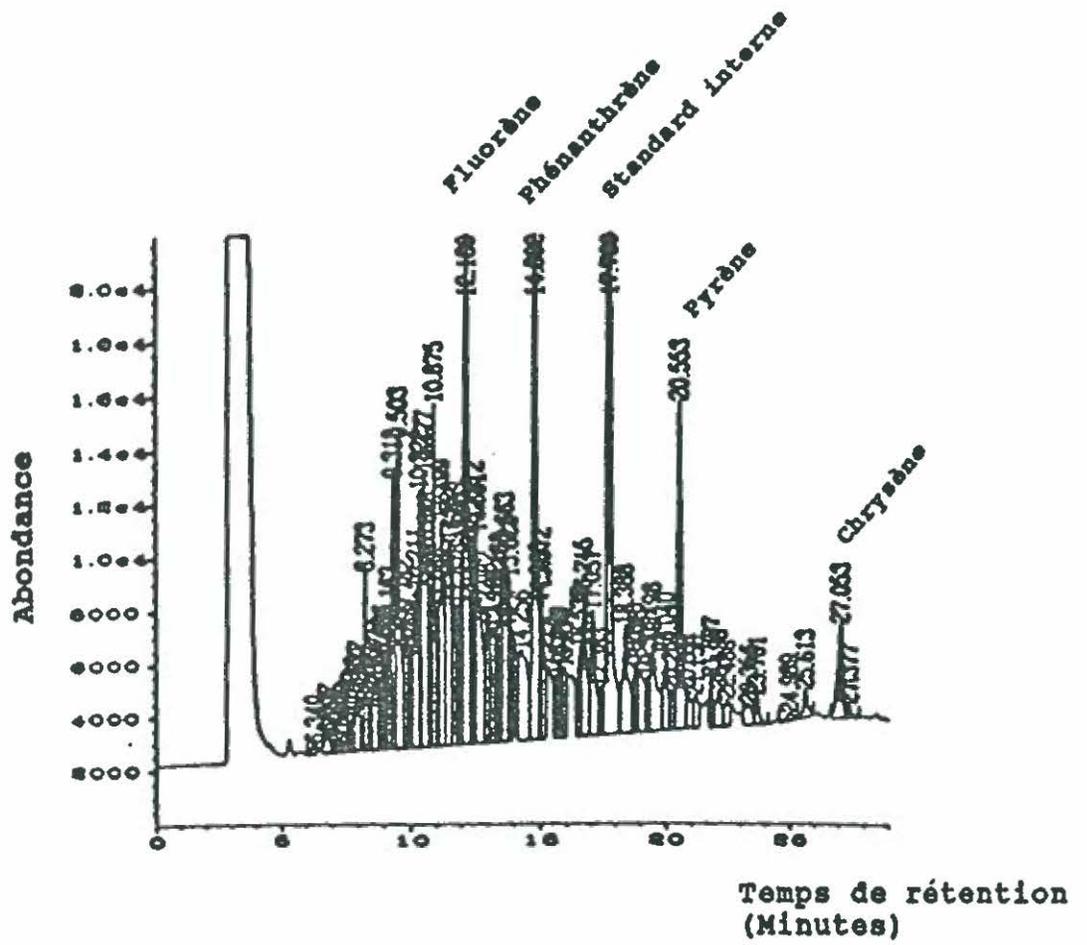
un arrêt (0.5% (p/v)) de l'enlèvement de ce HAP. Le chrysène a été enlevé de façon significative (33%) en milieu BH après 60 jours d'incubation (Tableau 8). Par contre, il n'y a eu aucune dégradation significative du chrysène en présence d'extrait de levures.

La Figure 19 présente une partie de ces résultats d'une autre façon, soit à l'aide des chromatogrammes obtenus à partir de l'injection de l'éther d'extraction récupéré au temps zéro et après 60 jours d'incubation pour les microcosmes contenant le milieu BH. Une réduction importante de l'ensemble des hydrocarbures déjà présents dans le sol de la sablière Thouin au départ (alcanes, HAM et HAP) ainsi que de trois des quatre HAPs ajoutés a été obtenue après 60 jours d'incubation.

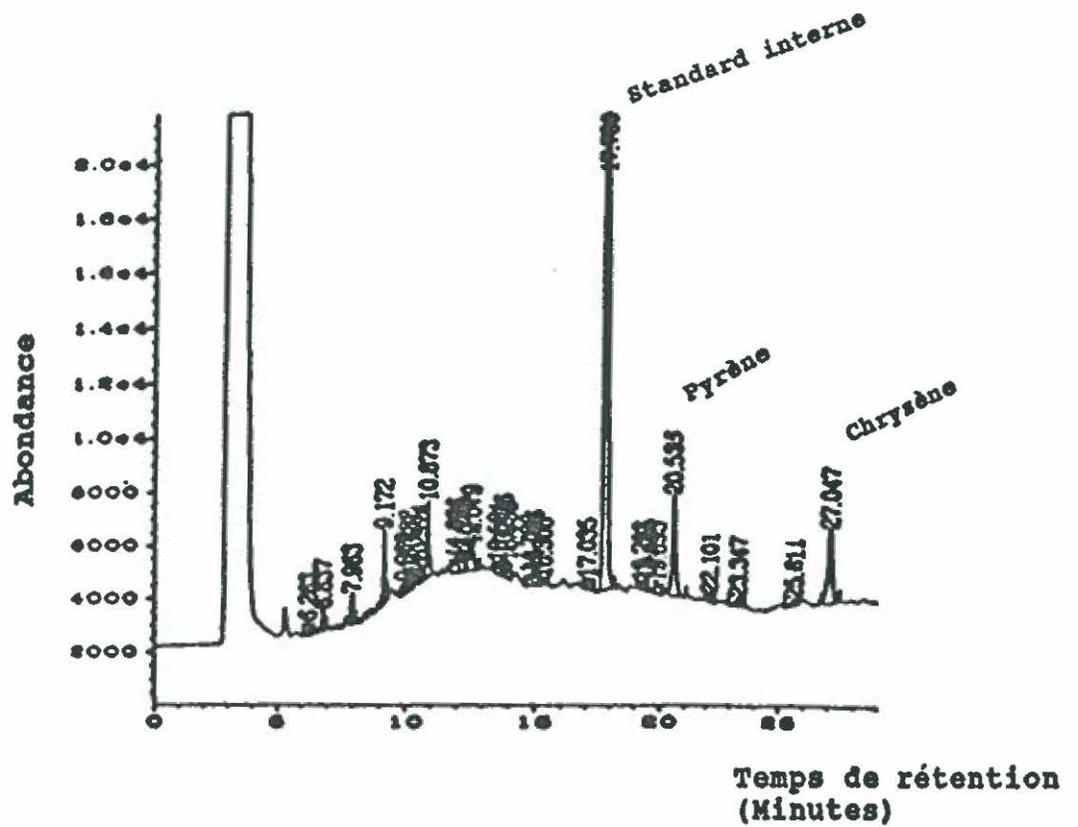
Différents modes d'agitation ont été comparés dans une même expérience en utilisant des microcosmes en milieu BH. Une accélération de l'enlèvement du fluorène et du phénanthrène a été observée sous une agitation de 300 rpm pendant 5 minutes quatre fois par jour comparativement à une agitation manuelle de 10 secondes une fois par jour (Figure 20). Cependant, après 60 jours d'incubation de ces cultures, ces deux HAPs ont été presque complètement enlevés quel que soit l'agitation utilisée. Une

Figure 19. Chromatogrammes obtenus en chromatographie en phase gazeuse à partir de l'éther d'extraction de microcosmes en milieu BH après zéro (a) et 60 jours (b) d'incubation.

a)



b)



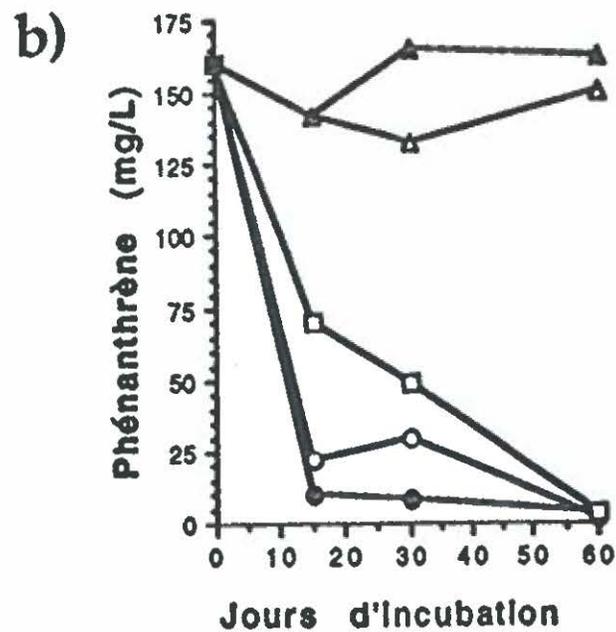
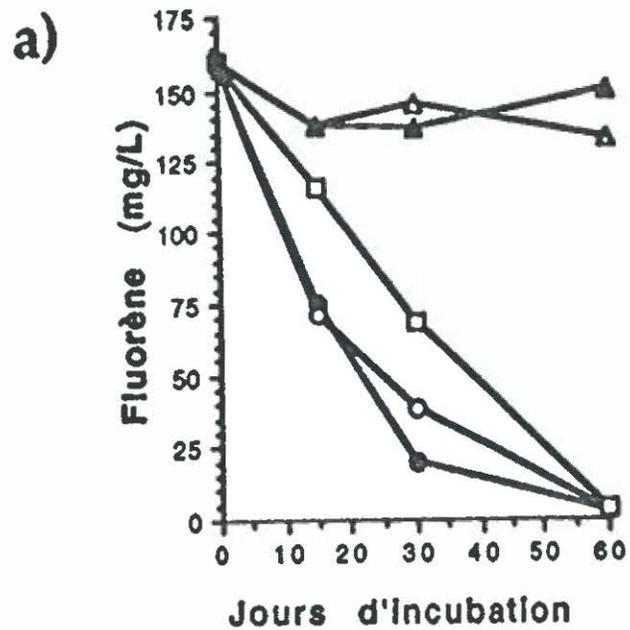


Figure 20.

Cinétique d'enlèvement en microcosmes du fluorène (a) et du phénanthrène (b), sous agitation à 300 rpm quatre fois par jour (sauf indications contraires). BH (●); BH agité à la main une fois par jour (□); BHVITMIN (○); Contrôle abiotique (△); Contrôle abiotique agité à la main une fois par jour (▲).

accélération de l'enlèvement a aussi été obtenue pour le pyrène et le chrysène (Figure 21). L'addition de vitamines et de minéraux au milieu BH dans les microcosmes les plus agités n'a pas présenté un avantage significatif au niveau de l'enlèvement des différents HAPs.

La substitution du milieu BH par de l'eau distillée dans des microcosmes agités à 300 rpm pendant 5 minutes quatre fois par jour n'a pas entraîné de différences significatives de l'enlèvement du fluorène et du phénanthrène après 60 jours d'incubation (Figure 22). Par contre, dans le cas du pyrène, ceci a eu pour effet d'empêcher ou de ralentir considérablement son enlèvement (Figure 23). Le chrysène, pour sa part, n'a pas été enlevé de façon significative dans l'un ou l'autre de ces microcosmes (résultats non présentés). De plus, dans les microcosmes où la quantité de liquide a été réduite de 27 à 12 mL sans toutefois modifier la concentration des éléments constituant le milieu BH dans ces cultures, aucun enlèvement significatif des HAPs n'a été observé après 60 jours d'incubation (Figures 22 et 23).

La population bactérienne totale et celle dégradant potentiellement le phénanthrène a été suivie en microcosmes contenant le milieu BH supplémenté d'extrait de levures à

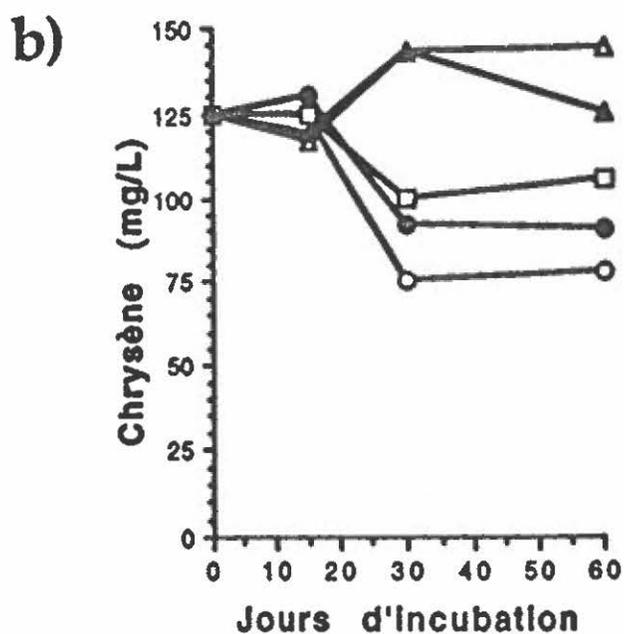
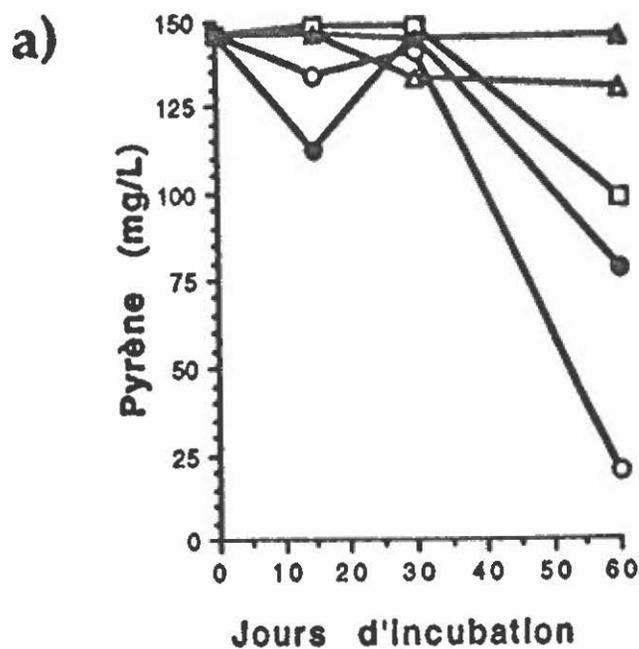


Figure 21.

Cinétique d'enlèvement en microcosmes du pyrène (a) et du chrysène (b), sous agitation à 300 rpm quatre fois par jour (sauf indications contraires). BH (○); BH agité à la main une fois par jour (□); BHVITMIN (●); Contrôle abiotique (▲); Contrôle abiotique agité à la main une fois par jour (△).

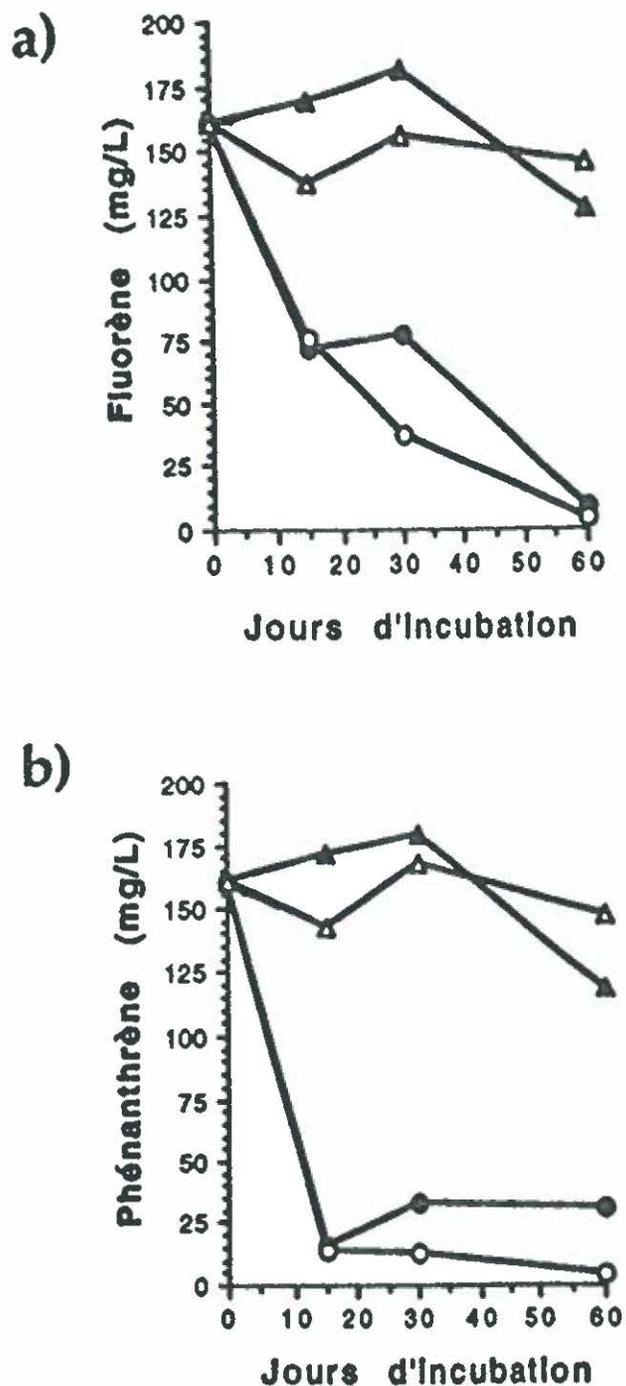


Figure 22.

Cinétique d'enlèvement en microcosmes du fluorène (a) et du phénanthrène (b), sous agitation à 300 rpm quatre fois par jour. 27 mL de milieu BH (○); 27 mL H₂O (●); 12 mL milieu BH concentré (▲); Contrôlé abiotique (△).

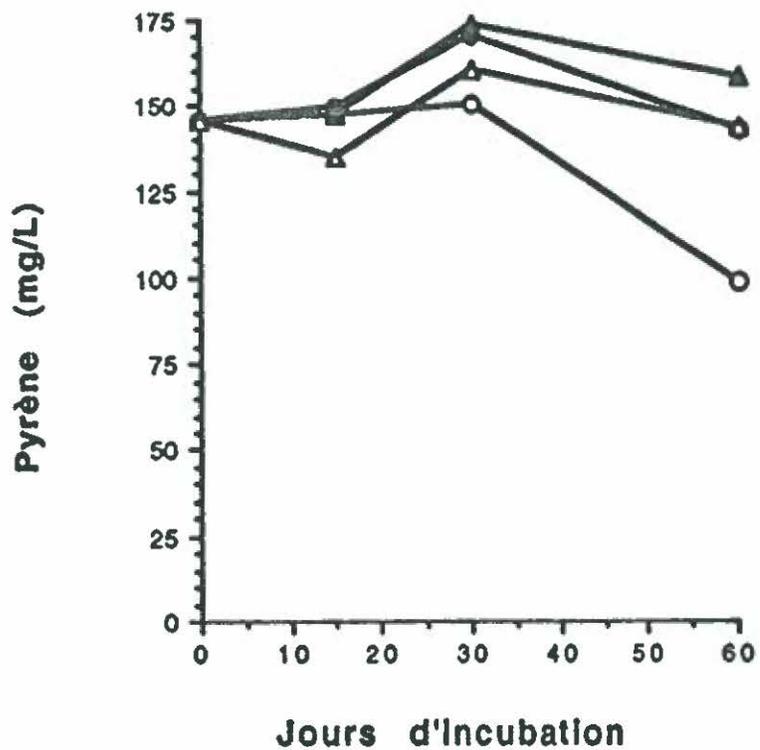


Figure 23. Cinétique d'enlèvement en microcosmes du pyrène sous agitation à 300 rpm quatre fois par jour. 27 mL de milieu BH (○); 27 mL H₂O (△); 12 mL de milieu BH concentré (●); Contrôle abiotique (▲).

0.5% (p/v) et agités à 300 rpm pendant 5 minutes une ou quatre fois par jour, comme dans la Figure 24. La dégradation du phénanthrène ainsi que la concentration de bactéries sont représentées dans la Figure 24. Plus de 90% du phénanthrène a été enlevé après 30 jours d'incubation. Pendant ce temps, la population bactérienne totale est passée de 4.5×10^5 à 1.5×10^7 UFC/g. La population bactérienne formant un halo en présence de phénanthrène a été évaluée au départ à 8.5×10^4 UFC/g soit 19% de la population totale et a augmenté à 6.0×10^6 UFC/g soit 40% de la population totale après 30 jours d'incubation. De plus, dans cette expérience, le fluorène a été enlevé à plus de 75% tandis que le pyrène et le chrysène n'ont pas été dégradés de façon significative après 30 jours d'incubation (résultats non présentés).

Dans une autre expérience, l'amidon (0.5% (p/v)) a remplacé l'extrait de levures. Le pH de ces microcosmes s'est acidifié mais n'a pas été ajusté afin de favoriser la croissance des champignons. Des pourcentages d'enlèvement de 90% du fluorène et du phénanthrène après 60 jours d'incubation ont été obtenus dans ces cultures (résultats non présentés). Toutefois, le pyrène et le chrysène n'ont pas été dégradés de façon significative sous ces conditions (résultats non présentés).

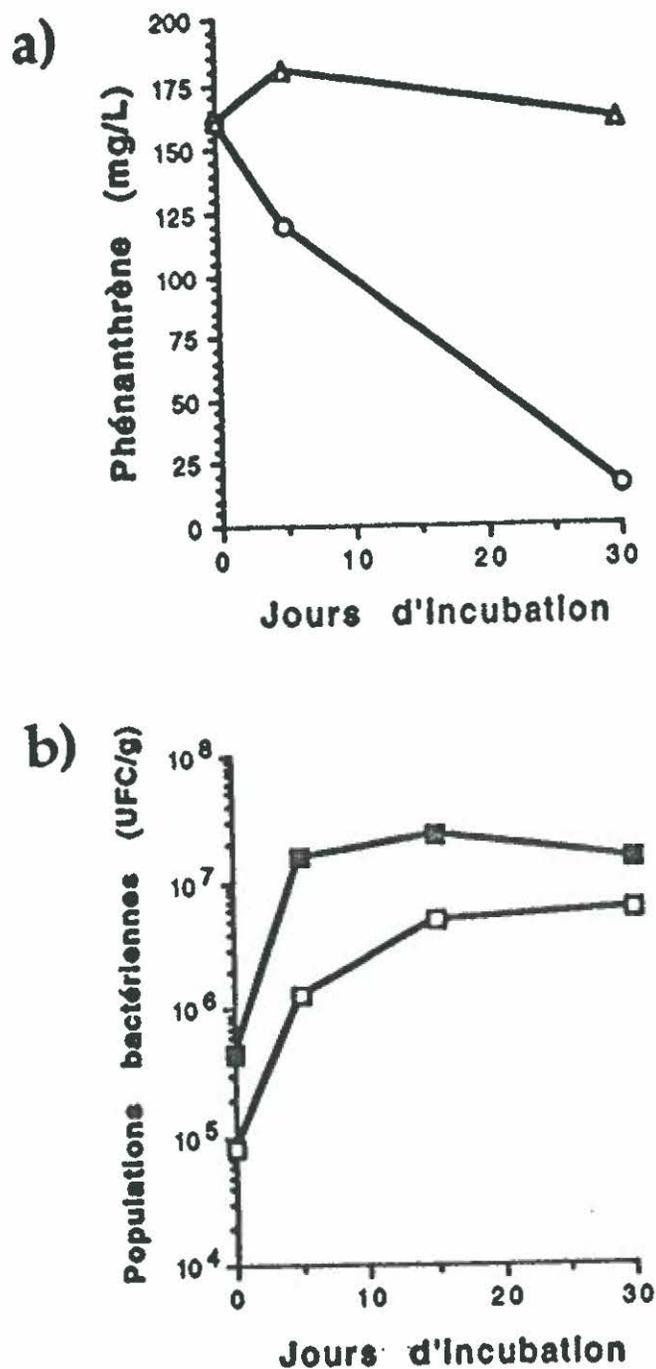


Figure 24.

Cinétique d'enlèvement en microcosmes du phénanthrène (a) et courbe de croissance de la population bactérienne totale et celle dégradant potentiellement le phénanthrène (b) en milieu BHEL.5 sous agitation à 300 rpm quatre fois par jour. BHEL.5 (-○-); Contrôle abiotique (-△-); Population bactérienne totale (-■-); Population bactérienne dégradant le phénanthrène (-□-).

La souche *Alcaligenes* sp. a aussi été réinoculée dans des microcosmes contenant le milieu BH et agités à 300 rpm pendant 5 minutes une fois par jour (résultats non présentés). Aucune amélioration de l'enlèvement des HAPs n'a été observée pour une période d'incubation de 60 jours, par rapport aux résultats obtenus en microcosmes non inoculés de cette bactérie.

5.0 MINÉRALISATION

5.1 Fluorène

Les microcosmes contenant du milieu BH supplémenté de 0.5% (p/v) d'extrait de levures et ayant reçu du fluorène marqué au carbone 14 ont montré une production de CO₂ marqué tel que suggéré par l'augmentation des cpm de 685 à 27 000 dans la solution de KOH ayant servi de trappe à CO₂ après 45 jours d'incubation (Figure 25A). Les microcosmes abiotiques, pour leur part, n'ont produit qu'une très faible augmentation des cpm. Durant cette période d'incubation, le fluorène a été enlevé graduellement dans les microcosmes n'ayant pas reçu de produit radioactif et qui ont servi de contrôles de la dégradation.

5.2 Phénanthrène

Les résultats obtenus à l'aide de microcosmes contenant du [9-¹⁴C] phénanthrène indiquent une production

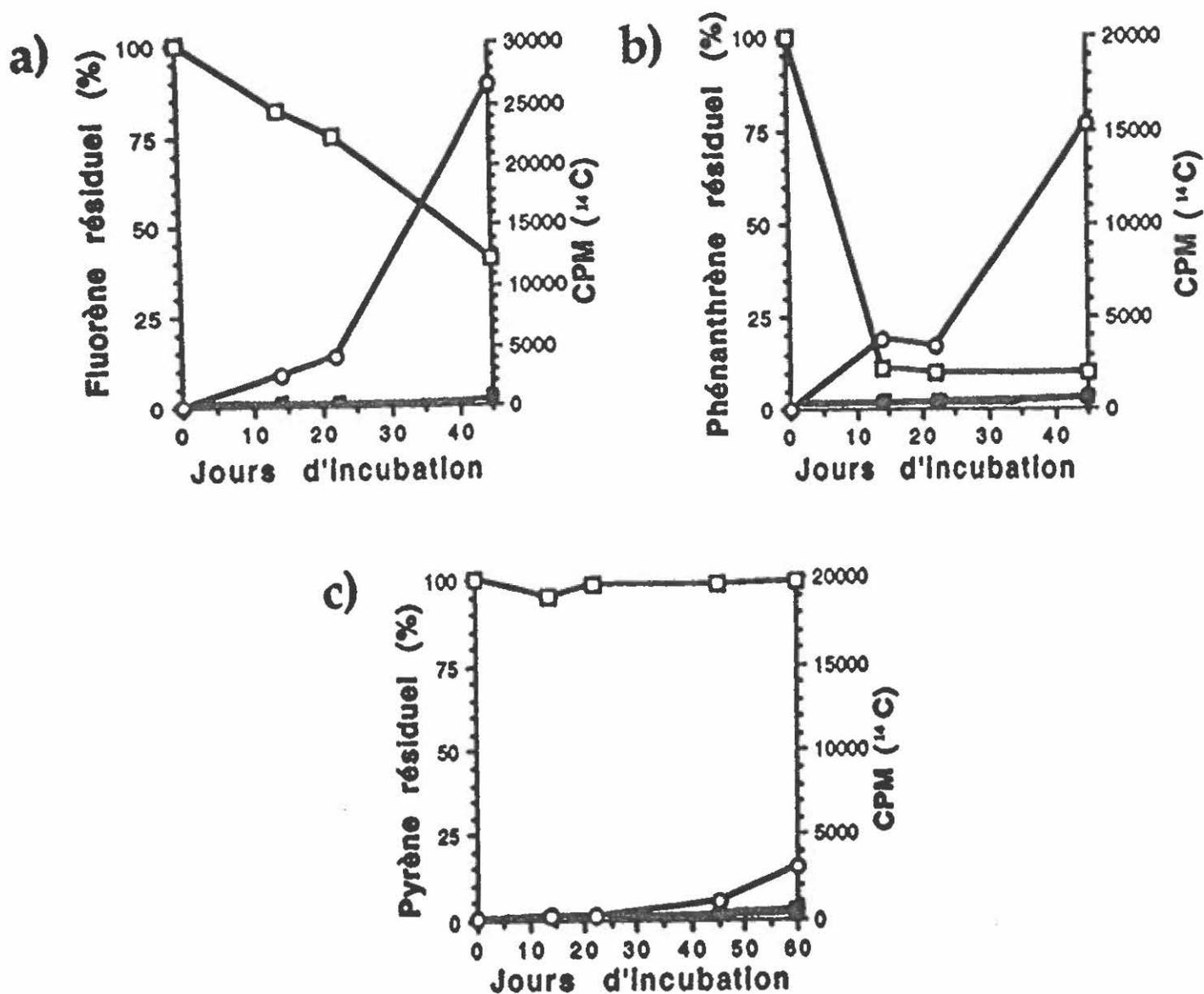


Figure 25.

Production de CO₂ marqué (¹⁴C) et pourcentage résiduel du fluorène (a), du phénanthrène (b) et du pyrène (c), en microcosmes contenant le milieu BHEL.5. ¹⁴C-CPM microcosme (-○-); ¹⁴C-CPM contrôle abiotique (-■-); Pourcentage HAP résiduel (-□-).

de CO₂ marqué équivalente à 15 500 cpm après 45 jours d'incubation (Figure 25B). L'enlèvement de ce HAP a quant à lui atteint un maximum de 90% après 14 jours d'incubation seulement.

5.3 Pyrène

Dans les microcosmes contenant du pyrène marqué, la production de CO₂ marqué a été évaluée à 3 000 cpm soit 2 000 de plus que le contrôle abiotique après 60 jours d'incubation (Figure 25C). Cependant, aucun enlèvement significatif de ce HAP n'a pu être observé, après extraction à l'éther, dans ces microcosmes.

DISCUSSION

1. CARACTÉRISTIQUES DU SOL

Tout comme Chakrabarty (1976) l'a déjà démontré pour des sols contaminés avec de fortes concentrations d'HAPs (source de carbone potentielle), le rapport C:N du lot de sol provenant de la sablière Thouin est très élevé avec une valeur de 100:2. Leahy et Colwell (1990) ainsi que Dibble et Bartha (1979) ont démontré que l'ajout d'azote organique ou inorganique permet de stimuler la biodégradation. Cependant, le rapport C:N optimal pour la dégradation des HAPs varie d'un auteur à l'autre, la moyenne s'établissant autour de 120:10 (Zhou et Crawford, 1995; Wilson et Jones, 1993; Manilal et Alexander, 1991; Dibble et Bartha, 1979). Nous avons donc choisi d'ajuster le sol à un rapport C:N de 100:10 avant tout amendement. Dans le sol, la concentration de phosphore trop élevée par rapport au carbone nous a empêché d'ajuster cet élément. A notre connaissance, aucun auteur n'a étudié de sols contaminés contenant du phosphore en trop grande quantité.

Le sol de la sablière Thouin contient environ 5% d'humidité. Le faible pourcentage d'humidité du sol limite souvent les échanges entre les microorganismes indigènes et les contaminants peu hydrosolubles tels que les HAPs (Providenti et al., 1993). Un minimum de 30% de saturation en eau est nécessaire pour un taux de dégradation optimal (Cooney, 1984).

L'humidité du sol a donc dû être augmentée afin d'optimiser la dégradation des HAPs. La concentration d'huiles et graisses du lot de sol utilisé était de 7786 ppm ce qui correspond à une valeur au-dessus du critère C du MEF. La concentration d'hydrocarbures (alcanes, HAM et HAP), particulièrement des HAPs, correspondait aussi à des valeurs supérieures à la concentration maximale pour le critère C du MEF.

Le pH du sol de la sablière Thouin a été évalué à 6.98. Selon Morgan et Watkinson (1989), un pH près de la neutralité favorise la croissance des bactéries au détriment des champignons. D'ailleurs, nous avons observé la présence d'une concentration élevée de bactéries dans le sol, soit 8.6×10^6 UFC/g. Des concentrations semblables ont aussi été obtenues dans des sols contaminés par des hydrocarbures selon Kerry (1993) ainsi que Morgan et Watkinson (1989). Oudot et al. (1987) ont démontré qu'entre 5 et 50% des bactéries totales pouvaient dégrader les hydrocarbures dans un sol contaminé par des résidus pétroliers. Pour notre part, la population bactérienne dégradant potentiellement les HAPs (fluorène et phénanthrène) représentait de 1 à 3% de la population totale du sol de la sablière Thouin. Le faible pourcentage obtenu dépend probablement des conditions du sol (Oudot et al., 1987). Il est donc évident que la population bactérienne dégradant les HAPs

du sol est minoritaire et qu'une stimulation de celle-ci conduirait à une augmentation de la biodégradation des HAPs, résultant de l'enrichissement d'une certaine population spécifique (Tabak et al., 1991; Leahy et Colwell, 1990; Spain et al., 1980).

2. OPTIMISATION DE LA BIODÉGRADATION DES HAPs

Comme le mentionnent Corseuil et Weber (1994), le temps nécessaire afin que la population microbienne capable de dégrader les HAPs soit assez élevée pour être efficace, peut être long. Il est donc essentiel d'optimiser les paramètres influençant la biodégradation des HAPs par la microflore indigène du sol afin d'obtenir un biotraitement efficace.

Etant donné que les pourcentages de dégradation ont été évalués par rapport aux contrôles abiotiques, il est important que ces derniers soient le plus stable possible. Dans les cas où des pertes, parfois importantes, ont été observées pendant les incubations des contrôles en milieux liquides et en microcosmes sol, la volatilisation des HAPs semblerait en être la cause principale. En effet, l'enlèvement des HAPs dans les cultures biotiques ne peut probablement pas être attribué à l'adsorption de ces hydrocarbures au verre ou aux particules de sol car l'éther d'extraction a été ajouté directement dans

l'erlenmeyer. Ceci implique que tous les HAPs, où qu'ils soient, ont été solubilisés. Les variations qui ont parfois été observées peuvent être causées par le fait qu'un erlenmeyer différent a dû être sacrifié à chaque temps puisque le contenu entier a été extrait. De plus, la formation d'émulsion, lors de l'extraction des cultures, a causé des problèmes de récupération de l'éther contenant les HAPs résiduels. Un autre point pouvant entraîner des variations est l'ajustement du pH. En effet, le pH des cultures a été contrôlé manuellement ce qui a provoqué des changements brusques du pH, et ce de façon fréquente. Erickson et al. (1993) ont fait mention qu'une baisse du pH pourrait causer une perte ou une inhibition des bactéries capables de dégrader les HAPs. De plus, des valeurs de pH entre 7.0 et 7.5 ont été rapportées par Weissenfels et al. (1990) ainsi que Casarini et al. (1988) comme étant optimales pour l'enlèvement des HAPs. Finalement, le pourcentage d'erreurs relié à la technique d'extraction et au GC-FID a été estimé à 20% ce qui indique qu'un pourcentage d'enlèvement des HAPs inférieur à cette valeur n'est pas significatif. Il faut donc tenir compte de l'allure de la courbe d'enlèvement dans son ensemble en plus de la valeur du pourcentage d'enlèvement afin de bien interpréter les résultats.

2.1 Milieux liquides

2.1.1 HAPs légers

2.1.1.1 Erlenmeyers de 500 mL

Il a été démontré que la microflore indigène du sol est capable d'enlever des HAPs légers, tels que le fluorène et le phénanthrène, dans un milieu minéral minimal (BH) liquide ne contenant pas de sol. A notre connaissance, aucune publication ne mentionne l'utilisation de l'ensemble de la microflore indigène en milieux liquides afin de dégrader un mélange d'HAPs. Il nous est donc difficile de comparer ces résultats avec d'autres études. Les autres auteurs ont plutôt utilisé des cultures pures et le plus souvent en présence d'un seul HAP.

Comme l'ont démontré Lehtomaki et Niemela (1975) ainsi que Griffol et al. (1992), l'ajout d'extrait de levures en milieu liquide a permis d'obtenir un enlèvement plus rapide des HAPs. Par contre, Dibble et Bartha (1979) ainsi que Morgan et Watkinson (1989) ont noté une utilisation préférentielle de la source de carbone la plus assimilable, ce qui a causé une diminution du taux de dégradation des hydrocarbures en sol. L'enlèvement plus rapide peut s'expliquer par le fait que l'ajout d'extrait de levures a stimulé la croissance des bactéries, dont celles dégradant le phénanthrène. En effet, la concentration maximale de bactéries totales, en milieu BH

supplémenté d'extrait de levures, a été supérieure d'un facteur de 20 par rapport à celle retrouvée en milieu BH non supplémenté. De même, la population pouvant potentiellement dégrader le phénanthrène représentait 90% de la population totale en milieu BH supplémenté d'extrait de levures comparativement à 66% en milieu BH. A en juger par l'apparence des colonies, il y a eu sélection de certaines bactéries durant l'incubation dans l'un et l'autre des milieux. Nous avons donc obtenu deux enrichissements différents mais qui ont tout de même conduit à l'enlèvement complet des HAPs.

Les milieux BH supplémentés de protéose peptone, d'amidon ou de combinaisons de protéose peptone, d'extrait de levures et d'amidon à 0.5% (p/v) chacun, n'ont pas démontré d'avantages. Des résultats contraires ont été obtenus par Ijah et Ukpe (1992) qui ont démontré que des souches de *Bacillus* dégradent l'huile brute à un taux maximal en présence de 0.7% (p/v) d'extrait de levures et de peptone en plus de 0.14% (p/v) d'urée. A notre connaissance, aucun auteur ne mentionne l'ajout d'amidon afin d'optimiser la dégradation des HAPs. L'ajout de vitamines et de minéraux au milieu BH supplémenté de 0.5% (p/v) d'extrait de levures n'a pas permis d'optimiser l'enlèvement, probablement parce que ce milieu supplémenté contient déjà plusieurs vitamines et minéraux en quantité suffisante.

Weissenfiels et al. (1990) ont démontré que l'ajout de cobalamine (vitamine B₁₂) à un milieu minimal permettait d'optimiser la dégradation du fluorène par une souche de *Pseudomonas*.

2.1.1.2 Erlenmeyers de 250 mL

Les changements qui se sont avérés nécessaires lorsque nous avons effectué des cultures en erlenmeyers de 250 au lieu de 500 mL, ont entraîné une perte d'activité de la microflore indigène en milieu BH. Cette perte a probablement été causée parce que les conditions n'étaient plus optimales pour les microorganismes. D'ailleurs, le suivi de la population bactérienne totale de ces cultures indique que celle-ci a atteint une concentration plus faible sous ces nouvelles conditions. Par contre, l'ajout d'extrait de levures a permis de stimuler la croissance bactérienne et de minimiser l'influence négative des nouvelles conditions.

Par la suite, nous avons tenté de réduire la concentration d'extrait de levures à 0.1% (p/v) en milieu BH afin de limiter les variations de pH et de minimiser les coûts d'un éventuel biotraitement. Cependant, le fluorène et le phénanthrène n'ont été que faiblement dégradés sous ces conditions. C'est donc dire que la concentration d'extrait de levures se doit d'être

supérieure à 0.1% (p/v). D'ailleurs, Trzesicka-Mlynarz et Ward (1995) ont réussi à augmenter la dégradation du fluoranthène en milieu liquide par un mélange de bactéries provenant d'un sol contaminé en utilisant une faible concentration d'extrait de levures soit 0.1% (p/v) en combinaison avec du glucose et du protéose peptone à 0.1% (p/v) chacun.

La faible solubilité des HAPs dans l'eau est un facteur limitant leur dégradation par les microorganismes. Les surfactants peuvent augmenter la quantité d'HAPs dans la phase aqueuse et, par le fait même, favoriser leur biodisponibilité (Singleton, 1994). Ainsi, il nous a été possible d'optimiser l'enlèvement des HAPs en ajoutant le surfactant synthétique Tween 80 au milieu BH contenant 0.1% (p/v) d'extrait de levures. Guerin et Jones (1988) ont obtenu une augmentation de la biodégradation du phénanthrène par une souche de *Mycobacterium* sp. avec l'ajout de Tween. Gray et al. (1994) ont aussi démontré que l'ajout de Tween 80 à une concentration de 0.1% (v/v) augmentait la solubilisation de l'anthracène en milieu liquide. Janiyani et al. (1993) ont obtenu des résultats semblables pour la dégradation d'hydrocarbures provenant de boues pétrolières. Cependant, des résultats contraires ont été obtenus par Laha et Luthy (1992;1991) qui ont démontré que le Tween pouvait être toxique à des concentrations supérieures à

la CMC. De plus, Sundaram et al. (1994) ont démontré que les surfactants synthétiques comme le Tween 80 peuvent être utilisés comme source de carbone par les microorganismes et ainsi nuire à la dégradation des HAPs. Il y a donc plusieurs différences entre les résultats rapportés dans ces études sur les surfactants.

Comme Wang et al. (1990), nous avons optimisé la dégradation des HAPs en ajoutant un mélange d'alcane au milieu de culture. Les alcanes sont reconnus comme des composés plus facilement dégradables par les microorganismes que les HAPs (Brown, 1987). Etant donné que nous n'avons pas évalué la microflore bactérienne dans cette expérience, il nous est impossible de confirmer que la croissance bactérienne a été stimulée par cette source de carbone. Par contre, la microflore indigène de la sablière Thouin est vraisemblablement déjà adaptée à ces composés étant donné que ce sol contient plusieurs alcanes.

Le lisier de porc a aussi été utilisé comme supplément dans cette étude, car nous aurions pu valoriser ce résidu de l'industrie porcine Québécoise. Les contrôles contenant seulement le lisier de porc sans l'inoculum de la sablière Thouin n'ont démontré aucune dégradation significative des HAPs

indiquant que la microflore contenue dans le lisier n'a pas contribué à l'enlèvement des HAPs. Ceci suggère que l'optimisation de l'enlèvement des HAPs que nous avons observée en présence de 1% (v/v) de lisier de porc serait attribuable à la matière organique ou à l'azote qu'il contient. A notre connaissance, aucune publication ne mentionne l'utilisation de lisier de porc dans le but d'optimiser la dégradation des HAPs.

L'importance de la concentration des microorganismes dans l'inoculum a aussi été démontrée, car les résultats obtenus ont indiqué un certain ralentissement de l'enlèvement des HAPs avec un inoculum de faible concentration, soit 10^3 UFC/mL. Par contre, l'utilisation d'une concentration plus élevée, comme 10^6 UFC/mL, n'a pas permis d'accélérer l'enlèvement des HAPs légers comparativement aux résultats obtenus avec l'inoculum habituel de 10^4 UFC/mL. Cullen *et al.* (1994) ont aussi démontré que le taux de dégradation du phénanthrène est dépendant de la concentration de microorganismes utilisée. Ces auteurs ont été capables de réduire de moitié le temps nécessaire à une culture mixte en milieu liquide pour dégrader ce HAP en augmentant par un facteur de 10 la concentration d'inoculum. Cet inoculum plus concentré a aussi permis de réduire le temps de latence nécessaire avant d'obtenir une dégradation significative du phénanthrène.

De façon similaire, l'expérience utilisant une méthode modifiée de préparation de l'inoculum, c'est-à-dire préparé à partir d'une plus grande quantité de sol et agité plus longtemps, a indiqué que la qualité de l'inoculum pouvait à elle seule déterminer la réussite ou l'échec de l'enlèvement des HAPs. En effet, l'utilisation de cette nouvelle méthode de préparation de l'inoculum a permis un enlèvement du fluorène et du phénanthrène en milieu BH, comparable à celui obtenu avec le même milieu en erlenmeyers de 500 mL. Étant donné que, pour l'ancienne méthode de préparation de l'inoculum, seulement 1 gramme de sol a été utilisé afin de récupérer les microorganismes, il est probable que cette petite quantité n'était pas très représentative de l'ensemble du lot de sol de la sablière Thouin. Aussi, un plus grand nombre de particules de densité semblable à celle des microorganismes et pouvant servir de sources de carbones, se sont peut-être retrouvées dans le nouveau type d'inoculum, amplifiant du même coup les différences observées. Une étude effectuée par Holm et al. (1992) portant sur la dégradation du naphtalène dans un aquifer (eau et sédiments) a démontré que la majeure partie des microorganismes restaient attachés aux particules sédimentaires, conduisant à un plus faible potentiel de dégradation dans la partie liquide sans sédiment. Ainsi, ces auteurs ont conclu que les particules sédimentaires sont

nécessaire afin d'obtenir un nombre plus élevé de microorganismes et des résultats plus stables concernant la dégradation des HAPs. Il est aussi possible que les microorganismes contenus dans l'inoculum préparé selon cette nouvelle méthode soient plus diversifiés, étant donné l'augmentation du temps d'agitation. Toutefois, nous n'avons pu tirer de conclusions quant à l'influence de la diversité des microorganismes sur l'efficacité d'enlèvement des HAPs, étant donné que nous n'avons pas identifié les bactéries présentes dans chacune de ces cultures.

2.1.2 HAPs LOURDS

Contrairement aux résultats positifs obtenus pour les HAPs légers, l'enlèvement des HAPs lourds n'a pas été observé en milieu BH et ce même en présence des différents suppléments, autant pour les cultures effectuées en erlenmeyers de 500 mL que de 250 mL. Il est possible que la prolongation de l'incubation permettrait d'observer une dégradation significative des HAPs, comme l'a mentionné Cerniglia (1992), étant donné que la demi-vie des HAPs lourds en sol est longue (la demi-vie du pyrène est de 34 à 90 semaines). Cette hypothèse est supportée par le fait qu'une dégradation significative du pyrène (46%) après seulement 30 jours d'incubation en milieu BH supplémenté de 0.5% (p/v) d'extrait

de levures, a été obtenue dans les cultures ayant été inoculées avec une concentration de bactéries totales cent fois plus élevées soit 10^6 UFC/mL. Cette procédure a permis une dégradation rapide de ce HAP lourd probablement parce qu'elle a réduit le temps de latence nécessaire afin d'obtenir une concentration élevée de microorganismes (Cullen et al., 1994).

Un autre point intéressant est que le pyrène, dans la culture précédente, a commencé à être enlevé seulement après l'enlèvement de la majorité du fluorène et du phénanthrène. Étant donné que le pyrène est plus difficilement dégradable que les HAPs légers, ceci suggère que les microorganismes utilisent ces derniers de façon préférentielle. Cerniglia (1992) a déjà démontré que le taux de dégradation des HAPs est inversement proportionnel au nombre de noyaux aromatiques. Malheureusement, peu d'informations existent sur l'effet de la biodégradation d'un HAP sur un autre comme c'est souvent le cas dans les sols contaminés (Tiehm et Fritzsche, 1995).

Les seules cultures liquides ayant démontré l'enlèvement significatif du chrysène sont celles ne contenant que l'amidon à 0.5% (p/v) comme supplément et où la croissance de champignons a été favorisée. La transparence de notre milieu suggérait que la croissance bactérienne était presque

inexistante dans ces cultures. Des prélèvements de ces cultures ont quand même démontré la présence de quelques colonies bactériennes sur milieu solide BH 0.025 en plus de champignons. La croissance des bactéries dans ces cultures a été défavorisée puisque le pH est descendu à près de 3.0 suite à la métabolisation de l'amidon.

Bien que notre étude soit centralisée sur les bactéries, les champignons semblent de plus en plus étudiés pour leur capacité de dégradation des HAPs (Barr et Aust, 1994; Dagley, 1981). Étant donné que notre champignon semblait intéressant, nous l'avons isolé sur milieu solide, en absence de chrysène. L'inoculation de milieux liquides avec ce champignon purifié n'a pas démontré de dégradation significative du chrysène, ni des trois autres HAPs à l'étude. Kiyohara et al. (1982) ont obtenus des résultats semblables quant à la perte de la capacité de dégradation. En effet, ils ont observé la disparition du phénotype Phn⁺ (phénanthrène positif) après plusieurs repiquages en milieu liquide en présence ou en absence du HAP. La perte du phénotype Phn⁺ a aussi été observée par Guerin et Jones (1988) dans des cultures liquides en absence de HAPs. Il aurait été préférable de faire croître le champignon continuellement en présence du chrysène, lors des étapes de purification. Une autre hypothèse serait que ce

champignon est incapable de dégrader les HAPs en culture pure et nécessiterait donc la présence d'autres microorganismes. A notre connaissance, aucun champignon n'a jusqu'à présent été isolé pour sa capacité à dégrader le chrysène; Walter et al. (1991) sont les seuls à avoir démontré la dégradation de ce HAP par une souche bactérienne purifiée de *Rhodococcus*.

2.1.3 Intermédiaires de dégradation

A notre connaissance, aucun auteur n'a recherché d'intermédiaires de dégradation des HAPs dans des cultures inoculées avec une population mixte de microorganismes, ce genre d'études se faisant avec des cultures pures. Guerin et Jones (1988) ont rapporté que, généralement, les cultures pures accumulaient des intermédiaires de dégradation tandis qu'en présence de cultures mixtes il n'y avait pas d'accumulation d'intermédiaires. C'est exactement ce que nous avons observé puisqu'en dépit du fait que nous n'avons pas retrouvé d'intermédiaires en présence de la microflore indigène, Ouellet (1994) a isolé une souche de *Pseudomonas putida* de la sablière Thouin qui accumulait l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque comme intermédiaire de dégradation du phénanthrène. Plusieurs facteurs peuvent expliquer les résultats négatifs que nous avons obtenus. Premièrement, il est possible que les intermédiaires ne soient qu'en quantité très faible dans les

cultures, rendant ainsi très difficile leur détection au GC/MS. Deuxièmement, il aurait été préférable d'utiliser des HAPs deutérés, ce qui auraient facilité leur identification parmi les nombreux composés présents dans l'extrait. Il est aussi possible que les intermédiaires ne s'accumuleraient pas sous nos conditions probablement parce qu'ils seraient métabolisés par certains membres de la population indigène. Cependant, une coloration jaune a été observée dans l'éther recueilli suite à l'extraction de cultures liquides ayant démontré une dégradation significative du fluorène et du phénanthrène. Stieber et al. (1994) ont aussi observé cette coloration jaun-brune, qu'ils ont associée à un processus de condensation de composés phénolés (Hedges, 1988; Stevenson, 1982). De même, Grifoll et al. (1992) ont observé une coloration jaune dans leur cultures qu'ils ont associé à la dégradation du fluorène en plus de l'utiliser comme méthode fiable de criblage des bactéries dégradant possiblement le fluorène. Donc, même si nous n'avons pu mettre d'intermédiaires de dégradation en évidence sous nos conditions, la coloration observée suggère tout de même leur présence.

2.1.4 Potentiel de dégradation de la souche *Alcaligenes* sp.

Suite à l'isolement d'une souche *Alcaligenes* du sol de la sablière Thouin, nous avons démontré sa capacité de dégrader

plusieurs HAPs légers et lourds de façon très efficace suite à leur vaporisation sur milieu solide. La dégradation du naphthalène, du phénanthrène, du fluoranthène, du pyrène et du benzanthracène a déjà été démontré chez quelques souches *Alcaligenes denitrificans* et *Alcaligenes faecalis* (Weissenfels et al., 1991,1990; Kelley et Cerniglia, 1991; Heitkamp et al., 1988; Gibson et al., 1975). Comparativement à notre étude, les spectres de dégradation de ces souches n'ont pas été déterminés.

Shiaris et Cooney (1983) ont démontré qu'une souche bactérienne ne peut être considérée comme dégradant un HAP uniquement suite à l'observation de halos sur milieu solide. Cette capacité de dégradation doit être confirmée en milieu liquide. Les résultats que nous avons obtenus en milieu liquide BH contenant les quatre HAPs à l'étude indiquent que cette bactérie a la capacité de dégrader le fluorène et le phénanthrène mais la dégradation des deux HAPs lourds, pyrène et chrysène, n'a pu être démontrée. Pour ce faire, il aurait probablement fallu prolonger l'incubation ou bien tenter de déterminer les conditions optimales de dégradation de cette bactérie.

Le ralentissement de l'enlèvement du phénanthrène que nous

avons noté lorsque nous avons mis les quatre HAPs ensemble a aussi été observé par Tiehm et Fritzsche (1995). En effet, leur culture pure de *Mycobacterium* sp. a démontré une dégradation du fluorène, du phénanthrène et du pyrène selon des cinétiques différentes en mélange par rapport à celles obtenues avec les HAPs individuels. Cette compétition métabolique entre les HAPs concorde avec l'étude de Stringfellow et Aitken (1995) qui ont démontré ce phénomène chez plusieurs souches de *Pseudomonas*.

2.2 Microcosmes sol

2.2.1 HAPs légers

L'enlèvement du fluorène et du phénanthrène a été suivi dans des microcosmes sol auxquels différents milieux liquides étaient ajoutés. La quantité de liquide ajouté au sol, soit 27 mL pour 50 grammes de sol, représente un sol sursaturé en eau. Cette valeur est supérieure au pourcentage minimal requis de 30% d'humidité pour obtenir une dégradation efficace des HAPs (Cooney, 1984). Étant donné que l'utilisation des HAPs par les microorganismes se fait sous leur forme solubilisée (Singleton, 1994), il nous est apparu essentiel de maximiser les échanges possibles entre les microorganismes et les composés à dégrader. Toutefois, la quantité d'eau ajouté est inférieure à celle utilisé dans le procédé de type "boues activées", tel que décrit précédemment. Le pH des microcosmes s'est comporté de la

même façon qu'en cultures liquides, c'est-à-dire que selon le supplément ajouté, le pH est devenu acide (amidon) ou alcalin (extrait de levures).

Dans un microcosme en présence du milieu BH non supplémenté et agité à 300 rpm pendant 5 minutes une fois par jour, le fluorène et le phénanthrène ont été presque entièrement dégradés après un temps d'incubation comparable à celui nécessaire pour obtenir un résultat semblable en cultures liquides avec ce même milieu. Par contre, Manilal et Alexander (1991) ont démontré que la minéralisation du phénanthrène (10 ppm) est plus rapide en milieu minimal liquide contenant des sels inorganiques qu'en microcosmes contenant 50 grammes de sol avec 27% d'humidité. Dibble et Bartha (1979) ont aussi démontré que la présence de plusieurs sources de carbones dans le sol, comme c'est le cas dans le sol de la sablière Thouin, peut diminuer le taux de dégradation des hydrocarbures. Pour notre part, nous avons démontré que les constituants du milieu BH ne sont pas essentiels puisque le fluorène et le phénanthrène ont été enlevés de façon similaire en microcosmes sol contenant seulement de l'eau distillée. Il semble donc que les besoins de la microflore indigène dégradant les HAPs étaient satisfaits par les éléments du sol ainsi que par l'azote ajouté lors de l'ajustement du rapport C:N.

Afin de reconstruire des conditions se rapprochant beaucoup plus de celles retrouvées dans une biopile, le volume de la phase liquide des microcosmes a été réduit de 27 à 12 mL. Les résultats obtenus ne démontrent aucune dégradation significative des HAPs après 60 jours d'incubation indiquant que l'humidité du sol est un facteur très important pour les microorganismes dégradant les HAPs (Cooney, 1984).

L'enlèvement du fluorène et du phénanthrène a été plus lent pour les microcosmes les moins agités et plus rapide sous une plus forte agitation (quatre fois par jour). L'oxygène disponible est donc important pour la dégradation des HAPs. Manilal et Alexander (1991) ont obtenu des résultats semblables en démontrant que la minéralisation du phénanthrène (10 ppm) à 45% s'effectuait en 6 jours d'incubation dans un sol aéré, comparativement à 40 jours sans aération. De même, von Wedel et al. (1988) ont obtenu des résultats indiquant que la concentration d'oxygène est une variable limitante de la biodégradation du pétrole dans le sol. Des valeurs optimales de 10 à 40 % d'oxygène dans l'air, sont suggérées dans la littérature (Zhou et Crawford, 1995; Bauer et Capone, 1988).

Les chromatogrammes représentant l'ensemble des hydrocarbures contenus dans le sol de la sablière Thouin à zéro

et 60 jours d'incubation ont démontré que la microflore de la sablière Thouin est capable de dégrader les alcanes et les HAMS, en plus des HAPs. Cette microflore indigène semble être capable de dégrader un large spectre d'hydrocarbures. L'ensemble des études effectuées sur l'enlèvement des hydrocarbures suggèrent qu'un groupe de microorganismes plutôt qu'une souche pure serait requis pour obtenir la dégradation d'un mélange complexe de ces composés (Brown, 1987). De plus, cette microflore semblerait être déjà adaptée puisque les quatre HAPs ajoutés au sol y étaient déjà présents en quantités appréciables. Étant donné que nous avons pu réduire la concentration de plusieurs hydrocarbures faisant l'objet des normes du MEF, un éventuel traitement par biopile en conditions optimisées pourrait s'avérer une solution efficace.

Contrairement aux résultats obtenus avec les cultures liquides, l'ajout d'extrait de levures à 0.5% (p/v) au milieu BH dans des microcosmes agités à 300 rpm pendant 5 minutes, quatre fois par jour, n'a pas accéléré l'enlèvement du fluorène et du phénanthrène. L'enlèvement du fluorène a même été ralenti de façon importante. Par contre, l'augmentation de la dégradation par l'ajout d'extrait de levures à 0.5% (p/v) a été observée dans une seule série de microcosmes agités à la main une fois par jour après 30 jours d'incubation, indiquant qu'il

est possible que la faible agitation ait été compensée par la présence d'extrait de levures. Manilal et Alexander (1991) ont démontré que l'ajout de glucose (300 ppm) à un microcosme contenant un milieu minimal, conduisait à un enlèvement plus lent du phénanthrène comparativement à des microcosmes aérés (injection d'eau saturé d'air) ne contenant pas de glucose.

Des résultats contradictoires quant à l'ajout d'extrait de levures afin d'optimiser la dégradation des hydrocarbures ont été rapportés dans la littérature. Dibble et Bartha (1979) ainsi que Morgan et Watkinson (1989) ont démontré que la présence d'une autre source de carbone dans le sol peut diminuer le taux de dégradation des hydrocarbures, résultant d'une utilisation préférentielle de la source de carbones la plus facilement assimilable. L'ajout d'une source de carbones peut aussi n'avoir aucun effet ou bien augmenter le taux de dégradation des hydrocarbures (Providenti et al., 1993; Oldenhuis et al., 1989; Kim et Maier, 1986). Lehtomaki et Niemela (1975) ainsi que Griffol et al. (1992) ont démontré que l'ajout d'extrait de levures augmente le taux de dégradation des hydrocarbures en sol. Les exigences spécifiques de chaque microorganisme, dépendamment des conditions du sol, peuvent donc conduire à des résultats différents (Providenti et al., 1993). L'addition d'un mélange de vitamines et minéraux au

milieu BH en microcosmes n'a pas permis d'optimiser la dégradation des HAPs, ce qui indique que ces éléments sont non requis ou déjà présents dans le sol.

Concernant le suivi de la population bactérienne pouvant potentiellement dégrader le phénanthrène, celle-ci a été enrichie puisqu'elle est passée de 19 à 40% de la population bactérienne totale après 30 jours d'incubation en milieu BH supplémenté de 0.5% d'extrait de levures. Bogard et Hemmingsen (1992) ainsi que Kastner et al. (1994), ont démontré un enrichissement de la population dégradant le phénanthrène dans des sols contaminés.

Il a été démontré que l'ajout de surfactant Tween 80 (200 ppm ou 0.4% (v/v)) au milieu BH en microcosmes sol ne permettait pas d'optimiser la dégradation du fluorène et du phénanthrène. Un ralentissement de l'enlèvement a même été observé. Ce ralentissement pourrait s'expliquer par la toxicité de ce surfactant quand la concentration de Tween est au-dessus de la CMC, tel que l'ont démontré Laha et Luthy (1992,1991) dans un sol contaminé par du phénanthrène. Cependant, comme nous n'avons pas tenu compte de la CMC dans nos expériences, il nous est impossible de confirmer cette hypothèse. De plus, les tests d'activité surfactante et émulsifiante ont indiqué que le

Tween 80 était dégradé après 30 jours d'incubation, confirmant que ce composé peut servir de source de carbones aux micro-organismes et ainsi ralentir l'enlèvement des HAPs. Par contre, Janiyani et al. (1993) ainsi que Gray et al. (1994) ont noté une augmentation de la solubilisation de l'antracène et d'hydrocarbures provenant de boues pétrolières en présence de 0.1% (v/v) de Tween 80.

L'addition de salicylate ou de lisier de porc en microcosmes sol contenant le milieu BH n'a pas permis d'optimiser la dégradation des HAPs. Contrairement à nos résultats, Ogunseitan et Olson (1993) ont démontré que l'ajout de salicylate en microcosmes augmentait significativement la minéralisation du naphthalène, un HAP à deux noyaux aromatiques. La concentration de salicylate que nous avons utilisée n'était peut-être pas optimale ou encore il est possible que le salicylate ait été métabolisé par des microorganismes indigènes du sol. Il est aussi possible que la microflore indigène du sol de la sablière Thouin n'utilise tout simplement pas cette voie métabolique comme voie principale de dégradation de ces HAPs. A notre connaissance, aucune publication ne mentionne l'ajout de lisier de porc à un sol contaminé afin d'augmenter l'enlèvement des HAPs. Une seule étude, soit celle de Erickson et al. (1993), se rapproche de la nôtre, puisqu'ils ont utilisé

du fumier comme supplément en microcosmes sol, mais ils n'ont toutefois pas réussi à optimiser la dégradation des HAPs sous ces conditions. Étant donné que le lisier de porc est considéré comme une source d'azote importante, il aurait fallu comparer des microcosmes dont le rapport C:N du sol n'aurait pas été préalablement ajusté, afin de mettre en évidence l'effet de ce supplément. Toutefois, il est important de noter qu'une incubation plus longue aurait peut-être permis une meilleure évaluation de l'effet du lisier de porc.

2.2.2 HAPs lourds

L'enlèvement significatif du pyrène et du chrysène après 60 jours d'incubation en microcosmes contenant le milieu BH indique que la microflore indigène du sol de la sablière Thouin est capable de dégrader des composés très récalcitrants. Les résultats négatifs obtenus en milieu BH liquide suggèrent qu'il aurait probablement fallu prolonger l'incubation au-delà de 30 jours. Il est aussi possible que les conditions en sol soient plus favorables pour l'enlèvement de ces HAPs. De plus, il a été démontré en microcosmes que l'ajout d'extrait de levures ralentissait considérablement l'enlèvement du pyrène et inhibait complètement l'enlèvement du chrysène. Les besoins des microorganismes dégradant les HAPs lourds sont donc minimes et la présence d'une autre source de carbone semble nuire à

l'enlèvement de ces HAPs.

L'augmentation de l'agitation des microcosmes a permis d'accélérer l'enlèvement du pyrène et du chrysène, indiquant que l'oxygène est important pour la dégradation des HAPs lourds. L'oxygène disponible se doit donc d'être suffisant pour favoriser la dégradation des composés plus récalcitrants. Des résultats semblables ont été obtenus par von Wedel et al. (1988) pour la dégradation du pétrole dans le sol.

La dégradation du pyrène et du chrysène nécessite, comme pour les HAPs légers, un pourcentage d'humidité important afin d'obtenir un enlèvement significatif, puisque la réduction de la phase liquide à 12 mL a inhibé la dégradation de ces HAPs. Contrairement à l'enlèvement des HAPs légers, les éléments présents dans le milieu BH sont importants pour l'enlèvement des HAPs lourds en sol puisque les microcosmes ne contenant que de l'eau distillée ont démontré un ralentissement majeur de l'enlèvement de ces HAPs. Les conditions normalement rencontrées dans le sol ne sont donc pas suffisantes pour permettre une dégradation rapide des HAPs lourds.

2.2.3 Inoculation de la souche *Alcaligenes* en microcosme

L'inoculation de la souche *Alcaligenes* sp., en microcosmes

sol contenant le milieu BH, n'a pas permis d'optimiser la dégradation des HAPs. Des résultats semblables ont été obtenus avec des souches pures ou des cultures mixtes de microorganismes indigènes dans des essais de bioaugmentation effectués par Gunulan et Fournier (1993), Muller et al. (1992) ainsi que par Goldstein et al. (1985). La présence de prédateurs ou de toxines dans le sol ou l'utilisation préférentielle d'autres sources de carbones que les HAPs sont des explications plausibles. La concentration de l'inoculum pourrait être une autre explication. D'ailleurs, l'influence de la concentration de bactéries a été étudiée par Weber et Corseuil (1994), qui ont observé que la concentration de bactéries ajoutées par gramme de sol se devait d'être supérieure à 10^5 bactéries au départ afin d'observer une dégradation significative des hydrocarbures. Comme la concentration de bactéries de notre inoculum n'a pu être vérifiée compte tenu de la mobilité de la souche *Alcaligenes* sur milieu solide et aussi de l'opacité de la culture causée par les débris du sol, nous ne pouvons nous prononcer sur ce point. Par contre, d'autres études ont démontré que l'inoculation d'une souche d'*Alcaligenes* sp. ou d'une souche de *Phanerochaete chrysosporium* au sol ont permis d'optimiser la dégradation du phénanthrène (Moller et Ingvorsen, 1993; Brodkorb et Legge, 1992). Aussi, Grosser et al. (1991) ont

obtenu la minéralisation du pyrène en inoculant au sol une souche de *Mycobacterium* sp..

3.0 MINÉRALISATION DES HAPs

Les HAPs légers fluorène et phénanthrène ont été minéralisés en CO₂ par la microflore indigène du sol de la sablière Thouin en microcosmes contenant le milieu BH supplémenté d'extrait de levures. Ces HAPs ne sont donc pas seulement transformés mais bien biodégradés, comme il a déjà été démontré avec le phénanthrène, en cultures liquides (souche pure) ou en sol (Grosser et al., 1995; Brodkorb et Legge, 1992; Grosser et al., 1991; Keuth et Rehm, 1991; Guerin et Jones, 1988). A notre connaissance, aucune étude n'a démontré la minéralisation du fluorène à l'aide du produit marqué radioactivement. Dans ces études, la mention de minéralisation est déduite du fait que le composé était la seule source de carbones. Contrairement à Heitkamp et al. (1988) qui ont démontré la minéralisation du pyrène par une souche de *Mycobacterium* sp., nous n'avons observé qu'un début de minéralisation de ce HAP. Cela est probablement dû au fait que nous avons utilisé l'extrait de levures comme supplément, ce qui a ralenti la dégradation du pyrène en microcosmes. Il aurait donc été intéressant d'effectuer cette expérience en milieu BH non supplémenté ou encore de prolonger l'incubation afin de pouvoir bien démontrer la biodégradation de ce HAP.

CONCLUSION

Le niveau de contamination en hydrocarbures du sol de la sablière Thouin que nous avons utilisé correspond à une valeur au-dessus du critère B, et même du critère C, du MEF. Ceci explique sa déficience en azote. Il a été démontré que la microflore indigène du sol contient des microorganismes ayant un potentiel de dégradation des HAPs.

En cultures liquides, le milieu BH supplémenté de 0.5% (p/v) d'extrait de levures s'est révélé être le milieu permettant le meilleur taux de dégradation des HAPs fluorène et phénanthrène, en plus de montrer une croissance plus élevée des bactéries totales et dégradant potentiellement le phénanthrène. La procédure de récupération des microorganismes du sol s'est révélée être un facteur important afin d'obtenir une population de microorganismes adéquate.

Une concentration élevée de bactéries dans l'inoculum semble être un prérequis pour obtenir un enlèvement significatif du pyrène en milieu liquide, après 60 jours d'incubation. L'enlèvement significatif du chrysène en milieu liquide, a été obtenu seulement dans les cultures où la croissance de champignons était dominante.

La microflore indigène du sol de la sablière Thouin est capable d'enlever significativement le fluorène, le

phénanthrène, le pyrène et le chrysène en microcosmes sol, après seulement 60 jours d'incubation, et ce en présence d'un milieu minéral minimal (BH). Dans ces microcosmes, l'ajout de suppléments, tel que l'extrait de levures, a inhibé à différents degrés l'enlèvement des HAPs, particulièrement pour les HAPs lourds. De plus, le volume de la phase liquide et l'agitation du sol, ont été identifiées comme des facteurs importants pour obtenir une dégradation efficace des HAPs en microcosmes.

La microflore indigène est capable de dégrader plusieurs hydrocarbures contenus dans le sol, en plus des quatre HAPs à l'étude, tel que démontré dans les microcosmes contenant le milieu BH.

La souche indigène *Alcaligenes* sp., isolée à partir d'une culture de milieu BH liquide suite à son potentiel de dégradation du phénanthrène, possède un spectre large de dégradation des HAPs. De plus, cette souche est capable d'utiliser le fluorène et le phénanthrène comme seule source de carbones en milieu liquide.

La microflore indigène du sol s'est avérée capable de minéraliser le fluorène, le phénanthrène et le pyrène. C'est probablement pour cette raison qu'il n'y a pas eu

d'accumulation d'intermédiaires de dégradation du fluorène et du phénanthrène en milieu liquide, en présence de l'ensemble de la microflore indigène.

L'optimisation de l'enlèvement des HAPs est possible, basé sur les expériences effectuées en milieux liquides et en microcosmes. Toutefois, les besoins de la microflore indigène semblent plus spécifiques pour l'enlèvement des HAPs lourds. Ces connaissances sont donc d'un grand intérêt dans l'élaboration et la mise en oeuvre d'un éventuel traitement par biopile, de même que dans la compréhension des processus de biodégradation des HAPs par une population mixte de microorganismes. Toutefois, l'utilisation de cultures liquides dans le but de mieux comprendre le comportement des souches impliquées dans la dégradation des HAPs, doit se faire avec précautions, puisque les conditions retrouvées en sol sont très différentes de celles en milieux liquides.

REMERCIEMENTS

J'aimerais adresser mes sincères remerciements à ...

Jean-Guy Bisailon, qui, par sa constante disponibilité et son dévouement, m'a bien dirigé dans ce projet.

Louis Racine, pour son support moral et technique, mais surtout pour sa patience et son grand coeur.

François Lépine et Sylvain Milot, deux chimistes qui ont partagé leur connaissances à plusieurs reprises.

Stéphane, mon amour, tu m'as encouragé et aidé bien plus que tu ne le penses...

A Bertrand, pour ta bonne humeur et surtout pour ta compagnie au congrès de l'ASM, à Washington.

A Eric, qui m'a été d'une aide incroyable dans l'affrontement des fameux HAPs.

Aussi, j'aimerais remercier tous le groupe de Microbiologie de l'Environnement.

Finalement, j'aimerais adresser un merci tout spécial, les bras vers le ciel, à Nanabozo, Grand Lapin Blanc...

BIBLIOGRAPHIE

Alain, R., F. Nadon, C. Seguin, P. Payment et M. Trudel. 1987. Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids. *J. Virological Methods*. 16: 209-216.

Anonyme. 1988. Politique de réhabilitation des terrains contaminés, Gouvernement du Québec, Editeur officiel du Québec, 54 pages.

Anonyme. 1990. Atelier d'échanges d'informations sur le développement et la démonstration de technologies de décontamination de lieux contaminés orphelins. Ministère de l'Environnement du Québec. 5 p.

American Public Health Association (APHA). 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th Ed. Edited by Lenure S. Clesceri, Arnold E. Greenberg et Rhodes Thussell. N.-Y.

Aronstein, B.N., Y.M. Calvillo et M. Alexander. 1991. Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Env. Sci. Technol.* 25: 1728-1731.

Aronstein, B.N. et M. Alexander. 1993. Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 386-390.

Atlas, R.M. 1977. Stimulated petroleum biodegradation. Dans: *Critical Review in Microbiology*, Lapskin A.I. et Lechevalier H. Ed, CRC Press. pp. 371-386.

Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180-209.

Atlas, R.M. 1990. Microbial hydrocarbon degradation-Bioremediation of oil spills. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 52: 149-156.

Atlas, R.M. et R. Bartha. 1973. Fate and effects of polluting petroleum on the marine environment. *Residue Rev.* 49: 49-59.

Barenschee, E.R., O. Helming, S. Dahmer, B. DelGrosso et C. Ludwig. 1990. Kinetic studies on the hydrogen peroxide-enhanced *in situ* biodegradation of hydrocarbons in water-saturated ground zone. In *Contaminated soil*. K. Wolf (Ed.). Kluwer Academic Publishers. pp:1011-1017.

- Barnsley, E.A. 1975. The bacterial degradation of fluoranthene and benzo(a)pyrene. *Can. J. Microbiol.* 21: 1004-1008.
- Barnsley, E.A. 1983. Bacterial oxidation of naphthalene and phenanthrene. *J. Bacteriol.* 153: 1069-1071.
- Barr, D.P. et S.D. Aust. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28: 78-87.
- Bauer, J.E. et D.G. Capone. 1988. Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1649-1655.
- Barr, D.P. et S.D. Aust. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28: 78-87.
- Bertrand, J.-C., P. Bonin, M. Goutx, M. Gauthier et G. Mille. 1994. The potential application of biosurfactants in combatting hydrocarbon pollution in marine environments. *Res. Microbiol.* 145: 53-56.
- Bogardt, A.H. et B.B. Hemmingsen. 1992. Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlayer technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2579-2582.
- Boldrin, B., A. Tiehm et C. Fritzsche. 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1927-1930.
- Bossert, I. et R. Bartha. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. Dans: Petroleum Microbiology, R.M. Atlas ed, New York, Macmillan, p.: 453-473.
- Bossert, I., W.M. Kachel et R. Bartha. 1984. Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 763-767.
- Bouchez, M., D. Blanchet et J.-P. Vandecasteele. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 156-164.
- Bourquin, A.W. 1990. Bioremediation of hazardous waste. *Biofutur*. Septembre: 24-34.

Boyds, S.A., D.R. Shelton, D. Berry et J.M. Tiedje. 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 50-54.

Britton, L.N. 1984. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. Dans: *Microbial degradation of organic compounds*. D.T. Gibson ed.. Marcel Dekker Inc. New York. p.: 89-129.

Brodkorb, T.S. et R.L. Legge. 1992. Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3117-3121.

Brown, L.R. Oil-degrading microorganisms. 1987. *Chem. Eng. Progress*. October: 35-40.

Casarini, D.C.P., R.M. de Macedo, R.C. de A. Cunha et J.C.O. Mauger. 1988. The development of assesment techniques to evaluate the biodegradation of oily sludge in a landfarming system. *Water Sci. Tech.* 20: 231-236.

Cerniglia, C.E. 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* 30: 31-71.

Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. 3: 351-368.

Cerniglia, C.E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cur. Opinion Biotechnology*. 4: 331-338.

Chakrabarty, A.M. 1976. Plasmids in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Genet.* 10: 7-30.

Colla, A., A. Fiecchi et V. Treccani. 1959. Ricerche sul metabolismo ossidativo microbico dell'anthracene e del fenanthrene. *Ann. Microbiol.* 9: 87-91.

Corseuil, X.C. et W.J.Jr. Weber. 1994. Potential biomass limitations on rates of degradation of mono aromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. *Water Research*. 28: 1415-1423.

Cooney, J.J. 1984. The fate of petroleum pollutants in fresh-water ecosystems. Dans: *Petroleum microbiology*, R.M. Atlas ed., MacMillan Publishing Co. New York.

Coover, M.P. et R.C. Sims. 1987. The effect of temperature on polycyclic aromatic hydrocarbons persistence in an unacclimated agricultural soil. *Hazardous Materials* 4: 69-82.

Cullen, W.R., X.-F. Li et Reimer K.J. 1994. Degradation of phenanthrene and pyrene by microorganisms isolated from marine sediment and seawater. *Sci. Total Environ.* 156: 27-37.

Cuthright, T.J. et L. Suggyu. 1994. Microorganisms and metabolic pathways for remediation of PAH contaminated soil. *Fresenius Envir. Bull.* 3: 413-421.

Dagley, S. 1981. New perspectives in aromatic catabolism. Dans: *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds*, T. Leisinger et al., New York, Academic Press, 181 pages.

Dibble, J.T. et R. Bartha. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 729-739.

Downey, D.C., R.E. Hinchee, M.S. Westroy et J.K. Slaughter. 1988. Combined biological and physical treatment of a jetfuel-contaminated aquifer. In *Proc. NWWA-Conf. Petrol. Hydrocarb. Org. Chem. Ground Water-Prevention, Detect., Restor., Nat. Water Well Ass., Worthington. Ohio.* pp:715-722.

Erickson, D.C., R.C. Loehr et E.F. Neuhauser. 1993. PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Water Res.* 27: 911-919.

Evans, W.C., H.N. Fernley et E. Griffiths. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *Pseudomonas*. *Biochem. J.* 95: 819-831.

Foght, J.M., P.M. Fedorak et D.W.S. Westlake. 1990. Mineralization of ¹⁴C-hexadecane and ¹⁴C-phenanthrene in crude oil: specificity among bacterial isolates. *Can. J. Microbiol.* 36: 169-175.

Foght, J.M. et D.W.S. Westlake. 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species. *Can. J. Microbiol.* 34: 1135-1141.

Fredrickson, J.K., D.L. Balkwill, G.R. Drake, M.F. Romine, D.B. Ringelberg et D.C. White. 1995. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1917-1922.

Frostegard, A., E. Baath et A. Tunlid. 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty analysis. *Soil Biol. Biochem.* 25: 723-730.

Ghosh, D.K. et A.K. Mishra. 1983. Oxidation of phenanthrene by a strain of *Micrococcus*: evidence of protochatechuate pathway. *Curr. Microbiol.* 9: 219-224.

Gibson, D.T. 1975. Oxidation of the carcinogens benz[a]pyrene and benz[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science.* 189:295-297.

Gibson, D.T. et V. Subramanian. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. Dans: *Microbial degradation of organic compounds*. Gibson ed. Dekker. New York Basel. pp.: 181-252.

Giger, W. et M. Blumer. 1974. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment; isolation and characterization by chromatography, visible, ultraviolet and mass spectrometry. *Anal. Chem.* 46: 1663-1671.

Goldstein, R.M., L.M. Mallory et M. Alexander. 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 977-983.

Guerin, W.F. et G.E. Jones. 1988. Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. . *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 937-944.

Guerin, W.F. et G.E. Jones. 1989. Estuarine ecology of phenanthrene-degrading bacteria. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 29: 115-130.

Gunulan, G. et J.-C. Fournier. 1993. Effect of microbial competition on the survival and activity of 2,4-D degrading *Alcaligenes xylofidans* subsp. *denitrificans* added to soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 16: 178-181.

Gray, M.R., D.K. Banerjee, P.M. Fedorak, A. Hashimoto, J.H. Masliyah et M.A. Pickard. 1994. Biological remediation of anthracene-contaminated soil in rotating bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 933-940.

Grifoll, M., M. Casellas, J.M. Bayona et A.M. Solanas. 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: Identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2910-2917.

Grifoll, M., N.A. Selifonov et P.J. Chapman. 1994. Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2438-2449.

Grosser, R.J., D. Warshawsky et J.R. Vestal. 1995. Mineralization of polycyclic and *N*-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon-contaminated soils. *Environ. Toxic. Chem.* 14: 375-382.

Grosser, R.J., D. Warshawsky et J.R. Vestal. 1991. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo(a)pyrene and carbazole in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3462-3469.

Haigler, B.E. et D.T. Gibson. 1990. Purification and properties of NADH-ferredoxine NAP reductase, a component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J. Bacteriol.* 172: 457-464.

Hedges, J.I.. 1988. Polymerization of humic substances in natural environments. Ed. Frimmel FH, Christman RF. Humic substances and their role in the environment. Wiley-Interscience. N.-Y.. pp: 5-58.

Heitkamp, M.A. 1987. Environmental and microbiological factors affecting the biodegradation and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. Ph.D. diss. , University of Arkansas, Arkansas.

Heitkamp, M.A. et C.E. Cerniglia. 1988a. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2549-2555.

Heitkamp, M.A. et C.E. Cerniglia. 1988b. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1612-1614.

Heitkamp, M.A., J.P. Freeman, D.W. Miller et C.E. Cerniglia. 1988. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: Identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2556-2565.

Heitkamp, M.A. et C.E. Cerniglia. 1989. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1968-1973.

Holm, P.E., P.H. Nielsen, H.-J. Albrechtsen et T.H. Christensen. 1992. Importance of unattached bacteria and bacteria attached to sediment in determining potentials for degradation of xenobiotic organic contaminants in an aerobic aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3020-3026.

Horowitz, A., D. Gutnick et E. Rosenberg. 1975. Sequential growth of bacteria on crude oil. *Appl. Microbiol.* 30: 10-19.

Ijah, U.J.J et L.I. Upke. 1992. Biodegradation of crude oil by *Bacillus* strains 28A and 61B isolated from oil spilled soil. *Waste Management.* 12: 55-60.

Jacob, J., W. Karcher, J.J. Belliardo et P.J. Wagstaffe. 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbons of environmental and occupational importance. *Anal. Chem.* 323: 1-10.

Jain, D.K., D.L. Collins-Thompson, H. Lee et J.T. Trevors. 1991. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods.* 13: 271-279.

Jain, D.K., H. Lee et J.T. Trevors. 1992. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *J. Indust. Microbiol.* 10: 87-93.

Janiyani, K.L., S.R. Wate et S.R. Joshi. 1993. Solubilization of hydrocarbons from oil sludge by synthetic surfactants. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 56: 305-308.

Jerina, D.M., H. Selander, H. Yagi, M.C. Wells, J.F. Davey, V. Mahadevan et D.T. Gibson. 1976. Dihydrodiols from anthracene and phenanthrene. *J. American Chemical Society.* 98: 3988-3996.

Jobson, A., M. McLaughlin, F.D. Cook et D.W.S. Westlake. 1974. Effect of amendments on the microbial utilization of oil applied to soil. *Appl. Microbiol.* 27: 166-171.

Jones, S.H. et M. Alexander. 1988. Phosphorus enhancement of mineralization of low concentrations of p-nitrophenol by *Flavobacterium* sp. in lake water. *FEMS Microbiol. Lett.* 52: 121-126.

Jones, J.G., M. Knight et J.A. Byron. 1970. Effect of gross pollution by kerosine hydrocarbons on the microflora of a moorland soil. *Nature (London)* 227: 1166.

Jones, K.C., J.A. Stratford, K.S. Waterhouse, E.T. Furlong, W. Giger, R.A. Hites, C. Schaffner et A.E. Johnston. 1989. Increase in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century. *Environ. Sci. Technol.* 23: 95-101.

Kastner, M., M. Breuer-Jammali et B. Mahro. 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-

contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 267-273.

Kelley, I. et C.E. Cerniglia. 1991. The metabolism of fluoranthene by a species of *Mycobacterium*. *J. Ind. Microbiol.* 7 : 19-26.

Kerr, R.P. et D.G. Capone. 1988. The effect of salinity on the microbial mineralization of two polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments. *Mar. Environ. Res.* 26: 181-198.

Kerry, E. 1993. Bioremediation of experimental petroleum spills on mineral soils in the Vestfold Hills, Antarctica. *Polar Biol.* 13: 163-170.

Keuth, S. et H.-J. Rehm. 1991. Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 804-808.

Kim, C.J. et W.J. Maier. 1986. Acclimatation and biodegradation of chlorinated aromatics in the presence of alternate substrate. *J. Water Pollution Control.* 58: 157-164.

Kiyohara H., K. Nagao et R. Nomi. 1976. Degradation of phenanthrene through o-phtalate by an *Aeromonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* 40: 1075-1082.

Kiyohara, H. et K. Nagao. 1978. Catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 105: 69-75.

Kiyohara, H., K. Nagao et K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on Agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 454-457.

Kiyohara, H., N. Takizawa, H. Date, S. Torigoe et K. Yano. 1990. Characterization of a phenanthrene degradation plasmid from *Alcaligenes faecalis* AFK2. *J. Ferment. Bioeng.* 69: 54-56.

Kiyohara, H., N. Takizawa et T. Nagao. 1992. Natural distribution of bacteria metabolizing many kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 49-51.

Laflamme R.E. et R.A. Hites. 1978. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochem. Cosmochim. Acta.* 42: 289-303.

Laha, S. et R.G. Luthy. 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems.

Environ. Sci. Technol. 25: 1920-1930.

Laha, S. et R.G. Luthy. 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. Biotechnol. Bioeng. 40: 1367-1380.

Lambert, M., S. Kremer, O. Sterner et H. Anke. 1994. Metabolism of pyrene by the Basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated precursors in strain JK375. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3597-3601.

Lapinskas, J. 1989. Bacterial degradation of hydrocarbon contamination in soil and groundwater. Chem. Industry. 4: 784-789.

Leahy, J.G. et R.R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54: 305-315.

Lehtomaki, M. et S. Niemela. 1975. Improving microbial degradation of oil in soil. Ambio. 4: 126.

Lewis, R.F. 1993. Site demonstration of slurry-phase biodegradation of PAH contaminated soil. Air and Waste. 43: 503-508.

Lewis, D.L., H.P. Kolling et R.E. Hodson. 1986. Nutrient limitation and adaptation of microbial populations to chemical transformations. Appl. Environ. Microbiol. 51: 598-603.

MacGillivray, A.R. et M.P. Shiaris. 1993. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1613-1618.

Mackay, D. et W.Y. Shiu. 1977. Aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. J. Chem. Eng. Data. 22: 399-402.

Maliszewska-Kordybach, B. 1992. The effect of temperature on the rate of disappearance of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. Environ. Pollution 79: 15-20.

Manilal, V.B. et M. Alexander. 1991. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 401-405.

Meek, M.E., P.K.L. Chan et S. Bartlett. 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. Environ. Carcino. Ecotox.

Revs. C12: 443-452.

Mihelcic, J.R. et R.G. Luthy. 1988. Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1188-1198.

Miller, R.M. et R. Bartha. 1989. Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 269-274.

Miller, E.C. et J.A. Miller. 1981. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer.* 47: 2327-2345.

Moller, J. et H. Ingvorsen. 1993. Biodegradation of phenanthrene in soil microcosms stimulated by introduced *Alcaligenes* sp. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 102: 271-278.

Monna, L., T. Omori et T. Kodoma. 1993. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 285-289.

Morgan, P. et R.J. Watkinson. 1989. Hydrocarbons degradation in soil and methods for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnology.* 8: 305-333.

Morgan, P. et R.J. Watkinson. 1990. Assessment of the potential for *in situ* biotreatment of hydrocarbon-contaminated soils. *Wat. Sci. Tech.* 22: 63-68.

Morgan, P. et R.J. Watkinson. 1992. Factors limiting the supply and efficiency of nutrients and oxygen supplements for the *in situ* biotreatment of contaminated soil and groundwater. *Wat. Res.* 26: 73-78.

Mueller, J.G., P.T. Chapman, B.O. Blattmann et P.H. Pritchard. 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1079-1086.

Mueller, J.G., P.J. Chapman et P.H. Pritchard. 1989. Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3085-3090.

Murray, R.G., D.K. Banerjee, P.M. Fedorak, A. Hashimoto, J.H. Masliyah et M.A. Pickard. 1994. Biological remediation of anthracene-contaminated soil in rotating bioreactors. *Appl.*

Microbiol. Biotechnol. 40: 933-940.

Okpokwasili, G.C., C.C. Sommerville, M. Sullivan, D.J. Grimes et R.R. Colwell. 1986. Plasmid mediated degradation of hydrocarbons in estuarine bacteria. *Oil & Chemical Pollution*. 3: 117-129.

Ogunseitan, O.A. et B.H. Olson. 1993. Effect of 2-hydroxybenzoate on the rate of naphthalene mineralization in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 799-807.

Oldenhuis, R.L., L. Kuijk, A. Lammers, D.B. Janssen et B. Withold. 1989. Degradation of chlorinated and non-chlorinated aromatic solvents in soil suspensions by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 211-217.

Oudot, J.F., P. Fusey, D.E. Abdelouahid, S. Haloui et M.F. Roquebert. 1987. Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel. *Can. J. Microbiol.* 33: 232.

Ouellet, S. 1994. Isolement et étude de la souche Phe-6 *Pseudomonas putida* dégradant le phénanthrène. Mémoire Maîtrise Microbiologie Appliquée. Institut Armand-Frappier. 148 p.

Pothuluri, J.V., J.P. Freeman, F.E. Evans et C.E. Cerniglia. 1986. Fungal transformation of fluoranthene. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2974-2983.

Providenti, M.A., H. Lee et J.T. Trevors. 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *J. Indust. Microbiol.* 12: 379-395.

Ribbons, D.W. et W.C. Evans. 1962. Oxidative metabolism of protocatechuic acid by certain soil *Pseudomonas*: a new ring-fission mechanism. *Biochem. J.* 83: 482-492.

Samson, R. 1994a. Biorestauration des sites contaminés: Les technologies *in situ*. Dans: La filière biomasse. Centre Québécois de valorisation de la biomasse. 19 pages.

Samson, R. 1994b. Biorestauration des sites contaminés: Les technologies *ex situ*. Dans: La filière biomasse. Centre Québécois de valorisation de la biomasse. 12p..

Savino, A. et M.N. Lollini. 1977. Identification of some fermentation products of phenanthrene in microorganisms of the genus *Arthrobacter*. *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.* 53: 916-921.

Schocken, M.J. et D.T. Gibson. 1984. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphtene and acenaphtylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 10-16.

Sherrill, T.W. et G.S. Sayler. 1980. Phenanthrene biodegradation in freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 172-178.

Shiaris M.P. et J.J. Cooney. 1983. Replica plating method for estimating phenanthrene-utilizing and phenanthrene-cometabolizing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 706-710.

Sims, R.C. 1990. Soil remediation techniques at uncontrolled hazardous waste sites. *J. Air Waste Management Assoc.* 40: 704-732.

Sims, R.C. et M.R. Overcash. 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Rev.* 88: 1-68.

Singleton, I. 1994. Microbial metabolism of xenobiotics: Fundamental and applied research. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 59: 9-23.

Sirvins, A. et B. Tramier. 1985. La biodegradation des hydrocarbures. *Recherche.* 18: 1344-1352.

Spain, J.C., P.H. Pritchard et A.W. Bourquin. 1980. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 726-734.

Stevenson, F.J. 1982. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. Wiley-Interscience. N.-Y.

Stieber, M., F. Haeseler, P. Warner et F.H. Frimmel. 1994. A rapid screening method for micro-organisms degrading polycyclic aromatic hydrocarbons in microplates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 753-755.

Stringfellow, W.T. et M.D. Aitken. 1995. Comparative physiology of phenanthrene degradation by two dissimilar pseudomonads isolated from a creosote-contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 40: 432-438.

Stucki, G. et M. Alexander. 1987. Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 292-297.

Sundaram N.S., M. Sarwar, S.S. Bang et M.R. Islam. 1994. Biodegradation of anionic surfactants in the presence of petroleum contaminants. *Chemosphere*. 29: 1253-1261.

Sutherland, J.B., J.P. Freeman, A.L. Selby, P.P. Fu, D.W. Miller et C.E. Cerniglia. 1990. Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens*. *Arch. Microbiol.* 154: 260-266.

Swindoll, C.M., C.M. Aelion et F.K. Pfaender. 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 212-217.

Sylvestre, M. 1980. Isolation method for bacterial isolates capable of growth on p-chlorobiphenyl. *Notes. Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1223-1224.

Tabak, H.H., J.R. Haines, A.D. Venosa, S. Desai et W. Nisamanepong. 1991. Enhanced degradation of the Alaskan weathered crude oil alkane and aromatic hydrocarbons by indigenous microbiota through application of nutrients. Dans: Gas, oil, coal and environmental biotechnology III, Ed. Cavit Akin et Jared Smith, 3-38.

Tiehm, A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 258-263.

Tiehm, A. et C. Fritzsche. 1995. Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 964-968.

Treccani, V. N. Walker et G.H. Wiltshire. 1954. The metabolism of naphthalene by soil bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 11: 341-348.

Trower, M.K., F.S. Sariaslani et F.G. Kitson. 1988. Xenobiotic oxidation by cytochrome P-450-enriched extracts of *Streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3: 1417-1422.

Trzesicka-Mlynarz, D. et O.P. Ward. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 41: 470-476.

Volkering, F., A.M. Breure, A. Sterkenburg et J. Andel. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 548-552.

von Wedel, R.J., J.F. Mosquera, C.D. Goldsmith, G.R. Hater, A. Wong, T.A. Fox, W.T. Hunt, M.S. Paules, J.M. Quiros et J.W. Wiegand. 1988. Bacterial biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater: *in situ* augmented bioreclamation with enrichment isolates in California. *Water Sci. Technol.* 20: 501-503.

Walker, J.D. et R.R. Cowell. 1976. Biodegradation rates of components of petroleum. *Can. J. Microbiol.* 22: 1209-1212.

Walter, U., M. Beyer, J. Klein et H.J. Rehm. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 671-676.

Wang, X., X. Yu et R. Bartha. 1990. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil. *Environ. Sci. Technol.* 24: 1086-1089.

Weber, W.J. Jr. et H.X. Corseuil. 1994. Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Water Res.* 28: 1407-1414.

Weissenfels, W.D., M. Beyer et J. Klein. 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 479-484.

Weissenfels, W.D., M. Beyer, J. Klein et H.J. Rehm. 1991. Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 528-535.

West, P.A., G.C. Okpokwasili, P.R. Brayton, D.J. Grimes et R.R. Colwell. 1984. Numerical taxonomy of phenanthrene-degrading bacteria isolated from the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 988-993.

Wilson, S.C. et K.C. Jones. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environ. Pollution.* 81: 229-249.

Wodsinski, R.S. et J.E. Coyle. 1974. Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. *Appl. Microbiol.* 27: 1081-1084.

Wodzinski, R.S et M. Johnson. 1968. Yields of bacterial cells from hydrocarbons. *Appl. Microbiol.* 16: 1886-1891.

Wolin, E.A., M.J. Wolin et R.S. Wolfe. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 238: 2882-2886.

Yang, Y., R.F. Cherr et M.P. Shiaris. 1994. Metabolism of naphthalene, fluorene and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NICB 9816. *J. Bacteriol.* 176: 2158-2164.

Zhou, E. et R.L. Crawford. 1995. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation.* 6: 127-140.

Zylstra, G.J. et D.T. Gibson. 1991. Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. In: *Genetic Engineering: Principles and methods Vol.13.* Setlow Ed.. Plenum Press. New-York. pp:183-203.