

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

PAR
KETSIA DOMINGUE

BIODÉGRADATION AÉROBIE DES SOLVANTS CHLORÉS
ALIPHATIQUES

OCTOBRE 1995

**Vaut mieux agir que discourir
sur le temps qui passe.**

Jean-Pierre Fragnière

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	ix
SOMMAIRE	xi
INTRODUCTION	1
REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
1. IMPORTANCE DE L'UTILISATION DES SOLVANTS CHLORÉS	5
2. PROBLÈMES DE POLLUTION DUS AUX SOLVANTS CHLORÉS	8
2.1 Pollution de l'air	8
2.2 Pollution du sol	9
2.3 Pollution de l'eau	9
2.4 Toxicité des solvants	10
3. SOLUTIONS AUX PROBLÈMES DE POLLUTION ...	12
3.1 Solutions physico-chimiques	12
3.2 Solutions biologiques	13
3.3 Critères et paramètres de la dégradation	14
4. BIODÉGRADATION EN CONDITION ANAÉROBIE ..	15
4.1 Mécanismes de la biodégradation en anaérobiose	15
4.2 Bactéries impliquées dans la biodégradation en anaérobiose	19
4.2.1 Méthanogènes	19
4.2.2 Acétogènes	20
4.2.3 Bactéries fermentaires	20
4.2.4 Bactéries dénitrifiantes	21
4.2.5 Bactéries réductrices de sulfate	21
5. BIODÉGRADATION EN CONDITION AÉROBIE	23
5.1 Mécanismes de la biodégradation en aérobiose	23

5.2	Bactéries impliquées dans la biodégradation en aérobiose.....	27
5.2.1	Méthylotrophes	27
5.2.2	<i>Pseudomonas</i>	30
5.2.3	Bactéries nitrifiantes	32
5.3	Compétition inhibitrice entre co- substrats	33
5.4	Solvants comme source principale de carbone et d'énergie	33
6.	MÉTHODOLOGIE EXPLOITÉE	38
6.1	Cultures des bactéries	38
6.2	Détermination de la biodégradation des solvants.....	41
6.3	Suivi de la croissance bactérienne	43
MATÉRIEL ET MÉTHODES		45
1.	SOURCE DES BACTÉRIES	46
2.	MILIEUX DE CULTURE	47
3.	SOLVANTS À TRAITER ET AUTRES PRODUITS CHIMIQUES	47
4.	CROISSANCE DES BACTÉRIES EN PRÉSENCE DES SOLVANTS	50
4.1	Étude en milieu solide	51
4.2	Étude en milieu liquide	52
5.	ENRICHISSEMENTS À PARTIR DU SOL DE LA SABLIÈRE THOUIN	53
5.1	Inoculation sur gélose	56
5.2	Cultures en milieu liquide	56
6.	ENRICHISSEMENTS À PARTIR DE SOL CONTAMINÉ AU PENTACHLOROPHÉNOL (PCP)	57
7.	ENRICHISSEMENTS À PARTIR DU SOL SICO ...	57
8.	ENRICHISSEMENTS EN PRÉSENCE DE CO- SUBSTRATS	59
9.	TEST D'OXYGÉNATION DES CULTURES	60

10.	TEST D'ACIDIFICATION DES MILIEUX	60
11.	SUIVI DE LA DÉGRADATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	61
11.1	Test d'extraction des solvants	62
11.2	Analyse de la biodégradation par les bactéries	63
RÉSULTATS ET DISCUSSION		66
1.	ÉTUDE DE LA CROISSANCE DES BACTÉRIES SUR GÉLOSE	67
2.	ÉTUDE DE LA CROISSANCE DES BACTÉRIES EN MILIEU LIQUIDE	69
3.	ISOLATS OBTENUS À PARTIR DES ENRICHISSEMENTS DU SOL DE LA SABLIERE THOUIN	73
4.	EXPÉRIENCE DE CONFIRMATION DU POTENTIEL DES ISOLATS	77
5.	ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	90
5.1	Détection des solvants	90
5.2	Courbes d'étalonnage	94
5.3	Extraction des solvants	94
6.	BIODÉGRADATION PAR LES ISOLATS	98
7.	ENRICHISSEMENTS À PARTIR DU SOL SICO ET DU SOL CONTAMINÉ AU PENTACHLOROPHÉNOL ..	103
8.	ENRICHISSEMENTS AVEC CO-SUBSTRATS À PARTIR DU SOL SICO ET DU SOL CONTAMINÉ AU PENTACHLOROPHÉNOL	105
9.	BIODÉGRADATION DU TOLUÈNE	111
10.	BIODÉGRADATION DU DICHLOROÉTHANE PAR DES TÉMOINS POSITIFS	116
11.	BACTÉRIES ET LEUR ORIGINE	117
12.	OXYGÉNATION DES CULTURES	125
13.	ACIDIFICATION DES MILIEUX	127

CONCLUSION	128
REMERCIEMENTS	131
BIBLIOGRAPHIE	133

LISTES DES TABLEAUX

TABLEAU 1:	Exemples de bactéries effectuant la biodégradation de divers solvants chlorés en condition aérobie	37
TABLEAU 2:	Quantité de solvant chloré (en μ l) ajoutée aux enrichissements de cultures à chacun des passages	55
TABLEAU 3:	Isolats présentant une meilleure croissance avec solvant en milieu liquide dans les expériences préliminaires et retenus pour confirmation	71
TABLEAU 4:	État de la croissance dans les enrichissements de cultures, de troisième et/ou quatrième passages, effectués à partir de sol mis en réacteurs	74
TABLEAU 5:	Examen de la morphologie des colonies obtenues par enrichissements avec les solvants versus les colonies contrôles provenant de cultures dépourvues de solvants	76
TABLEAU 6:	Tableau indicatif du pourcentage de récupération obtenu pour chaque solvant en fonction du détecteur.....	96
TABLEAU 7:	Quantification des solvants chlorés (en ppm) pour les cultures (cult.) et les contrôles abiotiques (cont.) après analyse par GC-FID	99
TABLEAU 8:	Quantification des solvants chlorés (en ppm) pour les cultures (cult.) et les contrôles abiotiques (cont.) après analyse par GC-ECD	101
TABLEAU 9:	Quantification des solvants chlorés (en ppm) pour les cultures obtenues par enrichissement du sol contaminé au pentachlorophénol.....	104

TABLEAU 10:	Quantification des solvants chlorés (en ppm) pour les cultures (cult.) enrichies avec les co-substrats ⁽¹⁾ toluène et ⁽²⁾ phénol, et dans les contrôles abiotiques(cont.) après analyse par GC-ECD	108
TABLEAU 11:	Pourcentage de disparition minimale ayant été calculé pour des échantillons de cultures enrichies avec le toluène lors de deux analyses par GC-ECD	109
TABLEAU 12:	Quantification des solvants chlorés (en ppm) pour les cultures enrichies avec les co-substrats ⁽¹⁾ toluène et ⁽²⁾ phénol, et dans les contrôles abiotiques (cont.) lors d'une deuxième expérience. Analyse par GC-ECD	110

LISTES DES FIGURES

FIGURE 1:	Mécanismes de déhalogénéation des solvants chlorés aliphatiques en condition anaérobie. a) hydrogénolyse, b) dihaloélimination. Tiré de Mohn et Tiedje (1992).....	17
FIGURE 2:	Mécanismes de la déhalogénéation des solvants chlorés aliphatiques en condition aérobie. a) substitution hydrolytique, b) déhalogénéation thiolytique, c) oxydation. a et c tirés de Leisinger et al (1993), b tiré de Janssen et al (1990)	25
FIGURE 3:	Solvants chlorés aliphatiques dont la biodégradation est étudiée en condition aérobie	48
FIGURE 4:	Croissance de l'isolat #2, en présence (A) et en absence de dichlorométhane (B), mesurée par la densité optique en fonction du temps	78
FIGURE 5:	Croissance de l'isolat #37, en présence (A) et en absence de trichlorométhane (B), mesurée par la densité optique en fonction du temps	81
FIGURE 6:	Croissance de l'isolat #62, en présence (A) et en absence de trichlorométhane (B), mesurée par la densité optique en fonction du temps	83
FIGURE 7:	Croissance de l'isolat #51, en présence (A) et en absence de dichlorométhane (B), mesurée par la densité optique en fonction du temps	86
FIGURE 8:	Croissance de l'isolat #6, en présence (A) et en absence de trichloroéthylène (B), mesurée par la densité optique en fonction du temps	88

FIGURE 9:	Signaux typiques obtenus: a) par GC-FID b) par GC-ECD, lors du suivi de la bio- dégradation des solvants chlorés	92
FIGURE 10:	Suivi du toluène dans un contrôle abiotique: a) jour 0, b) jour 7	112
FIGURE 11:	Suivi du toluène dans une culture enrichie avec du dichloroéthane: a) jour 0, b) jour 7.....	114
FIGURE 12:	Suivi du dichloroéthane dans un contrôle abiotique: a) jour 0, b) jour 5	118
FIGURE 13:	Suivi du dichloroéthane dans une culture de <i>Xanthomonas autotrophicus</i> GJ10: a) jour 0, b) jour 5	120
FIGURE 14:	Suivi du dichloroéthane dans une culture de <i>Ancylobacter aquaticus</i> AD20: a) jour 0, b) jour 5	122

Sommaire

Les composés chlorés aliphatiques sont des polluants majeurs retrouvés dans certaines zones industrielles. Les microorganismes et en particulier les bactéries ont démontré leur capacité à biodégrader plusieurs de ces produits. Une étude a donc été entreprise sur la biodégradation de six solvants chlorés aliphatiques en condition aérobie.

Dans un premier temps, l'étude a porté sur la croissance d'isolats bactériens en présence des solvants. Cette expérience visait la mise en évidence de l'utilisation des solvants par les bactéries comme source de carbone et d'énergie. Certains de ces isolats ont montré un potentiel de biodégradation en croissant mieux en présence des solvants qu'en leur absence. Leur croissance a été déterminée en mesurant leur densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre.

Des enrichissements de cultures à partir d'échantillons de sol ont été entrepris pour augmenter le nombre d'isolats disponibles pour effectuer cette étude. Ces enrichissements ont été fructueux et ont permis d'obtenir plusieurs autres isolats. Ils ont été retenus dans un premier temps à cause des différences phénotypiques présentées par les colonies qu'ils formaient. Ces différences étaient par rapport à des colonies provenant de cultures contrôles non enrichies de solvants chlorés. La deuxième étape qui a mené à leur sélection rejoint

la procédure employée pour les premiers isolats. Lorsque cultivés en milieu liquide, ces isolats montraient en effet une meilleure croissance que les cultures contrôles dépourvues de solvants.

D'autres enrichissements de cultures ont été effectuées pour l'obtention de consortiums capables de biodégrader les solvants chlorés. Des échantillons de sols contaminés au pentachlorophénol ont été utilisés. D'autres échantillons provenant des alentours de la compagnie Sico, une usine de fabrication de peinture, ont aussi été testés. Ces enrichissements ont d'abord été effectués avec les solvants chlorés comme unique source de carbone et d'énergie. Une deuxième série d'expériences a été menée avec le phénol et le toluène comme co-substrats.

Les isolats ainsi que les consortiums ont été testés pour leur capacité à biodégrader les solvants chlorés. Leur activité de biodégradation a été suivie par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme et un autre à capture d'électron. Malgré la croissance observée en présence de plusieurs solvants, aucune biodégradation n'a pu être confirmée. Par contre, des analyses portant sur le toluène ont permis de constater sa biodégradation par plusieurs consortiums enrichis avec différents solvants chlorés.

Par ailleurs, une expérience utilisant deux témoins positifs a été faite. Ces témoins sont deux souches bactériennes de référence dont le pouvoir à biodégrader le dichloroéthane a été prouvé. Cette expérience exécutée dans des conditions identiques à celles utilisées pour les autres expériences de l'étude a confirmé la biodégradation du dichloroéthane par les deux bactéries. Elle a ainsi permis de valider la méthodologie exploitée au cours de cette étude.

Introduction

Les solvants chlorés aliphatiques, dont l'usage s'étend du domaine du nettoyage à sec des vêtements à celui des insecticides, font partie d'un lot croissant de substances chimiques très largement utilisées. La multiplication de leur emploi sur de nombreuses années a entraîné divers problèmes de santé humaine et de préservation de l'environnement. Ces problèmes ont conféré aux solvants chlorés le titre peu enviable de polluants. Le problème est devenu à ce point critique que l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA) a placé plusieurs solvants chlorés sur une liste prioritaire de polluants majeurs.

Cette dénomination des solvants chlorés aliphatiques a ouvert la voie à une vaste recherche pour tenter de remédier aux problèmes. Cette recherche a trouvé une niche particulièrement importante en microbiologie, où des microorganismes, surtout des bactéries, se sont avérés aptes à biodégrader ces substances polluantes.

La biodiversité impose deux types d'environnements permettant d'explorer le potentiel de biodégradation des bactéries. Ainsi, le travail de recherche impliquant les bactéries se déroule en condition anaérobie ou aérobie. Pour diverses raisons, dont la facilité technique, les recherches en condition aérobie ont pris beaucoup d'ampleur. Par conséquent,

la littérature cite quelques exemples de bactéries dégradant un ou plusieurs solvants chlorés aliphatiques. Tel est le cas de *Xanthomonas autotrophicus* GJ10 qui dégrade le dichloroéthane.

Ces solvants chlorés aliphatiques peuvent servir de sources de carbone et d'énergie aux bactéries qui les dégradent. Mais, dans la plupart des cas, ils jouent un rôle de co-substrats et sont dégradés par l'action fortuite d'enzymes à spectre large. Les substrats primaires peuvent alors appartenir à divers groupes chimiques, mais semblent plus appropriés lorsqu'il s'agit de composés aromatiques comme le toluène.

Sachant que l'obtention de la dégradation de ces polluants par les bactéries a déjà été rapportée, une hypothèse quant à la possibilité d'isoler des bactéries dotées des mêmes capacités à partir des sols contaminés de la région de Montréal fut retenue. Cette dernière constitue donc le point de départ d'une étude portant sur la biodégradation des solvants chlorés aliphatiques en condition aérobie. Deux objectifs sont visés par cette étude: l'isolement de bactéries ou de consortiums dégradant les solvants chlorés aliphatiques et l'optimisation de leur potentiel dans des conditions similaires à celles de l'environnement naturel, c'est-à-dire en boues.

Revue de littérature

1. Importance de l'utilisation des solvants chlorés.

Les substances organiques chlorées forment un groupe chimique très important couramment appelé les organo-chlorés. Elles peuvent être subdivisées en deux catégories: les composés aromatiques et les aliphatiques. Ces substances largement utilisées dans le milieu industriel sont aussi connues sous le terme général de solvant. Ce terme générique regroupe des produits qui peuvent servir à la solubilisation de tiers composés tout en gardant leurs propriétés physico-chimiques, et c'est principalement à ce titre qu'ils sont employés. (Jacobs et Scheflan, 1953)

Plusieurs secteurs de l'activité économique mondiale font un grand usage des solvants chlorés aliphatiques parce qu'ils possèdent justement des caractéristiques physico-chimiques fort intéressantes pour le milieu industriel. La production par synthèse du dichloroéthane, par exemple, dépasse les 15 millions de tonnes par an à travers le monde (Janssen et al, 1994); celle du dichlorométhane s'élevait à plus de $1,6 \times 10^5$ tonnes en 1992, ceci aux États-Unis seulement (Leisinger et al, 1994).

Les solvants organiques chlorés sont utilisés surtout pour dégraisser les composantes métalliques, comme décapants de

peinture, ou encore pour séparer les paraffines de l'huile minérale, à l'aide du dichlorométhane par exemple (Holst et al, 1991).

Par ailleurs, plusieurs solvants chlorés sont employés en réfrigération (Ghosal et al, 1985), pour atténuer la progression d'incendies et éviter les risques d'explosions (Belkin, 1992). Dans l'industrie du nettoyage à sec, on retrouve également plusieurs solvants chlorés comme le trichloroéthylène (Broholm et al, 1991), et le tétrachloroéthylène (Aggazzoti et al, 1994).

S'il est un autre secteur qui fait un grand usage des solvants chlorés c'est l'agriculture. En effet, les agriculteurs emploient ces solvants dans les pesticides et herbicides (Jacobs et Scheflan, 1953). Les organisations militaires sont aussi de grandes consommatrices de solvants chlorés aliphatiques (Vanderberg et Perry, 1993).

La synthèse de nouveaux produits chimiques organiques, telles les amines, accapare une partie importante de la production mondiale de solvants chlorés aliphatiques (Janssen et al, 1994; Murray et Richardson, 1993).

La gigantesque industrie pharmaceutique est également consommatrice de ces solvants (Hartmans et Tramper, 1991). Dans une moindre mesure, l'industrie alimentaire emploie plusieurs solvants chlorés dont le dichlorométhane et le dichloroéthane (Stuki, 1990).

La place importante que les solvants chlorés occupent dans le monde industriel n'est pas sans causer des difficultés au niveau de leur gestion. Ces produits, lorsque mal gérés, occasionnent toute une panoplie de problèmes de pollution, d'effets toxiques et de risques à la santé.

2. Problèmes de pollution dus aux solvants chlorés

La production et l'utilisation massive des solvants chlorés aliphatiques par de nombreuses industries font en sorte qu'ils se retrouvent partout dans l'environnement. Les problèmes de pollution sont engendrés lorsque ces composés sont libérés accidentellement, par exemple contenants défectueux, ou encore lors de déversements volontaires pour contourner les coûts élevés de traitement (Fathepure et Vogel, 1991). La pollution par les solvants chlorés affecte principalement trois milieux: l'air, le sol et l'eau.

2.1 Pollution de l'air

Les solvants chlorés aliphatiques qui ont pour la plupart un point d'ébullition assez faible (entre 39,8°C et 121,2°C) se volatilisent rapidement lorsqu'ils sont en contact avec l'atmosphère. Au niveau des industries productrices ou utilisatrices des solvants chlorés, la volatilisation se fait à partir des effluents liquides ou encore les solvants sont directement libérés sous forme d'émissions gazeuses. Le cas de la Hollande, où selon les estimations portant sur l'année 1980, plus de 5 800 tonnes de dichlorométhane ont été émises dans l'air ambiant, illustre bien ce phénomène (Hartmans et Tramper, 1991). Une fois dans l'atmosphère, les solvants chlorés

sont exposés aux rayons ultraviolets et sont en grande partie dégradés par photolyse (Kempton et al, 1992).

2.2 Pollution du sol

Par ailleurs, les solvants sont relativement solubles dans l'eau. Ils sont donc entraînés dans les eaux de ruissellement et pénètrent le sol. La composition en matières organiques et inorganiques de ce dernier facilite sa contamination par adsorption, de sorte que les solvants sont peu disponibles pour une biodégradation potentielle (Bottomley, 1993; Fewson, 1988). Cette adsorption des produits sur les composants organiques du sol constitue un «réservoir» très efficace et devient en quelque sorte une source de pollution continue de l'environnement lors de la «désorption» progressive des solvants (van der Meer et al, 1992).

2.3 Pollution de l'eau

Le déplacement vertical des solvants chlorés à travers le sol s'achève dans la nappe phréatique contaminant ainsi les réserves d'eau potable. Ces substances étant plus denses que l'eau restent donc prisonnières entre l'eau et la couche argileuse de nature imperméable. Puisque les solvants ne peuvent s'échapper, la contamination des eaux souterraines peut

perdurer sur de nombreuses années (Hughes et Parkin, 1992). Les eaux de surface sont également contaminées par les déversements. Une autre source de contamination de ces eaux est la chloration effectuée par les usines de traitement de l'eau pour la rendre potable (Alvarez-Cohen et McCarty, 1991b; Vogel 1991). Dans l'environnement, les solvants chlorés ont une demi-vie relativement longue assortie d'une assez grande mobilité. Ces deux caractéristiques font qu'ils peuvent être retrouvés fort loin du site de déversement ou d'entreposage d'origine, et ceci longtemps après le contact initial avec l'environnement (Erzmann et Popel, 1991).

2.4 Toxicité des solvants

Les solvants chlorés se retrouvant en quantité si importante dans l'environnement posent forcément des problèmes de toxicité (Murray et Richardson, 1993). Plusieurs d'entre eux ont d'ailleurs été démontrés mutagènes et cancérigènes (Egli et al, 1988). Aggazzotti et al (1994) parlent de toxicité aiguë autant que chronique, du moins en ce qui concerne le tétrachloroéthylène. Il semblerait que la toxicité aiguë concerne avant tout le système nerveux central et dans une moindre mesure le foie et les reins. Un des effets chroniques signalés est une action débiliteuse sur le système rénal. Les solvants chlorés agissent sur l'organisme humain parce qu'ils

peuvent être activés dans le foie par le cytochrome P-450, une mono-oxygénase. Les réactions déclenchées conduisent à la modification des protéines et même du matériel génétique (Anders et Pohl, 1985, tel que cité par Wackett et al, 1992). De plus, on associe la toxicité de ces produits aux effets qu'ils peuvent avoir sur les membranes lipidiques du fait de leurs propriétés de solvant (Hanzlik, 1981).

L'abondance des solvants chlorés dans l'environnement et les problèmes de haute toxicité qu'ils peuvent causer, a alerté l'agence américaine de protection de l'environnement (Environmental Protection Agency, EPA), qui les a placé au premier rang d'une liste de polluants jugés prioritaires. (Keith et Telliard, 1979). Les risques pour la santé et l'environnement associés aux solvants chlorés aliphatiques étant reconnus, la recherche de solutions est devenue impérative. Pour y parvenir les efforts ont été intensifs. Deux approches de solutions peuvent être retenues: physico-chimiques et biologiques.

3. Solutions aux problèmes de pollution

3.1 Solutions physico-chimiques

Les procédés physiques employés, pour résoudre les problèmes de pollution occasionnés par les solvants chlorés, sont principalement l'aération mécanique, la vitrification, la solidification/stabilisation et l'incinération. Le premier procédé peut se faire aussi bien sur le site de la contamination, *in-situ*, ou après excavation, *ex-situ*. Dans les deux cas il s'agit de faire passer de l'air à travers la matrice contaminée pour favoriser la volatilisation des solvants. C'est également le but visé par la vitrification qui consiste à faire passer un courant électrique dans un sol contaminé. La solidification/stabilisation qui se fait après excavation du site contaminé consiste à ajouter un additif qui permet l'emprisonnement des produits contaminés dans une capsule. Finalement on peut toujours incinérer les solvants pour les détruire (Miller et al, 1990; Kempton et al, 1992).

Les solutions chimiques les plus couramment employées impliquent souvent l'extraction des produits ou l'ajout de composés facilitant la dégradation. L'extraction des produits du milieu contaminé se fait à l'aide de solvants, de surfactants, ou de leur mélange. Les oxydants sont en général

le type de produits ajoutés aux milieux. Lee et Carberry (1991) ont utilisé le peroxyde d'hydrogène et le réactif de Fenton pour oxyder le trichloroéthylène dans un pré-traitement avant de le soumettre à la biodégradation.

Pour les solutions qui viennent d'être abordées, il faut généralement prévoir des coûts assez élevés, et la nécessité, dans presque tous les cas, d'un traitement secondaire. Lorsqu'il s'agit de volatilisation, les produits sont habituellement captés sur du charbon activé (Herbert et al, 1986). Un autre traitement préconise l'utilisation des microorganismes dans des bioréacteurs qui sont surtout de type biofiltres (van Groenestijn et Hesselink, 1993).

3.2 Solutions biologiques

Les traitements secondaires requis par les solutions physico-chimiques énumérés ci-dessus sont souvent d'ordre biologiques. C'est aux traitements biologiques, vus comme plus respectueux de l'environnement et plus économiques, que l'on fait de plus en plus appel. Ces solutions qui supposent l'utilisation d'organismes vivants, des bactéries dans la majorité des cas, sont réalisées dans deux sortes de conditions: anaérobie et aérobie. Par ailleurs, la biodégradation se déroule selon deux scénarios métaboliques:

les bactéries utilisent directement le solvant pour combler leurs besoins en carbone et en énergie, ou elles le transforment de façon fortuite grâce à des enzymes à spectre large, c'est ce qu'on appelle le co-métabolisme (Dalton et Stirling, 1982). Le co-métabolisme nécessitant une source de carbone alternative.

3.3 Critères et paramètres de la dégradation

Le choix des traitements est basé sur plusieurs facteurs. Lorsque ces traitements se font *in-situ* (Semprini et al, 1992), ces facteurs concernent pour la plupart le site contaminé lui-même, ses caractéristiques physico-chimiques et son histoire, d'où la nécessité d'en faire une caractérisation. La concentration, la structure, la disponibilité des solvants peuvent tous être des facteurs à considérer dans un schéma de dégradation. Dans le cas de la biodégradation, il faut ajouter aux critères déjà mentionnés les paramètres biologiques. La première étape s'adresse bien sûr aux bactéries impliquées. Par ailleurs, en biodégradation, d'autres paramètres comme le pH, la température, l'oxygène et les nutriments revêtent une énorme importance (Singleton, 1994; Madsen, 1991; Leahy et Colwell, 1990; Fewson, 1988; Leisinger, 1983; Alexander, 1981).

4. Biodégradation en condition anaérobie

Les solvants chlorés s'accumulent en quantité relativement élevée dans la nappe phréatique de certaines régions industrialisées. Ce milieu est pratiquement dépourvu d'oxygène et par conséquent anaérobie.

Puisque la contamination des eaux souterraines représente un problème majeur de pollution, nombre de recherches s'ingénient à étudier les populations bactériennes ainsi que les mécanismes impliqués dans la biodégradation des solvants chlorés aliphatiques en condition anaérobie. Ces études démontrent que la biodégradation en anaérobiose est directement proportionnelle au nombre d'ions chlore que porte la molécule. En d'autres mots, plus il y a de chlores, plus le taux de dégradation anaérobie est élevé (Leisinger et al, 1993).

4.1 Mécanismes de la biodégradation en anaérobiose

La biodégradation en condition anaérobie résulte d'une suite de réactions de déhalogénéation réductrice (Bouwer et McCarty, 1983a). Mohn et Tiedje (1992) en ont parlé comme d'un mécanisme par lequel l'halogène est remplacé par un autre atome, de l'hydrogène par exemple, dans un échange d'électrons. Deux voies métaboliques sont principalement empruntées dans

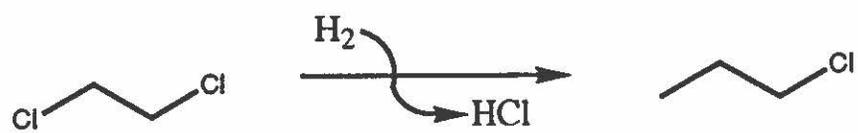
cette chaîne de réactions. Dans un premier temps, il y a l'hydrogénolyse où l'atome d'halogène est remplacé par un atome d'hydrogène (Figure 1a). La deuxième voie empruntée par la déhalogénéation réductrice est celle de la dihaloélimination. Il s'agit, comme le mot le suggère, d'éliminer simultanément deux atomes d'halogènes sur des carbones adjacents, ce qui conduit à la formation d'un double lien entre les carbones (Figure 1b).

Même si la déhalogénéation réductrice en condition anaérobie par des souches pures a été démontrée, par exemple avec la souche *PER-K23* (Holliger et al, 1993; Gälli et McCarty, 1989), il reste que c'est un phénomène plus souvent rencontré dans des milieux complexes où les bactéries sont en populations mixtes (Braus-Stromeyer et al, 1993; Vargas et Ahlert, 1987).

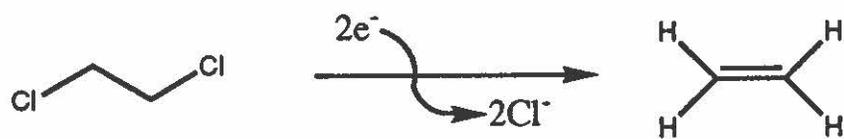
D'autre part, en condition anaérobie, la déhalogénéation réductrice est souvent associée au co-métabolisme (Murray et Richardson, 1993). Toutefois, la littérature rapporte des cas d'utilisation des solvants chlorés comme source de carbone et d'énergie par des bactéries en condition anaérobie (Freedman et Gossett, 1991).

FIGURE 1: Mécanismes de déhalogénéation des solvants chlorés aliphatiques en condition anaérobie. a) hydrogénolyse, b) dihaloélimination. Tiré de Mohn et Tiedje (1992).

a) Hydrogénolyse:



b) Dihaloélimination:



4.2 Bactéries impliquées dans la biodégradation en anaérobiose

Même si on parle de cultures mixtes ou de consortiums dans la dégradation anaérobie, cinq grandes familles sont reconnues comme étant responsables de la déhalogénéation. Il s'agit des bactéries méthanogènes, des acétogènes, des fermentaires, des bactéries dénitrifiantes et celles réductrices de sulfate.

4.2.1 Méthanogènes

La déhalogénéation réductrice par les méthanogènes est effectuée par des bactéries impliquées dans la synthèse du méthane. Elles constituent sans aucun doute un des groupes ayant reçu le plus d'attention de la part des chercheurs étudiant la biodégradation des solvants chlorés aliphatiques en anoxie. Ces bactéries anaérobies strictes utilisent surtout l'hydrogène et le dioxyde de carbone pour leur croissance. Elles sont aussi capables de métaboliser le formate, l'acétate au même titre que le méthanol (Hardman, 1991).

Bouwer et McCarty (1983a) ont rapporté la biodégradation du chloroforme, du dichloroéthane et du tétrachlorométhane par des microorganismes en condition méthanogénique. Ils ont décrit un phénomène de co-métabolisme où l'acétate servait de source

de carbone et d'énergie.

Liang et Grbic-Galic (1993), sont deux autres chercheurs à avoir étudié la déhalogénéation des solvants chlorés en condition méthanogénique. Encore une fois, cette étude a démontré que le co-métabolisme prévalait dans les milieux anaérobies. En effet, lors de cette étude, la dégradation des solvants a été réalisée en présence de composés aromatiques dont le toluène.

4.2.2 Acétogènes

D'autres études visant à élucider la déhalogénéation réductrice en anaérobiose ont eu pour cible le groupe de bactéries dont le métabolisme conduit à la synthèse de l'acétate. Egli et al, 1988, ont publié une recherche où la minéralisation du tétrachlorométhane était le résultat du catabolisme de bactéries acétogènes: *Acetobacterium woodii* et *Clostridium thermoaceticum*.

4.2.3 Bactéries fermentaires

Une autre catégorie de bactéries responsables de la déhalogénéation réductrice est celle des fermentaires. Lors du processus de fermentation, le métabolisme des composés

organiques n'occasionne aucun changement du potentiel d'oxydoréduction, mais il y a quand même génération d'énergie (Mathews et van Holde, 1990). Les bactéries fermentaires sont souvent liées aux populations bactériennes agissant en condition méthanogénique et acétogénique. Braus-Stromeyer et al (1993), ont isolé une bactérie fermentaire non identifiée et dénommée souche DMA capable d'effectuer la dégradation du dichlorométhane en l'utilisant comme source de carbone.

4.2.4 Bactéries dénitrifiantes

Les conditions dénitrifiantes sont elles aussi employées par les bactéries du genre *Pseudomonas*, comme la souche KC isolée par Lewis et Crawford (1993), pour réaliser la déhalogénéation réductrice. Bouwer et McCarty (1983b) ont décrit ces conditions comme étant à mi-chemin entre le potentiel d'oxydoréduction nécessaire pour l'aérobiose et celles pour la décomposition méthanogénique.

4.2.5 Bactéries réductrices de sulfate

Beaucoup de sites souterrains contaminés par les solvants chlorés aliphatiques contiennent des sulfates. Il a donc été intéressant pour des équipes de recherche sur la biodégradation d'étudier la déhalogénéation réductrice par des

bactéries réductrices de sulfate. Ces bactéries procèdent à la déhalogénéation des solvants par co-métabolisme, comme il a été mis en évidence dans une étude de Pavlostakis et Zhuang (1991). Cette équipe a en effet observé la dégradation du trichloroéthylène jusqu'au dichloroéthane en présence de lactate et d'acétate avec inhibition de l'activité des méthanogènes. *Desulfobacterium autotrophicum*, isolé par Egli et al en 1988, est cité comme exemple de bactérie réductrice de sulfate et qui transforme le tétrachlorométhane en chloroforme et dichlorométhane.

5. Biodégradation en condition aérobie

L'application de traitements biologiques en condition aérobie implique avant tout la nécessité d'avoir de l'oxygène dans le milieu. Chaudhry et Chapalamadugu, dans leur revue bibliographique publiée en 1991, ont décrit les techniques de cultures aérobies comme étant généralement simples, efficaces et surtout applicables. Il est donc compréhensible qu'une recherche intensive soit menée en condition aérobie pour trouver une solution à la pollution par les solvants chlorés aliphatiques. Cette recherche est d'autant plus nécessaire que la biodégradation réductrice de composés fortement chlorés en anaérobiose, tel le trichloroéthylène et le tétrachloroéthylène, conduit dans plusieurs cas à l'accumulation de produits intermédiaires moins chlorés mais souvent plus toxiques. Le chlorure de vinyle est le produit le plus souvent retrouvé dans ces cas de dégradation partielle. Toutefois, ce produit, à l'instar des autres intermédiaires chlorés de la biodégradation réductrice, est minéralisé en condition aérobie.

5.1 Mécanismes de la biodégradation en aérobiose

La biodégradation en condition aérobie se fait essentiellement par deux mécanismes-clés: les substitutions

nucléophiles d'une part et les déhalogénations oxydatrices d'autre part (Leisinger et al, 1993).

Dans le cas des substitutions nucléophiles, on peut aussi faire référence à la déhalogénéation hydrolytique. Ce mécanisme implique que l'atome d'halogène du composé organique est remplacé par un groupement hydroxyle provenant d'une molécule d'eau (Fetzner et Lingens, 1994) (Figure 2a). Un mécanisme analogue à celui de la substitution nucléophile est la déhalogénéation dite thiolytique. Cette dernière est catalysée par une glutathione transférase retrouvée chez certaines bactéries, du genre *Hyphomicrobium sp.* ou *Methylobacterium sp.*, effectuant la déhalogénéation du dichlorométhane (Janssen et al, 1990) (figure 2b).

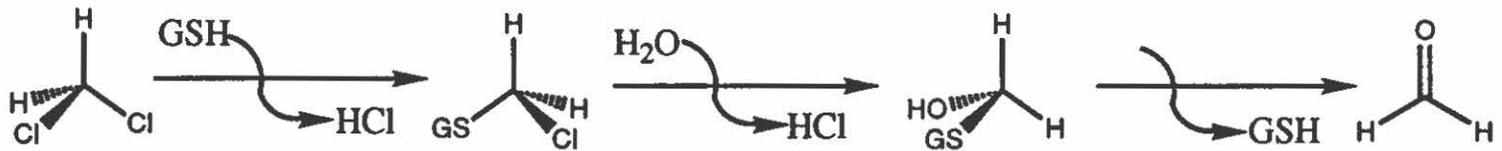
En condition aérobie la déhalogénéation des solvants chlorés s'accomplit aussi par le biais de leur oxydation. Les mono-oxygénases et les di-oxygénases qui catalysent la réaction ajoutent un ou deux atomes d'oxygène à la molécule de solvant (Fetzner et Lingens, 1994) (figure 2c).

FIGURE 2: Mécanismes de la déhalogénéation des solvants chlorés aliphatiques en condition aérobie. a) substitution hydrolytique, b) déhalogénéation thiolytique, c) oxydation. a et c tirés de Leisinger et al (1993), b tiré de Janssen et al (1990).

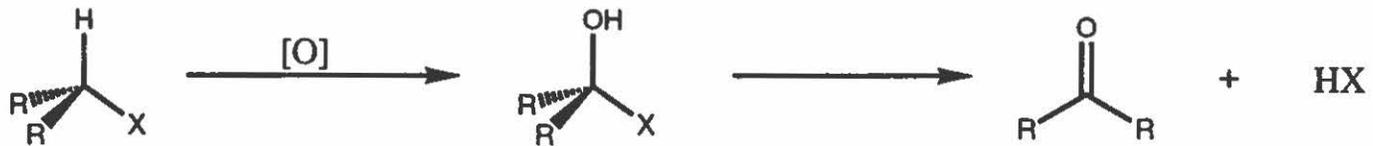
a) Déhalogénéation hydrolytique:



b) Substitution thiolique:



c) Oxygénation:



5.2 Bactéries impliquées dans la biodégradation en aérobiose

La recherche menée sur la biodégradation aérobie a permis de mettre en évidence plusieurs catégories de bactéries responsables de la déhalogénéation. Les méthylotrophes, les *Pseudomonas* et les bactéries dites nitrifiantes (Speitel et al 1991b).

5.2.1 Méthylotrophes

Les méthylotrophes sont des bactéries qui utilisent des composés n'ayant, dans la majorité des cas, qu'un seul atome de carbone (Speitel et al, 1991a). Dans cette famille de bactéries, les plus scrutées sont sans contredit les méthanotrophes. Ces dernières sont à la biodégradation aérobie ce que les méthanogènes sont à la biodégradation anaérobie. Elles ont d'ailleurs recours au méthane résultant du métabolisme des méthanogènes pour leur énergie et leur croissance (Strand et al, 1991).

Pour être en mesure de métaboliser le méthane, les méthanotrophes synthétisent des méthane-mono-oxygénases ou MMO. Ces enzymes ont un spectre d'activité assez large quant aux substrats sur lesquels elles peuvent agir. Elles sont par

conséquent capables d'oxyder des produits analogues à leur substrat de base, le dichlorométhane et le trichlorométhane entre autres (Lanzarone et McCarty, 1990). L'oxydation des solvants chlorés aliphatiques par les méthanotrophes est donc un phénomène de co-métabolisme (Halden et Chase, 1991).

Methylosinus LAC est un exemple de bactérie qui a été isolée lors d'une étude portant sur la biodégradation du trichlorométhane et du trichloroéthylène par oxydation (Alvarez-Cohen et al, 1992). *Methylosinus trichosporium OB3b* est une autre espèce du genre impliquée dans la dégradation de solvants chlorés et dont l'activité de l'oxygénase qu'elle produit a été suivie par Bowman et Sayler (1994). Eng et al (1991), l'ont quant à eux étudiée pour la biodégradation du trichloroéthylène. Ce dernier est également dégradé par un autre méthanotrophe: *Methylomonas methanica 68-1* (Koh et al, 1993).

Dans les exemples mentionnés ci-dessus, il a été question de biodégradation par des souches pures. Cependant, quand le but visé concerne la biodégradation *in-situ*, il faut prendre en considération les populations mixtes. Henson et al (1989), ont étudié le mécanisme de dégradation d'alcènes ainsi que d'alcènes chlorés en utilisant des cultures mixtes en présence de méthane. L'oxydation du chloroforme dans un échantillon de

sol, donc en présence de diverses formes bactériennes, a été suivie par Strand et Shippert (1986); le méthane fut utilisé comme source de carbone. Wilson et Wilson (1985), qui d'après la littérature sont les premiers à avoir invoqué la biodégradation co-métabolique des solvants chlorés par des méthanotrophes, ont réalisé la même expérience avec le trichloroéthylène.

À propos de l'utilisation d'un gaz naturel pour soutenir la dégradation de solvants chlorés, il faut mentionner le propane qui joue le même rôle que le méthane. Les bactéries qui effectuent la dégradation, *Mycobacterium vaccae* JOB5 par exemple, synthétisent des propane-mono-oxygénases (Vanderberg et Perry, 1993).

La nécessité de devoir ajouter du méthane ou du propane dans le milieu afin de favoriser la biodégradation des solvants chlorés par les méthylotrophes ne présente pas de problème dans la mesure où les gaz naturels sont abondants et qu'ils sont économiques. Cependant, le mélange de ces gaz avec l'oxygène de l'air peut être explosif, d'où le besoin d'exercer un contrôle strict dans leur utilisation.

5.2.2 *Pseudomonas*

Le second groupe impliqué dans la biodégradation de solvants chlorés aliphatiques en condition aérobie utilise les voies cataboliques des substances aromatiques, tel le phénol, pour la déhalogénéation. Ces dernières servent de source de carbone et d'énergie. Ce groupe est représenté en majorité par les *Pseudomonas*.

Les composés aromatiques comme le toluène, le phénol ou encore le benzène sont des contaminants largement répandus dans l'environnement à cause de leur utilisation abondante par diverses industries. Par conséquent, un grand nombre de bactéries sont capables de les minéraliser (Shin et Yang, 1992). Le métabolisme bactérien de ces divers composés est possible grâce à la synthèse de mono- et de di-oxygénases, qui sont les catalyseurs du processus d'oxydation de ces substrats (Shields et al, 1989). Tout comme les mono-oxygénases produites par les méthylotrophes, les oxygénases synthétisées par les *Pseudomonas* font preuve d'une capacité à interagir avec plusieurs substrats.

D'après Nelson et collaborateurs (1987), le processus de déhalogénéation, passant par la voie catabolique des substances aromatiques, serait le résultat d'une conversion des organo-

chlorés en époxydes par les oxygénases. Il s'en suivrait une formation de produits instables susceptibles à un réarrangement intramoléculaire spontané, pour finalement aboutir à des intermédiaires non-chlorés. À leur tour ces derniers pourraient être convertis en dioxyde de carbone par des oxydations enzymatiques ou chimiques. Toutefois, il est à noter que la formation d'époxyde ne concerne que les alcènes chlorés, les alcanes ne possédant pas de double lien (Vogel et al, 1987).

Nelson et al (1988), ont prouvé le rôle spécifique d'une toluène-di-oxygénase synthétisée par un mutant de *Pseudomonas putida* dans la dégradation du trichloroéthylène. Dans le même ordre d'idée, Fan et Scow (1993), n'ont pu observer la dégradation de ce solvant en absence de toluène.

Le phénol constitue une autre alternative pour les études de biodégradation de solvants chlorés en présence de composés aromatiques. Coyle et al (1993), ont pu établir que la dégradation du trichloroéthylène, par *Pseudomonas putida F1*, se faisait lorsque le phénol tenait lieu de source de carbone. Par ailleurs, ils ont noté dans leur expérience que le taux de dégradation du trichloroéthylène était directement proportionnel à la concentration du phénol. Folsom et al (1990), ont aussi mis en évidence l'implication du phénol dans

la biodégradation du trichloroéthylène par *Pseudomonas cepacia* G4. Mais contrairement à Coyle et ses collaborateurs, ils ont noté une certaine compétition inhibitrice entre les deux substrats.

D'autres substrats favorisant la biodégradation des solvants chlorés aliphatiques ont été examinés. Le xylène et divers composés benzéniques ont été analysés par Oldenhuis et al (1989a). Dabrock et al (1992), ont trouvé pour leur part que l'isopropyl benzène ou cumène facilitait la biodégradation du dichlorométhane.

5.2.3 Bactéries nitrifiantes

La dernière grande famille de bactéries, dites nitrifiantes, étudiées en condition aérobie transforme l'azote ammoniacal en nitrite par oxydation. Elles synthétisent des mono-oxygénases ammoniacales qui oxydent les solvants chlorés par co-métabolisme (Vanelli et al, 1990). Ces derniers à l'instar de Rasche et al (1991) ont étudié *Nitrosomonas europaea* qui est capable d'oxyder le dichlorométhane et le trichlorométhane.

5.3 Compétition inhibitrice entre co-substrats

Le co-métabolisme obligatoire observé chez les trois groupes de bactéries passés en revue pose un problème de compétition de type inhibiteur entre le substrat primaire (méthane, toluène, azote ammoniacal), et le co-substrat (solvant halogéné). Cette compétition a trait à la disponibilité des sites actifs des différentes oxygénases catalysant les réactions d'oxydation. Quant aux composés aromatiques, la difficulté inhérente à leur utilisation pour la restauration de sites vient du fait qu'ils sont eux aussi des polluants importants de l'environnement.

5.4 Solvants comme source principale de carbone et d'énergie

Jusqu'à maintenant, la biodégradation en condition aérobie a été abordée en terme de co-métabolisme. Il est toutefois évident que le travail qui s'effectue dans l'optique d'une biorestauration bénéficierait davantage de l'utilisation directe des solvants chlorés comme source principale de carbone et d'énergie par les bactéries.

De telles bactéries ont été isolées par plusieurs équipes de chercheurs. L'utilisation du dichlorométhane pour la

croissance bactérienne a été rapportée par Brunner et al (1980). La souche surnommée *DM1* procéderait à une déhalogénéation du solvant grâce à une halidohydrolase effectuant la substitution d'un atome de chlore par un hydroxyle.

Vandenberg et Kunka (1988), ont isolé un *Pseudomonas fluorescens* capable de se servir du trichloroéthane et du trichloroéthylène en rajoutant ces substrats dans la phase gazeuse du milieu de culture.

Le dichloroéthane constitue un autre exemple de solvant chloré pouvant soutenir la croissance de certaines bactéries. En effet, Stuki et al (1983), ont isolé et étudié une souche désignée sous le nom de *DE2* douée de cette capacité métabolique. *Xantobacter autotrophicus GJ10* isolée par Janssen et al (1985), est un autre exemple d'espèce bactérienne capable de croître avec le dichloroéthane comme unique source de carbone. Cette bactérie présente une caractéristique non négligeable pour son utilisation dans la biorestauration: la déhalogénase responsable de la dégradation du solvant est synthétisée de façon constitutive.

Le chlorure de vinyle, si souvent décrit comme un intermédiaire persistant apparaissant lors de la dégradation

réductrice du trichloroéthylène et du tétrachloroéthylène en condition anaérobie, a lui aussi été dégradé par des bactéries sans l'ajout d'autres substrats carbonés (Davis et Carpenter, 1990).

Finalement, le tétrachloroéthylène décrit dans la littérature comme un solvant récalcitrant en condition aérobie, et cela même par co-métabolisme, serait en mesure de soutenir la croissance de *Pseudomonas sp.* (Deckard et al, 1994).

Si l'utilisation des solvants chlorés comme source de carbone et d'énergie par les microorganismes est souhaitable et recherchée, l'isolement des bactéries détentrices des voies cataboliques nécessaires est un phénomène assez rare. Janssen et al (1990) rapportent les difficultés rencontrées lors de tests effectués avec plusieurs séries d'inocula, peu d'entre eux ayant donné des réponses positives. Le Tableau 1 donne quelques exemples de souches bactériennes pouvant dégrader des solvants chlorés.

Il se dégage de cette revue de littérature que le phénomène de biodégradation des solvants chlorés aliphatiques par les bactéries doit être analysé presque cas par cas. En effet, on remarque que plusieurs points importants sont sujets à contradiction dans les publications. Par exemple, un auteur

peut parler de toxicité d'un solvant alors qu'un autre fait état de la biodégradation de ce même solvant à des concentrations relativement élevées.

Par ailleurs, pour bien évaluer la performance de biodégradation d'un solvant par une souche, il faut porter attention à plusieurs facteurs. Premièrement, la concentration initiale du solvant: une souche qui dégrade 50 ppm de solvant ne peut être évaluée sur la même base que celle qui en dégrade dix fois plus. Dans ce même contexte, le temps nécessaire à la biodégradation devient un critère important. Certaines souches dégradent le substrat en quelques heures, alors que pour une concentration identique, d'autres souches auront besoin de plusieurs semaines. Un troisième point à surveiller concerne la présentation des résultats, surtout lorsqu'ils sont présentés en pourcentage de disparition du solvant. Il s'agit alors de déterminer la concentration initiale réelle du produit.

Cette évaluation de la biodégradation des solvants chlorés est d'autant plus difficile que la présentation des données souffre d'un manque de standardisation, en particulier au niveau des unités de mesure.

Tableau 1: Exemples de bactéries effectuant la biodégradation de divers solvants chlorés aliphatiques en condition aérobie.

Solvants	Bactéries	Références
Dichlorométhane	<i>Pseudomonas DM1</i>	Brunner et al (1980)
	<i>Hyphomicrobium DM2</i>	Stucki et al (1983)
Dichloroéthane	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	Janssen et al (1985)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Vandenberg et Kunka (1988)
Trichlorométhane	<i>Nitrosomonas europea</i>	Vanelly et al (1990)
Trichloroéthylène	<i>Methylosinus trichosporium</i>	Oldenhuis et al (1989)
Tétrachloroéthylène	<i>Pseudomonas spp.</i>	Deckard et al (1994)

6. Méthodologie exploitée

Qu'il s'agisse d'étudier des cultures axéniques ou des cultures mixtes de bactéries effectuant la biodégradation des solvants chlorés, par co-métabolisme ou comme substrat de croissance, les étapes méthodologiques utilisées sont devenues assez standard au cours des décennies de travaux dans le domaine. Cependant, selon les auteurs et les laboratoires, il existe des variations techniques dans les approches méthodologiques imputables à l'expérience accumulée et aux succès obtenus. Les méthodes employées concernent principalement l'isolement des bactéries actives ainsi que la mise en évidence de la biodégradation. Pour en arriver là, il faut passer par des méthodes d'enrichissement de cultures et de sélection des bactéries capables de dégrader les produits en cause.

6.1 Culture des bactéries

Tout d'abord, l'isolement d'une bactérie ou d'un consortium se fait dans un milieu minimal à base de sels minéraux (van den Wijngaard et al, 1993). À ce milieu de base, divers suppléments nutritifs nécessaires à la croissance bactérienne peuvent être ajoutés. Dans la majorité des cas, des éléments métalliques, de même que des solutions de vitamines

sont ajoutés en traces (Dabrock et al, 1992). D'autres suppléments plus ou moins empiriques comme l'extrait de levure peuvent aussi être introduit dans le milieu (Oldenhuis et al, 1989b).

Le substrat qui doit subir la dégradation sera ajouté sous forme liquide, dilué ou non, ou à l'état gazeux (système continu) dans un milieu liquide ou semi-liquide. Dans un milieu solide (de la gélose) le substrat peut être déposé sur un disque de papier filtre et placé dans le couvercle du vase qui sera incubé en position renversée (Dabrock et al, 1992). Il se peut que le composé à dégrader ne puisse soutenir la croissance des microorganismes. Dans le cas échéant, un co-substrat servant de source de carbone et d'énergie sera ajouté dans le milieu de culture.

Les bactéries seront ajoutées au milieu en souches pures ou en populations mixtes provenant d'échantillons de sites contaminés ou non par les substances à dégrader. Ces échantillons, sources potentielles de microorganismes, proviennent des eaux usées municipales, d'effluents d'usines, des réserves de la nappe phréatique, de rivières ou d'échantillons de sols contaminés. L'inoculation du milieu de culture à partir d'échantillons puisés dans l'environnement se fait en général à raison de 10% poids/volume ou volume/volume

(Henson et al, 1989).

Les solvants chlorés aliphatiques, comme il a été déjà mentionné, ont généralement un point d'ébullition relativement faible et par conséquent sont assez volatils. Les cultures sont souvent effectuées dans des contenants fermés, c'est-à-dire, clos de façon hermétique, qu'il s'agisse d'Erlenmeyers ou comme c'est plus souvent le cas de bouteilles sérologiques. Il est primordial de prendre soin de laisser suffisamment d'air (oxygène) dans le contenant dans le cas de cultures aérobies; donc, le rapport entre le volume de la culture et le volume du contenant sera faible. Un autre problème rencontré dans l'utilisation des solvants chlorés est leur facilité d'absorption sur différents matériaux supposés inertes. Ceci rend l'emploi du verre (de type borosilicate) de loin préférable et préféré à celui du plastique. Pour fermer les contenants, les septums de Téflon (DiStephano et al, 1992), un matériau inerte, sont d'usage courant.

En ce qui à trait à l'incubation des cultures, elle se fait en général entre 25-30°C à l'obscurité pour éviter la photolyse des solvants (Holliger et al, 1993), ce qui aurait tendance à fausser les résultats quant à leur taux de biodégradation réelle. Le milieu sera aussi agité afin de permettre un meilleur transfert continu du solvant de la

phase gazeuse à la phase liquide et une aération optimale. Souvent dans les travaux publiés, la concentration des solvants est donnée comme s'il y avait dissolution complète dans la phase liquide. Or, dans les faits il s'établit un équilibre entre les deux phases du milieu: liquide et gazeuse. Cet équilibre est régit par la loi d'Henry. Chaque substance possède sa constante d'Henry déterminée par le rapport de sa concentration en phase gazeuse et sa concentration en phase liquide selon la formule suivante:

$$H_c = \frac{[\text{solvant}]_g}{[\text{solvant}]_l}$$

H_c : constante d'Henry

g : phase gazeuse

l : phase liquide

6.2 Détermination de la biodégradation des solvants

Pendant ou vers la fin de la période d'incubation, la vérification de la biodégradation est faite à partir de diverses mesures. Deux méthodes principales sont utilisées pour arriver à déterminer la biodégradation du substrat.

Dans un premier temps, la concentration d'ions chlore dans le milieu peut être mesurée, soit par une méthode utilisant la

colorimétrie (Vanderberg et Perry, 1993), soit grâce à une électrode sélective pour les dits ions (Nelson et al, 1987). Le choix de cette dernière méthode d'analyse exige l'utilisation d'un milieu dépourvu de tout chlore d'origine autre pour la culture des bactéries (Deckard et al, 1994).

La seconde façon de mettre en évidence la biodégradation est de suivre la disparition du solvant en question. Le procédé le plus simple consiste, après équilibre du système, à faire l'analyse de la phase gazeuse du milieu de culture. Cette analyse est plus connue sous le terme de «head-space analysis» (Fan et Scow, 1993). Un autre procédé implique l'extraction du milieu de culture avec d'autres solvants. Les exemples suivants sont couramment utilisés: le pentane, l'hexane, l'octane et l'éther. Le milieu à extraire peut l'être en partie ou en totalité. (Deckard et al, 1994; Coyle et al, 1993; Cobb et Bower, 1991; Koh et al, 1991; Janssen et al, 1985).

Une fois l'extrait obtenu, il est déshydraté par l'addition de sulfate de magnésium ou de sodium avant d'être analysé, à l'instar du processus de «head-space analysis», par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur approprié. Il existe deux types de détecteurs pour ce genre d'analyse: le détecteur à ionisation de flamme (FID) et celui à capture d'électron (ECD) (Broholm et al, 1991). Ce dernier est jusqu'à

cent fois plus sensible que le premier. L'utilisation d'un standard interne approprié lors des analyses par chromatographie en phase gazeuse permet de quantifier de façon adéquate les solvants chlorés (Janssen et al, 1985). Le suivi de la disparition des solvants chlorés du milieu de culture par chromatographie en phase gazeuse peut se coupler à l'identification des intermédiaires de la biodégradation en associant la spectrométrie de masse à la chromatographie (Gälli et McCarty, 1989).

6.3 Suivi de la croissance bactérienne

Une autre manière de s'assurer du bon déroulement de toute la procédure est de suivre la croissance bactérienne comparativement à un témoin. Encore une fois, cela peut se faire de différentes façons:

- mesure de la densité optique grâce à un spectrophotomètre (Bowman et Sayler, 1994),
- mesure de la synthèse des protéines (Gälli et McCarty, 1989),
- évaluation de la biomasse par la mesure du poids sec des échantillons (Alvarez-Cohen et McCarty, 1991a),
- compte bactérien par l'inoculation des

échantillons sur milieux adéquats (Dabrock et al, 1992).

Il ne peut être affirmé qu'il y a biodégradation, donc action bactérienne, si des contrôles abiotiques, stériles, ne sont pas menés parallèlement à l'expérience de biodégradation proprement dite (Davis et Madsen, 1991).

Matériel et méthodes

1. Source des bactéries

Au début de cette étude une banque contenant 57 isolats bactériens a été utilisée. Ces bactéries avaient été isolées à partir du sol de la sablière Thouin. Cette dernière, située dans la région de l'Assomption, est surtout contaminée par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). La caractérisation chimique du site a révélé qu'on y retrouve en certains points de très faibles quantités de solvants chlorés aliphatiques.

D'autres isolats bactériens ont été obtenus à la suite d'un enrichissement d'échantillons de sol provenant de réacteurs ensemencés à partir de la sablière Thouin. Deux autres enrichissements ont été effectués dans le but d'obtenir des consortiums bactériens. Pour le premier de ces enrichissements, un sol contaminé au pentachlorophénol (PCP) a été utilisé. Le dernier enrichissement a été réalisé à partir d'échantillons de sol prélevés autour des réservoirs souterrains de solvants localisés près de l'usine Sico qui fabrique de la peinture. Ce sol a été jugé plus propice à l'établissement de populations bactériennes aptes à procéder à la biodégradation des solvants chlorés aliphatiques visés par la présente étude. Finalement, deux souches bactériennes de références ont été obtenues du laboratoire du docteur Janssen.

2. Milieux de culture

Les milieux à base de soya digéré ont été utilisés pour la conservation des bactéries, que ce soit sur gélose le TSA «Tryptic Soy Agar», ou en milieu liquide le TSB «Tryptic Soy Broth». Lorsqu'il s'agissait de cultiver les bactéries en présence des solvants, le milieu minimal Bushnell-Haas, à base de sels minéraux, était employé. Selon les expériences entreprises, ce milieu était utilisé seul ou enrichi d'extrait de levure et de tryptone à diverses concentrations dans un rapport poids/volume.

La stérilisation des milieux de culture et du matériel utilisé se faisait à l'autoclave à 121°C durant 20 minutes, sauf pour les boîtes de Petri en verre qui ont été stérilisées au four Pasteur à 180°C durant 2 heures. Le travail en condition aseptique était réalisé autour d'une flamme produite par un brûleur au gaz ou sous une hotte laminaire. Dans les deux cas, les surfaces de travail étaient au préalable nettoyées soit avec de l'éthanol à 70%, soit de la proviodine diluée.

3. Solvants à traiter et autres produits chimiques

Six solvants chlorés aliphatiques ont été utilisés comme

substrats dans le cadre de cette étude (Figure 3). Ils sont regroupés en deux ensembles: les alcanes et les alcènes. Le premier regroupe les molécules saturées: le dichlorométhane (DCM), le 1,2-dichloroéthane (DCE), le trichlorométhane plus connu sous le nom de chloroforme (CF) et le tétrachloroéthane (TCA). Deux alcènes ont été utilisés: le trichloroéthylène (TCE) et le tétrachloroéthylène (PCE). Ces composés sont insaturés et possèdent des doubles liens carbone-carbone. Deux substances aromatiques: le toluène et le phénol ont été employées lors des expériences d'utilisation de co-substrats.

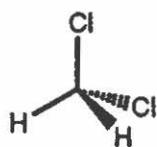
Par ailleurs, deux indicateurs colorés ont été utilisés pour vérifier les conditions de croissance. Le premier, la résazurine, pour la vérification de la présence d'oxygène dans le milieu de culture en bouteilles sérologiques. Le second indicateur, le bleu de bromothymol, est employé pour le suivi de la variation du pH dans un milieu de culture. Dans cette étude, il l'a été pour déterminer s'il y avait déchloration des solvants chlorés par certaines bactéries.

4. Croissance des bactéries en présence des solvants

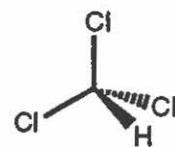
Cette première série d'expériences avait pour but de vérifier si les 57 isolats montraient une meilleure croissance en présence des solvants chlorés ajoutés et ainsi mettre en

FIGURE 3: Solvants chlorés aliphatiques dont la biodégradation est étudiée en condition aérobie.

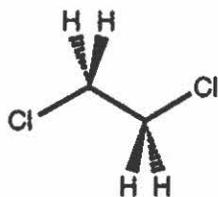
Dichlorométhane



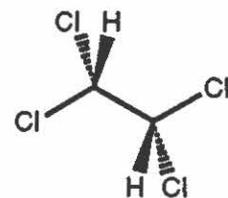
Trichlorométhane



1,2-Dichloroéthane



1,1,2,2-Tétrachloroéthane



Trichloroéthylène



Tétrachloroéthylène



évidence l'utilisation des solvants chlorés comme source de carbone. Un groupe contrôle où les solvants étaient omis a été utilisé pour fin de comparaison. Cette expérience a été effectuée d'abord en milieu gélosé et par la suite en milieu liquide.

4.1 Étude en milieu solide

Le milieu minimal Bushnell-Haas additionné d'agar et où le dichloroéthane servait de source de carbone a été utilisé pour la première expérience. Le milieu gélosé a été coulé dans des boîtes de Petri en verre. L'inoculation des 57 isolats de la banque a été effectuée à partir des cultures maintenues en TSB avec l'anse bouclé d'un manche de Koch. Deux groupes de boîtes de Petri ont été inoculés, un pour la croissance avec le dichloroéthane et l'autre servant de contrôle. Dans un premier temps, 20 μ l de solvant ont été versés sur un morceau de papier filtre déposé dans le couvercle des boîtes de Petri. Les boîtes de Petri ont été enveloppées individuellement avec du parafilm, l'ensemble a été placé dans des sacs de plastique et incubé à température de la pièce (20-21°C). Après une semaine d'incubation, un autre volume de 60 μ l a été rajouté et les échantillons ont été incubés pendant une autre semaine.

Lors de la deuxième étape de cette démarche le dichlorométhane, le trichlorométhane, le tétrachloroéthane et le trichloroéthylène ont été utilisés comme substrats potentiels à raison de 60 μ l. Cette fois-ci le milieu minimal a été enrichi de tryptone et d'extrait de levure à 0,1% (p/v) chacun. Par ailleurs, les boîtes de Petri ont été emballées dans du papier d'aluminium plutôt que du parafilm. Après chaque semaine d'incubation pendant deux semaines, toujours à la température ambiante, les boîtes ont été inspectées visuellement pour évaluer la croissance des bactéries dans les deux groupes.

4.2 Étude en milieu liquide

Pour l'étude de la croissance des isolats en milieu liquide, le milieu Bushnell-Haas enrichi d'extrait de levure à 0,5% (p/v) et de tryptone à 0,1% (p/v) a été utilisé. L'inoculum, provenant des cultures de maintenance dans le TSB, a été fait de manière à obtenir entre 0,1 et 0,2 de densité optique à 450 nm, en effectuant des dilutions au besoin. Les cultures en éprouvette étaient encore une fois en duplicata, un groupe avec et l'autre groupe contrôle sans solvant. Pour sceller le plus hermétiquement possible les éprouvettes et pour éviter les réactions possibles entre les solvants et les bouchons de silicone, ces derniers ont été enveloppés de ruban

de Téflon. Les éprouvettes contenant 8 ml de culture au total ont été incubées à 28-29°C à l'obscurité. Quotidiennement, les cultures ont été agitées au vortex. La croissance des bactéries a été suivie sur une période de 6 ou 7 jours à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm. Les solvants, le dichlorométhane, le dichloroéthane, le trichlorométhane et le tétrachloroéthane ont été ajoutés aux cultures à la concentration de 1 000 ppm; quant au tétrachloroéthylène il a été ajouté à la concentration de 500 ppm. Une seringue étanche, de type «gastight», a été employée pour ajouter les solvants. Lorsque les isolats montraient une meilleure croissance en présence d'un solvant comparativement à la culture contrôle, l'expérience était reprise en triplicata avec ces isolats pour confirmer les premières observations. Ces expériences de confirmation ont été répétées dans les mêmes conditions que celles de départ.

5. Enrichissements à partir du sol de la sablière Thouin

Pour améliorer les chances d'obtenir des microorganismes possédant un potentiel de biodégradation des solvants chlorés, des enrichissements de cultures à partir de divers réacteurs ont été entrepris. Ces réacteurs contenant du sol de la sablière Thouin ayant reçu divers amendements, tel l'ajustement du rapport carbone:azote:phosphore. Dans ces réacteurs une microflore particulièrement adaptée métabolisait les

hydrocarbures polycycliques, principaux contaminants du site. Trois réacteurs ont été échantillonnés: le réacteur n° 13 aux jours 0 et 154 (R13-T0 et T154), le n° 16 aux jours 0 et 151 (R16-T0 et T151) et le n° 18 au jour 0 (R18-T0). À partir de chaque réacteur, six échantillons de 2,5 gr de sol ont été inoculés dans 25 ml de milieu minimal Bushnell-Haas. À ces six cultures, les solvants étudiés, au nombre de six, ont été rajoutés séparément. Ainsi, pour chaque réacteur, il y avait six cultures avec chacune un solvant différent. Des éprouvettes à bouchons vissés dans lesquels un septum de Téflon avait été placé ont été utilisées. L'incubation des échantillons a été réalisé entre 28-30°C, à l'obscurité, avec agitation quotidienne, pendant une semaine après laquelle il y avait ré-inoculation des échantillons dans un milieu de culture frais. Le Tableau 2 fait état de la quantité, en μ l, de chaque solvant ajouté pendant les quatre semaines qu'ont duré les enrichissements de cultures.

Pendant les trois premiers passages, il y a eu ré-inoculation des cultures, principalement le surnageant, dans le milieu Bushnell-Haas non-enrichi et un inoculum de 10% (v/v) était utilisé. Au quatrième passage, soit à la quatrième semaine d'enrichissement, l'inoculum a été porté à 20% (v/v) et contrairement aux trois premières semaines le milieu a été enrichi de tryptone et d'extrait de levure à 0,1% (p/v) chacun.

Tableau 2 : Quantité de solvant chloré (en μl) ajoutée aux enrichissements de cultures à chacun des passages.

Solvants	Passages			
	1 ^e	2 ^e	3 ^e	4 ^e
DCM	19	20	22	25
DCE	19	20	22	25
CF	17	18	20	20
TCA	16	17	19	20
TCE	9	10	15	15
PCE	5	5	10	10

DCM : dichlorométhane

DCE : dichloroéthane

CF : trichlorométhane

TCA : tétrachloroéthane

TCE : trichloroéthylène

PCE : tétrachloroéthylène

5.1 Inoculation sur gélose

Puisque le but de l'expérience était de mettre en évidence des isolats sélectionnés ayant un potentiel de biodégradation, les différentes cultures ont été inoculées sur gélose TSA en boîtes de Petri et ce à chaque passage. Les colonies obtenues à partir des enrichissements de cultures avec les solvants ont été comparées avec des colonies provenant de cultures contrôles n'ayant jamais reçu de solvant. Au bout de quatre semaines d'enrichissement les colonies présentant des traits phénotypiques différents de celles des milieux contrôles ont été retenues pour caractérisation.

5.2 Cultures en milieu liquide

Tout comme dans le cas de la première expérience, la croissance des isolats obtenus par enrichissements de cultures a été étudiée en milieu liquide minimal enrichi avec ajout de solvants chlorés dans un groupe, alors que le groupe contrôle en est dépourvu. Le solvant employé pour chaque isolat a été celui qui avait permis de le mettre en évidence au cours de l'étape d'enrichissement. Après cette étape les cultures donnant une croissance jugée significative par rapport au tube contrôle ont été confirmées en répétant l'expérience en triplicata.

6. Enrichissements à partir de sol contaminé au pentachlorophénol (PCP)

À la différence des enrichissements précédents, ceux effectués à partir du sol contaminé au pentachlorophénol avaient pour but de mettre en évidence des consortiums ayant un potentiel de biodégradation des solvants chlorés aliphatiques. Ces enrichissements ont été effectués dans des bouteilles sérologiques de 50 ml fermées par des bouchons de butyle enveloppés de ruban de Téflon scellés par des capsules d'aluminium. Le milieu Bushnell-Haas enrichi de tryptone et d'extrait de levure à 0,1% (p/v) a été utilisé. Pour les deux premiers passages, ces derniers étant effectués à une semaine d'intervalle, tous les solvants ont été ajoutés à une concentration de 200 ppm. Au troisième passage, ces concentrations ont été doublées sauf dans le cas du tétrachloroéthane et du tétrachloroéthylène. Les échantillons ont été incubés à 25-27°C, à l'obscurité, et agités à environ 150 rpm. Encore une fois, au moins quatre passages étaient réalisés avant que les analyses de biodégradation par chromatographie en phase gazeuse soient effectuées.

7. Enrichissements à partir du sol Sico

Divers échantillons de sol provenant des environs de

l'usine de fabrication de peinture de la compagnie Sico, à Montréal, ont été recueillis. Les solvants chlorés aliphatiques étant employés couramment dans l'industrie de la peinture, il a été jugé que ce site était propice à l'établissement de populations bactériennes aptes à les dégrader. Un total de six prélèvements a été effectué. Les quatre premiers échantillons ont été pris dans le sol autour des réservoirs, trois d'entre eux étaient plutôt secs et le quatrième boueux. Les deux autres échantillons ont été prélevés plus en profondeur, entre 3 et 7 mètres. Les échantillons ont été séparés en trois groupes: l'échantillon boueux a été inoculé seul (Sico I), ceux qui étaient secs et prélevés autour des réservoirs ont été mis ensemble (Sico II), alors que ceux prélevés en profondeur formaient le dernier groupe (Sico III). L'inoculation des échantillons a été faite à raison de 20% (p/v), soit 20 gr de sol dans 100 ml de milieu Bushnell-Haas enrichi de tryptone à 0,1% (p/v) et d'extrait de levure à 0,05% (p/v). Pour le premier passage deux solvants ont été utilisés en mélange: le dichloroéthane et le trichloroéthylène à 250 ppm chacun. Ces cultures ont été menées dans des bouteilles de 500 ml dont les bouchons étaient doublés d'un septum de Téflon. Les conditions d'incubations étaient les suivantes: 23-25°C, à l'obscurité et agitation à 150 rpm. Lors des ré-inoculations effectuées après une semaine d'incubation, un inoculum de 10% (v/v) a été utilisé. Dès le second passage, les trois groupes

d'échantillons ont été inoculés chacun avec l'un des six solvants. La concentration des solvants dans le milieu était de 500 ppm sauf pour le tétrachloroéthane et le tétrachloroéthylène à 250 ppm. Des volumes de 25 ml de culture ont aussi été transférés dans des bouteilles sérologiques de 125 ml.

8. Enrichissements en présence de co-substrats

Un échantillon de sol contaminé au pentachlorophénol ainsi que des échantillons de sol de la compagnie Sico ont été employés dans des enrichissements de cultures avec les solvants chlorés et deux co-substrats: le toluène et le phénol. Le processus d'enrichissement a été le même que celui utilisé précédemment pour les échantillons de sol Sico. Lors de la première inoculation, le dichloroéthane et le trichloroéthylène ont été utilisés en combinaison avec le toluène ou le phénol. Les solvants et les co-substrats ont été rajoutés à la concentration finale de 500 ppm, et chaque produit représentait environ un tiers de cette concentration. Toutes les cultures d'enrichissement ont été incubées à 23-25°C, à l'obscurité et agitées à 150 rpm. Pour tous les enrichissements, un minimum de quatre semaines s'écoulait avant que l'étape d'analyse par chromatographie en phase gazeuse soit entreprise.

9. Test d'oxygénation des cultures

La cultures des bactéries avec les solvants s'effectuant dans des contenants hermétiques, il a été nécessaire de faire des tests afin de vérifier si les milieux n'étaient pas déficitaires en oxygène même après une incubation prolongée. Dans un premier temps, par rapport à l'étude de croissance en éprouvettes, le test a été fait avec des bouteilles sérologiques de 50 ml remplies de culture au trois-quarts. Le test a été répété avec les bouteilles de 125 ml et d'autres à bouchons vissés de 500 ml contenant respectivement 25 ml et 100 ml de culture. Cette expérience a été réalisée avec la résazurine qui a été ajoutée dans le milieu de culture à la concentration de 1 mg/l.

10. Test d'acidification des milieux

Sachant que la biodégradation des solvants chlorés passe par leur déhalogénéation, donc la libération d'ions chlore qui acidifient le milieu; un test avec le bleu de bromothymol a été réalisé pour suivre la variation du pH. Cette expérience a été entreprise avec les cultures d'enrichissement du sol contaminé au pentachlorophénol en milieu solide d'abord et par la suite en milieu liquide. Dans le premier cas, le milieu Bushnell-Haas seul a été utilisé et 20 μ l de chaque solvant ont été déposés

sur la gélose et les bouteilles sérologiques contenant ces cultures ont été incubées à 28-29°C.

Pour cette dernière expérience un groupe contrôle non ensemencé a été utilisé. En ce qui a trait au milieu liquide, le milieu Bushnell-Haas enrichi de tryptone et d'extrait de levure à 0,05% (p/v) chacun a été employé. Les solvants y ont été rajoutés en concentration de 250 et 500 ppm tel que déjà mentionné pour l'enrichissement du sol utilisé. Les mêmes conditions d'incubation préalablement décrites pour les divers enrichissements ont été employées.

11. Suivi de la dégradation par chromatographie en phase gazeuse

Avant de procéder au suivi de la biodégradation des solvants chlorés par les différentes cultures, des essais préliminaires ont d'abord été effectués pour déterminer la sensibilité du détecteur à ionisation de flamme (FID) et quelle concentration minimale significative pouvait être détectée. Les solvants ont donc été dilués dans du pentane à la concentration de 200 ppm. Un échantillon a été mis dans un vial de 2 ml et analysé par GC-FID. L'étape suivante a été de trouver un standard interne permettant une quantification adéquate des solvants. Le fréon 113, l'acétonitrile, le toluène

ont été employés pour cet essai. Là encore, ces produits ont été dilués dans le pentane à une concentration de 200 ppm pour tenter de les détecter et ensuite dans des concentrations de 50 à 200 ppm pour vérifier leur stabilité et la reproductibilité de la méthode. Une fois les solvants détectés, donc les temps de rétention déterminés, et un standard interne trouvé, il s'agissait d'obtenir une courbe d'étalonnage pour chaque solvant. Dans cette optique, chaque solvant a été préparé dans une gamme de concentrations allant de 50 à 500 ppm et le standard interne a été ajouté à une concentration fixe de 200 ppm par échantillon. Les dits échantillons ont été préparés dans des vials dans un volume total de 1 ml.

11.1 Test d'extraction des solvants

Suite à l'établissement d'une courbe d'étalonnage, un test d'extraction des solvants à partir du milieu de culture a été effectué. Pour réaliser cette expérience 20 ou 25 ml de milieu de culture ont été placés dans des bouteilles sérologiques. Les solvants extraits séparément ont été rajoutés à raison de 400 ppm et 200 ppm pour le tétrachloroéthylène. Les échantillons ont été incubés à 30°C et agités à 200 rpm pendant une heure. Ils ont ensuite été placés dans un bain d'eau glacée avant que les bouteilles ne soient décapsulées, de façon à minimiser les pertes par volatilisation. L'extraction du milieu de culture a

été faite avec le pentane en trois fois: 10-5-5 ml. Aux premiers 10 ml, le standard interne a été ajouté de manière à obtenir une concentration de 200 ppm dans l'extrait final. Après chaque ajout de pentane l'échantillon est agité à la main et après séparation des phases organique et aqueuse, le pentane est prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur et gardé dans un tube vissé de 50 ml. L'extrait est ensuite asséché avec du sulfate de sodium avant d'être jaugé dans un ballon de 25 ml. Des échantillons sont ensuite placés dans des vials pour analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Les tests de détection des solvants, la recherche d'un standard interne, la mise au point des courbes d'étalonnage, les test d'extraction ont tous été repris avec le détecteur à capture d'électron (ECD), ceci en partant des résultats obtenus précédemment avec le détecteur à ionisation de flamme. Pour chaque détecteur, les expériences ont été répétées plusieurs fois pour standardiser la méthode, optimiser les performances et confirmer les résultats.

11.2 Analyse de la biodégradation par les bactéries

Les premières analyses, par chromatographie en phase gazeuse, qui visaient la mise en évidence de la biodégradation des solvants par les isolats bactériens, ont été effectuées en

utilisant le détecteur à ionisation de flamme (Brunner et al, 1980). Lors de ces expériences le milieu minimal de base enrichi de tryptone à 0,1% (p/v) et d'extrait de levure à 0,5% (p/v) a été utilisé. Les échantillons étaient préparés en duplicata et la totalité du contenu était sacrifié lors des extractions. Le suivi de la biodégradation allait du jour 0, établit une heure après le début de l'incubation, jusqu'au jour 15 avec des dosages périodiques en cours d'expérience. Les solvants chlorés ont été ajoutés à une concentration de 500 ppm dans les cultures, sauf dans le cas du tétrachloroéthylène où cette quantité a été réduite de moitié. Les bouteilles sérologiques ont été incubées à l'obscurité à 25-26°C et agitées à environ 150 rpm. Pour l'extraction des solvants, la même procédure fut utilisée avec les milieux contrôles non inoculés.

Un peu plus tard, ces expériences ont été reprises avec les mêmes isolats mais en utilisant un détecteur à capture d'électron. La procédure de suivi de la biodégradation des solvants chlorés par les consortiums, obtenus après les enrichissements de cultures, est la même que celle appliquée pour les isolats bactériens. Il est à noter que le détecteur à capture d'électron nécessitait la dilution des échantillons à cause de sa plus grande sensibilité pour les solvants chlorés. Cette dilution était fonction du solvant extrait et de sa

concentration de départ. Par ailleurs, il a aussi fallu déterminer un autre standard interne pour la quantification des solvants. Le nitrobenzène, l'ortho-dichlorobenzène et le méta-dichlorobenzène sont les trois produits qui ont été testés.

Résultats et discussion

1. Étude de la croissance des bactéries sur gélose

L'expérience qui a été effectuée pour étudier la croissance d'isolats bactériens (provenant de la sablière Thouin) inoculés sur gélose en présence de divers solvants comme source de carbone n'a pas permis de mettre en évidence une croissance bactérienne attribuable à ces solvants. À la fin des périodes d'incubation certains isolats présentaient une très faible croissance, alors que pour d'autres, elle était nulle. De plus, il a été observé que dans plusieurs cas, il y avait une meilleure croissance de l'isolat sur la gélose-contrôle, sans ajout de solvant, versus celui pour lequel un solvant avait été ajouté. Puisque le milieu contrôle dépourvu de solvant ne contient théoriquement aucune source de carbone, il faut invoquer la présence d'impuretés dans le milieu, ou encore l'apport de traces de nutriments dans l'inoculum pour tenter d'expliquer la croissance bactérienne observée. En outre, pour les situations où le contrôle croissait mieux que l'isolat avec solvant, la toxicité de ce dernier peut probablement être mise en cause. Par exemple, Vargas et Ahlert (1987) parlent de toxicité du dichloroéthane à une concentration de 35 ppm seulement. Une inhibition de la croissance bactérienne par trichloroéthylène à 14 ppm a été rapportée par Eng et al (1991).

Lorsqu'aucune croissance, ou très peu, n'était visible dans les deux groupes de l'expérience, une volatilisation trop rapide des solvants pouvait être envisagée comme explication, cela en dépit des efforts pour bien sceller les boîtes. Pour pallier au problème de volatilisation, certains auteurs proposent l'utilisation d'un contenant à fermeture hermétique (Dabrock et al, 1992) où sont placés les boîtes de Petri et un médium imbibé du solvant à étudier. Cette méthode règle évidemment le problème de la volatilisation des produits, mais en soulève un autre tout aussi important sinon davantage: la toxicité. En effet, la concentration du solvant n'étant pas véritablement contrôlée, cette méthode empirique peut s'avérer «risquée» pour les microorganismes; puisque dans un effort de sélection, les bactéries, plus ou moins sensibles à une concentration relativement élevée de solvants, risquent une élimination spontanée. La pauvreté du milieu pouvait également être soulevée, ce dernier n'étant composé que de sels minéraux. Il est connu que certaines souches bactériennes dépendent d'éléments nutritifs particuliers comme les vitamines (Stucki et al, 1983). Pour pallier simultanément aux problèmes de volatilisation et de toxicité, d'autres auteurs proposent un système qui peut être qualifié de semi-clos, puisque les solvants sont livrés en concentration connue et contrôlée dans un flot continu (Vandenberg et Kunka, 1988). Cette façon de faire nécessite cependant le déploiement de moyens techniques

plus complexes.

2. Étude de la croissance des bactéries en milieu liquide

Dans la section précédente la possibilité a été soulevée que le milieu minimal Bushnell-Haas avec l'addition des solvants comme sources de carbone ne puisse suffire pour soutenir la croissance bactérienne. Ceci explique donc que du tryptone et de l'extrait de levure aient été ajoutés au milieu liquide, comme il est d'usage courant dans la méthodologie citée dans la littérature (Janssen et al, 1985). Ainsi, en milieu liquide aucun problème de croissance n'a été décelé pour les isolats bactériens, sauf quelques rares exceptions. Parce que le milieu de culture a été enrichi, une bonne croissance pouvait aussi être mesurée dans le groupe contrôle. Cependant, puisque l'ajout de solvant était la seule différence entre les deux groupes, l'hypothèse était qu'une meilleure croissance en présence d'un solvant serait attribuable à l'utilisation de ce dernier. Ainsi à la suite d'une première sélection, un groupe de dix-sept isolats bactériens a été retenu (Tableau 3). Dans l'ensemble, il présentait par rapport à leur contrôle respectif des variations de croissance, mesurée en densité optique, allant d'environ 15% à plus de 30% dans certains cas. Toutefois, pour les alcènes, donc le tri- et le tétrachloroéthylène, des variations sous les 15%, 5% pour

l'isolat n° 10 avec le tétrachloroéthylène, et l'isolat n° 37 avec le trichloroéthylène. Si des valeurs moindres ont été acceptées pour les alcènes, c'est qu'il a été montré souvent dans la littérature que ces produits sont déhalogénés plus facilement en condition anaérobie (Leisinger et al, 1993). Par conséquent, une plus grande marge de manoeuvre a été adoptée pour ces deux solvants. Toutefois, ce qui peut être retenu suite à cette première sélection, c'est qu'aucun isolat n'a montré un potentiel de biodégradation quelconque en présence de tétrachloroéthane. Ce dernier, au même titre que le tétrachloroéthylène, possède une résistance élevée à la biodégradation à cause de la présence de quatre ions chlore sur sa molécule.

Tableau 3: Isolats présentant une meilleure croissance avec solvant en milieu liquide dans les expériences préliminaires et retenus pour confirmation.

Solvants	Isolats retenus
Dichlorométhane	2; 4; 6; 7; 12; 19; 33; 37; 46; 51;
Dichloroéthane	3; 17; 26; 37;
Trichlorométhane	14; 33; 37;
Tétrachloroéthane	nil
Trichloroéthylène	2; 4; 6; 10; 22; 23; 37;
Tétrachloroéthylène	2; 4; 6; 10; 17; 22; 23; 33;

D'après le Tableau 3, basé sur les différences de densité optique, il y aurait un certain nombre d'isolats capables de croître, selon l'hypothèse émise, avec le tri- et le tétrachloroéthylène. Ce nombre apparaît plutôt élevé lorsqu'on considère les données de la littérature. Cette dernière mentionne que les alcènes sont assez récalcitrants à la biodégradation, particulièrement en condition aérobie (de Bruin et al, 1992). Il a été envisagé qu'une contamination probable des échantillons soit responsable de la croissance abondante observée. Cette contamination se serait produite lors de l'addition des solvants par des seringues. Ceci est d'autant plus probable quand on sait que plusieurs de ces isolats sont les cas d'exception dont il a été fait mention plus tôt, c'est-à-dire, ceux qui montraient par rapport à l'ensemble une croissance beaucoup plus lente dans le milieu minimal enrichi utilisé. Cette possibilité de contamination s'est confirmée. En effet, après l'expérience de confirmation, le nombre d'isolats montrant un potentiel de biodégradation basé sur leur croissance supérieure en présence d'un solvant chloré comme source de carbone, a considérablement diminué pour s'établir à quatre. Il s'agit des isolats 2, 33 et 37 avec le dichlorométhane, ce dernier a d'ailleurs donné des résultats prometteurs avec le dichloroéthane, le trichlorométhane et le trichloroéthylène; finalement, il y a l'isolat 10 retenu pour le tétrachloroéthylène.

Lors des expériences en milieu liquide certains isolats développent des pigments qui sont sécrétés dans le milieu, avec ou sans solvant. Ces pigments, qui font preuve d'une certaine activité biologique, ne doivent pas nécessairement mener à la conclusion d'une meilleure croissance à cause d'une augmentation de l'opacité de la culture. Ils pourraient, lorsque plus abondants dans une culture avec solvant, être le résultat d'un «stress» exercé par le solvant plutôt que le signe d'une activité bénéfique. Par conséquent, il est fort important de s'assurer, lors de la mesure de la densité optique par spectrophotométrie visible, que la pigmentation n'exerce pas d'influence sur le résultat obtenu, entraînant ainsi des faux positifs.

3. Isolats obtenus à partir des enrichissements de sol de la sablière Thouin

Pour les enrichissements de sol de la sablière Thouin effectués à partir des cinq réacteurs, les résultats ont été notés en fonction du réacteur et du solvant employé. Puisque les conditions expérimentales avaient été modifiées entre le troisième et le quatrième passage, les deux ont été considérés pour l'obtention d'isolats. Le Tableau 4 fait état des réacteurs qui après trois ou quatre passages montraient une croissance bactérienne avec un ou plusieurs solvants.

Tableau 4: État de la croissance dans les enrichissements de cultures, de troisième et/ou quatrième passages, effectués à partir de sol mis en réacteurs.

Réacteurs	Solvants					
	DCM	DCE	CF	TCA	TCE	PCE
R13-T0	+	+	+	-	-	-
R13-T154	+	+	-	-	-	-
R16-T0	+	+	+	-	-	+
R16-T151	+	+	+	-	+	-
R18-T0	+	+	+	-	-	+

+ observation de croissance

- aucune croissance observée

DCM : dichlorométhane

DCE : dichloroéthane

CF : trichlorométhane

TCA : tétrachloroéthane

TCE : trichloroéthylène

PCE : tétrachloroéthylène

Le Tableau 4 révèle que les trois premiers solvants de façon générale sont très bien tolérés par les populations bactériennes du sol étudié. Ceci est tout à fait à l'opposé du phénomène qui est observé avec le tétrachloroéthane à la concentration à laquelle il est utilisé. Quand aux deux autres solvants les résultats obtenus montrent qu'ils sont un peu moins bien tolérés par les bactéries, donnant lieu à moins de résultats positifs. Pour tous les échantillons qui ont présentés une croissance avec un solvant, les colonies obtenues sur gélose ont été comparées avec d'autres provenant de cultures contrôles qui n'avaient pas reçu de solvant. Elles ont donc été analysées d'un point de vue morphologique et celles qui présentaient un phénotype différent des colonies contrôles ont été retenues. Le Tableau 5 résume les résultats observés, soit les réacteurs pour lesquels les colonies isolées possèdent des caractères phénotypiques différents de celles des cultures du groupe contrôle.

Tableau 5: Examen de la morphologie des colonies obtenues par enrichissements avec les solvants versus les colonies contrôles provenant de cultures dépourvues de solvants.

Réacteurs	Solvants				
	DCM	DCE	CF	TCE	PCE
R13-T0	+	+	+	-	-
R13-T154	+	+	-	-	-
R16-T0	+	-	-	-	-
R16-T151	+	+	-	+	-
R18-T0	-	-	+	-	+

+ morphologie différente du contrôle

- morphologie identique au contrôle

DCM : dichlorométhane

TCA : tétrachloroéthane

DCE : dichloroéthane

TCE : trichloroéthylène

CF : trichlorométhane

PCE : tétrachloroéthylène

Après l'analyse morphologique, moins d'isolats semblent avoir un potentiel de biodégradation des solvants étudiés. Ainsi, un total de quatorze isolats ont pu être obtenus par l'enrichissement de cultures. Tout comme les isolats de la première banque, leur croissance en milieu liquide avec le solvant de pré-sélection a été mesurée en utilisant évidemment un groupe contrôle.

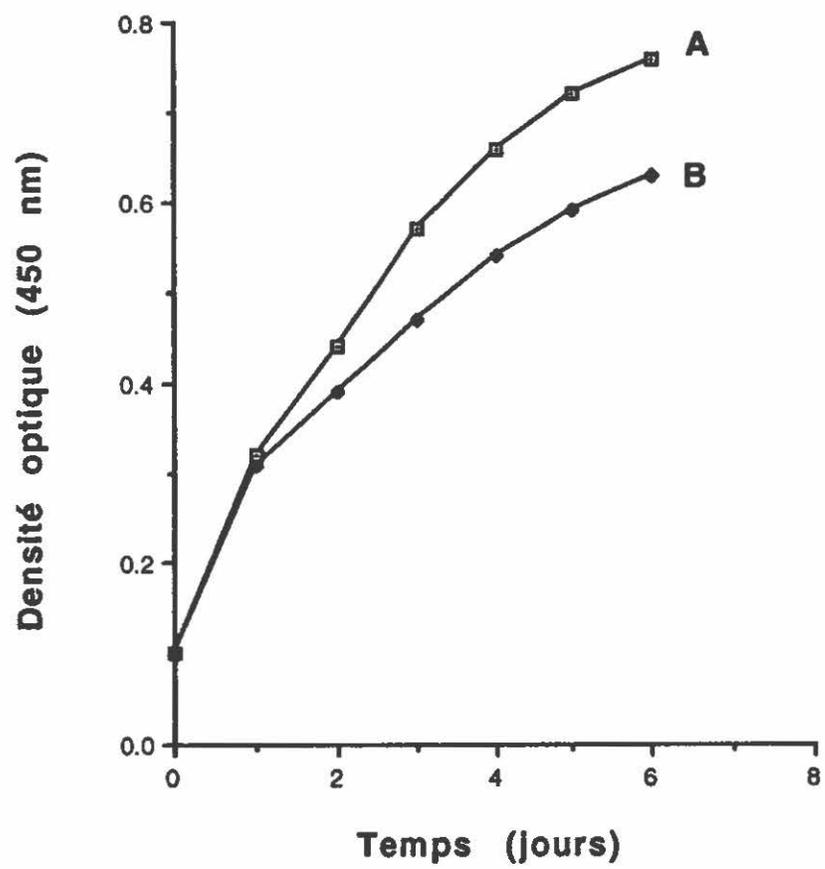
4. Expérience de confirmation du potentiel des isolats

Aux quatre isolats de la première banque, cinq autres obtenus à partir des enrichissements de cultures se sont ajoutées à la liste des bactéries dont la capacité à utiliser certains solvants est à confirmer. Il s'agit des isolats:

- 59 avec le dichloroéthane,
- 62 avec le trichlorométhane,
- 63 et 63-1 avec le dichlorométhane,
- 70 avec le trichloroéthylène.

Au cours de l'expérience de confirmation des isolats en milieu liquide, quatre phénomènes distincts se sont révélés. Le premier (Figure 4) est celui où tout au long du suivi de la croissance par spectrophotométrie, il s'établit progressivement une différence marquée entre le contrôle sans solvant et la culture avec solvant, à l'avantage de cette dernière. Le second

FIGURE 4: Croissance de l'isolat #2, en présence (A) et en absence de dichlorométhane (B), mesurée par la densité optique en fonction du temps.



phénomène est illustré par les Figures 5 et 6; un temps de latence est observé dans la culture avec solvant par rapport à son contrôle. Il faut se rappeler que pour ces cultures il s'agit d'isolats mixtes, leur pureté n'a pas été vérifiée. Par conséquent, il est fort probable que la croissance abondante observée en début de la période d'incubation pour la culture contrôle soit due à un groupe bactérien qui, n'étant pas soumis au stress lié à la présence d'un solvant, peut croître plus librement. Ce même groupe soumis aux effets du solvant en question ne pourrait se manifester, ce qui serait détecté par une densité optique moins élevée. La croissance qui est donc visible dans la culture avec solvant pourrait s'avérer être le résultat d'un groupe bactérien à croissance plus lente qui utilise le solvant comme source de carbone à un rythme ralenti. Un temps de latence peut souvent être observé lorsqu'il doit y avoir une certaine adaptation au substrat. Dans le cas présent, cette adaptation doit se faire vis-à-vis les solvants chlorés. Elle est probablement nécessaire parce que les enzymes essentielles à la déhalogénéation des dits solvants ne sont pas sécrétées de manière constitutive comme c'est le cas avec *Xanthomonas autotrophicus* GJ10 (Janssen et al, 1994). Toutefois, la croissance de ce dernier groupe finit par prendre son envol jusqu'à dépasser celui du groupe contrôle. Une troisième observation notée lors de cette expérience est ce qui pourrait être soit une toxicité flagrante du solvant pour les

FIGURE 5: Croissance de l'isolat #37, en présence (A) et en absence de trichlorométhane (B), mesurée par la densité optique en fonction du temps.

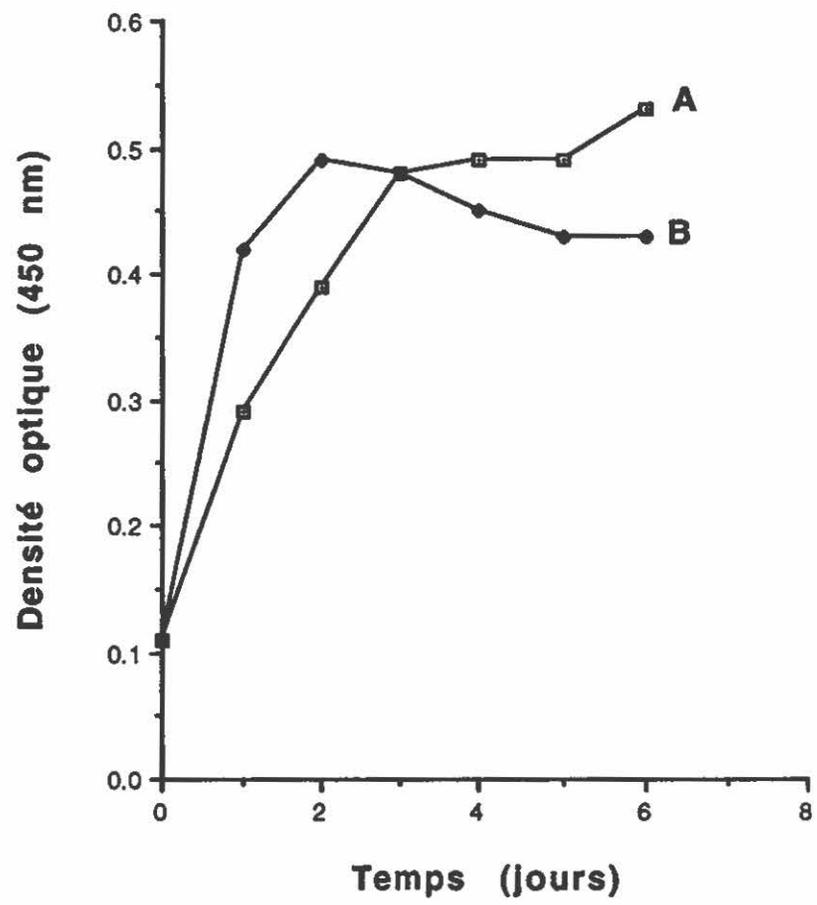
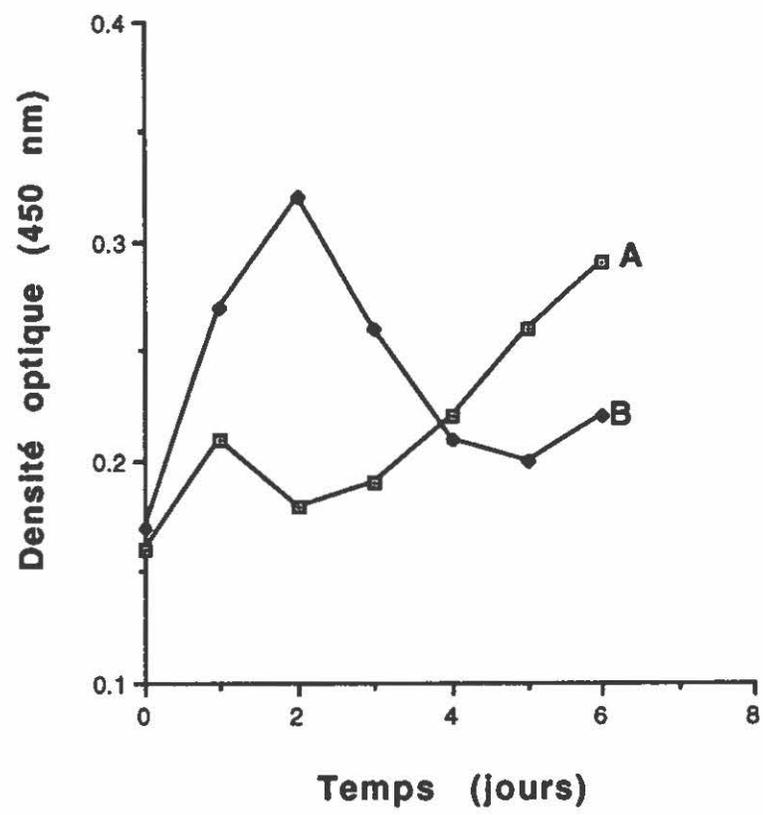


FIGURE 6: Croissance de l'isolat #62, en présence (A) et sans trichlorométhane (B), mesurée par la densité optique en fonction du temps.



bactéries avec lequel il est en contact, soit, encore une fois, un cas de groupes bactériens réagissant différemment. Dans le groupe contrôle, il pourrait y avoir plusieurs types bactériens qui croissent parfaitement parce qu'il n'y a aucun «stress» alors qu'en présence du solvant un des types succombe à la toxicité (Figure 7). Comme pour la Figure 4, il s'établit dès le départ une différence très nette entre les cultures et les contrôles. Cette différence se présente toutefois à l'avantage du contrôle, contrairement à la première situation. Finalement, dans certains cas il n'y a aucune différence notable entre les deux groupes suivis: cultures et contrôles (Figure 8). Dans ce dernier cas, malgré une absence de toxicité, la culture en présence de solvant ne semble pas profiter de la source supplémentaire de carbone qui lui est fournie. Elle se comporte de façon quasi identique au contrôle pourtant dépourvu de solvant. Avec ces résultats en main, il a donc été possible d'entreprendre l'analyse de la biodégradation des solvants chlorés par les isolats retenus en utilisant la chromatographie en phase gazeuse.

FIGURE 7: Croissance de l'isolat #51, en présence (A) et sans dichlorométhane (B), mesurée par la densité optique en fonction du temps.

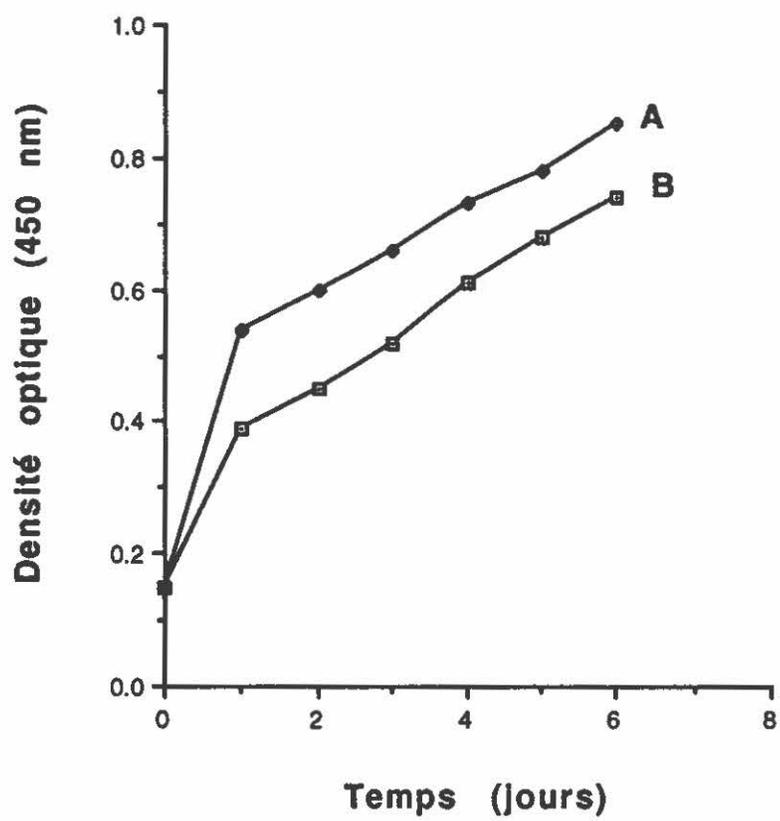
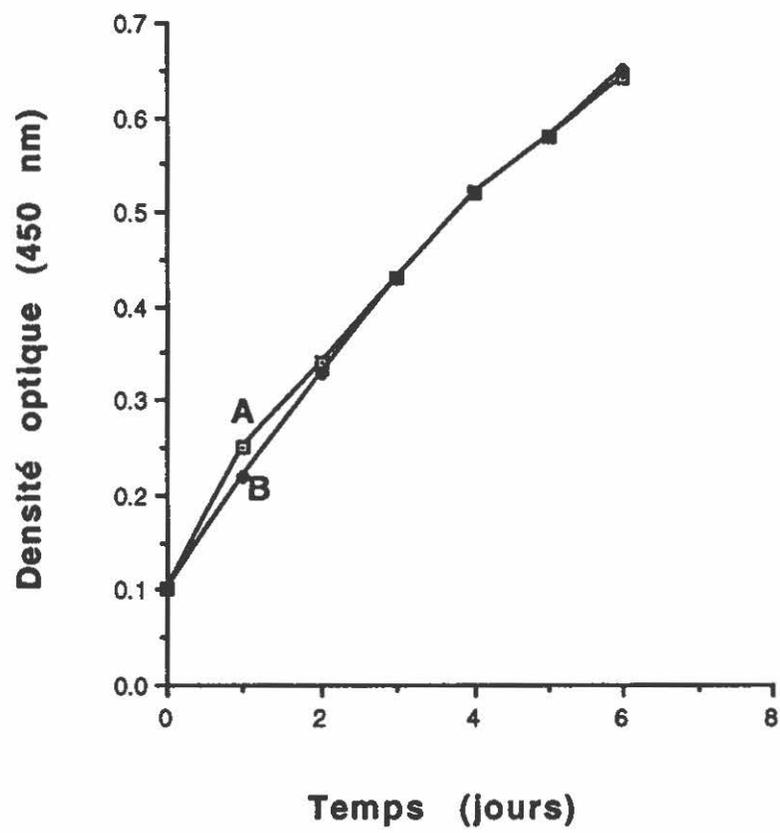


FIGURE 8: Croissance de l'isolat #6, en présence (A) et en absence de trichloroéthylène (B), mesurée par la densité optique en fonction du temps.



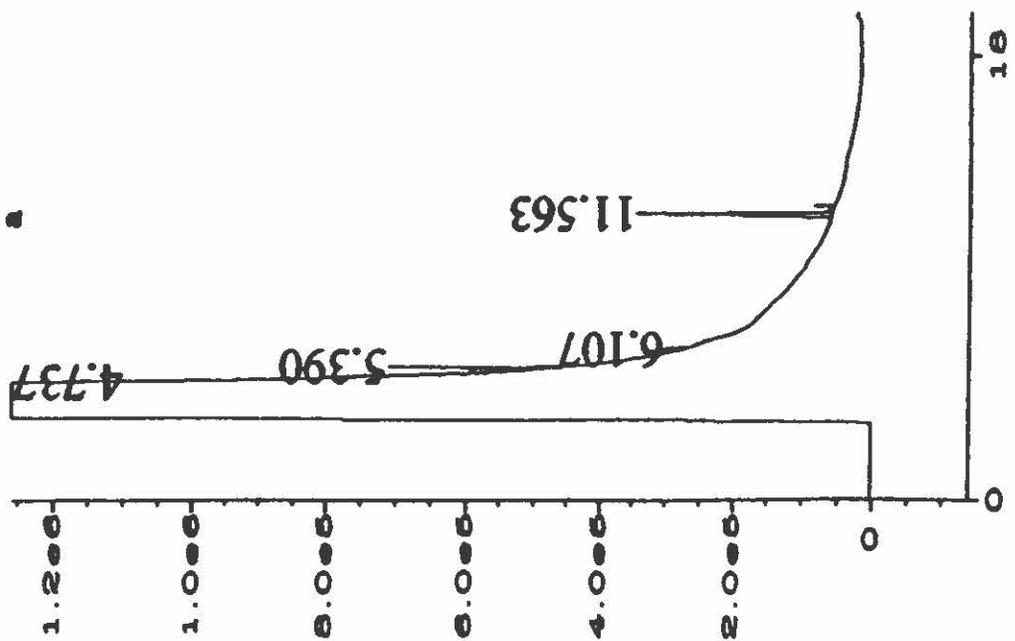
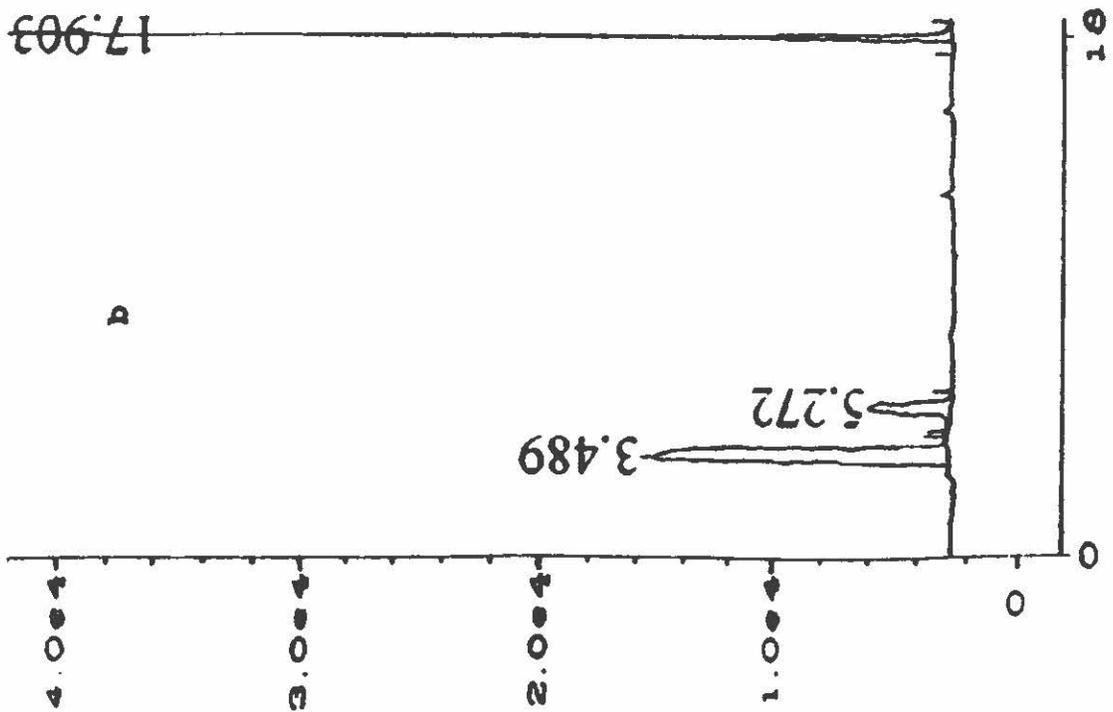
5. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

5.1 Détection des solvants

Le test de détection des solvants chlorés employés dans cette étude par le détecteur à ionisation de flamme a révélé que sur les cinq solvants à analyser seuls quatre pouvaient être détectés. En effet, aucun signal n'était observé pour le dichlorométhane avec la méthodologie mise de l'avant. Ce solvant, le dichlorométhane, a un point d'ébullition de $39,8^{\circ}\text{C}$, une valeur très proche de celle du solvant d'extraction, le pentane, dont le point d'ébullition est de $36,1^{\circ}\text{C}$. Le pentane est un solvant qui brûle très bien lorsqu'un détecteur à ionisation de flamme est employé, il a par conséquent un signal fort important qui masque celui du dichlorométhane beaucoup moins intense et qui malheureusement à un temps de rétention trop court pour pouvoir se dégager et être visible. Pour pallier à ce problème, il aurait fallu utiliser un solvant d'extraction ayant une température d'ébullition beaucoup plus basse que celle du pentane. Cette solution a par contre d'énormes inconvénients. Sachant que la température ambiante peut facilement approcher et même dépasser les 25°C , il aurait fallu envisager le travail dans une pièce à température contrôlée, surtout que l'appareil à chromatographie dégage beaucoup de chaleur. Ceci n'était pas possible avec les

installations disponibles. Le signal du pentane est tellement important qu'il s'estompe très lentement. À cause de ce phénomène, les solvants comme le dichloroéthane et le trichlorométhane quoique visible sont difficiles à intégrer, d'autant plus que cette intégration est manuelle. Des auteurs comme Brunner et al (1980), mentionnent l'utilisation du FID pour la détection du dichlorométhane, malheureusement, comme c'est souvent le cas dans les publications, des détails techniques très importants sont omis, de sorte que des comparaisons n'ont pu être établies. À la Figure 9 sont présentés deux chromatogrammes illustrant les signaux obtenus par GC-FID et pour comparaison par GC-ECD. Évidemment, la difficulté d'obtenir des signaux clairs fait en sorte que la reproductibilité des résultats obtenus n'est d'aucune façon chose facile. Donc, pour affirmer que la disparition d'un solvant est le résultat d'une biodégradation, il fallait que la différence soit appréciable (au moins 15%) entre le contrôle abiotique, effectué pour toutes les expériences par chromatographie en phase gazeuse, et les cultures bactériennes. Par ailleurs, des trois standards internes testés, le toluène est celui qui s'est avéré le plus propice à la quantification des solvants chlorés à analyser. Le signal obtenu a été clair, stable et reproductible contrairement aux deux autres solvants. Le fréon ne pouvait pas être détecté, possiblement masqué par le signal du pentane. Quant à l'acétonitrile, il n'a pu être

FIGURE 9: Signaux typiques obtenus: a) par GC-FID, b) par GC-ECD, lors du suivi de la biodégradation des solvants chlorés aliphatiques.



identifié avec certitude.

5.2 Courbes d'étalonnage

Les courbes d'étalonnage réalisées ont permis d'établir des facteurs de correction pour chacun des solvants. Ces facteurs de correction sont nécessaires pour une quantification plus exacte. Quand un détecteur à capture d'électron est devenu disponible pour l'analyse des solvants, de nouvelles courbes d'étalonnage ont été effectuées. Ces dernières, contrairement aux premières, ont été obtenues à partir d'échantillons extraits, selon la méthode décrite dans la section précédente, afin de se rapprocher davantage des conditions employées pour suivre la biodégradation des solvants chlorés par les cultures bactériennes.

5.3 Extraction des solvants

L'extraction des solvants dans des milieux de culture non inoculés a permis de déterminer le pourcentage de solvant qui pouvait être récupéré et ainsi faire la distinction entre la portion du produit véritablement disparue et celle ne pouvant être récupérée parce que volatilisée ou encore demeurant dans la phase aqueuse. Il a été trouvé que le taux de récupération n'est pas équivalent pour tous les solvants, certains étant

récupérés pratiquement dans leur totalité alors que d'autres ne l'étaient que de moitié. Le Tableau 6 présente le pourcentage de récupération obtenu sous les conditions expérimentales pour chaque solvant selon le détecteur employé.

Tableau 6: Tableau indicatif du pourcentage de récupération obtenu pour chaque solvant en fonction du détecteur.

Solvants	Détecteurs	
	FID	ECD
DCM	-	86
DCE	96	95
CF	64	77
TCE	73	100
PCE	48	100

- : non déterminé

DCM : dichlorométhane

TCA : tétrachloroéthane

DCE : dichloroéthane

TCE : trichloroéthylène

CF : trichlorométhane

PCE : tétrachloroéthylène

FID : détecteur à ionisation de flamme

ECD : détecteur à capture d'électron

Tout d'abord, les différences observées dans les pourcentages de récupération des solvants peuvent s'expliquer par le fait que le pentane soit le seul solvant à avoir été utilisé pour la récupération de tous les solvants. Ces derniers n'ayant pas une solubilité identique dans le pentane, il est donc normal que certains puissent être récupérés plus facilement que d'autres. Dans la revue de littérature (section 6.2), il a d'ailleurs été montré que les équipes, comme celle de Deckard et al (1994), travaillant dans le même domaine utilisent plusieurs solvants d'extraction. Une différence peut aussi être notée selon le type de détecteur utilisé, celui à capture d'électron étant jusqu'à cent fois plus sensible que celui à ionisation de flamme, d'ailleurs la dilution des échantillons a été nécessaire pour éviter de saturer l'appareil. La différence entre les détecteurs montre qu'une bonne récupération des solvants chlorés ne garantit pas de bons résultats. Il faut aussi pouvoir les détecter de façon efficace, ce qui est possible avec le détecteur à capture d'électron. Toutefois, l'expérience a démontré que ces appareils nécessitent un étalonnage précis et pointilleux pour en tirer le maximum, cela n'a malheureusement pas été possible lors de ces premières tentatives. Par exemple,ENZIEN et al (1994), ont travaillé avec des limites de détection de 50 µg/l et 1,0 µg/l pour le dichloroéthane et le trichloroéthylène respectivement. Dans la présente étude par contre, les valeurs

les moins élevées pour les courbes d'étalonnage sont de 25 mg/l pour le dichloroéthane et de 0,5 mg/l pour le trichloroéthylène.

6. Biodégradation par les isolats

Pour tous les isolats testés, l'analyse des résultats des dosages par chromatographie en phase gazeuse n'a pu permettre d'affirmer qu'il y avait biodégradation. Les différences observées entre les groupes servant de contrôles abiotiques et les cultures bactériennes n'ont pas été assez marquées compte tenu d'une certaine marge d'erreur, pour parler de véritable biodégradation. Dans le Tableau 7 sont présentés les résultats obtenus pour divers isolats en utilisant le détecteur à ionisation de flamme.

Ce tableau ne présente aucune donnée pour le dichlorométhane qui n'a pu être décelé par le détecteur à ionisation de flamme. En comparant les chiffres des colonnes intitulées contrôle et isolat, il ressort qu'il ne saurait être question de biodégradation compte tenu de leur rapprochement. En effet, les mêmes valeurs sont pratiquement retrouvées dans les deux groupes, c'est-à-dire, qu'il n'y a pas de différence significative entre isolats et contrôles. Il est même arrivé que la quantité de solvant recueillie dans la culture soit plus

Tableau 7: Quantification des solvants chlorés (en ppm) pour les cultures (cult.) et les contrôles abiotiques (cont.) après analyse par GC-FID.

Isolats	Solvants							
	DCE		CF		TCE		PCE	
	cult.	cont.	cult.	cont.	cult.	cont.	cult.	cont.
10	-	-	-	-	-	-	nd	nd
37	316	304	117	114	31	23	-	-
59	306	304	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	104	114	-	-	-
70	-	-	-	-	18	23	-	-

nd: non détecté

-: non déterminé

DCE : dichloroéthane

TCE : trichloroéthylène

CF : trichlorométhane

PCE : tétrachloroéthylène

élevée que celle extraite du milieu contrôle. Ceci laisse supposer qu'une certaine portion de solvant est adsorbée sur la surface des bactéries et qu'elle est solubilisée au moment de l'extraction avec le pentane. Dans d'autres cas, il n'a pas été possible de détecter une quantité suffisante de produit pour être en mesure de le quantifier (isolat 10, tétrachloroéthylène). Quelques mois plus tard, lorsqu'il a été possible de faire les analyses de biodégradation avec le détecteur à capture d'électron les expériences ont été reprises. Malgré les précautions, la viabilité de plusieurs isolats a été perdue et la vérification de ceux-ci ne put être effectuée: l'isolat 10 étudié pour la dégradation du tétrachloroéthylène, et les isolats 33, 63 et 63-1 qui avaient précédemment montré un certain potentiel avec le dichlorométhane. Par conséquent, le Tableau 8 n'illustre que les résultats des isolats ayant survécu au long entreposage.

Encore une fois, les valeurs sont très rapprochées dans les deux groupes comparés dans l'expérience, de sorte qu'aucune affirmation dans le sens d'une biodégradation ne peut être faite. Il est à souligner que dans la littérature certains auteurs travaillent avec des quantités infimes de solvant, de l'ordre de quelques ppm, et que par conséquent, dans les conditions expérimentales de cette étude, il est tout à fait possible que la croissance des bactéries observée puisse être

Tableau 8: Quantification des solvants chlorés (en ppm) pour les cultures (cult.) et les contrôles abiotiques (cont.) après l'analyse des échantillons par GC-ECD.

Isolats	Solvants							
	DCM		DCE		CF		TCE	
	isol.	cont.	isol.	cont.	isol.	cont.	isol.	cont.
2	342	352	-	-	-	-	-	-
37	314	352	427	440	314	335	nd	nd
59	-	-	442	440	-	-	-	-
62	-	-	-	-	312	335	-	-
70	-	-	-	-	-	-	367	317

nd: non détecté

-: non déterminé

DCE : dichloroéthane

TCE : trichloroéthylène

CF : trichlorométhane

PCE : tétrachloroéthylène

attribuée à l'utilisation de quelques ppm des solvants. Malgré les efforts du professionnel en charge de l'appareil l'étalonnage n'était pas parfaite, n'étant pas spécifique aux solvants chlorés aliphatiques qui font l'objet de cette étude. Donc, aucun des détecteurs n'ayant été calibrés pour la détection de petites concentrations il n'a pas été possible de constater si tel était bien le cas. A cause de l'absence de toxicité, la décision de travailler avec des concentrations relativement élevées de solvant a été adoptée dès le début des expériences, il a donc fallu composer avec des limites de détection assez hautes. L'absence de toxicité observée concorde avec les données de Stucki (1990) qui a travaillé avec le dichloroéthane à des concentrations variant entre 1000 et 2000 ppm sans aucune démonstration de toxicité. Il a toutefois constaté que les bactéries perdaient leur capacité de dégradation du solvant si ce dernier n'était pas ajouté pendant dix jours. Les bactéries de cette étude étant maintenu dans un milieu riche sans ajout de solvants, il est fort possible qu'elles aient perdu leur pouvoir de biodégradation. Le délai ayant été assez long (plusieurs semaines) entre les essais de croissance avec les solvants et la vérification de leur disparition par chromatographie. Toutefois, il possible de garder des souches performantes dans un milieu dépourvu d'une pression sélective, ici le solvant chloré. C'est d'ailleurs le cas des souches de références qui conservent leur capacité

métabolique même si elles sont maintenues dans du bouillon nutritif (nutrient broth, N.B.) en l'absence du dichloroéthane.

7. Enrichissements à partir du sol Sico et du sol contaminé au Pentachlorophénol

Les enrichissements effectués à partir des sols Sico, poursuivis pendant quatre semaines, n'ont malheureusement fait preuve que d'une croissance très limitée en présence des solvants chlorés. L'analyse de la biodégradation des solvants par les bactéries provenant de ces sols n'a donc pas été poursuivie. En ce qui à trait aux enrichissements du sol contaminé au pentachlorophénol, il a été constaté que malgré une croissance assez soutenue des bactéries il n'y a pas eu de biodégradation des solvants. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le Tableau 9.

Dans ce tableau, il n'y a pas de valeur pour le dichlorométhane car le détecteur à capture d'électron n'était pas encore disponible. Les valeurs attendues pour les contrôles abiotiques sont présentées dans ce tableau afin d'établir dans une certaine mesure la difficulté éprouvée quant à la quantification des produits. Il est à noter que dans certains cas les concentrations analysées se révèlent supérieures à celles théoriquement ajoutées. Ceci met en lumière une autre

Tableau 9: Quantification des solvants chlorés (en ppm) pour les cultures obtenues par enrichissement du sol contaminé au pentachlorophénol.

Solvants	Valeurs attendues des contrôles abiotiques	Valeurs détectées pour les contrôles abiotiques	Valeurs détectées pour les cultures après incubation
DCE	331	428	438
CF	332	309	360
TCA	165	111	106
TCE	328	140	148
PCE	162	60	36

DCE : dichloroéthane

CF : trichlorométhane

TCA : tétrachloroéthane

TCE : trichloroéthylène

PCE : tétrachloroéthylène

source de difficulté, soit un manque de précision lors de l'ajout par seringue de très petites quantités de solvant au milieu de culture. Dans la majorité des cas il est question de quelques microlitres seulement. Les remarques qui ont déjà été faites pour les analyses de biodégradation par les isolats s'appliquent aussi à celles des cultures obtenues par voie d'enrichissement, c'est-à-dire qu'essentiellement, la biodégradation des solvants par ces cultures n'a pu être confirmée. Toutefois, contrairement aux isolats, les cultures obtenues par enrichissement ont toujours été en contact avec leur solvant de sélection. La seule culture ayant donné un résultat préliminaire intéressant est celle obtenue avec le tétrachloroéthylène. En effet, il y a 40% moins de solvant quantifié dans le milieu inoculé que dans le contrôle abiotique. Malheureusement, lors de la reprise de cette expérience le résultat n'a pu être reproduit.

8. Enrichissements avec co-substrats à partir du sol Sico et du sol contaminé au Pentachlorophénol

Le phénol et le toluène sont les deux co-substrats qui ont été ajoutés aux cultures bactériennes pour essayer d'obtenir la biodégradation des solvants chlorés par co-métabolisme. Lors d'une première analyse, une seule culture a montré un résultat encourageant lorsque le phénol était le co-substrat utilisé. Il

s'agit du mélange n° 2 des sols Sico enrichis avec le trichlorométhane. Avec le toluène cependant, plusieurs cultures ont donné des signes de biodégradation, plus ou moins importante, des solvants avec lesquels elles avaient été en contact. Le pourcentage de biodégradation allait de 6% à 82%. Toutefois, une analyse plus approfondie des chromatogrammes obtenus a permis de déceler des anomalies qui ont justifié la tenue d'une deuxième série d'analyses pour tous les échantillons, sauf pour la culture provenant de l'enrichissement avec le phénol comme co-substrat. En effet l'analyse ayant été effectuée à un moment différent des autres il n'y a pas eu d'anomalies notables. Cette autre analyse des échantillons a révélé que ce qui était apparu précédemment comme une biodégradation n'était en fait que de faux résultats attribuables à une défaillance de l'appareil.

Si pour certains échantillons une diminution de la disparition du solvant est apparue, dans d'autres cas c'est le phénomène contraire qui a été observé, c'est-à-dire qu'une augmentation du pourcentage de disparition était visible. Le problème de fiabilité des détecteurs couplés à l'appareil de chromatographie en phase gazeuse a déjà été mentionné, mais n'aurait pu être plus flagrant avec ces dernières analyses. Une conclusion s'imposait donc: pour chaque série d'analyses, il fallait nécessairement procéder à des tests de

reproductibilité. Même si certains résultats étaient mis en doute, toutes les cultures retenues lors de la première analyse ont subi une expérience de confirmation. Les cellules cultivées en TSB et lavées ont été inoculées avec leur solvant respectif ainsi que leur co-substrat. Le Tableau 10 fait état des résultats obtenus suite à la première analyse des échantillons. Le Tableau 11 illustre le pourcentage de disparition observé lors des deux analyses. Quant au Tableau 12, il résume les résultats obtenus après l'expérience de confirmation. Dans le Tableau 11, on retrouve le pourcentage de disparition minimale pour diverses cultures. Ce pourcentage de disparition a été établi en tenant compte des écarts types calculés et variant de 3% à 9%.

En termes absolus il existe des différences de concentration entre certaines cultures et leurs contrôles respectifs, toutefois, ces différences ne dépassaient pas les marges d'erreur établies pour l'expérience. Ces erreurs sont attribuables aux manipulations, en particulier à l'extraction, et au détecteur. L'expérience a été reprise à partir d'un milieu minimal avec solvant contrairement au premier essai. En effet, la première expérience avait été effectuée à partir du milieu TSB. Ce milieu riche pourvu de nombreux éléments nutritifs aurait pu modifier l'équilibre du consortium bactérien, altérer les capacités enzymatiques responsables de

Tableau 10: Quantification des solvants chlorés (en ppm) dans les cultures (cult.) d'enrichissement avec les co-substrats (¹) toluène et (²) phénol, et dans les contrôles abiotiques (cont.) après analyse par GC-ECD.

Cultures	Solvants							
	DCE		CF		TCE		PCE	
	cont.	cult.	cont.	cult.	cont.	cult.	cont.	cult.
Sico I ¹	-	-	-	-	264	204	130	113
Sico II ²	-	-	196	169	-	-	-	-
Sico III ¹	-	-	-	-	264	137	130	14
PCP ¹	251	91	-	-	264	187	130	114

-: non déterminé

Sico I: sol boueux

Sico II: mélange de sol n° 1

Sico III: mélange de sol n° 2

PCP: sol contaminé au pentachlorophénol

DCE : dichloroéthane

TCE : trichloroéthylène

CF : trichlorométhane

PCE : tétrachloroéthylène

Tableau 11: Pourcentage de disparition minimale ayant été calculé pour des échantillons de cultures enrichies avec le toluène lors de deux analyses (A et B) par GC-ECD.

Cultures	Solvants							
	DCE		CF		TCE		PCE	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Sico I	-	-	-	-	7	14	6	5
Sico III	-	-	-	-	36	1	82	8
PCP	60	39	-	-	15	42	6	7

-: non déterminé

Sico I: sol boueux

Sico III: mélange de sol n° 2

PCP: sol contaminé au pentachlorophénol

DCE : dichloroéthane

TCE : trichloroéthylène

CF : trichlorométhane

PCE : tétrachloroéthylène

Tableau 12: Quantification des solvants chlorés (en ppm) pour les cultures (cult.) enrichies avec les co-substrats (¹) toluène et (²) phénol, et dans les contrôles abiotiques (cont.) lors d'une deuxième expérience. Analyse par GC-ECD.

Cultures	Solvants							
	DCE		CF		TCE		PCE	
	cont.	cult.	cont.	cult.	cont.	cult.	cont.	cult.
Sico I ¹	-	-	-	-	239	191	81	85
SicoII ²	-	-	159	125	-	-	-	-
Sico III ¹	-	-	-	-	239	218	81	68
PCP ¹	260	252	-	-	239	221	81	88

-: non déterminé

Sico I: sol boueux

Sico II: mélange de sol n° 1

Sico III: mélange de sol n° 2

PCP: sol contaminé au pentachlorophénol

DCE : dichloroéthane

TCE : trichloroéthylène

CF : trichlorométhane

PCE : tétrachloroéthylène

la biodégradation, ou réprimer leur sécrétion. Cependant, même en reprenant l'expérience à partir du milieu d'enrichissement, aucune biodégradation n'a pu être confirmée.

9. Biodégradation du toluène

Lorsqu'il est devenu apparent que les solvants n'étaient pas significativement dégradés par les cultures bactériennes, la question s'est posée à savoir qu'est ce qui permettait la croissance des cellules. Sachant que la dégradation du toluène a déjà été observée (Fan et Scow, 1993), il a tout de suite été soupçonné et des analyses ont été effectuées pour savoir si ce produit employé au départ comme co-substrat avait été assimilé par les bactéries en tant que source principale de carbone. Il est apparu à la lumière des résultats que partout où une croissance avait été observée, que le toluène était bel et bien dégradé. Les chromatogrammes qui suivent (Figures 10, 11) illustrent bien la biodégradation du toluène par une culture bactérienne alors que pour le contrôle abiotique il n'y a pas de variation au niveau du signal du toluène. Selon la littérature, les enzymes responsables de l'utilisation du toluène peuvent également dégrader les solvants chlorés (Mu et Scow, 1994; Nelson et al, 1988). Une comparaison entre les enzymes impliquées dans la biodégradation du toluène par les enrichissements de cultures de cette étude et celles sécrétées

FIGURE 10: Suivi du toluène dans un contrôle abiotique: a) jour 0, b) jour 7.

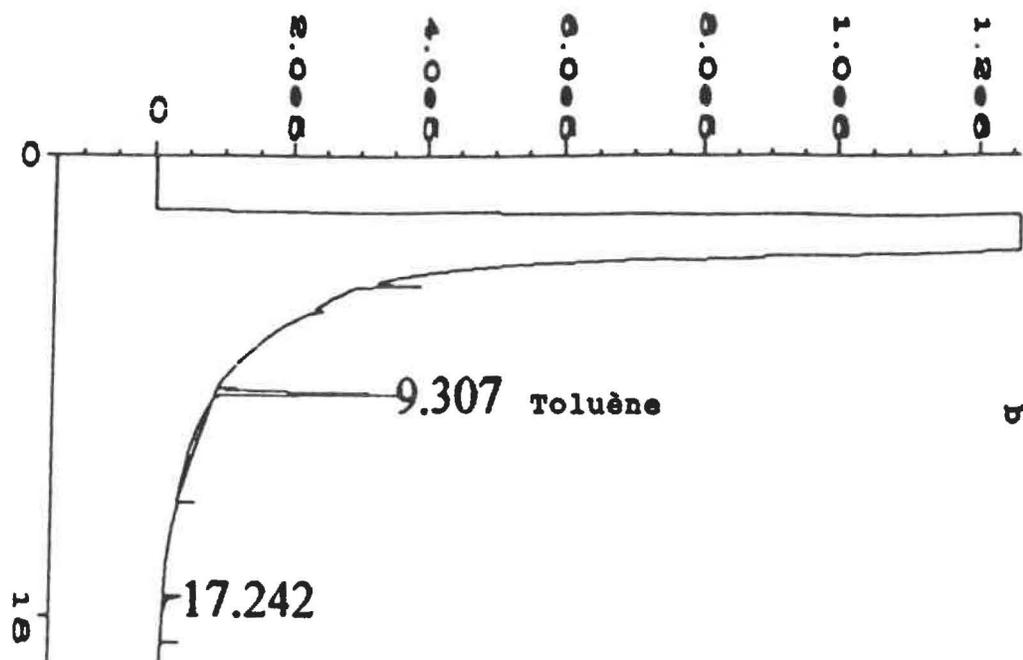
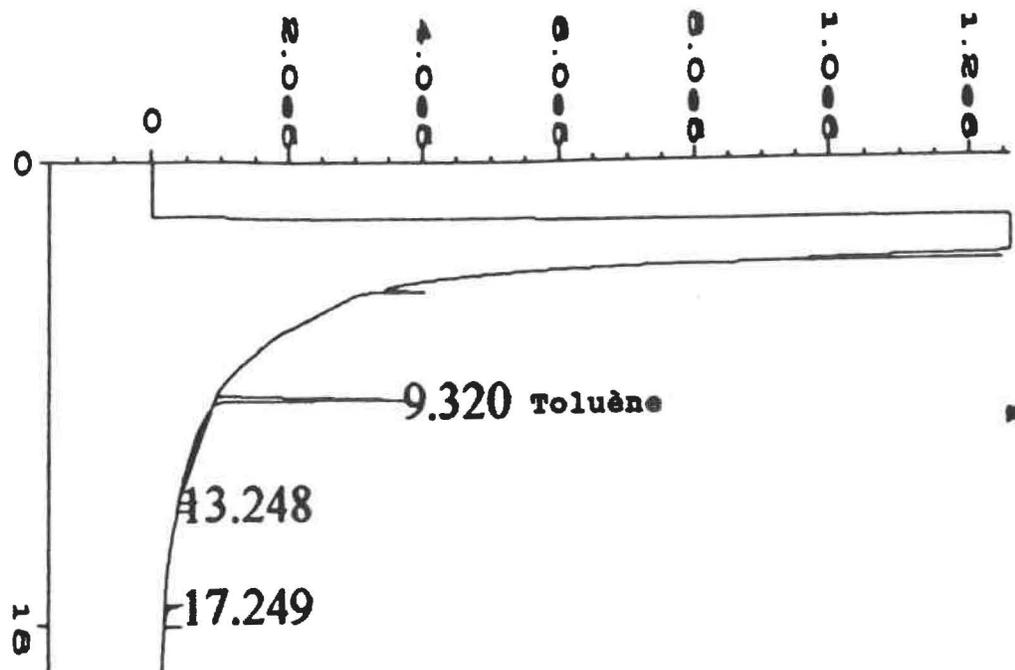
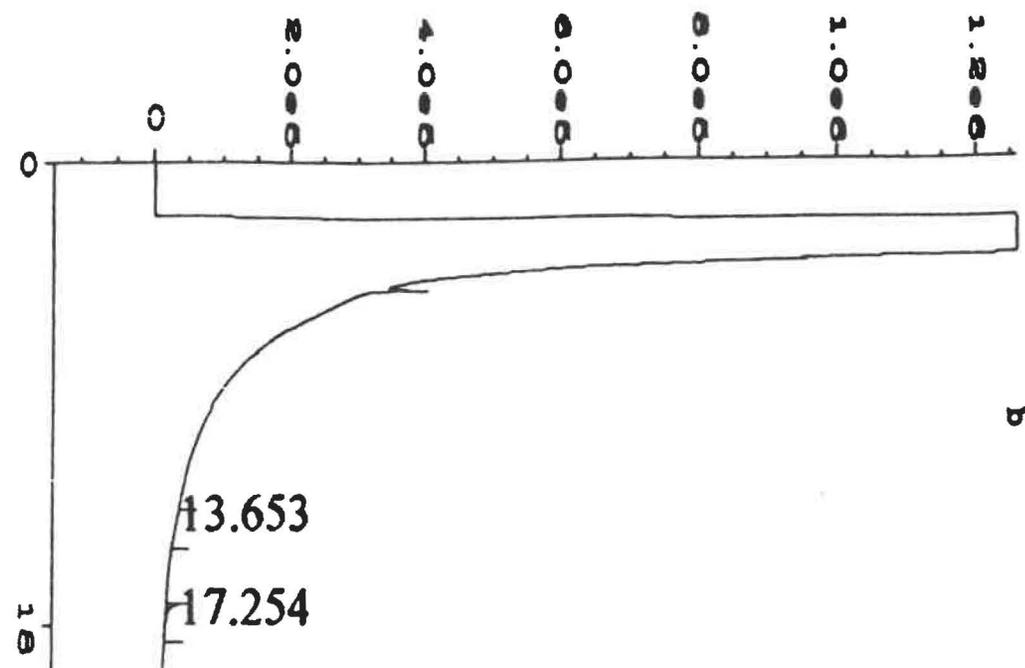
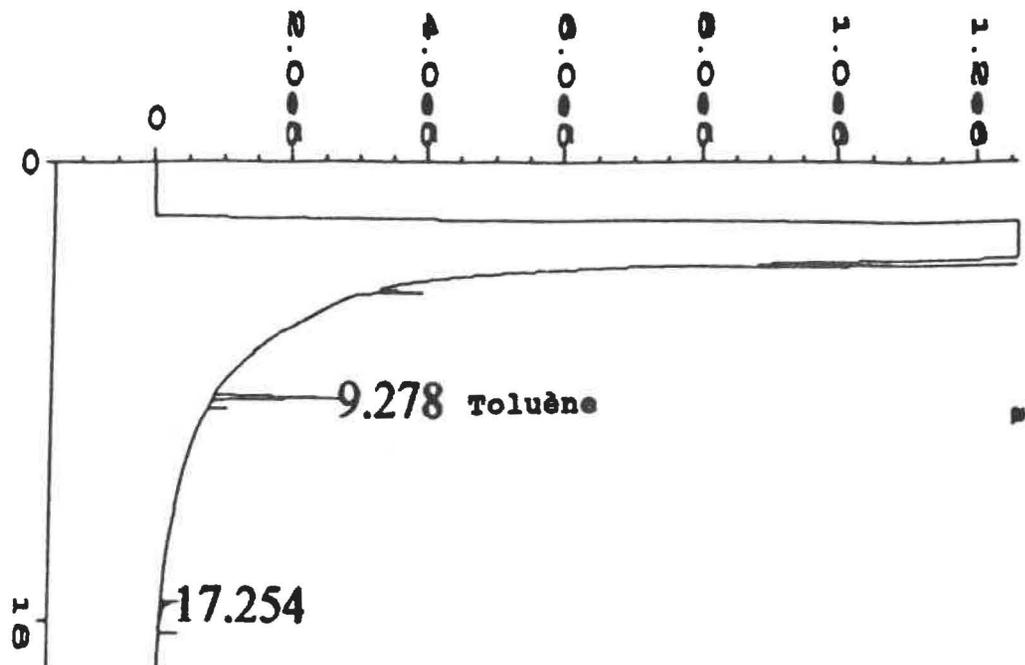


FIGURE 11: Suivi du toluène dans une culture enrichie avec du dichloroéthane: a) jour 0, b) jour 7.



par les bactéries citées dans divers travaux aurait pu montrer si oui ou non elles étaient similaires, donc aptes à accomplir les mêmes fonctions. D'un autre côté, il se pourrait que l'absence de biodégradation des solvants chlorés par les enzymes responsables de celle du toluène soit due à l'inhibition compétitive (section 5.3, revue de littérature). Pour surmonter ce problème, l'ajout des co-substrats par intermittence est une solution envisageable (Fan et Scow, 1993; Speitel et al, 1990).

10. Biodégradation du dichloroéthane par des témoins positifs

N'ayant pas pu isoler des bactéries ou même obtenir des consortiums capables de dégrader aucun des six solvants chlorés utilisés dans cette étude, la méthodologie employée a été remise en cause. Cette dernière, il est à souligner, s'inspire de celle employée dans la littérature. Dans le but d'éprouver le protocole établi, des témoins positifs ont été étudiés en observant les mêmes procédures. Deux souches bactériennes ont été obtenues du laboratoire du Dr Janssen, qui étudie la biodégradation de polluants, dont les solvants chlorés. Les souches en question sont *GJ10* et *AD20* des genres *Xanthomonas* et *Ancylobacter* respectivement. Elles possèdent la capacité de dégrader le dichloroéthane dans un laps de temps relativement

court, soit quelques heures. Ces deux bactéries ont donc été cultivées avec le dichloroéthane comme unique source de carbone dans les mêmes conditions utilisées lors des expériences précédentes: le milieu minimal Bushnell-Haas, incubation dans l'obscurité, température de l'ordre de 25-26°C et agitation des cultures. Comme il est possible de voir en comparant les chromatogrammes obtenus pour le contrôle abiotique et les cultures des deux bactéries (Figures 12, 13, 14), il est clair qu'il y a bel et bien une biodégradation du dichloroéthane tel que rapporté par le Dr Janssen et son équipe (Janssen *et al*, 1994). Par conséquent, il a été conclu que la méthodologie employée n'était pas la cause de l'impossibilité d'obtenir la biodégradation des solvants chlorés par les cultures bactériennes utilisées. La biodégradation du dichloroéthane par les deux souches témoins vient en fait valider la méthodologie employée tout au long du processus expérimental exploité dans cette étude.

11. Bactéries et leur origine

Puisque la méthodologie employée pour la réalisation de expériences ne pouvait être remise en cause, il fallait songer aux sites et aux sources des échantillons où ont été puisées les bactéries. D'une part il y a la sablière Thouin qui tel que mentionné au début de ce mémoire n'est que très peu contaminé

FIGURE 12: Suivi du dichloroéthane dans un contrôle abiotique: a) jour 0, b) jour 5.

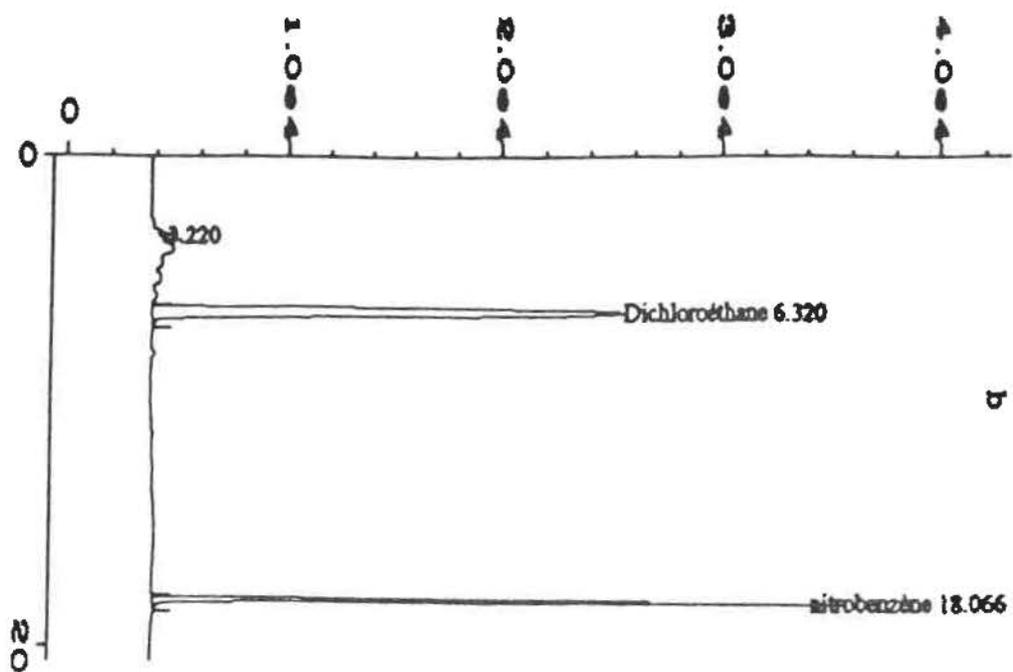
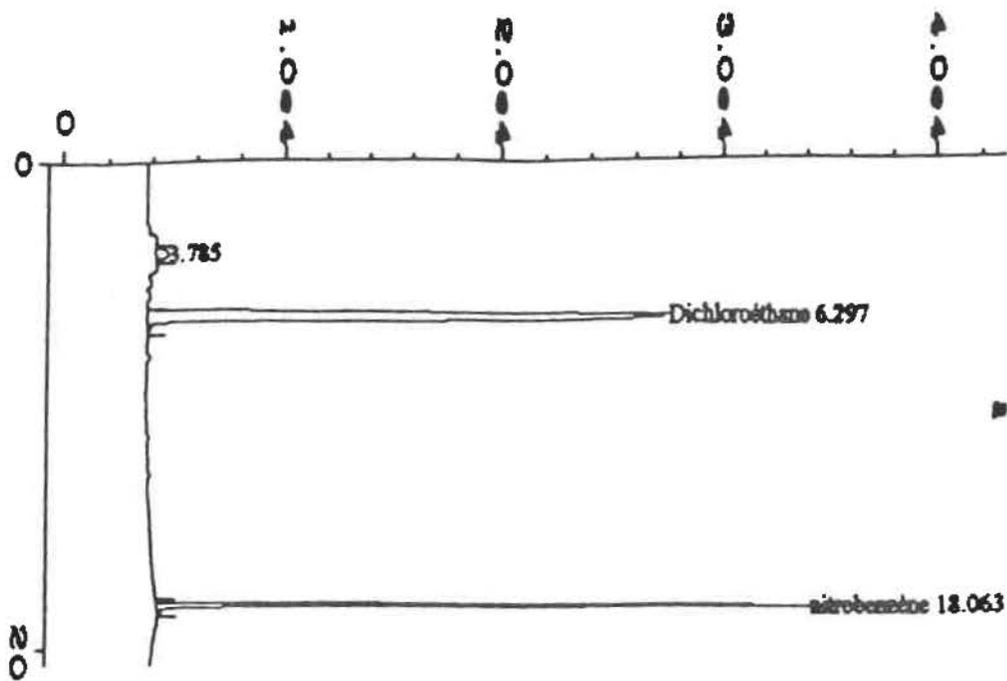


FIGURE 13: Suivi du dichloroéthane dans une culture de *Xanthomonas autotrophicus* GJ10: a) jour 0, b) jour 5.

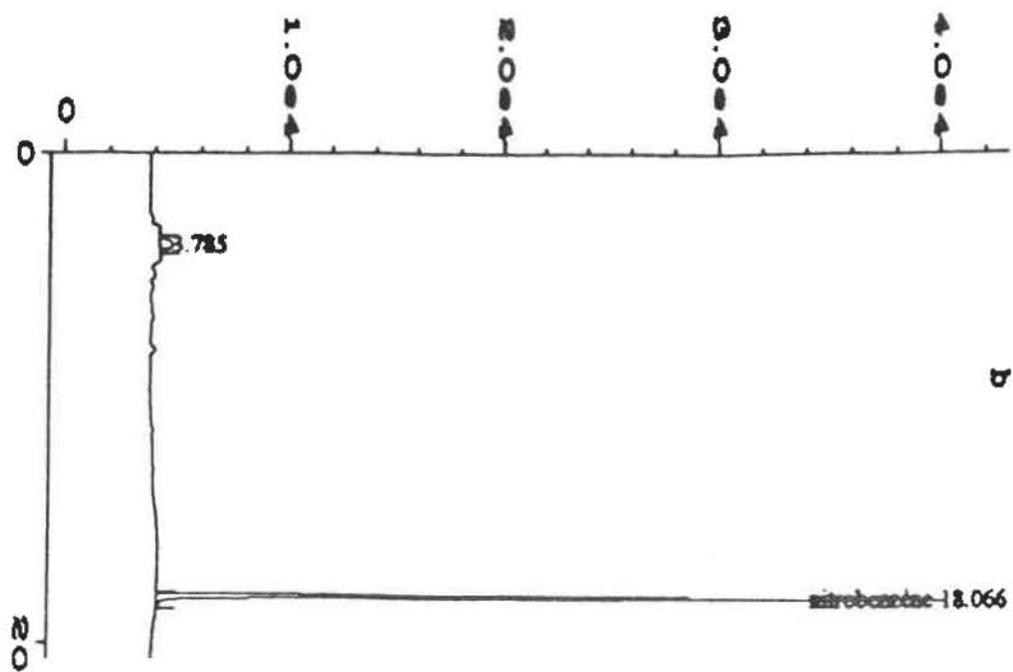
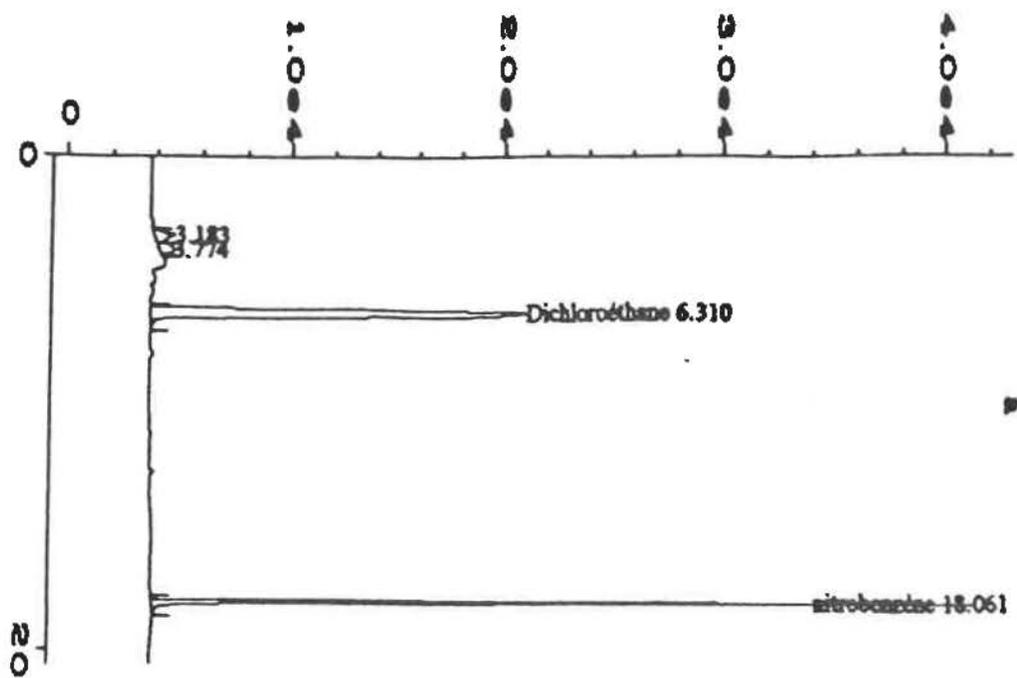
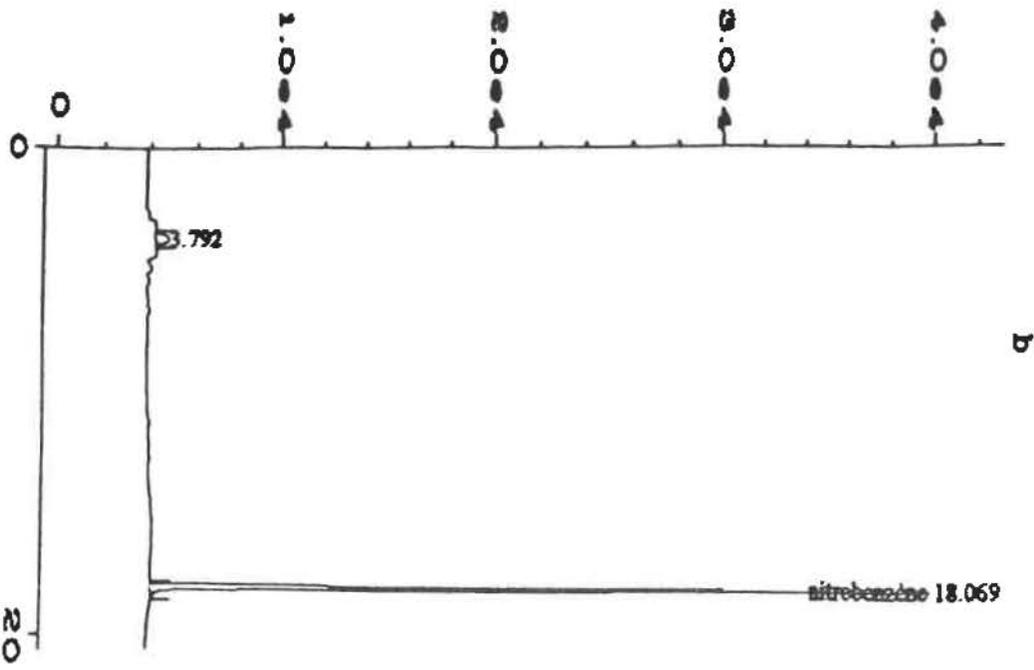
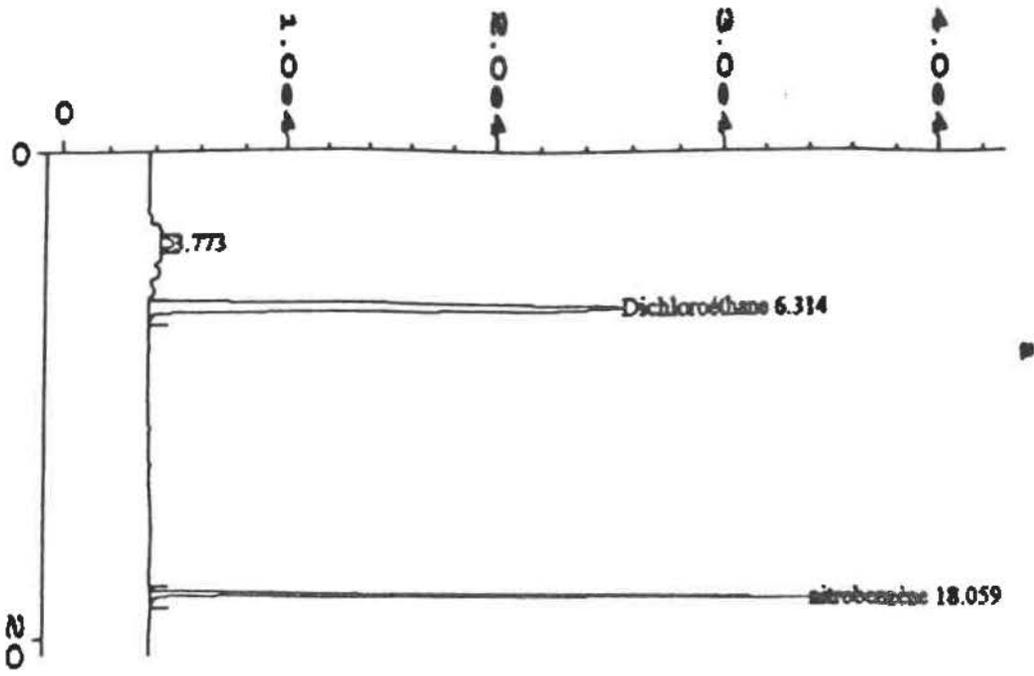


FIGURE 14: Suivi du dichloroéthane dans une culture de *Ancylobacter aquaticus* AD20: a) jour 0, b) jour 5.



par les solvants chlorés ciblés par la présente étude. Ceci bien évidemment diminue énormément les chances de voir un ou plusieurs genres bactériens, possédant la capacité de dégrader les produits en question, s'établir dans un tel milieu. Il faut se rappeler que l'évolution enzymatique des bactéries est directement reliée aux conditions environnementales et à la nature des substrats avec lesquels elles sont en contact (Daubaras et Chakrabarty, 1992). Cette évolution nécessite par ailleurs du temps pour se faire et est d'autant plus longue lorsqu'il s'agit de produits xénobiotiques comme les solvants chlorés utilisés pour cette étude. D'un autre côté, il y a l'utilisation des sols d'une usine de fabrication de peinture. Même si les chances d'y trouver des populations bactériennes aptes à la biodégradation des solvants chlorés étaient meilleures, rien ne les garantissait. Il n'existe pas véritablement d'historique de fuites de ces solvants dans le sol entourant l'usine, même si la probabilité que ce soit le cas soit réelle, d'autant plus qu'au moment de l'échantillonnage, la compagnie procédait au remplacement de certains réservoirs. Cependant, il est reconnu que les solvants organiques s'adsorbent sur les composants humiques du sol, donc, il est possible qu'ils n'aient pas été disponibles pour servir de substrats (Bottomley, 1993). Par ailleurs, la durée du temps de contact entre les bactéries et les substrats disponibles ne peut être établie. Ce temps de contact est

pourtant un facteur très important dans l'adaptation des bactéries à leur environnement et surtout aux substrats qui leur sont disponibles. Dans le cas de cette étude, il n'est pas certain que le contact entre les bactéries du sol Sico et les solvants chlorés ait eu lieu. Finalement, d'après les informations obtenues de M. André Pruss, responsable du dossier des substances dangereuses au Ministère de l'Environnement et de la Faune en 1994, les sites répertoriés sur le territoire québécois pour leur contamination aux solvants chlorés sont très peu nombreux. Dans ces conditions, il est fort difficile de faire un échantillonnage qui concorde parfaitement avec les objectifs visés. Le meilleur pari était que des bactéries possédant des enzymes ayant un spectre d'activité large (donc possibilité de co-métabolisme) auraient pu répondre aux attentes formulées dans cette étude.

12. Oxygénation des cultures

Les tests effectués avec la résazurine (Davis et Carpenter, 1990) pour vérifier si les cultures étaient bien en condition aérobie ont permis de déduire deux choses. Dans un premier temps, il est fort important que la phase gazeuse dans les bouteilles sérologiques ou tout autre contenant à fermeture hermétique, occupe un volume suffisant pour combler les besoins en oxygène des cultures (Janssen et al, 1987), surtout pour des

périodes de temps relativement longues. Il s'agit en fait d'éviter que l'oxygène devienne un facteur limitant de la biodégradation. Il a été démontré au cours des expériences réalisées que le problème de l'oxygénation se posait beaucoup moins ou était carrément absent lorsque des bouteilles sérologiques de 125 ml contenant 25 ml de culture étaient utilisés. Par contre, le milieu devenait rapidement incolore, ce qui dénote l'absence d'oxygène, lorsque des bouteilles de 50 ml remplies à 80% de leur capacité étaient employées. Deuxièmement, une bonne agitation des cultures est apparue essentielle. Il a été remarqué que même dans les bouteilles remplies à 80%, le problème ne se situait pas forcément au niveau d'un manque d'oxygène, mais plutôt d'une distribution inadéquate de ce dernier. Halden et Chase (1991) ont en effet observé que l'oxygène même en trace est suffisant pour dégrader le trichloroéthylène. L'expérience menée avec la rézasurine a permis de constater qu'une bonne agitation était nécessaire pour l'aération des cultures. Bien sûr, il est plus difficile d'agiter des contenants s'ils sont presque pleins, d'où le besoin de garder une phase gazeuse importante.

13. Acidification des milieux

Le test d'acidification des milieux a été employé dans l'espoir d'accélérer le processus de sélection de bactéries

capables de biodégradation des six solvants chlorés. Lorsque ces tests ont été réalisés sur un milieu solide, aucune conclusion n'a pu être tirée, car lorsque l'indicateur virait au jaune, signe d'une acidification, c'était dans la majorité des cas dans les deux groupes, c'est-à-dire avec les cultures et les contrôles abiotiques. Dans un milieu liquide par contre, des différences étaient perceptibles, surtout pour les cultures où le toluène était utilisé en co-substrat. Selon les cultures et les solvants une acidification, milieu jaune, ou une alcalinisation, milieu bleu, était visible. Toutefois, ce test n'était qu'à titre indicatif, parce qu'il est évident que même si il y avait biodégradation des solvants résultant dans la libération d'ions chlore, il est très probable que ces ions réagiraient rapidement avec l'un des constituants du milieu.

Conclusion

Cette étude portant sur la biodégradation des solvants chlorés aliphatiques, a permis de constater que bon nombre de bactéries présentes dans les échantillons de sol utilisés sont résistantes à des concentrations de solvant relativement élevées. La plupart des solvants ne présente, en effet, pas de toxicité inhibant la croissance des bactéries étudiées.

Par ailleurs, même si la biodégradation des solvants étudiés n'a pu être réellement démontrée, les résultats obtenus de façon répétitive avec plusieurs isolats permettent de penser que certains solvants jouent un rôle dans leur croissance. Toutefois, ce rôle reste encore inexpliqué.

Lors de l'utilisation du toluène comme co-substrat dans les enrichissements de cultures, il s'est avéré que les consortiums obtenus avec différents solvants sont en mesure de dégrader ce composé aromatique. Cette biodégradation du toluène semble relativement rapide. Toutefois, il n'a pas eu l'effet escompté, c'est-à-dire celui de faciliter la biodégradation des solvants chlorés par co-métabolisme.

Les expériences de comparaison menées avec deux souches de références, *Xanthomonas autotrophicus* GJ10 et *Ancylobacter aquaticus* AD20, dans des conditions identiques à celles utilisées tout au long de la présente étude ont donné des

résultats positifs. C'est-à-dire que les deux souches en question dégradent le dichloroéthane. Ces résultats permettent d'affirmer que la méthodologie analytique employée est adéquate pour l'étude de la dégradation des solvants chlorés par les bactéries.

Les sols contaminés utilisés dans ce travail ne semblent pas contenir des organismes possédant les enzymes permettant la dégradation rapide et significative des solvants chlorés aliphatiques. Ces résultats ont été observés malgré les incubations prolongées, les passages successifs et l'utilisation de co-substrats.

Finalement, il est à souligner que la possibilité d'obtenir des bactéries aptes à la biodégradation à partir de sols non contaminés par les produits dont la dégradation est souhaitée sont plutôt minces. Même si la possibilité existe, il est évident que les bactéries de ces sols ne possèdent pas nécessairement le bagage enzymatique nécessaire pour métaboliser des produits avec lesquels elles n'ont jamais été en contact.

Pour maximiser les chances d'observer une biodégradation lors de futures expériences, il serait important de mettre au point un système de micro-détection des solvants chlorés.

Remerciements

Je voudrais remercier le Dr. Gilles Paquette pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir dirigé mon projet de maîtrise, pour ses conseils précieux, sa disponibilité.

Mes remerciements vont également à M. Sylvain Milot dont l'aide a été essentielle à la réalisation de ce projet.

Je remercie du fond du coeur ma famille et mes amis pour le support qu'ils m'ont apporté tout au long de ma maîtrise, merci beaucoup J.D.

Bibliographie

- Aggazzotti, G., Fantuzzi, G., Righi, E., Predieri, G., Gobba, F.M., Paltrinieri, M., Cavalleri, A.** 1994. Occupational and environmental exposure to perchloroethylene (PCE) in dry cleaners and their family members. *Archiv. of Environ. Health.* **49:487-493.**
- Alexander, M.** 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* **211:130-138.**
- Alvarez-Cohen, L., McCarty, P.L., Boulygina, E., Hanson, R.S., Brusseau, G.A., Tsien, H.C.** 1992. Characterization of a methane-utilizing bacterium from a bacterial consortium that rapidly degrades trichloroethylene and chloroform. *Appl. Environ. Microbiol.* **58:1886-1893.**
- Alvarez-Cohen, L., McCarty, P.L.** 1991a. A cometabolic biotransformation model for halogenated aliphatic compounds exhibiting product toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **25:1381-1387.**
- Alvarez-Cohen, L., McCarty, P.L.** 1991b. Product toxicity and cometabolic competitive inhibition modeling of chloroform and trichloroethylene transformation by methanotrophic resting cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **57:1031-1037.**
- Belkin, S.** 1992. Biodegradation of haloalkanes. *Biodegrad.* **3:299-313.**
- Bouwer, E.J., McCarty, P.L.** 1983a. Transformation of 1- and 2-carbon halogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **45:1286-1294.**
- Bouwer, E.J., McCarty, P.L.** 1983b. Transformations of halogenated organic compounds under denitrification conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **45:1295-1299.**
- Bottomley, P.J.** 1993. Microbial activity in soil. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4:318-322.**
- Bowman, J.P., Sayler, G.S.** 1994. Optimization and maintenance of soluble methane monooxygenase activity in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biodegrad.* **5:1-11.**
- Braus-Stromeyer, S.A., Hermann, R., Cook, A.M., Leisinger, T.** 1993. Dichloromethane as the sole source for an acetogenic mixed culture and isolation of a fermentative, dichloromethane-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59:3790-3797.**

- Broholm, K., Christensen, T.H., Jensen, B.K.** 1991. Laboratory feasibility studies on biological in-situ treatment of a sandy soil contaminated with chlorinated aliphatics. *Environ. Technol.* **12**:279-289.
- Bruin de, W.P., Kotterman, M.J.J., Posthumus, M.A., Schraa, G., Zehnder, A.J.B.** 1992. Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1996-2000.
- Brunner, W., Staub, D., Leisinger, T.** 1980. Bacterial degradation of dichloromethane. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:950-958.
- Chaudhry, G.R., Chapalamadugu, S.** 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* **55**:59-79.
- Cobb, G.D., Bouwer, E.J.** 1991. Effects of electron acceptors on halogenated organic compound biotransformations in a biofilm column. *Environ. Sci. Technol.* **25**:1066-1074.
- Coyle, C.G., Parkin, G.F., Gibson, D.T.** 1993. Aerobic phenol-induced TCE degradation in completely mixed continuous-culture reactors. *Biodegrad.* **4**:59-69.
- Dabrock, B., Riedel, J., Bertram, J., Gottschalk, G.** 1992. Isopropylbenzene (cumen) - a new substrate for the isolation of trichloroethylene-degrading bacteria. *Arch. Microbiol.* **158**:9-13.
- Dalton, H., Stirling, D.I.** 1982. Co-metabolism. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **297**:481-496.
- Daubaras, D., Chakrabarty, A.M.** 1992. The environment, microbes and bioremediation activities modulated by the environment. *Biodegrad.* **3**:125-135.
- Davis, J.W., Madsen, S.S.** 1991. The biodegradation of methylene chloride in soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**:463-474.
- Davis, J.W., Carpenter, C.L.** 1990. Aerobic biodegradation of vinyl chloride in groundwater samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3878-3880.
- Deckard, L.A., Willis, J.C., Rivers, D.B.** 1994. Evidence for the aerobic degradation of tetrachloroethylene by a bacterial isolate. *Biotech. Lett.* **16**:1221-1224.

- DiStefano, T.D., Gossett, J.M., Zinder, S.H.** 1992. Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3622-3629.
- Egli, C., Tschan, T., Scholtz, R., Cook, A.M., Leisinger, T.** 1988. Transformation of tetrachloromethane to dichloromethane and carbon dioxide by *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2819-2824.
- Eng, W., Palumbo, A.V., Sriharan, S., Strandberg, G.W.** 1991. Methanol suppression of trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichosporium (OB3b)* and methane-oxidizing mixed cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **28/29**:887-899.
- Enzien M.V., Picardal, F., Hazen, T.C., Arnold, R.G., Fliermans, C.B.** 1994. Reductive dechlorination of trichloroethylene and tetrachloroethylene under aerobic conditions in a sediment column. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2200-2204.
- Erzmann, M.W., Pöpel, H.J.** 1991. Biodegradation of tetrachloromethane under anaerobic conditions. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **19**:249-255.
- Fan, S., Scow, K.M.** 1993. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1911-1918.
- Fathepure, B.Z., Vogel, T.M.** 1991. Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by a two-stage biofilm reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3418-3422.
- Fetzner, S., Lingens, F.** 1994. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Reviews.* **58**:641-685.
- Fewson, C.A.** 1988. Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Tibtech.* **6**:148-153.
- Folsom, B.R., Chapman, P.J., Pritchard, P.H.** 1990. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1279-1285.

- Freedman, D.L., Gossett, J.M.** 1991. Biodegradation of dichloromethane and its utilization as a growth substrate under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2847-2857.
- Gälli, R., MacCarty, P.L.** 1989. Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a *Clostridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:837-844.
- Ghosal, D., You, I.-S., Chatterjee, D.K., Chakrabarty, A.M.** 1985. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science* **228**:135-142.
- van Groenestijn, J.W., Hesselink, P.G.M.** 1993. Biotechniques for air pollution control. *Biodegrad.* **4**:283-301.
- Halden, K., Chase, H.A.** 1991. Methanotrophes for renovation of polluted aquifers. *Trans IChemE. Part A* **69**:181-183.
- Hanzlik, R.P.** 1981. Reactivity and toxicity among halogenated methanes and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **30**:3027-3030.
- Hardman, D.J.** 1991. Biotransformation of halogenated compounds. *Crit. Rev. Biotechnol.* **11**:1-40.
- Hartmans, S., Tramper, J.** 1991. Dichloromethane removal from waste gases with a trickle-bed bioreactor. *Bioproc. Eng.* **6**:83-92.
- Henson, J.M., Yates, M.V., Cochran, J.W.** 1989. Metabolism of chlorinated methanes, ethanes, and ethylenes by a mixed bacterial culture growing on methane. *J. Ind. Microbiol.* **4**:29-35.
- Herbert, P., Charbonnier, P., Rivolta, L., Servais, M., Van Mensch, F., Campbell, I.** 1986. The occurrence of chlorinated solvents in the environment. *Chem. and Ind. dec.* 1986 861-869.
- Holliger, C., Schraa, G., Stams, A.J.M., Zehnder, A.J.B.** 1993. A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2991-2997.
- Holst, J., Martens, B., Gulyas, H., Greiser, N., Sekoulov, I.** 1991. Aerobic biological regeneration of dichloromethane-loaded activated carbon. *J. Environ. Eng.* **117**:194-208.

- Hughes, J.B., Parkin, G.F.** 1992. The effect of mixtures of xenobiotics and primary electron donor on the anaerobic biotransformation of high concentrations of chlorinated aliphatic. *Wat. Sci. Technol.* **26**:117-126.
- Jacobs, M.B, Schefflan, L.** 1953. Chemical analysis of industrial solvents. Interscience Publishers, Inc. New-York. USA. 501 p.
- Janssen, D.B., Ploeg van der, J.R., Pries, F.** 1994. Genetic and biochemistry of 1,2-dichloroethane degradation. *Biodegrad.* **5**:249-257.
- Janssen, D.B., Oldenhuis, R., Wijngaard, van den A.J.** 1990. Hydrolytic and oxydative degradation of chlorinated aliphatic compounds by aerobic microorganism. *Biotechnol. Biodegrad.* **4**:105-125.
- Janssen, D.B., Jager, D., Witholt, B.** 1987. Degradation of *n*-haloalkanes and α,ω Dihaloalkanes by wild-type and mutants of *Acinetobacter* sp. strain GJ70. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:561-566.
- Janssen, D.B., Scheper, A., Dijkhuizen, L., Witholt, B.** 1985. Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:673-677.
- Keith, L.H., Telliard, W.A.** 1979. Priority pollutants. I-a perspective view. *Environ. Sci. Technol.* **13**:416-423.
- Kempton, H., Davis, A., Olsen, R.** 1992. Remediation of solvent-contaminated soils by aeration. *J. Environ. Qual.* **21**:121-128.
- Koh, S.-C., Bowman, J.P., Sayler, G.S.** 1993. Soluble methane monooxygenase production and trichloroethylene by a type I methanotroph, *Methylomonas methanica* 68-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:960-967.
- Lanzarone, N.A., McCarty, P.L.** 1990. Column studies on methanotrophic degradation of trichloroethene and 1,2-dichloroethane. *Ground Water.* **28**:910-919.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**:305-315.
- Lee, Sang H., Bower Carberry, J.** 1991. Aerobic biodegradation of trichloroethylene enhanced by chemical oxidants. *Hazard. Ind. Wastes.* **23**:198-210.

Leisinger, T., Bader, R., Hermann, R., Schmid-Appert, M., Vuilleumier, S. 1994. Microbes, enzymes and genes involved in dichloromethane utilization. *Biodegrad.* 5:237-248.

Leisinger, T., La Roche, S., Bader, R., Schmid-Appert, M., Braus-Stromeyer, S., Cook, A.M. 1993. Chlorinated methanes as carbon sources for aerobic and anaerobic bacteria. In *Microbial growth on C₁ compounds*. p351-363. In J.C. Murrell and D.P. Kelly (ed) Intercept, Andover U.K.

Leisinger, T. 1983. Microorganism and xenobiotic compounds. *Experientia* 39:1183-1191.

Lewis, T.A., Crawford, R.L. 1993. Physiological factors affecting carbon dehalogenation by the denitrifying bacterium *Pseudomonas sp.* strain KC. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1635-1641.

Liang, L.-N., Grbic-Galic, D. 1993. Biotransformation of chlorinated aliphatic solvents in the presence of aromatic compounds under methanogenic conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 12:1377-1393.

Madsen E.L. 1991. Determining in situ biodegradation: facts and challenges. *Environ. Sci. Technol.* 25:1663-1673.

Mathews, K.C., van Holde, K.E. 1990. *Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Redwood city CA. 1129p.

Meer van der, J.R., Bosma, T.N.P., Bruin de, W.P., Harms, H., Holliger, C., Rijnaarts, H.M.M., Tros, M.E., Schraa, G., Zehnder, J.B. 1992. Versatility of soil column experiments to study biodegradation of halogenated compounds under environmental conditions. *Biodegrad.* 3:265-284.

Miller, G.P., Portier, R.J., Hoover, D.G., Friday, D.D., Sicard, J.L. 1990. Biodegradation of chlorinated hydrocarbons in an immobilized bed reactor. *Environ. Progress.* 9:161-164.

Mohn, W.W., Tiedje J.M. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* 56:482-507.

Mu, Y.D., Scow, K.M. 1994. Effect of trichloroethylene and toluene concentrations on TCE and toluene biodegradation and the population density of TCE and toluene degraders in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2661-2665.

Murray, W.D., Richardson, M. 1993. Progress toward the biological treatment of C₁ and C₂ halogenated hydrocarbons. *Crit. Rev. Environ. Sci. and Technol.* **23(3):195-217.**

Nelson, M.J.K., Montgomery, S.O., Pritchard, P.H. 1988. Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **54:604-606.**

Nelson, M.J.K., Montgomery, S.O., Mahaffey, W.R., Pritchard, P.H. 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **53:949-954.**

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

Oldenhuis, R., Vink, R.L.M.J., Janssen, D.B., Witjolt, B. 1989b. Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55:2819-2826.**

Pavlosathis, S.G., Zhuang, P. 1991. Transformation of trichloroethylene by sulfate-reducing cultures enriched from a contaminated subsurface soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36:416-420.**

Rasche, M.E., Hyman, M.R., Arp, D.J. 1991. Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea*: Cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **57:2986-2994.**

Semprini, L., Hopkins, G.D., Roberts, P.V., McCarty, P.L. 1992. Pilot scale field studies of in situ bioremediation of chlorinated solvents. *J. Hazard. Waste.* **32:145-162.**

Shields, M.S., Montgomery, S.O., Chapman, P.J., Cuskey, S.M., Pritchard, P.H. 1989. Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.* **55:1624-1629.**

Shin, H.J., Yang, J.W. 1992. The effect of aromatic compounds on trichloroethylene degradation using *Pseudomonas* species. *Biochem. Eng. Conf.* 824-6. Edited by Furusaki, Shintaro; Endo, Isao; Matsuno, Ryuichi. Springer. Tokyo, Japan.

- Singleton, I.** 1994. Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **59**:9-23.
- Speitel, G.E.Jr., Member, ASCE, Closmann, F.B.** 1991a. Chlorinated solvent biodegradation by methanotrophs in unsaturated soils. *J. Environ. Eng.* **117**:541-558.
- Speitel, G.E.Jr., Alley R.Jr.** 1991b. Bioremediation of unsaturated soils contaminated with chlorinated solvents. *J. Hazard. Mat.* **28**:81-90.
- Speitel, G.E.Jr., Thompson, R.C., Segar, R.L.Jr., Leonard, J.M.** 1990. Effect of growth substrate and microbial population on the biotransformation of chlorinated aliphatic chemicals. *Proc. Annu. Conf., Am. Water Works Assoc. (pt.1)* 123-127.
- Strand, S.E., Wodrich, J.V., Stensel, H.D.** 1991. Biodegradation of chlorinated solvents in a sparged, methanotrophic biofilm reactor. *Res. J. WPCF.* **63**:859-867.
- Strand, S.E., Shippert, L.** 1986. Oxidation of chloroform in an aerobic soil exposed to natural gas. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:203-205.
- Stucki, G.** 1990. Biological decomposition of dichloromethane from a chemical process effluent. *Biodegrad.* **1**:221-228.
- Stuki, G., Krebsler, U., Leisinger, T.** 1983. Bacterial growth on 1,2-dichloroethane. *Experientia* **39**:1271-1273.
- Vanderberg, L.A., Perry, J.J.** 1994. Dehalogenation by *Mycobacterium vaccae* JOB-5: role of the propane monooxygenase. *Can. J. Microbiol.* **40**:169-172.
- Vandenbergh, P.A., Kunka, B.S.** 1988. Metabolism of volatile chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2578-2579.
- Vannelli, T., Logan, M., Arciero, D.M., Hooper, A.B.** 1990. Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1169-1171.
- Vargas, C., Ahlert, R.C.** 1987. Anaerobic degradation of chlorinated solvents. *J. Water Pollut. Control Fed.* **59**:964-968.

Vogel, T.M. 1991. Mechanisms and applications of sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chlorinated organic compounds. Environ. Poll. 1- ICEP.1 764-771.

Vogel, T.M., Criddle, C.S., McCarty, P.L. 1987. Transformation of halogenated aliphatic compounds. Environ. Sci. Technol. 21:722.

Wackett, L.P., Logan, M.S.P., Blocki, F.A., Bao-li, C. 1992. A mechanistic perspective on bacterial metabolism of chlorinated methanes. Biodegrad. 3:19-36.

Wijngaard van den, A.J., Kleij van der, R.G., Doornweerd, R.E., Janssen, D.B. 1993. Influence of organic nutrients and cocultures on the competitive behavior of 1,2-dichloroethane-degrading bacteria. Appl. Environ. Microbiol, 59:3400-3405.

Wilson, J.T., Wilson, B.H. 1985. Biotransformation of trichloroethylene in soil. Appl. Environ. Microbiol. 49:242-243.