

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ A

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

SYLVIE OUELLET

ISOLEMENT ET ÉTUDE DE LA SOUCHE Phe-6 *Pseudomonas*
putida DÉGRADANT LE PHÉNANTHRÈNE

Décembre 1994

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	viii
SOMMAIRE	ix
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. CONTAMINATION DES SOLS	6
1.1 Sources de contamination	6
1.2 Contamination par les hydrocarbures	6
2. NORMES	7
3. HYDROCARBURES	9
4. HAPs	12
5. TRAITEMENT BIOLOGIQUE DE SOLS	13
5.1 Traitement Ex-situ	14
5.2 Traitement In-situ	15
6. PARAMÈTRES	15
7. MICROORGANISMES	17
8. VOIE MÉTABOLIQUE DES HAPs PAR LES BACTÉRIES	19
9. PHÉNANTHRÈNE	22
10. FLORE BACTÉRIENNE INDIGÈNE DÉGRADANT LE PHÉNANTHRÈNE	27
10.1 Dénombrement et isolement	27
10.2 Besoins nutritifs pour la dégradation	28
10.3 Spectre d'activité	30
10.4 Minéralisation du phénanthrène	32
10.5 Inoculation de microorganismes	34
10.6 Performance d'une souche pure en sol	36
11. IMPORTANCE DES PSEUDOMONAS DANS LA MICROFLORE DU SOL	37

MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
1. SOL DE LA SABLIERE THOUIN	39
1.1 Échantillonnage et conservation du sol	39
1.2 Pourcentage d'humidité du sol	39
2. ÉNUMÉRATION DE LA MICROFLORE	39
2.1 Dénombrement total	39
2.2 Dénombrement des microflores utilisant certains HAPs	40
2.3 Dénombrement des microflores de sols traités en réacteur	41
3. ISOLEMENT, CONSERVATION ET IDENTIFICATION DES SOUCHES	41
4. ACTIVITÉ EN MILIEU LIQUIDE DES SOUCHES ISOLÉES	42
4.1 Inoculum	42
4.2 Culture en milieu liquide	43
4.3 Extraction et analyse	44
5. ENRICHISSEMENT EN MILIEU LIQUIDE	46
6. ÉTUDE DE L'UNE DES SOUCHES ISOLÉES	47
6.1 Sélection	47
6.2 Optimisation de l'activité	47
6.3 Spectre d'activité d'enlèvement des hydrocarbures	48
6.4 Effet de différentes concentrations de phénanthrène	49
6.5 Identification des métabolites	49
6.6 Enlèvement de l'intermédiaire	51
6.7 Cinétique d'enlèvement du phénanthrène	51
6.8 Toxicité	52
6.9 Minéralisation	53
6.10 Performance en sol	54
6.10.1 Microcosmes	54
6.10.2 Énumération de la microflore utilisant le phénanthrène	56
6.10.3 Extraction et analyses du phénanthrène	56
RÉSULTATS	57
1. OBSERVATION DES HALOS ET DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN	58
2. DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN DE SOLS TRAITÉS EN RÉACTEUR	62
3. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES	65

4.	CONSERVATION DES SOUCHES	65
5.	ACTIVITÉ EN MILIEU LIQUIDE DES SOUCHES ISOLÉES	67
6.	ENRICHISSEMENTS EN MILIEU LIQUIDE	73
7.	SÉLECTION D'UNE SOUCHE ET IDENTIFICATION	76
8.	OPTIMISATION DE L'ACTIVITÉ	78
9.	MILIEU OPTIMISÉ ET SOUCHE FLU-4	85
10.	SPECTRE D'ACTIVITÉ	88
11.	EFFET DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE HAP SUR L'ACTIVITÉ D'ENLÈVEMENT	90
12.	IDENTIFICATION ET CONFIRMATION DES MÉTABOLITES	92
13.	ENLÈVEMENT DE L'INTERMÉDIAIRE	95
14.	CINÉTIQUE D'ENLÈVEMENT DU PHÉNANTHRÈNE PAR LA SOUCHE PHE-6	99
15.	TOXICITÉ	103
16.	MINÉRALISATION	104
17.	PERFORMANCE DE LA SOUCHE PHE-6 EN SOL	104
DISCUSSION		108
1.	OBSERVATION DES HALOS ET DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN	109
2.	ISOLEMENT ET CONSERVATION	111
3.	ACTIVITÉ EN MILIEU LIQUIDE	112
4.	ENRICHISSEMENT EN MILIEU LIQUIDE	113
5.	SÉLECTION D'UNE SOUCHE	114
6.	OPTIMISATION DE L'ACTIVITÉ	115
7.	MILIEU OPTIMISÉ ET SOUCHE FLU-4	119
8.	SPECTRE D'ACTIVITÉ	119

9.	EFFET DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE HAP SUR L'ACTIVITÉ D'ENLÈVEMENT	124
10.	CONFIRMATION ET ENLÈVEMENT DE L'INTERMÉDIAIRE	123
11.	CINÉTIQUE D'ENLÈVEMENT DU PHÉNANTHRÈNE PAR LA SOUCHE PHE-6	125
12.	TOXICITÉ	127
13.	MINÉRALISATION	127
14.	PERFORMANCE DE LA SOUCHE PHE-6 EN SOL	128
	CONCLUSION	131
	REMERCIEMENTS	134
	BIBLIOGRAPHIE	136
	ANNEXE: Abréviations	148

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Grille des critères indicatifs de la contamination des sols pour les HAPs.	8
Tableau II.	Observation de halos sur milieu solide B.H.025.	59
Tableau III.	Dénombrement bactérien du sol contaminé de la sablière Thouin.	61
Tableau IV.	Dénombrement bactérien du sol de la sablière Thouin traité dans le réacteur no 15 après 186 jours d'incubation à la température de la pièce.	63
Tableau V.	Dénombrement bactérien du sol de la sablière Thouin traité dans le réacteur no 2 après 294 jours d'incubation à la température de la pièce.	64
Tableau VI.	Souches isolées en culture pure formant des halos sur milieu solide B.H.025.	66
Tableau VII.	Pourcentages d'enlèvement de HAPs en milieu liquide obtenus avec les souches isolées retenues.	74
Tableau VIII.	Pourcentages d'enlèvement de HAPs obtenus dans les cultures d'enrichissements en milieu liquide (B.H.025).	75
Tableau IX.	Caractéristiques de <u>Pseudomonas putida</u> , souche Phe-6.	77
Tableau X.	Enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 en présence de différents suppléments ajoutés au milieu de culture.	79
Tableau XI.	Enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 en présence de différentes concentrations de suppléments et de vitamines.	81

Tableau XII.	Effet de l'ajout de suppléments au milieu de culture sur l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6	82
Tableau XIII.	Enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 dans un milieu de culture faiblement et fortement supplémenté	84
Tableau XIV.	Effet de l'ajout d'amidon et d'extrait de levures sur l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6	86
Tableau XV.	Enlèvement du fluorène par la souche Flu-4 et du phénanthrène par la souche Phe-6 dans le milieu optimisé et non optimisé.	87
Tableau XVI.	Activité de la souche Phe-6 en présence de HAPs à 3 noyaux.	89
Tableau XVII.	Effet de différentes concentrations de phénanthrène sur l'enlèvement de phénanthrène par la souche Phe-6.	91
Tableau XVIII.	Effet de l'ajout de protéose-peptone 0,5% (p/v) au temps cinq jours sur la cinétique d'enlèvement de l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque.	98
Tableau XIX.	Enlèvement de l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque par la souche Phe-6.	100
Tableau XX.	Production de CO ₂ marqué (C ¹⁴) par la souche Phe-6 lors de la dégradation du [9- ¹⁴ C] phénanthrène en fonction du temps d'incubation.	105
Tableau XXI.	Enlèvement du phénanthrène du sol par la souche Phe-6 en fonction du temps d'incubation.	106

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.	Structures chimiques de quelques HAPs (Wilson et Jones, 1993)	10
FIGURE 2.	Voie métabolique utilisée par les bactéries pour l'oxydation des HAPs (Cerniglia, 1984)	20
FIGURE 3.	Différentes voies métaboliques pour l'oxydation bactérienne du phénanthrène (Cerniglia, 1984)	25
FIGURE 4.	Enlèvement de l'acénaphthylène par la souche Ace-1 en milieu liquide (B.H.025) en fonction du temps d'incubation.	69
FIGURE 5.	Enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 en milieu liquide (B.H.025) en fonction du temps d'incubation.	71
FIGURE 6.	Fragmentogrammes obtenus par spectrométrie de masse pour l'identification de l'intermédiaire de la voie métabolique du phénanthrène.	93
FIGURE 7.	Chromatogrammes obtenus en chromatographie en phase gazeuse pour la confirmation de l'intermédiaire de la voie métabolique du phénanthrène.	96
FIGURE 8 .	Cinétique d'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 en milieu liquide (B.H.500V).	101

SOMMAIRE

La technique de vaporisation sur milieu solide a été effectuée afin de pouvoir énumérer et isoler des bactéries provenant de la microflore indigène du sol de la sablière Thouin pouvant potentiellement dégrader des HAPs. Neufs souches ont ainsi été obtenues avec les HAPs acénaphthylène, fluorène, phénanthrène et anthracène. L'activité de chacune de ces souches envers leur HAP respectif a été testée en milieu liquide et des pourcentages d'enlèvement significatifs pour au moins une souche ont été obtenus pour tous ces HAPs, sauf pour l'anthracène. Des cultures d'enrichissement ont été effectuées avec les HAPs pour lesquels peu ou pas d'halos ont été observés sur milieu solide, soit pour l'anthracène, le pyrène, le chrysène, le benzanthracène et le benzopyrène. Des pourcentages d'enlèvement significatifs ont été obtenus pour l'anthracène, le chrysène et le benzanthracène.

Parmi les souches isolées en culture pure, la souche Phe-6, identifiée comme étant un *Pseudomonas putida*, a été sélectionnée pour ses capacités à enlever 52% du phénanthrène après 42 jours d'incubation dans le milieu de culture Bushnell-Haas supplémenté à 0,025% (p/v) de chacun des suppléments suivants: extrait de levures, protéose peptone et amidon. L'ajout de ces suppléments est essentiel pour obtenir

un enlèvement significatif de HAP. L'ajout des suppléments extrait de levures et protéose peptone à une concentration de 0,5% (p/v) en plus de 250 μ L d'un mélange de vitamines au milieu de culture, a permis d'optimiser l'activité d'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6. En effet, 81% d'enlèvement ont été obtenus après seulement 5 jours d'incubation. Le contrôle du pH du milieu de culture dans un écart variant de 7.1 à 7.4 s'est révélé être un paramètre important pour atteindre ce rendement.

L'étude de la cinétique a démontré que la majorité de l'enlèvement du phénanthrène survient dans la phase stationnaire de croissance, soit entre la première et la troisième journée d'incubation. De plus, les variations de pH ont été les plus grandes lors des trois premiers jours d'incubation. Le principal intermédiaire obtenu lors de l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 a été l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque.

La souche Phe-6 s'est révélée apte à utiliser le fluorène en plus du phénanthrène. Dans les conditions de culture utilisées, cette souche n'a pas utilisé d'autres HAPs comme l'anthracène, le benzanthracène, le benzopyrène et des composés aliphatiques comme l'hexadécane et le tétradécane.

La production de CO_2 marqué à partir de $[9\text{-}^{14}\text{C}]$ phénanthrène a indiqué que la souche Phe-6 minéralise le phénanthrène. L'inoculation de cette souche dans le sol d'un microcosme a permis d'accélérer l'enlèvement du phénanthrène dans ce sol comparativement au sol non inoculé.

INTRODUCTION

La contamination des sols est un problème majeur et le biotraitement est une technologie importante dans la restauration de ces sites. Le biotraitement est un procédé naturel qui offre une solution permanente et à des coûts avantageux (Singleton, 1994; Murray et al., 1994; Lewis, 1993; Atlas, 1990). Comme le biotraitement est basé sur l'activité enzymatique des populations bactériennes, différents facteurs environnementaux peuvent affecter le rendement de ces microorganismes (Morgan et Watkinson, 1989). L'optimisation d'un biotraitement requiert donc l'acquisition de meilleures connaissances de ces microorganismes qui sont les ouvriers de ces biotraitements.

Les hydrocarbures constituent la source la plus importante de contamination des sols québécois (Anonyme, 1990). Les hydrocarbures regroupent différentes classes de composés dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAPs. Le phénanthrène est un HAP de trois noyaux aromatiques qui est largement répandus dans l'environnement (Cerniglia, 1984). Le phénanthrène est un bon modèle d'étude pour la dégradation des HAPs dû à son comportement physique et parce que sa structure de base est retrouvée chez d'autres HAPs considérés comme mutagènes (Guerin et Jones, 1988b; Okpokwasili et al., 1986; Sims et Overcash, 1983).

Différents microorganismes ont été répertoriés comme étant capables d'utiliser les HAPs dont le phénanthrène. Parmi ceux-ci, il y a les *Pseudomonas* qui représentent le principal genre bactérien présent dans le sol (Alexander, 1977).

Différents suppléments sont répertoriés dans la littérature comme servant de substrat pour la croissance bactérienne lors de l'enlèvement du phénanthrène, comme du glucose, du peptone, de l'extrait de levures et de l'amidon (Keuth et Rehm, 1991). À notre connaissance, il n'y a pas d'étude portant sur l'utilisation des suppléments extrait de levures, protéose peptone et d'un mélange de vitamines pour optimiser l'activité d'enlèvement du phénanthrène par une souche de *Pseudomonas putida*.

De plus, le fait qu'un microorganisme peut enlever un HAP en milieu liquide au laboratoire, ne signifie pas que ce microorganisme aura le même rendement envers ce HAP dans le sol (Manilal et Alexander, 1991). L'utilisation d'un modèle contrôlé qui simule en partie les conditions environnementales, comme le microcosme, est donc une étape importante dans le cadre de l'étude d'une souche bactérienne ayant des capacités d'enlèvement d'un HAP. Plusieurs études ont été effectuées sur l'inoculation bactérienne et différents résultats, tant des succès que des échecs, ont été rapportés

(Comeau et al., 1993; Gunulan-Fournier, 1993; Ramadan et al., 1990; Goldstein et al., 1985). À notre connaissance, il n'y a pas dans la littérature des essais qui ont porté sur l'inoculation d'une souche de *Pseudomonas putida* dans un microcosme contenant du sol contaminé par les hydrocarbures.

Dans ce travail, l'objectif principal a été de mieux comprendre l'aspect microbiologique du biotraitement pour acquérir des connaissances qui nous permettront de mieux intervenir dans le cadre d'un biotraitement. Dans un premier temps, nous avons énuméré et isolé des souches pouvant potentiellement dégrader certains HAPs présents dans le sol de la sablière Thouin. L'une de ces souches a été sélectionnée et étudiée plus à fond dans le but d'optimiser son activité d'enlèvement d'un HAP, d'évaluer son spectre d'activité, sa voie métabolique, sa cinétique d'enlèvement et pour ses capacités de minéralisation. Finalement, la performance de cette souche a été vérifiée dans un microcosme sol pour savoir s'il y a avantage à inoculer cette souche dans le sol de la sablière Thouin.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. CONTAMINATION DES SOLS

1.1 Sources de contamination

Diverses activités humaines, incluant l'élimination des déchets et autres résidus comme les dépotoirs et les neiges usées, les activités industrielles comme les industries de pâtes et papiers et les tanneries, l'entreposage et le transport de substances dangereuses comme les produits pétrochimiques, l'épandage de pesticides ou de boues d'usines d'épuration, sont à l'origine de la contamination des sols (Anonyme, 1988). Différents polluants peuvent ainsi être répertoriés dans les sols contaminés comme des métaux, des minéraux, des composés phénoliques, des pesticides, des composés aromatiques monocycliques volatils, des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des hydrocarbures chlorés (Anonyme 1988).

1.2 Contamination par les hydrocarbures

La contamination des sols par les hydrocarbures est reliée aux activités humaines d'utilisation du pétrole, incluant le raffinement, le transport, l'entreposage et les déversements accidentels (Anonyme, 1990; Heitkamp, 1987; Bossert et al., 1984b). Les hydrocarbures sont responsables d'environ 60% des sols contaminés québécois et représentent ainsi la source la plus importante de contamination des sols. Des cas de contamination de sols sont aussi signalés dans le grand nord québécois (Anonyme, 1990).

2. NORMES

Le Ministère de l'environnement et de la faune du Québec (MEF) a établi une grille des critères indicatifs de contamination des sols exprimés en ppm pour chacun des polluants, qui permet de classer les sols sous trois valeurs-seuils soit A, B, C et de déterminer trois plages d'intervention soit les plages A-B, B-C, et C (Anonyme, 1988).

Le Tableau 1 représente la grille des critères indicatifs pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et illustre les valeurs-seuils A, B, et C pour ce type de polluants. Les concentrations pour le seuil A sont les plus basses soit inférieures à 0,1 ppm et pour le seuil C, elles atteignent les valeurs les plus élevées soit de 10 à 100 ppm. La plage A-B regroupe des sols faiblement contaminés où aucun travaux de décontamination ne seront nécessaires. Ces sols peuvent être utilisés pour des constructions de type résidentiel. La plage B-C regroupe des sols contaminés mais qui feront l'objet de travaux de décontamination seulement s'il y a un impact des contaminants sur la nappe phréatique (Anonyme, 1988). Ces sols peuvent être utilisés tels quels pour des usages industriel ou commercial. Finalement, la plage C regroupe des sols qui sont plus fortement contaminés et où tous les usages y sont restreints (Anonyme, 1988). C'est-à-dire qu'ils devront être décontaminés avant d'être utilisés.

Tableau 1. Grille des critères indicatifs de la contamination des sols pour les HAPs

HAPs	Concentrations HAPs mg/kg de matière sèche (ppm)		
	A	B	C
Benzo(a)anthracène	< 0,1	1	10
1,2 benzanthracène			
7,2 diméthyl	< 0,1	1	10
Dibenzo(a,h)anthracène	< 0,1	1	10
Chrysène	< 0,1	1	10
3 méthylcholanthrène	< 0,1	1	10
Benzo(b)fluoranthène	< 0,1	1	10
Benzo(j)fluoranthène	< 0,1	1	10
Benzo(k)fluoranthène	< 0,1	1	10
Benzo(g,h,i)pérylène	< 0,1	1	10
Benzo(c)phénanthrène	< 0,1	1	10
Pyrène	< 0,1	10	100
Benzo(a)pyrène	< 0,1	1	10
Dibenzo(a,h)pyrène	< 0,1	1	10
Dibenzo(a,i)pyrène	< 0,1	1	10
Dibenzo(a,l)pyrène	< 0,1	1	10
Indéno(1,2,3,c,d) pyrène	< 0,1	1	10
Acénaphtène	< 0,1	10	100
Acénaphtylène	< 0,1	10	100
Anthracène	< 0,1	10	100
Fluoranthène	< 0,1	10	100
Fluorène	< 0,1	10	100
Naphthalène	< 0,1	5	50
Phénanthrène	< 0,1	5	50

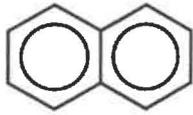
(Anonyme, 1988)

3. HYDROCARBURES

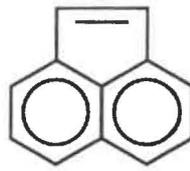
Les hydrocarbures regroupent quatre classes de composés soit les aliphatiques, les asphaltènes, les résines et les aromatiques (Leahy et Colwell, 1990; Walker et Colwell, 1976). Les aliphatiques sont des composés à longues chaînes de carbone qui peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques. Les aliphatiques linéaires sont considérés comme les composés les plus rapidement éliminés par les microorganismes (Atlas, 1981). Les asphaltènes sont des composés à longues chaînes de carbone et de haut poids moléculaire. Les asphaltènes regroupent des acides carboxyliques, des cétones, des esters et des porphyrines. Les résines regroupent en outre des pyridines, des sulfoxides et des amides (Walker et Colwell, 1976). Les asphaltènes sont considérés comme étant les plus récalcitrants à l'attaque microbienne.

Les aromatiques sont constitués d'un noyau cyclique de base, celui du benzène. Il y a les hydrocarbures aromatiques monocycliques qui comprennent un seul noyau aromatique et les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAPs qui sont constitués par la fusion de deux ou plusieurs noyaux aromatiques, qui peuvent être disposés de façon linéaire, en angle ou en amas (Figure 1) (Wilson et Jones, 1993; Cerniglia, 1992; Cerniglia, 1984; Sims et Overcash, 1983).

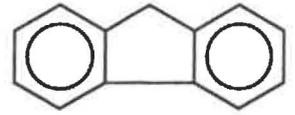
FIGURE 1. Structures chimiques de quelques HAPs
(Wilson et Jones, 1993)



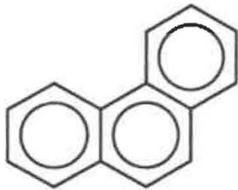
Naphthalène



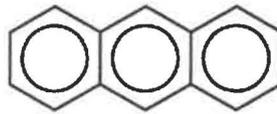
Acénaphthylène



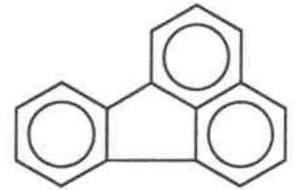
Fluorène



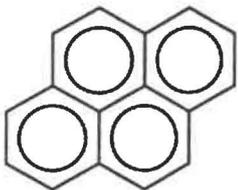
Phénanthrène



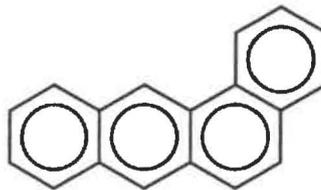
Anthracène



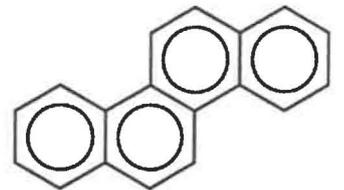
Fluoranthène



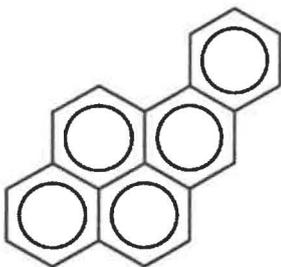
Pyrène



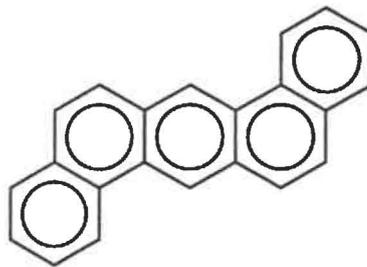
Benz[a]anthracène



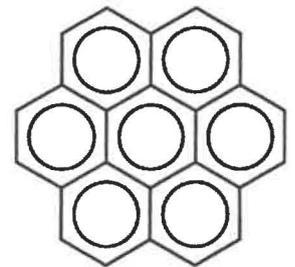
Chrysène



Benzo[a]pyrène



Dibenz[a]anthracène



Coronène

4. HAPs

Les HAPs sont des composés très largement répandus dans l'environnement. Il existe deux voies d'entrée principale pour les HAPs dans l'environnement soit une dite naturelle, reliée à la combustion de la matière organique et une autre dite artificielle, reliée aux activités humaines incluant divers procédés industriels, les traitements de liquéfaction et de gazéification du charbon et l'utilisation du pétrole. (Wilson et Jones, 1993; Heitkamp, 1987; Cerniglia, 1984; Sims et Overcash, 1983;). Les HAPs étant des composés très hydrophobes, ils ont tendance à s'accumuler dans l'environnement (Cerniglia, 1992; Heitkamp, 1987; Mackay et Shiu, 1977). Les HAPs de quatre noyaux aromatiques et plus sont les plus récalcitrants à l'attaque microbienne et certains sont génotoxiques et possèdent des capacités mutagènes (Jacob et al., 1986; Miller et Miller, 1981). C'est pourquoi les HAPs sont identifiés comme des polluants prioritaires par "l'U.S. Environmental Protection Agency".

Une fois dans l'environnement, les HAPs peuvent être soumis à différents destins comme la volatilisation, la photooxydation, l'oxydation chimique, la bioaccumulation, l'adsorption aux particules du sol, la filtration et la dégradation microbienne. Cette dernière constitue le principal phénomène pour l'élimination des HAPs dans l'environnement (Cerniglia, 1992).

5. TRAITEMENT BIOLOGIQUE DE SOLS

Le traitement biologique est un concept étudié depuis plus de quarante ans (Ju et Devinny, 1993; Hoff, 1993). Le biotraitement est devenu une technologie majeure dans la restauration des sites contaminés parce qu'il offre une solution permanente en transformant les polluants en CO₂, H₂O et biomasse et ce, à des coûts avantageux comparativement aux traitements physiques ou chimiques (Singleton, 1994). Seulement aux États-Unis, une centaine de sites contaminés sont l'objet de projets de biotraitement et au Québec, la politique de réhabilitation des terrains contaminés favorise les solutions définitives (Anonyme, 1990).

De plus le biotraitement est un procédé naturel qui est basé sur les capacités enzymatiques des populations microbiennes indigènes du sol (Murray et al., 1994; Lewis, 1993; Atlas, 1990). La biodégradation des hydrocarbures par les populations microbiennes est l'un des mécanismes primaires par lequel ce type de polluant est éliminé de l'environnement (Atlas, 1990). Les biotraitements requièrent cependant plus de temps que d'autres technologies comme l'incinération par exemple et dans certains cas, des sous-produits toxiques peuvent être générés. Également, la complexité d'un mélange de polluants peut affecter le rendement du biotraitement.

Il y a deux grandes catégories de traitement biologique soit *ex-situ* qui implique une excavation du sol contaminé et *in-situ* c'est-à-dire que le sol n'est pas déplacé.

5.1 Traitement *Ex-situ*

Il y a trois principaux traitements soit le procédé en pile, en bioréacteur et l'épandage. Le procédé en pile implique un pré-traitement du sol soit un assèchement, un tamisage, l'ajout de nutriments ou de produits biodégradables comme de la paille par exemple, pour permettre l'aération et le drainage du sol. Le sol est par la suite distribué en plusieurs buttes sous lesquelles est installée une membrane géotextile. L'eau qui s'échappe de la pile est recueillie et traitée (Morgan et Watkinson, 1989; Lapinskas, 1989).

Dans le cas du procédé en bioréacteur, les sols sont traités sous forme de boues auxquelles sont ajoutés des nutriments. Les réacteurs sont à film fixe ou sont agités. Les réacteurs peuvent être opérés en mode continu ou discontinu. Le contenu du réacteur passe à travers un système de séparation d'eau et celle-ci est recyclée (Irvine et al., 1993; Castaldi et Ford, 1992; Morgan et Watkinson, 1989).

L'épandage consiste à excaver et étendre le sol contaminé dans une enceinte fermée, des nutriments sont ajoutés et le sol est labouré pour permettre une bonne aération. L'air et

l'eau de filtration sont recueillis et traités (Morgan et Watkinson, 1989; Casarini et al., 1988).

5.2 Traitement In-situ

Différents traitements peuvent être utilisés comme par exemple le traitement en milieu saturé d'eau, par percolation et en milieu sec. Comme ce type de biotraitement n'est pas le propos de ce travail, nous suggérons quelques références: Wilson et Jones, 1993; Morgan et Watkinson, 1992; Morgan et Watkinson, 1990; Sims, 1990; Morgan et Watkinson, 1989.

6. PARAMÈTRES

Le biotraitement accélère le processus naturel de dégradation des hydrocarbures en optimisant les conditions environnementales du site contaminé (Wang et Bartha, 1990). Des facteurs environnementaux peuvent affecter et limiter le rendement de la population microbienne et leur importance relative peut varier d'un site à l'autre (Morgan et Watkinson, 1989). De façon générale, ces paramètres sont la température, l'oxygène et le potentiel redox, les éléments nutritifs comme le carbone, l'azote et le phosphore, le taux d'humidité et le pH (Singleton, 1994; Wilson et Jones, 1993; Sims, 1990; Leahy et Colwell, 1990; Morgan et Watkinson, 1989; Heitkamp, 1987).

La température peut modifier l'aspect physique et la composition chimique des hydrocarbures et peut affecter le

métabolisme microbien et la composition de la flore indigène du sol (Leahy et Colwell, 1990). La plupart des microorganismes isolés des sols contaminés sont des mésophiles et les valeurs optimales de température se situent donc entre 25 et 37°C (Singleton, 1994; Wilson et Jones, 1993).

L'oxygène est un facteur important dans le biotraitement puisque la première étape du catabolisme des hydrocarbures est une oxydation du substrat par une oxygénase (Leahy et Colwell, 1990; Morgan et Watkinson, 1989). Les valeurs optimales se situent entre 10 et 40% d'O₂ (Wilson et Jones, 1993).

Les éléments nutritifs limitants dans le sol sont généralement le carbone, l'azote et le phosphore. Le carbone et l'azote jouent un rôle primordial dans la formation des molécules organiques et de la biomasse. Le phosphore répond aux besoins énergétiques de la cellule (Leahy et Colwell, 1990; Sims, 1990; Sirvins et Tramier, 1985). Les valeurs optimales de ces éléments nutritifs sont exprimées sous forme de rapport. D'après Wilson et Jones (1993) le ratio optimal pour le carbone et l'azote (C:N) est de 60:1 et celui pour le carbone et le phosphore (C:P) est de 800:1.

Le taux d'humidité du sol est un autre facteur important puisque le métabolisme et la croissance microbienne dépendent de la disponibilité en eau de leur environnement (Leahy et

Colwell , 1990). La valeur optimale pour le taux d'humidité d'un sol est fixée entre 30 et 90% d'H₂O (Wilson et Jones, 1993).

Bien que le pH du sol peut être très variable, la plupart des bactéries indigènes préfèrent un pH aux environs de la neutralité. Les valeurs optimales de pH se situent donc entre 7,5 et 7,8 (Wilson et Jones, 1993).

Il existe de nombreuses études dans la littérature qui ont porté sur l'optimisation de biotraitement de sols contaminés par les hydrocarbures à l'aide des différents paramètres de culture (Erickson et al., 1993; Antai, 1990; Song et al., 1990; Fedorak et Westlake, 1981; Tabak et al., 1991; Ramadan et al., 1990; Atlas, 1981; Cundell et Traxler, 1974; Atlas et Bartha, 1972).

7. MICROORGANISMES

Les bactéries et les champignons sont les principaux microorganismes responsables de l'élimination des hydrocarbures dans l'environnement (Leahy et Colwell, 1990). Bien que ces microorganismes soient largement répandus dans les différents écosystèmes (Atlas, 1981; Phillips et Stewart, 1974), la fraction qu'ils représentent par rapport à la microflore indigène du sol est très variable. Pour les champignons, elle se situe entre 6 et 82% comparativement à

0,13 et 50% pour les bactéries (Leahy et Colwell, 1990). Mais le nombre de microorganismes pouvant utiliser les hydrocarbures et leur proportion par rapport à la flore indigène peuvent augmenter suite à la contamination du sol par des hydrocarbures. Plusieurs études ont même rapporté une capacité d'adaptation de la microflore indigène par rapport aux hydrocarbures, ce qui se traduit par une augmentation de l'utilisation des hydrocarbures associée avec un sol contaminé en comparaison avec un sol non contaminé (Leahy et Colwell, 1990; Tabak et al., 1991).

Cette capacité d'utiliser les hydrocarbures n'est pas restreint à seulement quelques genres de bactéries et de champignons, mais plutôt à un groupe très divers (Atlas, 1981). En 1969, Zolbell a dénombré plus de 100 espèces pouvant utiliser les hydrocarbures, représentant 30 genres bactériens et regroupant des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Cerniglia, 1993). Les genres bactériens les plus importants utilisant les hydrocarbures dans le sol sont: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* et *Bacillus* (Leahy et Colwell, 1990). D'autres genres bactériens ont également été isolés comme *Micrococcus*, *Vibrio*, *Brevibacterium*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Aeromonas* et *Beijeriackia* (Cerniglia, 1992; Leahy et Colwell, 1990; Heitkamp, 1987; Cerniglia, 1984; Fedorack et Westlake, 1981;

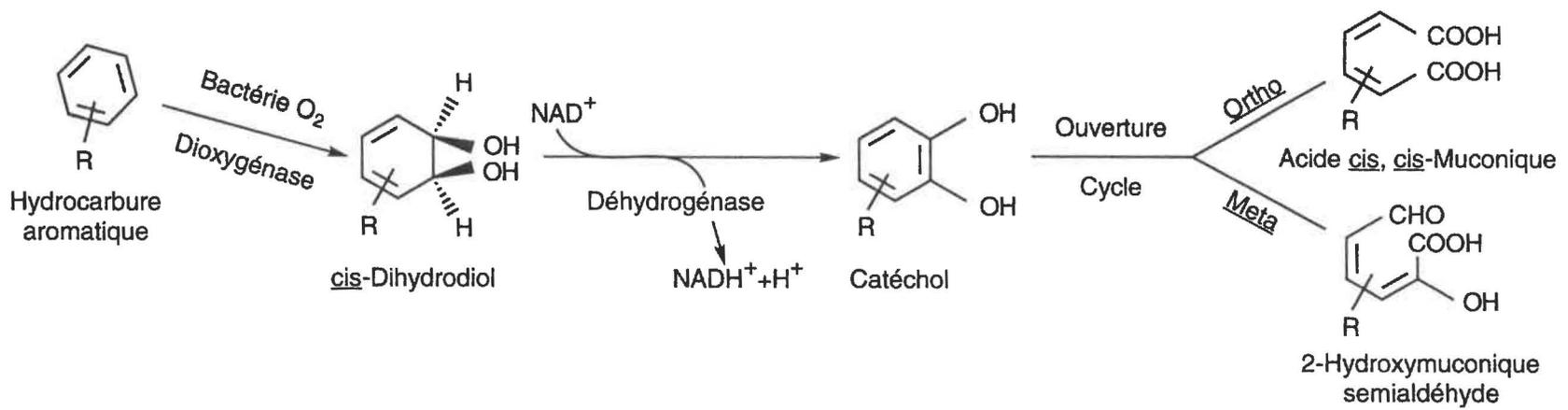
Atlas, 1981; Austin et al. 1977; Cundell et Traxler , 1974; Phillips et Stewart, 1974).

Les champignons *Trichoderma* et *Mortierella* sont les plus fréquemment isolés du sol comme étant capables d'utiliser les hydrocarbures (Leahy et Colwell, 1990). D'autres champignons ont été isolés lors de diverses études comme: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Cunninghamella* (Barr et Aust, 1994; Brodkorb et Legge, 1992; Leahy et Colwell, 1990; Atlas, 1981). Des levures telles que *Candida* et *Rhodotorula*, ont été identifiées comme pouvant utiliser les hydrocarbures (Leahy et Colwell, 1990; Sirvins et Tramier, 1985; Atlas, 1981). Des algues ont également été identifiées comme étant capables d'utiliser les hydrocarbures (Leahy et Colwell, 1990; Cerniglia, 1984; Atlas, 1981).

8. VOIE MÉTABOLIQUE DES HAPS PAR LES BACTÉRIES

Les voies métaboliques des hydrocarbures utilisées par les différents microorganismes sont diversifiées. Dans ce travail, compte tenu que notre intérêt s'est dirigé vers l'étude d'une souche bactérienne, nous nous attarderons sur la voie métabolique des HAPs utilisés pour les bactéries (Figure 2). La première étape consiste en une oxydation du HAP par une dioxygénase, qui convertit le substrat en *cis*-dihydrodiol suite à l'incorporation de deux atomes d'oxygène moléculaire

FIGURE 2. Voie métabolique utilisée par les bactéries pour l'oxydation des HAPs (Cerniglia, 1984)



(Heitkamp, 1987; Atlas, 1981; Cerniglia, 1984). Il a été démontré que des dioxétanes instables sont formés lors de cette étape et sont par la suite réduits en dihydrodiols comportant une configuration *cis* (Gibson 1982 et 1978). Les bactéries peuvent ainsi oxyder une variété de composés aromatiques allant du benzène jusqu'au benzopyrène (Cerniglia, 1984).

Le composé *cis*-dihydrodiol est par la suite déhydrogéné par l'enzyme déhydrogénase *cis*-dihydrodiol qui reforme le noyau benzénique pour donner des intermédiaires dihydroxylés comme le catéchol (Patel et Gibson, 1974). Il y a par la suite oxydation par une autre dioxygénase et ouverture du noyau soit en position ortho ou méta (Dagley, 1981). Les intermédiaires obtenus sont par la suite catabolisés par le cycle de Krebs (Cerniglia, 1993).

9. PHÉNANTHRÈNE

Le phénanthrène est constitué de trois noyaux aromatiques et est largement répandus dans l'environnement (Cerniglia, 1984). Bien qu'il ne soit pas cancérigène ou mutagène, le phénanthrène sert de modèle lors d'étude sur la dégradation des HAPs parce que sa structure de base est retrouvée dans des HAPs considérés comme cancérigènes tels que le benzanthracène (Okpokwasili et al., 1986; Sims et Overcash, 1983). De plus, le phénanthrène est un bon modèle d'étude dû à son comporte-

ment physique et la solubilité de son intermédiaire (Guerin et Jones, 1988b).

La solubilité du phénanthrène dans l'eau est de 1,29 mg/L et illustre bien la faible solubilité des HAPs (Volkering et al., 1993; Weissenfels et al., 1990). Le phénanthrène est sensible à la photooxydation mais n'est pas volatil (Sims et Overcash, 1983).

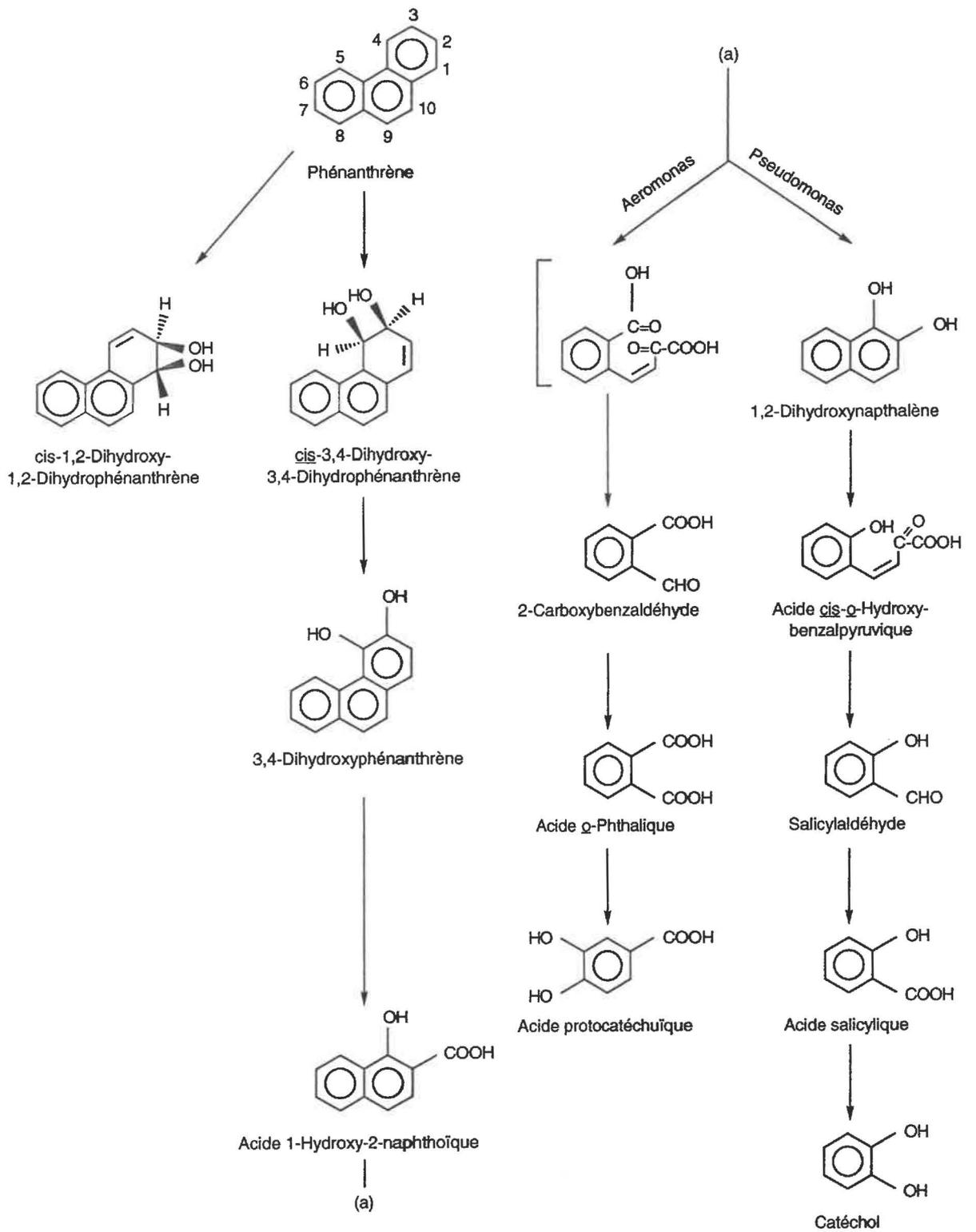
Les microorganismes pouvant utiliser le phénanthrène sont largement répandus (Sherrill et Sayler, 1980). Une variété de genres bactériens possédant cette capacité ont été répertoriés comme par exemple *Pseudomonas*, *Beijerinckia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Bacillus* et *Mycobacterium* (Yang et al., 1994; Singleton, 1994; Heitkamp, 1987; Sims et Overcash, 1983; Kiyohara et al., 1982; Wodzinski et Johnson, 1968). Différents champignons peuvent également utiliser le phénanthrène comme *Aspergillus*, *Cunninghamella* et *Phanerochaete* (Singleton, 1994; MacGillivray et Shiaris, 1993; Cerniglia et al., 1989a).

La voie métabolique de la dégradation du phénanthrène par les bactéries et plus spécifiquement par les *Pseudomonas* a fait l'objet de plusieurs études. L'oxydation initiale du phénanthrène se fait soit en position ortho (entre les carbonnes 3,4) ou en position méta (entre les carbonnes 1,2)

pour former soit le *cis*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophénanthrène ou le *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrophénanthrène (Figure 3) (Smith, 1990; Cerniglia, 1984; Jerina et al., 1976; Evans et al., 1965). La formation de *trans*-3,4-dihydro-3,4-dihydrophénanthrène a également été rapportée chez des souches de *Pseudomonas* (Jerina et al., 1976; Evans et al., 1965). Il y a par la suite oxydation du dihydrodiol en 3,4-dihydroxyphénanthrène qui est métabolisé en acide 1-hydroxy-2-naphthoïque. Cet intermédiaire est le produit prédominant de la dégradation du phénanthrène (Guerin et Jones, 1988b). Il est par la suite décarboxylé en 1,2-dihydroxynaphtalène, puis métabolisé par la voie de dégradation du naphthalène pour donner le catéchol (Cerniglia, 1984).

Certaines bactéries telles que *Aeromonas*, des *Pseudomonas* des groupes *fluorescents* et non *fluorescents* et des *Vibrio*, utilisent une autre voie en convertissant l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque en 2-carboxybenzaldéhyde et finalement en acide protocatéchuïque (Kiyohara et Nagao, 1978). Les champignons pour leur part métabolisent le phénanthrène en *trans*-dihydrodiols et un nouvel intermédiaire a été identifié, soit le 1-hydroxyphénanthrène, lors de la dégradation du phénanthrène par *Cunninghamella elegans* (Cerniglia et al., 1989a; Cerniglia, 1984).

FIGURE 3. Différentes voies métaboliques pour l'oxydation bactérienne du phénanthrène (Cerniglia, 1984)



10. FLORE BACTÉRIENNE INDIGÈNE DÉGRADANT LE PHÉNANTHRÈNE

10.1 Dénombrement et isolement

Différentes méthodes faciles d'utilisation, fiables et rapides ont été développées. L'une de ces méthodes consiste à vaporiser un solvant, dans lequel est dissous le HAP, à la surface d'une gélose et d'observer la formation de halos entourant les colonies bactériennes après quelques jours d'incubation (Kiyohara et al., 1982).

Une modification de cette technique, proposée par Bogardt et Hemmingsen (1992), consiste à incorporer l'échantillon bactérien et le HAP solubilisé dans la gélose. Cependant, ces méthodes peuvent sous-estimer la population bactérienne présente puisqu'il est reconnu qu'environ 5% des bactéries peuvent former des colonies sur milieu solide (Frostegard et al., 1993; Cerniglia, 1993).

Différents auteurs utilisent une technique d'enrichissement en milieu liquide pour ainsi favoriser la croissance des bactéries pouvant utiliser les HAPs, puisque ces bactéries ne sont, en général, pas dominantes dans le sol et certaines d'entre elles poussent lentement (Horowitz et al., 1975). Les bactéries sont cultivées en présence du HAP, comme le phénanthrène, comme seule source de carbone ou en présence de d'autres substrats pour favoriser la croissance et les suspensions bactériennes sont réinoculées dans du milieu frais

à intervalles réguliers (Weissenfels et al., 1990; Stucki et Alexander, 1987).

10.2 Besoins nutritifs pour la dégradation

Différentes bactéries comme *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Beijerinckia* et *Rhodococcus* ont été répertoriées comme étant capables d'utiliser le phénanthrène lorsque celui-ci est la seule source de carbone (Takizawa et al., 1994; Walter et al., 1991; Weissenfels et al., 1991; Weissenfels et al., 1990; Stucki et Alexander, 1987; Sims et Overcash, 1983). Le phénanthrène doit alors supporter la croissance bactérienne et être disponible pour les bactéries. Selon plusieurs auteurs, le phénanthrène, comme d'autres HAPs, serait utilisé par les bactéries sous forme dissoute (Efroymsen et Alexander, 1991; Thomas et al., 1986; Wodzinski et Coyle, 1974; Wodzinski et Bertolini, 1972). Le taux de dissolution du phénanthrène limite son utilisation par les bactéries. Dean-Raymond et Bertha (1975) ont démontré qu'un *Pseudomonas putida* utilisait le phénanthrène comme seule source de carbone, mais que ce HAP soutenait faiblement la croissance bactérienne.

Certaines bactéries ne peuvent utiliser le phénanthrène comme seule source de carbone et nécessite l'ajout de suppléments pour soutenir la croissance bactérienne. Le phénanthrène est alors enlevé par co-métabolisme et ce phénomène

s'applique à plusieurs HAPs et est considéré comme un mécanisme important pour l'enlèvement des polluants dans l'environnement (Alexander, 1981; Perry, 1979; Hulbert et Krawlec, 1977; Horvath, 1972). Différents suppléments sont répertoriés dans la littérature comme servant de substrat pour la croissance bactérienne lors de l'enlèvement du phénanthrène comme par exemple, l'ajout de faible concentration de glucose dans le cas d'une souche d'*Arthrobacter* (Keuth et Rehm, 1991), l'ajout de peptone, d'extrait de levures et d'amidon dans le cas d'une bactérie à Gram positif (Heitkamp et Cerniglia, 1988b). Dans certains cas, une bactérie peut exiger la présence d'un facteur de croissance précis comme par exemple la vitamine B₁₂ (Grifoll et al., 1992).

Le phénomène de co-oxydation peut également être impliquer lors de l'enlèvement du phénanthrène par l'utilisation d'un HAP ou d'un composé aliphatique servant comme source de carbone pour soutenir la croissance bactérienne (Keck et al., 1989). La co-oxydation est similaire au cométabolisme mais implique la présence d'un hydrocarbure servant de co-substrat dans un milieu où un ou plusieurs hydrocarbures sont présents comme substrats pour la croissance bactérienne (Foster, 1962). Le n-hexadécane, par exemple, peut servir de substrat pour la croissance bactérienne lors de l'oxydation du phénanthrène (Keck et al., 1989). Également, Bauer et Capone(1988) ont

démonstré que le naphthalène stimulait l'enlèvement du phénanthrène.

Le phénanthrène peut à son tour être utilisé comme substrat pour soutenir la croissance bactérienne en présence de HAPs de quatre noyaux aromatiques et plus, comme le pyrène, le benzanthracène et le benzopyrène (McKenna et Heath, 1976).

10.3 Spectre d'activité

Différentes études ont été effectuées sur l'utilisation d'un HAP par une bactérie en culture pure. Mais l'étude de la capacité d'utilisation de différents HAPs par une même bactérie en culture pure est d'un grand intérêt dans la compréhension de l'enlèvement des HAPs dans l'environnement (Kiyohara et al., 1992). Différents auteurs ont également étudié la capacité d'utilisation d'un mélange de HAPs en présence d'une culture mixte de bactéries (Wiesel et al., 1993; Atlas, 1981; Walker et al., 1975).

Il existe deux tendances dans la littérature concernant l'enlèvement des HAPs par les bactéries. Certains auteurs privilégient la présence d'une culture mixte pour l'enlèvement de différents HAPs en se basant sur le fait qu'une culture mixte de bactéries renferment des propriétés physiologiques permettant un plus large spectre d'enlèvement des HAPs (Heitkamp et Cerniglia, 1988b; Bauer et Capone, 1988).

D'autres auteurs croient plutôt qu'une culture bactérienne pure peut posséder des enzymes à large spectre d'action qui permettent à cette bactérie d'utiliser différents HAPs (Takizawa et al., 1994; Soli et Bens, 1973).

Chez différents genres bactériens, il a été démontré qu'une seule souche était capable d'utiliser, en plus du phénanthrène, d'autres HAPs comme le naphthalène, le fluorène, l'anthracène, le pyrène et le fluoranthène. Ces genres retrouvés sont: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Xanthomonas*, *Brevibacterium* et *Vibrio* (Yang et al., 1994; Weissenfels et al., 1991; Foght et Westlake, 1988; Jeffrey et al., 1975; Cundell et Traxler, 1974; Evans et al., 1965). De plus, Yang et al. (1994) ont démontré chez une souche de *P. putida*, qu'un même groupe de gènes peuvent coder pour la partie supérieure des voies métaboliques de différents HAPs comme le naphthalène et le phénanthrène mais l'utilisation du fluorène ne serait pas reliée à ce groupe de gènes. Selon ces mêmes auteurs, il semble qu'une voie métabolique et des enzymes similaires sont impliquées dans l'utilisation du naphthalène et du phénanthrène par cette souche de *P. putida*, ce qui suggère à ces mêmes auteurs que l'utilisation de d'autres HAPs de plus hauts poids moléculaires comme le pyrène, pourraient être codée par ce même groupe de gènes. Si une bactérie utilise un HAP de quatre noyaux comme le pyrène, il est probable qu'elle puisse également utiliser des HAPs de

trois noyaux et moins (Kiyohara et al., 1992; Kiyohara et Nagao, 1978).

Il existe également deux tendances dans la littérature quant à la capacité pour une même bactérie d'utiliser à la fois des hydrocarbures aliphatiques et des HAPs (Foght, 1990). Certains auteurs prétendent qu'il existe une certaine spécificité dans le type d'hydrocarbures utilisés par une bactérie et qu'ainsi l'enlèvement d'un mélange de composés aliphatiques et de HAPs requiert la présence de différentes bactéries (Austin et al., 1977). Des conclusions contradictoires ont été rapportées par d'autres auteurs, supportant le fait qu'une même bactérie, comme *Pseudomonas*, peut à la fois utiliser des composés aliphatiques et des HAPs (Gough et al., 1992; Foght et Westlake, 1988; Walker et al., 1975; Candell et Traxler, 1974; Soli et Bens, 1973).

10.4 Minéralisation du phénanthrène

La mesure de l'évolution de la production de $^{14}\text{CO}_2$ à partir d'un HAP marqué au carbone-14 présent soit dans une solution aqueuse ou dans un sol, est une méthode sensible et largement répandue pour évaluer la biodégradation et le métabolisme de ce composé par la population microbienne (Fedorak et al., 1982; Marinucci et Bartha, 1979). Il y a dégradation si le HAP est minéralisé, c'est-à-dire complète-

ment décomposé en ses constituants minéraux tels que le CO₂ et H₂O (Singleton, 1994).

Le phénanthrène marqué ([9-¹⁴C-]phénanthrène) sert souvent d'indicateur pour évaluer la capacité de minéralisation d'un microorganisme envers ce HAP (Brodkorb et Legge, 1992; Manilal et Alexander, 1991). Malgré la sensibilité des techniques utilisant un produit marqué comme le [9-¹⁴C-]phénanthrène, la démonstration d'une dégradation complète demeure difficile (Singleton, 1994). La minéralisation requiert une dégradation plus étendue des noyaux aromatiques (Foght et Westlake, 1988) et il peut y avoir accumulation d'un intermédiaire dans la phase aqueuse, ce qui limite la production et la récupération de CO₂ marqué (Keuth et Rehm, 1991; Guerin et Jones, 1988b; Stucki et Alexander, 1987).

Différents genres bactériens ont été répertoriés pour leur capacité de minéraliser le phénanthrène comme *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes* et une bactérie non identifiée Gram positive (Moeller et Ingvorsen, 1993; Keuth et Rehm, 1991; Foght et Westlake, 1988; Guerin et Jones, 1988a). Le champignon *Phanerochaete chrysosporium* a également été rapporté comme étant capable de minéraliser le phénanthrène (Brodkorb et Legge, 1992).

10.5 Inoculation de microorganismes

L'inoculation consiste à ajouter au sol ou à d'autres milieux contaminés, des microorganismes en culture pure ou en mélange reconnus pour leur capacité à enlever les polluants présents dans le sol et ainsi contribuer à améliorer le biotraitement (Comeau et al., 1993; Stephenson et Stephenson, 1992; Vecchioli et al., 1990). Plusieurs études impliquant l'inoculation bactérienne ont été effectuées et différents résultats, tant des succès que des échecs, ont été rapportés (Comeau et al., 1993; Gunulan-Fournier, 1993; Ramadan et al., 1990; Goldstein et al., 1985). Différents facteurs comme des facteurs biologiques tels que la compétition avec la microflore indigène, la prédation par les protozoaires, des facteurs chimiques tels que l'inhibition par des composés toxiques, la faible concentration des nutriments et des facteurs physiques tels que la faible diffusion bactérienne dans le sol, ont été cités pour expliquer l'échec de l'augmentation de l'enlèvement des polluants suite à certaines inoculations (Singleton, 1994; Comeau et al., 1993; Stephenson et Stephenson, 1992). Plusieurs études ont également rapporté une augmentation de l'enlèvement de différents polluants, incluant même des HAPs de quatre noyaux comme le pyrène suite à l'inoculation de microorganismes (Comeau et al., 1993; Grosser et al., 1991; Ramadan et al., 1990). Certaines de ces études ont utilisé pour l'inoculation un mélange de différentes espèces bactériennes prétendant qu'une combinaison de ces

différentes espèces est plus efficace pour l'enlèvement des polluants. Des résultats positifs ont été obtenus pour l'augmentation de l'enlèvement d'un mélange d'hydrocarbures lorsque l'inoculum comprenait entre autre des *Pseudomonas* (Mueller et al., 1990). Un tel procédé peut être envisagé dans le but d'enlever un mélange de polluants, tel qu'un mélange d'hydrocarbures, mais des effets d'inhibition peuvent survenir entre ces différentes bactéries et ainsi réduire l'enlèvement des hydrocarbures (Soli et Bens, 1973).

De façon plus spécifique, des inoculations avec des cultures pures de bactéries telles que *Alcaligenes*, *Mycobacterium* et *Rhodococcus* ont été effectuées et une augmentation de l'enlèvement du phénanthrène a été observée (Moeller et Ingvorsen, 1993; Mueller et al., 1992; Heitkamp et Cerniglia, 1989).

Différentes études ont porté sur l'utilisation, lors de l'inoculation, de bactéries non indigènes au site contaminé et des bactéries modifiées génétiquement. L'utilisation des bactéries non indigènes a été critiquée comme n'étant pas nécessaire ou étant inefficace (Vecchioli et al., 1990). Dans le cas des bactéries modifiées génétiquement, l'utilisation des *Pseudomonas* est privilégiée écologiquement, comparative-ment à *Escherichia coli* par exemple (Stephenson et Stephenson, 1992; Van Elsas et al., 1989; Foght et Westlake, 1988).

10.6 Performance d'une souche pure en sol

Le fait qu'un microorganisme peut éliminer un HAP en milieu liquide au laboratoire, ne veut pas dire que ce microorganisme aura le même rendement envers ce HAP dans le sol (Manilal et Alexander, 1991). De façon général, ce rendement est moindre lorsque le microorganisme agit au niveau du sol comparativement au rendement obtenu en laboratoire (Jones et al., 1989; Bossert et Bartha, 1984a). Ceci suggère que l'activité microbienne est affectée par les conditions naturelles du sol (Manilal et Alexander, 1991).

Le sol est un milieu complexe, hétérogène et la vie microbienne y est diversifiée (Hattori et Hattori, 1976). L'enlèvement des HAPs présents dans un sol est fortement influencé par une variété de facteurs environnementaux comme par exemple, le type de sol, la concentration des HAPs, le pourcentage de matière organique. La flore indigène de ce sol joue également un rôle important. De plus, la forte adsorption des HAPs à la matrice du sol et leur faible taux de dissolution, comme dans le cas du phénanthrène, font que les HAPs sont peu biodisponibles pour les microorganismes. La biodisponibilité des HAPs est une condition essentielle pour l'enlèvement par biotraitement des HAPs présents dans un sol (Singleton, 1994; Cerniglia et al., 1993; Volkering et al., 1993; Jenkins et Lion, 1993; Volkering et al., 1992; Cerniglia et Heitkamp, 1989; Sims et Overcash, 1983).

L'utilisation d'un modèle contrôlé comme le microcosme, permet de simuler les conditions environnementales retrouvées dans un sol tout en facilitant l'étude de l'enlèvement d'un composé comme le phénanthrène par exemple. Le rôle du microcosme est de combler, en partie, l'écart qui sépare l'étude faite avec un microorganisme en milieu liquide au laboratoire et l'étude faite avec ce microorganisme en milieu naturel réel (Heitkamp, 1987).

11. IMPORTANCE DES PSEUDOMONAS DANS LA MICROFLORE DU SOL

Les *Pseudomonas* sont des bactéries Gram négatifs en forme de bâtonnets, aérobies strictes, mobiles, catalase positive. Les *Pseudomonas* représentent le principal genre bactérien présent dans le sol (Alexander, 1977). De plus, ce genre bactérien possède un métabolisme versatile, ce qui permet aux *Pseudomonas* d'utiliser un bon nombre de composés organiques dont les HAPs (Rossello-Mora et al., 1994; Chakrabarty, 1972).

Des *Pseudomonas* ont été isolés et utilisés dans plusieurs études portant sur l'enlèvement des HAPs et dans certains cas, sur l'enlèvement du phénanthrène (Weissenfels et al., 1990; Foght et Westlake, 1988; Sims et Overcash, 1983; Kiyohara et al., 1982; Kiyohara et Nagao, 1978; Jeffrey et al., 1975; Wodzinski et Johnson, 1968).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. SOL DE LA SABLIÈRE THOUIN

1.1 Échantillonnage et conservation du sol

Le sol utilisé provient de la sablière Thouin située à l'Assomption (Québec). Un mélange des prélèvements effectués en mai 1992 (sol faiblement contaminé, concentration huiles et graisses: 1600 µg/g) et juillet 1992 (sol fortement contaminé, concentration huiles et graisses: 44,000 µg/g) a été utilisé dans les proportions de 25% sol de mai et 75% sol de juillet. Ce mélange a été entreposé à 4°C.

1.2 Pourcentage d'humidité du sol

La détermination du pourcentage d'humidité du sol de la sablière Thouin a été effectuée à l'aide d'une méthode modifiée d'après celle de Bogardt et Hemmingsen (1992). Un gramme de sol a été ajouté dans un creuset propre. Le poids du contenant avec le sol a été noté et le tout a été déposé dans une étuve à 80°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La différence de poids a été utilisée pour calculer le pourcentage d'humidité du sol.

2. ÉNUMÉRATION DE LA MICROFLORE

2.1 Dénombrement total

L'énumération de la microflore totale a été effectuée selon la méthode proposée par Bogardt et Hemmingsen (1992). Un gramme (poids sec) de sol de la sablière Thouin a été ajouté à 24 mL d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS)

stérile et cette suspension a été agitée à la main pendant une minute. Après deux minutes d'attente pour laisser sédimenter le sol, 10 mL de surnageant ont été déposés dans un tube stérile et une série de dilutions décimales a été préparée. Des aliquots de 0.1 mL sont déposés et étalés sur des géloses contenant du milieu Bushnell-Haas (Difco, Détroit, É.U.) supplémenté à 0.025% (p/v) de chacun des éléments suivants: protéose peptone (P.P.) (Difco, Détroit, É.U.), extrait de levures (E.L.) (Grand Island Biological Company, New York., É.U.) et amidon (A.) (Fisher Scientific Company, New Jersey, É.U.). Dorénavant ce milieu sera appelé B.H.025. Le dénombrement des colonies bactériennes a été effectué après cinq et sept jours d'incubation à la température de la pièce. Les résultats présentés sont la moyenne des essais effectués en triplicata et sont exprimés en ufc (unités formatrices de colonies) par gramme de poids sec de sol.

2.2 Dénombrement des microflores utilisant certains HAPs

L'énumération des souches pouvant potentiellement dégrader certains HAPs a été effectuée par la même procédure que celle utilisée pour l'énumération de la microflore totale, sauf qu'après inoculation, les géloses ont été vaporisées par la technique proposée par Kiyohara et Nagao (1978). Une solution de 2% (p/v) d'HAP dans de l'acétone a été utilisée pour la vaporisation. Les géloses ont été incubées à la température de la pièce pour une période de cinq à sept jours.

Puis les colonies entourées d'un halo c'est-à-dire d'une zone d'éclaircissement ont été dénombrées. Les HAPs utilisés ont été les suivants: acénaphthylène, fluorène, phénanthrène, anthracène, pyrène, chrysène, benzo(a)anthracène et benzo(a)-pyrène (Aldrich, Milwaukee, É.U.). Les résultats sont exprimés par gramme de poids sec de sol.

2.3 Dénombrement des microflores de sols traités en réacteur

La méthode décrite précédemment a été utilisée pour l'énumération des souches pouvant potentiellement dégrader certains HAPs dans des sols provenant d'un réacteur performant et non performant en terme d'enlèvement des HAPs. Il s'agissait de réacteurs tubulaires contenant 10 Kg de sol de la sablière Thouin, utilisés dans un autre projet. Ces réacteurs étaient aérés par la base en utilisant de l'air humide à intervalles réguliers.

3. ISOLEMENT, CONSERVATION ET IDENTIFICATION DES SOUCHES

Certaines des souches formant des halos ont été isolées en culture pure sur milieu solide. Ces souches ont été conservées à la température de la pièce par repiquages successifs sur milieu solide et à -70°C par congélation d'aliquots de 0,2 mL contenant 10% (v/v) de glycérol. Chacune des souches isolées en culture pure a été colorée par la technique de Gram puis observée au microscope photonique (Leitz Wetzlar, Allemagne). L'identification de ces souches

bactériennes a été réalisée par la technique des galeries API 20E selon les recommandations du fabricant (Sherwood Medical, New York, É.U.).

4. ACTIVITÉ EN MILIEU LIQUIDE DES SOUCHES ISOLÉES

Des essais en milieu liquide B.H.025 ont été effectués avec les différentes souches isolées en culture pure dans le but de choisir la meilleure pour ses capacités d'enlèvement d'un HAP. La méthode qui a été utilisée s'inspire de celle proposée par Grifoll et al. (1992).

4.1 Inoculum

Un aliquot de l'une des souches isolées conservé à -70°C a été décongelé. Puis, un volume de 0,1 mL a été déposé et étalé en duplicata sur des géloses contenant du milieu de culture B.H.025. Les géloses ont été incubées à la noirceur et à la température de la pièce pour une période de 24 heures. Après ce délai, un volume de 5 mL d'une solution tamponnée PBS a été déposé sur l'une des géloses et la surface de celle-ci a été raclée. La suspension microbienne résultante a été recueillie et déposée sur l'autre gélose. Celle-ci a été raclée à son tour et la suspension recueillie a été déposée dans un erlenmeyer contenant 45 mL de PBS. Cette suspension a été homogénéisée par agitation. Une dilution décimale de cette suspension a été effectuée en utilisant du PBS. Cette

suspension diluée a servi d'inoculum pour ensemencher les milieux liquides.

4.2 Culture en milieu liquide

Un volume de 45 mL du milieu de culture B.H.025 a été déposé dans un erlenmeyer stérile de 500 mL fermé par un bouchon en mousse de polystyrène. Un mL d'une solution de HAP dans de l'éther à une concentration de 0,01% (p/v) a été ajouté. Les erlenmeyers ont été entreposés à la noirceur et à la température de la pièce pour une période de 12 à 24 heures pour permettre l'évaporation de l'éther. Puis, 5 mL de la suspension bactérienne ont été inoculés. Le volume final de la culture est donc de 50 mL. Ces cultures ont été effectuées en plusieurs exemplaires pour tenir compte du fait que nous devons extraire la totalité de la culture et non pas seulement un échantillon, afin d'obtenir plus de précision dans les analyses. Une culture contrôle abiotique (non inoculée) de même volume final a été jumelée à chacune des cultures. Toutes les cultures ont été incubées à la noirceur, à la température de la pièce et ont été agitées à 100 rpm dans des appareils New Brunswick modèle G 25 (New Jersey, É.U.). Le pH des cultures a été maintenu dans un écart variant de 7,1 à 7,4. Le pourcentage d'enlèvement biologique du HAP par la souche bactérienne a été calculé par rapport au contrôle abiotique considéré comme valeur de référence (soit équivalent à 100%) et jumelé au temps d'incubation déterminé.

Pour certaines cultures, la solution de HAP a été remplacée en ajoutant 10 g d'une matrice artificiellement contaminée. Cette matrice était de la silice (Dioxyde de silicium, Fisher Scientific, New Jersey, É.U.). Une solution de HAP à une concentration de 0.01% (p/v) dans de l'éther a été ajoutée à la silice. L'éther a été évaporé à 39°C à l'aide d'un "rotavapor" (Brinkmann, Suisse) et le HAP est resté fixé sur la silice.

4.3 Extraction et analyse

Tout le contenu de l'erlenmeyer a été acidifié en ajoutant un mL de HCl 12M. L'ajout du solvant diéther pour l'extraction s'est fait en trois étapes successives soit: 25 mL contenant 150mg/L de biphenyl comme standard interne, 15 mL et 15 mL. Après chaque ajout de solvant, l'erlenmeyer a été agité vigoureusement pendant une minute et son contenu a été ensuite versé dans une ampoule à décantation. La phase éther a été recueillie dans un erlenmeyer propre. Du Na₂SO₄ a été ajouté pour déshydrater la phase éther.

Deux µL de cette préparation ont été par la suite injectés dans un chromatographe à phase gazeuse (GC), modèle 5890 (Hewlett-Packard, Avondale, É.U.). La colonne capillaire utilisée était de type ultra-2 avec un film intérieur d'une épaisseur de 0,33µ constitué de 5% de phényl-méthyl-silicone (25 m X 0,2mm). L'hélium a servi de gaz porteur.

L'injecteur automatique a été opéré en mode de volume d'injection complet pendant 30 secondes puis en mode de volume d'injection partiel dans un rapport de 25:1. Le chromatographe était muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le programme d'intégration était le Chemstation série 2 version 3365 (Hewlett-Packard).

Deux programmations différentes du four ont été utilisées pour obtenir une bonne résolution de chacun des pics des huit HAPs étudiés. Pour les HAPs acénaphthylène, fluorène, phénanthrène et pyrène, celle-ci était: une température initiale de 70°C suivi d'une augmentation de 20°C/min jusqu'à une température de 210°C puis d'une augmentation de 10°C/min jusqu'à une température de 285°C et finalement d'une augmentation de 20°C/min jusqu'à une température finale de 300°C avec un plateau de 8 minutes. Pour les HAPs anthracène, chrysène, benzanthracène et benzopyrène, la programmation de four a été la suivante: une température initiale de 100°C suivi d'une augmentation de 20°C/min jusqu'à une température de 220°C puis d'une augmentation de 4°C/min jusqu'à une température de 260°C et finalement d'une augmentation de 10°C/min jusqu'à une température de 300°C avec un plateau de 8 minutes. Les concentrations résiduelles des HAPs dans les cultures ont été déterminées à partir de courbes standards.

5. ENRICHISSEMENT EN MILIEU LIQUIDE

Un volume de 25 mL du milieu de culture B.H.025 a été déposé dans un erlenmeyer stérile de 500mL. Le HAP a été ajouté sous forme solide à raison de 0,005 g par erlenmeyer.

L'inoculum bactérien a été préparé comme suit: 25 mL de milieu de culture B.H.025 a été ajouté à 5 g (poids sec) de sol de la sablière Thouin. Le tout a été agité vigoureusement. Le surnageant a été récupéré et ajouté à l'erlenmeyer qui contient 25 mL de milieu de culture et le HAP. Une série de cultures a été préparée de cette façon. Pour les contrôles abiotiques, 50 mL de milieu de culture plutôt que 25 mL ont été ajoutés afin d'obtenir un volume final identique. Après plusieurs jours d'incubation, un échantillon de 5 mL de l'une des cultures a été inoculé dans 45 mL de milieu B.H.025 contenant 0,005 g de HAP dans le but d'effectuer le repiquage. Le reste de la procédure qui comprend l'incubation, l'extraction et la programmation du four du GC, a été identique à celle effectuée précédemment. Le pourcentage d'enlèvement biologique a été calculé par rapport à un contrôle abiotique considéré comme valeur de référence (soit équivalent à 100%) et jumelé au temps d'incubation déterminé. Le pH des milieux de cultures a été maintenu dans un écart variant de 7,1 à 7,4. Pour certains enrichissements, le HAP sous forme solide a été remplacé par l'ajout de 10 g d'une matrice artificiellement contaminée. Cette matrice était de la silice.

6. ÉTUDE DE L'UNE DES SOUCHES ISOLÉES

6.1 Sélection

A partir des résultats obtenus, la souche Phe-6 isolée en culture pure a été sélectionnée compte tenu de son activité intéressante au niveau de l'enlèvement du phénanthrène.

6.2 Optimisation de l'activité

Différents suppléments ont été ajoutés au milieu Bushnell-Haas dans le but d'optimiser l'activité de la souche sélectionnée soit de l'extrait de levures (E.L.), du protéose peptone (P.P.), de l'amidon (A.), à des concentrations de 0,025, 0,1 et 0,5% (p/v) et dans certains cas, 250 μ L d'un mélange de vitamines (V.) (Wolin, 1963). Ce mélange est constitué de biotine 4 mg/L, d'acide folique 4 mg/L, de pyridoxine 20 mg/L, de riboflavine 10 mg/L, de thiamine 10 mg/L, d'acide nicotinique 10 mg/L, d'acide pantothénique 10 mg/L, de B12 0,2 mg/L, d'acide p-aminobenzoïque 10 mg/L, d'acide thionique 10 mg/L. Ces suppléments ont été ajoutés seuls et combinés. Des cultures semblables à celles effectuées précédemment ont été utilisées.

Dans certains essais, du rouge phénol a été ajouté comme indicateur de pH. Le pH des milieux de culture a été déterminé avec un pH-mètre modèle pHM82 standard (Radiometer Copenhagen, Copenhague, Danemark) muni d'une électrode E-54 (Fisher Scientific Limited, Pittsburgh, É.U.). Le pH a été

ajusté avec une solution de HCl 1N dans un écart variant entre 7,0 et 7,4.

Nous avons utilisé le milieu optimisé précédent avec une autre souche, soit la souche Flu-4 qui a été isolée et identifiée antérieurement et qui a démontré une capacité d'enlèvement du fluorène en milieu liquide. Cette expérience a été effectuée afin de démontrer si le milieu optimisé permettait un meilleur enlèvement du fluorène par cette souche. Les conditions de culture ont été similaires à celles utilisées précédemment.

6.3 Spectre d'activité d'enlèvement des hydrocarbures

L'étude du spectre d'activité de la souche Phe-6 a été effectuée en remplaçant le phénanthrène dans le milieu de culture par des alcanes comme l'hexadécane et le tétradécane (Aldrich, Milwaukee, É.U.), et par différents HAPs de trois à cinq noyaux aromatiques comme le fluorène, l'anthracène, le benzanthracène, le benzopyrène. Ces composés ont été ajoutés seuls et en mélange. La culture a été effectuée de façon semblable à celle présentée précédemment. Le milieu de culture Bushnell-Haas additionné de 0,5% (p/v) de chacun des éléments suivants P.P., E.L. et A. ainsi que de 250 μ L de V. et de rouge phénol comme indicateur de pH a été utilisé. Dorénavant ce milieu sera appelé B.H.500V. Le standard

interne utilisé lors de l'extraction du tétradécane était le pyrène à une concentration de 1000 mg/L.

Pour les échantillons d'hexadécane et de tétradécane, la programmation du four a été modifiée comme suit: une température initiale de 35°C avec un plateau de 2 minutes suivi d'une augmentation de 10°C/min jusqu'à une température de 100°C puis une augmentation de 4°C/min jusqu'à une température de 280°C et finalement une augmentation de 10°C/min jusqu'à une température de 310°C avec un plateau de 3 minutes.

6.4 Effet de différentes concentrations de phénanthrène

Des cultures semblables à celles présentées précédemment ont été utilisées, mais avec des concentrations de phénanthrène de 100, 200, 500 et 1000 mg/L.

6.5 Identification des métabolites

Les échantillons pour l'identification des métabolites de la voie métabolique du phénanthrène ont été extraits en utilisant la procédure au diéthyl-éther décrite précédemment. Puis, ces échantillons ont été dérivés par la technique de silylation avec le N,O-bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA) (Pierce Chemicals, Rockford, Illinois) comme suit: un volume de 150 µL BSTFA:Acétonitrile (1:4) a été ajouté à 150 µL d'échantillon préalablement évaporé sous jet d'azote.

Le mélange a été incubé à 70°C pendant 30 minutes. Deux μL de cette préparation ont été injectés au GC.

Les métabolites de la voie métabolique ont été identifiés en spectrométrie de masse. La procédure de culture a été la même que celle décrite précédemment, sauf que du phénanthrène- D^{10} marqué au deutérium (CDN Isotopes Inc., Vaudreuil, Québec) a été utilisé. Un chromatographe Varian 3500 couplé à un spectromètre de masse modèle Ion Trap 800 (Finnigan) a été utilisé. La colonne capillaire était de type DB-5 avec un film intérieur d'une épaisseur de 0,33 μ et d'un diamètre interne de 250 μ (30m X 0,25 mm). L'hélium a servi de gaz porteur. Le débit à la tête de la colonne a été de 2,4 mL/min à 70°C et la pression de 24 PSI. Un μL d'échantillon a été injecté en mode de volume d'injection partiel dans un rapport de 50:1. Le spectre de masse a été enregistré par balayage répétitif à une vitesse de 1 s/décade de 70 à 400 daltons. Le programme d'intégration était le ITDS version 3.0 (Finnigan Corporation).

Des produits purs correspondant à chacun des métabolites identifiés en spectrométrie de masse ont été obtenus commercialement et utilisés comme standards. Les temps de rétention de ces produits purs ont été comparés aux temps de rétention des métabolites identifiés précédemment. De plus, la confirmation de l'identité du principal métabolite obtenu de la voie

métabolique du phénanthrène a été réalisée en ajoutant séparément les 2 isomères possibles de ce métabolite à l'éther d'extraction de l'étape précédente. Deux μL de ces échantillons ont été injectés au GC. La co-élution du métabolite de dégradation avec l'un des isomères ajoutés, confirme l'identité de ce métabolite.

6.6. Enlèvement de l'intermédiaire

Des cultures semblables à celles utilisées précédemment ont été effectuées sauf que le phénanthrène a été remplacé par l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque obtenu commercialement. Le milieu de culture utilisé était le B.H.500V. La concentration de cet intermédiaire dans la culture a été déterminée par GC à intervalle régulier.

6.7. Cinétique d'enlèvement du phénanthrène

L'étude de la cinétique d'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 a été effectuée à l'aide de cultures décrites précédemment et utilisant le milieu B.H.500V. Ces cultures ont été incubées pour une période de cinq jours et des analyses ont été effectuées à tous les jours. Deux contrôles ont été ajoutés soit, un contrôle abiotique non-inoculé et un contrôle abiotique cellules tuées dans lequel 5 mL d'une solution de HgCl_2 , à une concentration de 400 mg/mL, ont été ajoutés après inoculation.

6.8. Toxicité

La toxicité des échantillons prélevés à chaque jour pour l'étude de cinétique a été évaluée par le système Microtox 500 (Carlsbad, É.U.). La procédure utilisée a été celle retrouvée dans le mode d'emploi de Microbics Corporation (1990). Des temps d'incubation de 5 et 15 minutes ont été effectués et puisque peu de différences furent notées entre les valeurs obtenues pour ces deux temps, l'incubation de 5 minutes a été choisie pour exprimer les résultats.

Une suspension de bactéries marines luminescentes, *Phosphobacterium phosphoreum* a été mise en contact avec le surnageant de culture et la baisse de luminescence a été enregistrée par rapport à un contrôle. La baisse de luminescence est proportionnelle à la toxicité de l'échantillon. Les résultats ont été exprimés en nombre d'unités toxiques ($1/EC_{50} \times 100$) qui est l'inverse de la concentration du surnageant qui provoquait une diminution de 50% de la lumière émise par la suspension bactérienne. Ainsi, plus le nombre d'unités toxiques est élevé, plus le produit est toxique. Un contrôle de qualité du test de toxicité a été effectué pour vérifier la reproductibilité des résultats, en utilisant le sulfate de zinc comme standard (Microbics Corporation, 1990).

6.9. Minéralisation

Un volume de 9 mL du milieu de culture B.H.500 contenant du rouge phénol comme indicateur de pH, a été déposé dans une bouteille sérologique de 100 mL. Un volume de 0,1 mL d'une solution de HAP dans de l'éther, comprenant du phénanthrène à une concentration de 0,01% (p/v) et du [9-¹⁴C] phénanthrène (8,3 mCi/mmol) (Sigma, St-Louis, É.U.) correspondant à une activité de 0,1 μ Ci ($2,2 \times 10^5$ dpm), a été ajouté à cette bouteille. Après un délai de 24 heures à la température de la pièce pour permettre l'évaporation de l'éther, un mL d'inoculum à une concentration d'environ 10^7 ufc/mL (unités formatrices de colonies) a été ajouté, suivi de 25 μ L du mélange de vitamines. Une trappe à CO₂ constituée de 0,5 mL d'une solution de KOH 1M déposée dans un tube a été placée dans la bouteille sérologique. Après l'ajout de tout les éléments, la bouteille sérologique a été fermée hermétiquement avec une valve Minivert en téflon (Supelco, Oakville, Ontario). Des contrôles abiotiques non-inoculés ont été effectués. Les cultures ont été incubées à la température de la pièce pour une période de 20 jours.

La solution de KOH a été prélevée à intervalle régulier à l'aide d'une seringue en perçant le septum de caoutchouc de la valve Minivert. La trappe à CO₂ a été rincée avec 0,5 mL d'une solution fraîche de KOH 1 M et remplie à nouveau avec 0,5 mL de KOH 1 M. Après chaque prélèvement de la solution de

KOH, environ 40 mL d'oxygène ont été injectés dans la bouteille. Les deux volumes de KOH recueillis ont ainsi été déposés dans un même vial à scintillation auquel ont été ajoutés 1 mL d'eau distillée et 5 mL de liquide à scintillation Ultima Gold TM XR (Packard Instrument, Meriden, É.U.). Le tout a été mélangé au vortex et laissé reposer une nuit à la noirceur à la température de la pièce. Le comptage de la radioactivité a été effectué à l'aide d'un compteur à scintillation Delta 300 modèle 6891 (Tracor Analytic, Illinois, É.U.). Les valeurs obtenues ont été exprimées en coups par minute C¹⁴ (cpm c¹⁴) à l'aide d'une courbe standard.

Dans le but de suivre l'enlèvement du phénanthrène, des cultures semblables ont été effectuées en parallèle mais elles ne contenaient ni trappe à CO₂, ni phénanthrène marqué. Une culture contrôle non inoculée a aussi été jumelée. Le contenu de la bouteille a été acidifié, extrait avec trois volumes successifs de 10 mL de diéthyl-éther et analysé tel que décrit précédemment.

6.10. Performance en sol

6.10.1 Microcosmes

Des échantillons de sol de la sablière Thouin prélevés en juillet 1993 ont été utilisés pour évaluer la performance de la souche sélectionnée dans des microcosmes sol. Les microcosmes ont été réalisés de la façon suivante:

des erlenmeyers de 500 mL contenant 50 g de sol auxquels ont été ajoutés 20 mL de milieu de culture B.H.500V et 7 mL d'inoculum à une concentration d'environ 10^7 ufc/mL de la souche sélectionnée.

Deux séries de microcosmes ont été effectuées. Une première série dans laquelle la souche sélectionnée a été inoculée dans un sol non stérilisé et une deuxième série où cette souche a été inoculée dans un sol traité par exposition à des vapeurs de chloroforme pour inactiver la flore indigène. Pour chacune des séries, des contrôles cellules tuées ont été effectués en ajoutant 5 mL d'une solution de HgCl_2 à une concentration de 400 mg/L après inoculation.

Des microcosmes contrôles ont été utilisés dans lesquels la souche sélectionnée n'a pas été inoculée. Dans ce cas, le volume de milieu de culture ajouté était de 27 mL. Les erlenmeyers ont été incubés à la noirceur et à la température de la pièce pour une période de deux mois. L'ajustement du pH et du niveau de liquide dans les microcosmes ainsi qu'une agitation manuelle des erlenmeyers ont été effectués une à deux fois par semaine.

6.10.2 Énumération de la microflore utilisant le phénanthrène

L'énumération de la microflore pouvant potentiellement dégrader le phénanthrène a été effectuée tel que décrit précédemment sauf qu'un volume de 77 mL (plutôt que 24 mL) de PBS a été ajouté au contenu de l'erlenmeyer.

6.10.3 Extraction et analyses du phénanthrène

L'extraction et l'analyse du phénanthrène ont été effectuées en duplicata tel que décrit précédemment sauf que les volumes des produits suivants ont été ajoutés au contenu des erlenmeyers: 50 mL d'eau distillée, 1 mL de HCl 12M, 20mL de diéthyl-éther, 10 mL d'une solution de standard interne de 9,10-diméthylanthracène (Aldrich) à une concentration de 2000 mg/L dans de l'éther. Deux autres extractions ont été effectuées en ajoutant à chaque fois 15 mL de diéthyl-éther comme solvant d'extraction. Le volume d'éther obtenu a été complétée jusqu'à 50 mL puis dilué dans un rapport 1:5. Deux μ L de cette solution ont été injectés au GC. La programmation du four était semblable à celle utilisée précédemment sauf que la température finale du premier gradient de température était de 290°C et celle du deuxième gradient était de 315°C avec un plateau de 10 minutes. La détermination de la concentration du phénanthrène dans le sol de la sablière (considéré comme la valeur au temps zéro) a été effectuée en triplicata.

RÉSULTATS

1. OBSERVATION DES HALOS ET DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN

Des colonies formant des halos sur milieu solide B.H.025 ont été observées après vaporisation de l'acénaphthylène, du fluorène, du phénanthrène et de l'anthracène (Tableau II). La volatilisation rapide de l'acénaphthylène rend difficile le dénombrement de la flore pouvant dégrader ce HAP. D'ailleurs, la vaporisation de l'acénaphthylène après l'apparition des colonies bactériennes et l'utilisation d'une jarre fermée hermétiquement pour entreposer les géloses, ont dû être utilisées pour permettre la formation de halos. Le dénombrement des bactéries produisant un halo avec l'acénaphthylène n'a pu être effectué dû à la faible reproductibilité des résultats obtenus après plusieurs essais.

Pour le fluorène et le phénanthrène, les halos étaient bien visibles et les résultats étaient reproductibles d'un essai à l'autre. Les dénombrements de la microflore pouvant potentiellement dégrader le fluorène et le phénanthrène plutôt que de la microflore totale ont été utilisés pour suivre la microflore active du sol de la sablière Thouin. Le suivi de la flore indigène dans son ensemble étant un indicateur moins précis.

Seulement quelques halos isolés ont été observés sur l'ensemble des géloses vaporisées avec l'anthracène sans aucun

Tableau II. Observation de halos sur milieu solide B.H.025

HAPs utilisés	Présence de halos
Acénaphthylène	Positif
Fluorène	Positif
Phénanthrène	Positif
Anthracène	Positif
Pyrène	Négatif
Chrysène	Négatif
Benzo(a)anthracène	Négatif
Benzo(a)pyrène	Négatif

rapport entre les différentes dilutions décimales. Pour cette raison, le dénombrement n'a pu être effectué.

Aucun halo n'a été observé après vaporisation avec le pyrène, le chrysène, le benzanthracène et le benzopyrène. Une concentration plus faible et des solvants différents tels que l'éther et l'hexane ont dû être utilisés pour les HAPs faiblement solubles comme l'anthracène (solution 0,1%(p/v) dans l'éther), le chrysène (solution 0,01%(p/v) dans l'hexane), le benzanthracène (solution 1%(p/v) dans l'éther) et le benzopyrène (solution 0,5%(p/v) dans l'éther). Une quantité plus importante de ces solutions a dû être vaporisée pour obtenir un dépôt de HAP équivalent aux HAPs plus solubles. Dans le cas du chrysène et du benzanthracène, l'utilisation d'une lampe à rayons ultra-violet a été nécessaire pour visualiser le dépôt de HAP sur les géloses.

À la lumière des résultats obtenus, le dénombrement bactérien du sol de la sablière Thouin a été effectué (Tableau III). La microflore bactérienne totale a été évaluée à 2×10^6 ufc/g (unités formatrices de colonies). Les résultats sont rapportés en g de poids sec en tenant compte du pourcentage d'humidité du sol qui a été évalué à 12%. Les microflores pouvant potentiellement dégrader le fluorène et le phénanthrène ont été évaluées à 2×10^5 et 3×10^5 ufc/g, respectivement.

Tableau III: Dénombrement bactérien du sol contaminé de la sablière Thouin.

Microflore Bactérienne	Dénombrement ^a (ufc/g)
Totale	2×10^6
Dégradant potentiellement le fluorène	2×10^5
Dégradant potentiellement le phénanthrène	3×10^5

a: valeurs obtenues de triplicata

Pour établir les exigences nutritionnelles de la microflore totale, des dénombrements ont été effectués sur des géloses contenant différents milieux de cultures soit: BHI (milieu riche) (Difco), Bushnell-Haas (milieu minimal), Bushnell-Haas supplémenté à 0,005% (p/v) des éléments suivants: P.P, E.L. et A. Le même nombre de colonies a été observé avec les trois types de milieux de culture sauf que les colonies observées étaient plus grosses avec le milieu BHI.

2. DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN DE SOLS TRAITÉS EN RÉACTEUR

Le phénanthrène et le fluorène ont été utilisés pour évaluer la microflore pouvant potentiellement dégrader ces HAPs à partir d'un réacteur non performant après 186 jours d'opération (Tableau IV). Ces microflores dans le réacteur no 15 sont toutes deux inférieures à 10^2 ufc/g. La microflore bactérienne totale de ce réacteur a été évaluée à 2×10^5 ufc/g.

Le même type d'évaluation de la microflore a été réalisé avec un réacteur performant, à noter que le sol provient d'un mélange de sols différents de celui des dénombrements précédents (Tableau V). La microflore totale et les microflores pouvant potentiellement dégrader le fluorène et le phénanthrène ont été respectivement évaluées à 3×10^7 , $< 10^2$ et 3×10^4 ufc/g.

Tableau IV. Dénombrement bactérien du sol de la sablière Thouin traité dans le réacteur No 15 après 186 jours d'incubation à la température de la pièce

Microflore bactérienne	Dénombrement ^a (ufc/g)
Totale	2×10^5
Dégradant potentiellement le fluorène	$< 10^2$
Dégradant potentiellement le phénanthrène	$< 10^2$

a : valeurs obtenues de triplicata

Tableau V. Dénombrement bactérien du sol de la sablière Thouin traité dans le réacteur No 2 après 294 jours d'incubation à la température de la pièce

Microflore bactérienne	Dénombrement ^a (ufc/g)
Totale	3×10^7
Dégradant potentiellement le fluorène	$< 10^2$
Dégradant potentiellement le phénanthrène	3×10^4

a : valeurs obtenues de triplicata

3. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES

Seize colonies formant des halos en présence de HAPs ont été repiquées et isolées en culture pure sur milieu solide B.H.025. À partir de leurs aspects macroscopiques, neuf souches bactériennes potentiellement différentes ont été retenues (Tableau VI). La souche Ace-1 a formé des halos en présence d'acénaphthylène. Les souches Flu-4, Flu-6 et Flu-8 ont formé des halos et produit une coloration jaune qui a diffusé dans le milieu, en présence de fluorène. Les souches Phe-2, Phe-6, Phe-10 et Phe-11 ont formé des halos en présence de phénanthrène. La souche Ant-1 a formé des halos en présence d'anthracène.

Toutes les souches sont de courts bâtonnets Gram négatifs à l'exception de la souche Ant-1 qui est un coccobacille Gram négatif. L'identification des souches par la technique des galeries API a révélé qu'elles appartenaient au genre Pseudo-monas du groupe fluorescens sauf la souche Ant-1.

4. CONSERVATION DES SOUCHES

Comme moyen de conservation, les souches ont subi une série de repiquages sur milieu solide B.H.025 en présence et en absence de HAP. La moitié des souches ont perdu leur capacité d'utiliser le HAP après le deuxième repiquage en absence de HAP. Dans le cas des repiquages en présence de HAP, les souches ont conservé leur capacité à former des halos

Tableau VI: Souches isolées en culture pure formant des halos sur milieu solide B.H.025

Souches isolées retenues	HAPs utilisés	Aspects macroscopiques des colonies
Ace-1	Acénaphthylène	bords crénelés pigments noirs
Flu-4	Fluorène	mate
Flu-6	Fluorène	grisâtre bords crénelés
Flu-8	Fluorène	grisâtre centre surélevé
Phe-2	Phénanthrène	mate
Phe-6	Phénanthrène	blanche centre surélevé
Phe-10	Phénanthrène	blanche bordure claire centre surélevé
Phe-11	Phénanthrène	bords crénelés centre foncé
Ant-1	Anthracène	très petite incolore

jusqu'au quatrième repiquage, mais la plupart ont perdu cette capacité après le sixième repiquage.

Pour tester un autre moyen de conservation, les souches ont été congelées à -70°C . Après des temps de 1 et 6 mois, des aliquots ont été décongelés et testés pour déterminer la viabilité des populations et leur capacité à former des halos avec la technique de vaporisation sur milieu solide. Après chacune de ces périodes de congélation, 10^8 ufc/mL ont été retrouvées et chacune des souches a conservé sa capacité de former des halos en présence de leur HAP respectif. Le procédé de congélation à -70°C a été retenu comme moyen de conservation des souches.

5. ACTIVITÉ EN MILIEU LIQUIDE DES SOUCHES ISOLÉES

La capacité d'enlèvement des neuf souches isolées retenues a été testée par des essais sommaires en milieu liquide à l'aide du HAP correspondant. Le pourcentage d'enlèvement biologique a été calculé par rapport à un contrôle abiotique (non inoculé) considéré comme valeur de référence (soit équivalent à 100%) et jumelé au temps d'incubation déterminé.

À la suite de premiers essais non concluant dû à la volatilisation rapide de l'acénaphthylène, l'enlèvement de ce HAP par la souche Ace-1 a été suivi sur une plus courte

période de temps, soit 7 jours (Figure 4). Un enlèvement de 71% a été obtenu après 5 jours d'incubation, soit le maximum atteint. L'enlèvement a également été suivi sur des cultures utilisant une matrice artificiellement contaminé avec de l'acénaphthylène et des résultats similaires ont été obtenus.

La Figure 5 montre l'enlèvement du phénanthrène effectué par la souche Phe-6. Un pourcentage d'enlèvement de 52 a été obtenu après 42 jours d'incubation. La population microbienne qui était au départ de 1×10^7 ufc/mL a atteint 1×10^8 ufc/mL après 12 jours d'incubation. Une légère baisse de la concentration du phénanthrène a été observée dans chacun des deux contrôles abiotiques (non inoculé et cellules tuées) indiquant une faible volatilisation. Après le 42^e jour d'incubation, la souche Phe-6 a été repiquée dans un milieu frais dans le but de favoriser l'acclimatation de cette souche au milieu liquide et ainsi augmenter son pourcentage d'enlèvement du phénanthrène, mais ce procédé n'a présenté aucun avantage.

Une matrice artificiellement contaminé avec du phénanthrène a été utilisée dans certaines cultures et aucun enlèvement significatif du HAP par la souche Phe-6 n'a été observé dans ces conditions. À la suite des faibles taux d'enlèvement obtenus en général lors des différents essais utilisant une matrice artificiellement contaminée, il a été décidé d'abandonner ce type de procédé.

FIGURE 4. Enlèvement de l'acénaphthylène par la
souche Ace-1 en milieu liquide (B.H.025) en
fonction du temps d'incubation

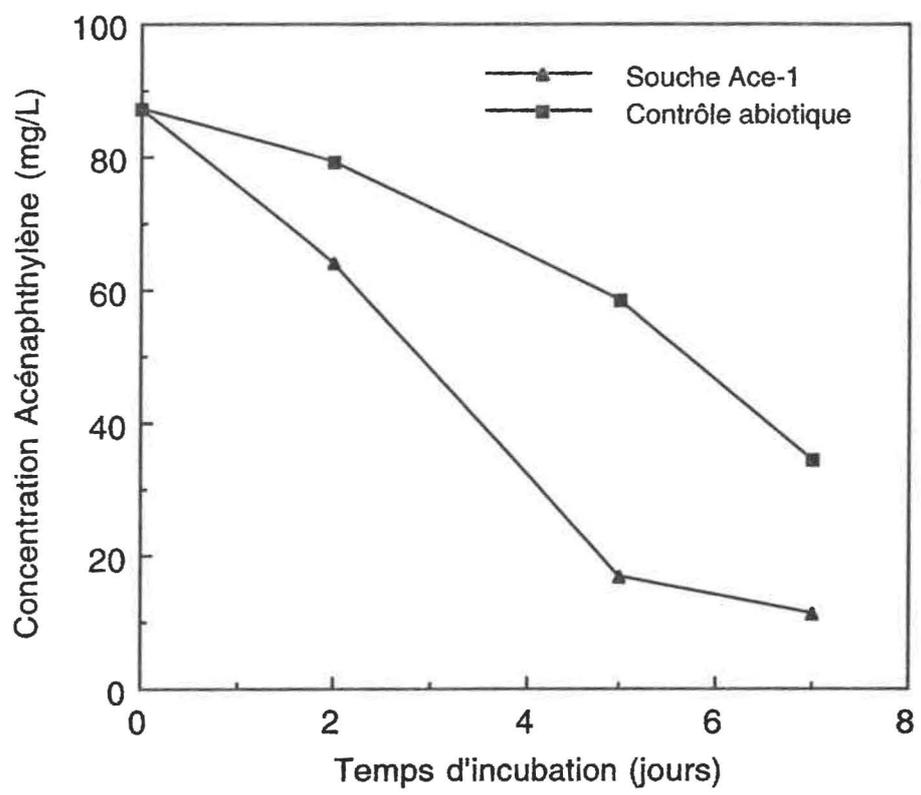
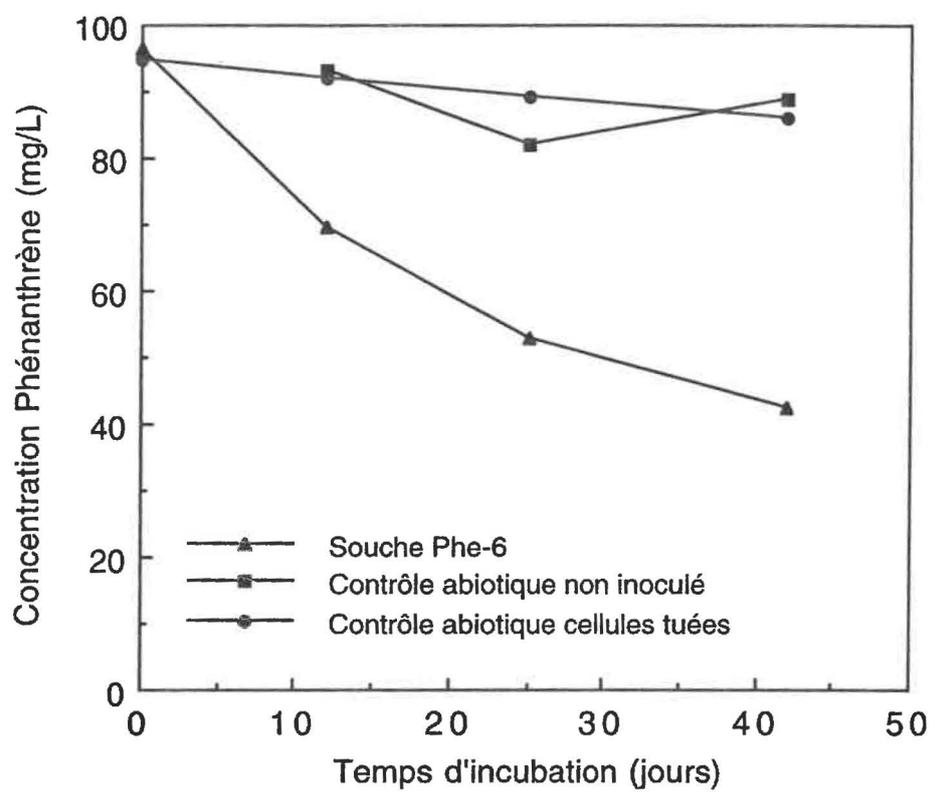


FIGURE 5. Enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6
en milieu liquide (B.H.025) en fonction du
temps d'incubation



D'autres essais ont été effectués en milieu liquide avec les souches Flu-4, Flu-6, Flu-8, Phe-2, Phe-10, Phe-11 et Ant-1 envers leur HAPs respectifs soit le fluorène, le phénanthrène et l'anthracène. Les résultats détaillés pour ces souches ne sont pas présentés par contre, le Tableau VII résume les pourcentages maximums d'enlèvement obtenus indépendamment du temps d'incubation avec les différentes souches isolées retenues. Dû à des variations de l'ordre de 20% observées dans les résultats suite à la technique d'extraction utilisée, seulement les souches ayant un pourcentage d'enlèvement supérieur à 20% ont été considérées comme pouvant dégrader un HAP. Ainsi, six des neuf souches isolées retenues sont considérées intéressantes.

6. ENRICHISSEMENTS EN MILIEU LIQUIDE

Des enrichissements en milieu liquide ont été effectués avec les HAPs suivants: anthracène, pyrène, chrysène, benzanthracène et benzopyrène car aucune souche bactérienne intéressante n'a pu être isolée en culture pure en utilisant la technique de vaporisation. Le suivi d'enlèvement des HAPs a été effectué au cours des enrichissements en milieu liquide et les temps d'incubation ont varier entre 48 et 60 jours. Bien que les résultats détaillés de ces enrichissements ne sont pas présentés, le Tableau VIII regroupe les pourcentages maximums d'enlèvement obtenus indépendamment des temps d'incubation avec ces cultures d'enrichissements en milieu

Tableau VII: Pourcentages d'enlèvement de HAPs en milieu liquide obtenus avec les souches isolées retenues

Souches bactériennes retenues	Pourcentages maximums d'enlèvement ^a
Ace-1	71
Flu-4	45
Flu-6	33
Flu-8	13
Phe-2	39
Phe-6	52
Phe-10	17
Phe-11	33
Ant-1	20

a : calculé par rapport au contrôle abiotique considéré comme valeur de référence (100%) au temps déterminé

Tableau VIII. Pourcentages d'enlèvement de HAPs obtenus dans les cultures d'enrichissements en milieu liquide (B.H.025)

HAPs	Pourcentage maximums d'enlèvement ^a
Anthracène	69
Pyrène	16
Chrysène	56
Benzanthracène	72
Benzopyrène	19

a: calculé par rapport au contrôle abiotique considéré comme valeur de référence (100%) au temps déterminé

liquide. Pour les mêmes raisons que celles mentionnées précédemment, seulement les taux d'enlèvement supérieurs à 20% ont été retenus. Aucune amélioration du pourcentage d'enlèvement d'un HAP n'a été observée suite aux repiquages des cultures d'enrichissements en milieu liquide, à l'exception du chrysène et du pyrène où des augmentations respectives de 35 à 56% et de 6 à 16% d'enlèvement ont été observées.

Comme il a été mentionné précédemment pour l'activité en milieu liquide des souches isolées retenues, l'utilisation d'une matrice artificiellement contaminée pour l'enrichissement a été abandonnée, puisque en général, ce procédé ne semble pas permettre l'enlèvement des HAPs.

7. SÉLECTION D'UNE SOUCHE ET IDENTIFICATION

À partir des résultats obtenus lors des essais en milieu liquide avec les différentes souches isolées retenues, la souche Phe-6 a été sélectionnée pour sa capacité d'enlèvement du phénanthrène. De plus, ce HAP nous semblait intéressant à étudier compte tenu qu'il est peu volatil et relativement facile à extraire. La souche Phe-6 a été identifiée comme étant un Pseudomonas putida. Le Tableau IX illustre les différents résultats obtenus à partir de différents tests effectués pour l'identification.

Tableau IX. Caractéristiques de Pseudomonas putida, souche Phe-6

Caractéristiques	Résultats
<u>Tests bactériologiques:</u>	
Mobilité	+
Croissance 4°C	+
Croissance 41°C	-
<u>Tests biochimiques:</u>	
Bêta-galactosidase	-
Arginine dihydrolase	+
Lysine décarboxylase	-
Ornithine décarboxylase	-
H ₂ S	-
Uréase	-
Tryptophane déaminase	-
Indole	-
Acétoïne	-
Gélatinase	-
Réduction nitrate	+
Oxidase	+
Amylase	-
<u>Tests d'utilisation:</u>	
Glucose	-
Mannose	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Saccharose	-
Arabinose	-
Citrate	+

8. OPTIMISATION DE L'ACTIVITÉ

Différents essais exploratoires ont été effectués en modifiant les concentrations et les suppléments du milieu de culture Buhsnell-Haas, dans le but d'optimiser le milieu de culture pour l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6.

Des pourcentages d'enlèvement de 37 et 48 ont été respectivement obtenus avec le B.H. supplémenté de 0,5% (p/v) E.L. et 0,1% (p/v) A. et avec le B.H. supplémenté de 0,5% E.L. et 0,1% P.P. (Tableau X). Des pourcentages supérieurs d'enlèvement soit 60 et 66, ont été respectivement obtenus avec le milieu B.H.500 et avec le milieu B.H.025V. Il est à noter que chacune des cultures dans cette expérience a montré une baisse de la concentration en unités viables de l'ordre de 1 à 2 unités logarithmiques après 26 jours d'incubation. Le pH de ces cultures n'a pas été suivi.

L'expérience avec le milieu de culture B.H.025V a été répétée. Un pourcentage d'enlèvement inférieur, soit 40, a été obtenu après 20 jours et ce, même avec l'ajout d'un autre 250 μ L du mélange de vitamines après 10 jours d'incubation (résultats non présentés). Les unités viables sont passées de 4×10^5 à 1×10^7 ufc/mL après 20 jours d'incubation. Le pH du milieu de culture après 20 jours était de 7,3 comparativement à 7,2 pour le contrôle abiotique.

Tableau X. Enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 en présence de différents suppléments ajoutés au milieu de culture

Milieux de culture	Phénanthrène (mg/L) (ufc/mL)			% Enlèvement ^a après 26 jours d'incubation
	Jours d'incubation			
	0	14	26	
B.H. 0,5% E.L. 0,1% P.P.	83,1 (2x10 ⁸)	45,8 (1x10 ⁷)	40,1 (1x10 ⁷)	48
B.H. 0,5% E.L. 0,1% A.	85,3 (2x10 ⁸)	58,3 (1x10 ⁷)	48,8 (2x10 ⁶)	37
B.H.500	82,1 (2x10 ⁸)	46,9 (1x10 ⁶)	31,2 (3x10 ⁶)	60
B.H.025V	82,8 (2x10 ⁸)	N.D. (4x10 ⁷)	26,8 (1x10 ⁷)	66
Contrôle abiotique	-	81,6	77,7	

N.D.: non déterminé

a: calculé par rapport au contrôle abiotique considéré comme valeur de référence (100%) au temps déterminé

Dans une autre série d'essais, des pourcentages semblables d'enlèvement, soit 54 et 46, ont été obtenus après 16 jours d'incubation des deux milieux B.H.025, même si l'un des milieux contenait deux fois plus de vitamines que l'autre (Tableau XI). Un pourcentage d'enlèvement de 73 a été observé avec le milieu B.H.500V après 16 jours d'incubation. De plus, ce milieu soutient la croissance bactérienne jusqu'à une concentration de 2×10^8 ufc/mL, comparativement à une concentration de 1×10^7 ufc/mL dans le cas des deux milieux B.H.025 additionnés de vitamines. Le pH du milieu B.H.500V devient alcalin, des valeurs de 8,8 et 8,3 ont été observées après 5 et 16 jours d'incubation respectivement. Cette alcalinisation du milieu n'a pas été observée dans le milieu B.H.025V, le pH demeurant plutôt stable.

Dans une autre série d'essais, de faibles pourcentages d'enlèvement de l'ordre de 18 et 11 ont été obtenus respectivement avec le milieu B.H. sans supplément et le milieu B.H. supplémenté seulement avec le mélange de vitamines (Tableau XII). Dans les deux cas, les milieux n'ont pas supporté la croissance bactérienne puisque la concentration des unités viables a diminué. Un pourcentage d'enlèvement de 57 a été obtenu avec le milieu B.H.025 et aussi avec le milieu B.H. supplémenté à 0,5% (p/v) E.L. Dans les deux cas, les milieux de cultures ont supporté la croissance bactérienne puisque celle-ci a augmenté d'environ une unité logarithmique. Dans

Tableau XI. Enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 en présence de différentes concentrations de suppléments et de vitamines

Milieux de culture	Phénanthrène (mg/L) (ufc/mL)				% Enlèvement ^a après 16 jours d'incubation
	Jours d'incubation				
	0	5	10	16	
B.H.025V	85,1 (5x10 ⁶)	51,4 (1x10 ⁷)	46,2 (4x10 ⁶)	43,4 (1x10 ⁷)	54
B.H.025V ₂	94,9 (4x10 ⁶)	61,6 (1x10 ⁷)	50,3 (1x10 ⁷)	51,7 (1x10 ⁷)	46
B.H.500V	90,6 (4x10 ⁶)	45,9 (1x10 ⁸)	51,0 (2x10 ⁸)	26,2 (4x10 ⁷)	73
Contrôle abiotique	-	86,1	93,5	95,3	

V : 250 µL vitamines

V₂ : 500 µL vitamines

a : calculé par rapport au contrôle abiotique
considéré comme valeur de référence (100%) au temps
déterminé

Tableau XII. Effet de l'ajout de suppléments au milieu de culture sur l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6

Milieux de culture	Phénanthrène ^a (mg/L) (ufc/mL)				% Enlèvement ^b après 21 jours d'incubation
	Jours d'incubation				
	0	7	14	21	
B.H.025	112,6 (3x10 ⁶)	77,4 (2x10 ⁶)	63,2 (1x10 ⁷)	60,1 (1x10 ⁷)	57
B.H.	95,3 (2x10 ⁶)	105,8 (1x10 ⁶)	95,2 (2x10 ⁵)	116,4 (N.D.)	18
B.H. 0,5% E.L.	100,6 (3x10 ⁶)	80,3 (1x10 ⁷)	52,3 (2x10 ⁷)	60,1 (3x10 ⁷)	57
B.H.V.	98,2 (2x10 ⁶)	105,7 (1x10 ⁵)	112,8 (3x10 ⁵)	126,2 (2x10 ⁵)	11
Contrôle abiotique	-	102,8	120,1	141,3	

E.L. : extrait de levures

V. : 250 µL vitamines

N.D. : non déterminé

a : valeurs obtenues de duplicata

b : calculé par rapport au contrôle abiotique
considéré comme valeur de référence (100%)
au temps déterminé

le cas du milieu B.H. supplémenté de 0,5% (p/v) E.L., le pH a dû être ajusté avec une solution de HCl 1N, puisqu'un pH de 8,9 a été atteint après 7 jours d'incubation.

Une autre série d'essais a été effectuée pour confirmer les résultats obtenus précédemment (Tableau XIII). Pour ces essais, la concentration bactérienne de départ était de 1×10^8 ufc/mL. Des pourcentages semblables d'enlèvement, soit de 46 et 44, ont été respectivement obtenus avec les milieux B.H.025 et B.H.025V. Dans le milieu B.H.500V où le pH a été contrôlé, 85% d'enlèvement du phénanthrène a été obtenu après seulement 10 jours d'incubation, comparativement à 67% lorsque le pH n'a pas été contrôlé. D'ailleurs le pH dans cette dernière culture a atteint une valeur 8.9 après 6 jours et est demeuré à cette valeur jusqu'à la fin de la période d'incubation. De plus, une diminution des unités viables de 1×10^8 jusqu'à 1×10^6 ufc/mL après 6 jours a été observée dans cette culture.

Le milieu B.H.500V a donc été utilisé pour tout le reste de ce travail et le pH de ce milieu a été ajusté plusieurs fois par jour avec une solution de HCl 1N. Il est à noter que les plus grandes variations de pH ont été observées lors des trois premiers jours d'incubation.

Un autre essai a été effectué dans le but de vérifier l'effet de l'ajout de A. et de E.L. sur l'enlèvement du

Tableau XIII. Enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 dans un milieu de culture faiblement et fortement supplémenté

Milieux de culture	Phénanthrène ^a (mg/L) (ufc/mL)			% Enlèvement ^b après 10 jours d'incubation
	Jours d'incubation			
	0	5	10	
B.H.025	88,6 (1x10 ⁸)	67,2 (1x10 ⁷)	36,1 (2x10 ⁷)	46
B.H.025V	90,3 (1x10 ⁸)	67,0 (2x10 ⁷)	59,2 (2x10 ⁷)	44
B.H.500V (pH non contrôlé)	94,0 (1x10 ⁸)	45,9 (1x10 ⁶)	41,6 (N.D.)	67
B.H.500V (pH contrôlé)	94,1 (1x10 ⁸)	19,5 (1x10 ⁹)	15,9 (2x10 ⁸)	85
Contrôle abiotique	-	102,0	100,3	

N.D.: non déterminé

a: valeurs obtenues de duplicata

b: calculé par rapport au contrôle abiotique considéré comme valeur de référence (100%) au temps déterminé

phénanthrène par la souche Phe-6. Un pourcentage d'enlèvement de 56 a été obtenu après 6 jours avec le milieu B.H.500V qui sert de contrôle (Tableau XIV). Un ajustement moins fréquent du pH lors des trois premiers jours, expliquerait ce pourcentage inférieur à celui observé précédemment (81% après 5 jours) (Tableau XIII). Le milieu dont les suppléments ne contenaient plus d'A. n'a pas montré de différence au niveau de l'enlèvement du HAP comparativement au milieu contenant tous les suppléments. Un pourcentage de dégradation de 42 a été obtenu avec le milieu supplémenté avec P.P. Les unités viables qui étaient au départ de 4×10^6 ufc/mL, ont atteint 4×10^8 ufc/mL avec les trois milieux de culture, ce qui démontre que chacun de ces milieux a supporté la croissance bactérienne.

9. MILIEU OPTIMISÉ ET SOUCHE FLU-4

Cet essai a été réalisé dans le but de vérifier si le milieu optimisé B.H.500V peut permettre d'augmenter l'efficacité d'une autre souche que la souche Phe-6 et ce, pour l'enlèvement d'un autre HAP. La souche Flu-4 a été choisie pour cet essai, compte tenu de ses capacités à enlever le fluorène (Tableau VII). Comme le montre le Tableau XV, deux milieux de culture ont été utilisés, soit le B.H.025V et le B.H.500V. L'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 a également été suivi, à titre de contrôle, avec ces deux mêmes milieux. Le temps d'incubation était de 5 jours. Dans le cas

Tableau XIV. Effet de l'ajout d'amidon et d'extrait de levures sur l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6

Milieux de culture	Phénanthrène ^a (mg/L) (ufc/mL)		% Enlèvement ^b après 6 jours d'incubation
	Jours d'incubation		
	0	6	
B.H.500V	90,6 (4x10 ⁶)	33,4 (4x10 ⁸)	56
B.H. 0,5% P.P. V.	96,3 (4x10 ⁶)	43,9 (4x10 ⁸)	42
B.H. 0,5% E.L. 0,5% P.P. V.	92,6 (4x10 ⁶)	32,3 (4x10 ⁸)	57
Contrôle abiotique	-	75,3	

E.L.: Extrait de levures

P.P.: Protéose peptone

a: valeurs obtenues de duplicata

b: calculé par rapport au contrôle abiotique
considéré comme valeur de référence (100%) au temps
déterminé

Tableau XV. Enlèvement du fluorène par la souche Flu-4 et du phénanthrène par la souche Phe-6 dans le milieu optimisé et non optimisé.

Souches	Milieux de culture	Fluorène ou phénanthrène ^a (mg/L) (ufc/mL)		% Enlèvement ^b après 5 jours d'incubation
		Jours d'incubation		
		0	5	
Flu-4	B.H.025V	94,6 (2x10 ⁶)	115,4 (4x10 ⁷)	8
Flu-4	B.H.500V	96,7 (4x10 ⁶)	97,7 (1x10 ⁹)	15
Contrôle abiotique		-	126,1	
Phe-6	B.H.025V	148,3 (4x10 ⁶)	92,6 (1x10 ⁸)	27
Phe-6	B.H.500V	141,3 (4x10 ⁶)	34,7 (1x10 ⁹)	72
Contrôle abiotique		-	114,7	

a: valeurs obtenues de duplicata

b: calculé par rapport au contrôle abiotique considéré comme valeur de référence (100%) au temps déterminé

de la souche Phe-6, des pourcentages de 27 et 72 ont été respectivement obtenus avec les milieux B.H.025V et B.H.500V. Dans le cas de la souche Flu-4, un faible pourcentage d'enlèvement de 8 a été observé avec le milieu B.H.025V comparativement à un enlèvement de 15% avec le milieu B.H.500V. De plus, les unités viables ont atteint une concentration de 1×10^9 ufc/mL avec le milieu B.H.500V pour les deux souches comparativement à 10^7 et 10^8 ufc/mL avec le milieu B.H.025. Cette expérience a été reprise et des enlèvements du fluorène de 21 et 40% ont été obtenus après 5 et 15 jours d'incubation avec le milieu B.H.500V comparativement à des enlèvements de 3 et 10% avec le milieu B.H.025V après 5 et 15 jours d'incubation. Le milieu B.H.500V semble donc être efficace pour augmenter l'enlèvement du fluorène par la souche Flu-4.

10. SPECTRE D'ACTIVITÉ

L'activité de la souche Phe-6 a été testée envers des HAPs à 3 noyaux tels que le fluorène, l'anthracène et le phénanthrène (contrôle) (Tableau XVI). Des pourcentages d'enlèvement de 97, 71 et 18 ont été respectivement obtenus avec le phénanthrène, le fluorène et l'anthracène après 5 jours d'incubation. Ce dernier pourcentage n'a pas été considéré comme positif compte tenu des résultats obtenus lors d'une seconde expérience et où seulement 8% d'enlèvement de l'anthracène a été observé après 15 jours d'incubation (résultats non présentés). La souche Phe-6 a montré une

capacité à enlever le phénanthrène et le fluorène même lorsque ces HAPs sont en mélange dans le même milieu. Cependant, les pourcentages obtenus, soit de 36 pour le phénanthrène et 26 pour le fluorène, sont inférieurs à ceux observés précédemment lorsqu'un seul HAP est présent dans la culture. Une augmentation de une à deux unités logarithmiques de la souche Phe-6 a été obtenue après 5 jours d'incubation de ces cultures.

La souche Phe-6 n'a pas montré d'activité envers des HAPs à 4 et 5 noyaux, comme le benzanthracène et le benzopyrène et envers des alcanes comme l'hexadécane et le tétradécane qui sont tous deux présents dans le sol de la sablière Thouin. De plus, aucun enlèvement a été observé pour le benzanthracène et le benzopyrène lorsqu'en mélange avec le phénanthrène, même après 10 jours d'incubation (résultats non présentés). Il en a été de même pour les deux alcanes. Par contre, dans ces essais, des pourcentages d'enlèvement du phénanthrène de 61 et 72 ont été obtenus lorsque ce HAP a été ajouté en mélange avec les autres HAPs et les alcanes, respectivement.

11. EFFET DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE HAP SUR L'ACTIVITÉ D'ENLÈVEMENT

La capacité d'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 en présence de 100, 200, 500 et 1000 mg/L de ce HAP, a été évaluée (Tableau XVII). Les écarts entre les concentra-

Tableau XVII. Effet de différentes concentrations de phénanthrène sur l'enlèvement de phénanthrène par la souche Phe-6

Essai	Concentration de phénanthrène (mg/L) ajoutée au départ	Phénanthrène ^a (mg/L) (ufc/mL)		Écart (mg/L) après 5 jrs d'incubation
		Jours d'incubation		
		0	5	
	100	98,4 (1x10 ⁷)	23,5 (5x10 ⁸)	75
	200	213,1 (1x10 ⁷)	132,1 (3x10 ⁸)	81
Cultures	500	533,3 (1x10 ⁷)	458,6 (3x10 ⁸)	75
	1000	1164,9 (1x10 ⁷)	1079,5 (4x10 ⁸)	85
Contrôle abiotique	100	-	101,3	

a : valeurs obtenues de duplicata

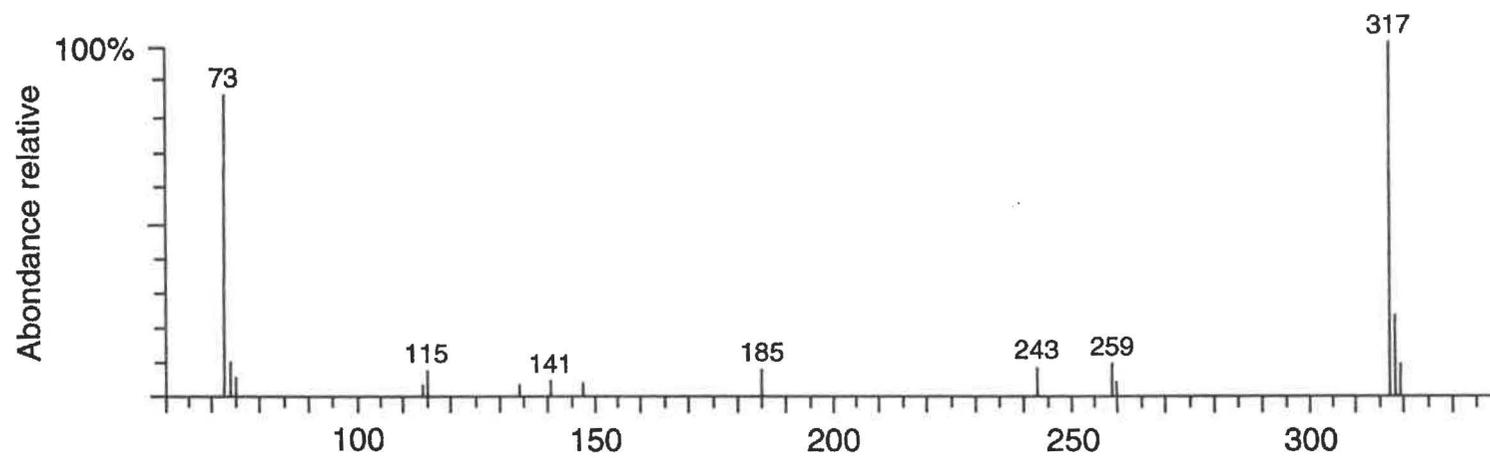
tions de phénanthrène aux temps 0 et 5 jours ont été semblables pour chacun des essais, c'est-à-dire qu'ils variaient de 75 à 85 mg/L.

12. IDENTIFICATION ET CONFIRMATION DES MÉTABOLITES

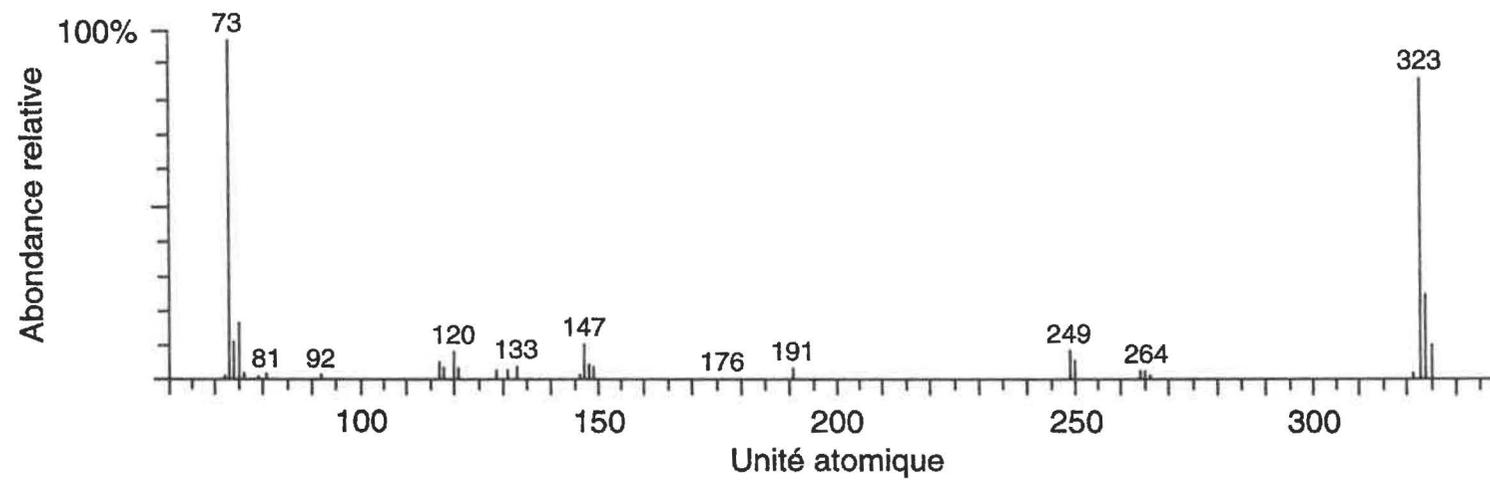
La Figure 6 représente le fragmentogramme de l'ion principal obtenu à partir du chromatogramme en spectrométrie de masse d'un échantillon de culture de la souche Phe-6 en présence du phénanthrène après 5 jours d'incubation. L'ion principal observé a une unité atomique de 317 (Figure 6a). Selon la banque de données intégrée au spectrogramme de masse, il s'agirait de l'acide soit 1-hydroxy-2-naphthoïque ou 2-hydroxy-1-naphthoïque. Après avoir repris l'expérience en remplaçant le phénanthrène par du phénanthrène deutéré (D_{10}), l'ion principal observé a maintenant une unité atomique de 323, soit 6 unités de plus que l'ion précédent (Figure 6b). Le phénanthrène deutéré possède 10 atomes d'hydrogène de plus donc son unité atomique est de 10 unités supérieures à l'unité atomique du phénanthrène. Comme l'intermédiaire obtenu provient de l'ouverture d'un des cycles du phénanthrène, ceci entraîne la perte de 4 hydrogènes. Donc, la molécule résiduelle possède seulement 6 des 10 hydrogènes de surplus du phénanthrène deutéré. C'est ce qui explique la différence de 6 unités entre les deux ions. De plus, ces deux ions ont le même temps de rétention. Ces résultats suggèrent donc qu'il

FIGURE 6. Fragmentogrammes obtenus par spectrométrie de masse pour l'identification de l'intermédiaire de la voie métabolique du phénanthrène. A: en présence de phénanthrène, B: en présence de phénanthrène deutéré.

a)



b)



s'agit de la même molécule dans les deux cas et que ce composé est un intermédiaire de la voie métabolique du phénanthrène

Chacun des deux isomères a été ajouté séparément à l'échantillon de culture et la Figure 7 illustre les chromatogrammes obtenus avec le chromatographe en phase gazeuse. La Figure 7a montre le pic de l'intermédiaire a identifié. Il y a co-élution avec l'intermédiaire et l'isomère l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque (7b), alors que l'ajout de l'isomère l'acide 2-hydroxy-1-naphtoïque montre deux pics différents (7.c). Ces résultats confirment donc que l'intermédiaire de la voie métabolique du phénanthrène produit par la souche Phe-6 est l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque.

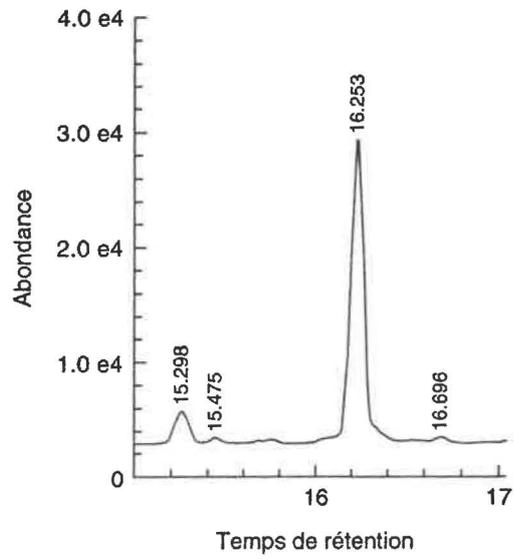
13. ENLÈVEMENT DE L'INTERMÉDIAIRE

Deux cultures ont été effectuées pour déterminer la cinétique d'enlèvement de l'intermédiaire de la voie métabolique du phénanthrène (Tableau XVIII). Dans l'une des cultures, 2 mL d'une solution de P.P. 0,5% (p/v) ont été ajoutés au cinquième jour d'incubation. Des concentrations semblables de l'intermédiaire ont été obtenues dans les deux cultures ce qui suggèrent que l'ajout de P.P. ne stimule pas l'enlèvement de l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque. D'ailleurs, la concentration de l'intermédiaire a semblé se maintenir dans ces cultures plutôt que de diminuer avec le prolongement de l'incubation. L'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque ne semblent donc pas s'accumu-

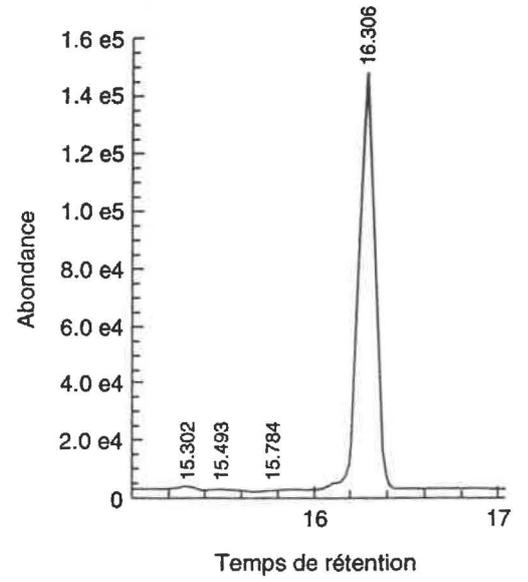
FIGURE 7. Chromatogrammes obtenus en chromatographie en phase gazeuse pour la confirmation de l'intermédiaire de la voie métabolique du phénanthrène.

A: échantillon seul; B: ajout de l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque; C: ajout de l'acide 2-hydroxy-1-naphthoïque.

a)



b)



c)

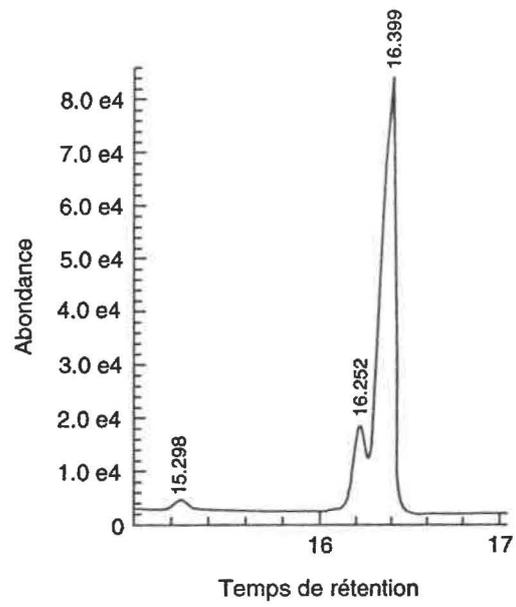


Tableau XVIII. Effet de l'ajout de protéose peptone 0,5% (p/v) au temps cinq jours sur la cinétique d'enlèvement de l'acide 1-hydroxy-2-napthoïque

Milieux de culture	Ajout P.P 0,5% (p/v) après 5 jours d'incubation	Acide 1-hydroxy-2-napthoïque ^a (mg/L) (ufc/mL)				
		Jours d'incubation				
		0	2	5	7	9
B.H.500V	0 mL	<1 (2x10 ⁶)	2,6 -	17,3 (1x10 ⁹)	6,6 -	13,1 (1x10 ⁹)
B.H.500V	2 mL	<1 (2x10 ⁶)	6,4 -	13,0 (1x10 ⁹)	7,3 -	18,3 (1x10 ⁹)

a : valeurs obtenues de duplicata

ler de façon importante lors de l'enlèvement du phénanthrène, ce qui laisse supposer que la souche Phe-6 n'arrête pas la transformation à ce produit mais pourrait poursuivre plus loin la voie métabolique.

Pour appuyer cette hypothèse, une série de cultures a été effectuée dans laquelle l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque a été ajouté comme substrat à la place du phénanthrène (Tableau XIX). Une culture contrôle contenant du phénanthrène a aussi été effectuée en parallèle. Un pourcentage d'enlèvement de l'intermédiaire de 53 a été obtenu après 5 jours d'incubation. Ces résultats confirment que la voie métabolique utilisée par la souche Phe-6 pour l'enlèvement du phénanthrène ne s'arrête pas à l'intermédiaire mais se poursuit plus loin.

14. CINÉTIQUE D'ENLÈVEMENT DU PHÉNANTHRÈNE PAR LA SOUCHE Phe-6

La cinétique d'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 a été déterminée à l'aide d'analyses quotidiennes sur une période de 5 jours (Figure 8). Il semble que l'enlèvement du phénanthrène a été à son maximum entre le premier et le troisième jour d'incubation. Pendant cette activité élevée d'enlèvement, une plus grande variation du pH et une concentration en unités viables plus élevée ont été observées. En effet, la concentration des unités viables qui étaient au départ de 4×10^6 ufc/mL a atteint 2×10^9 ufc/mL après 24 heures

Tableau XIX. Enlèvement de l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque par la souche Phe-6

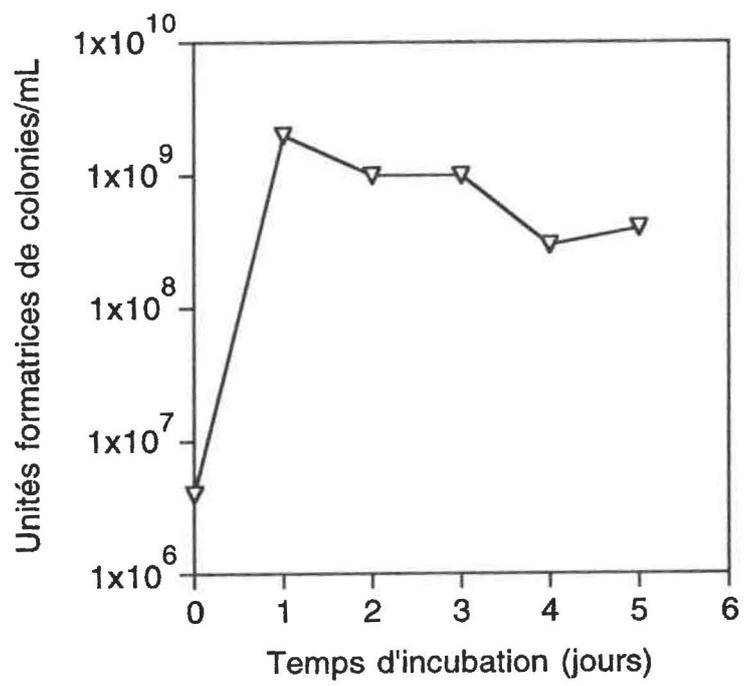
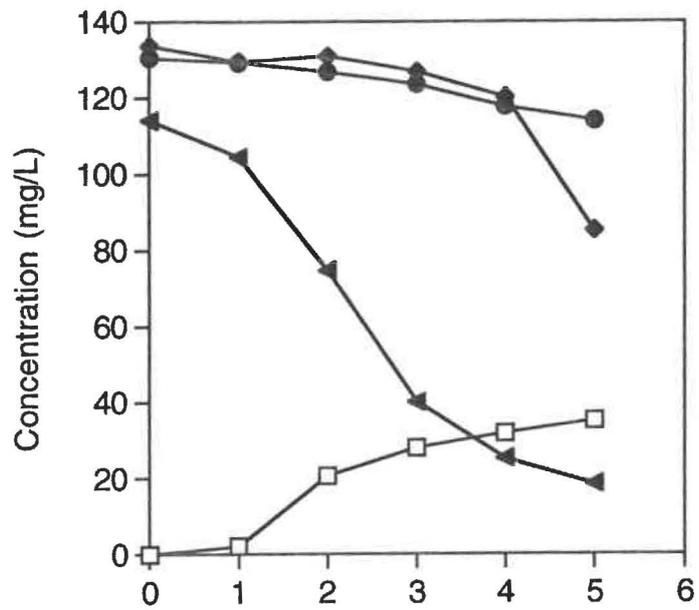
Substrats		Concentration ^a (mg/L) (ufc/mL)		% Enlèvement ^b après 5 jours d'incubation
		Jours d'incubation		
		0	5	
Acide 1-hydroxy-2- naphthoïque	Culture	87,3 (3x10 ⁶)	41,7 (3x10 ⁸)	53
	Contrôle abiotique	-	88,9	
Phénanthrène	Culture	N.D.	20,3	76
	Contrôle abiotique	-	84,1	

a: valeurs obtenues de duplicata

b: calculé par rapport au contrôle abiotique
considéré comme valeur de référence (100%) au temps
déterminé

N.D.: non déterminé

FIGURE 8 . Cinétique d'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 en milieu liquide (B.H.500V).
Phénanthrène (▼); acide 1-hydroxy-2-naphthoïque (□); unités formatrice de colonies (▽); contrôle abiotique non inoculé (◆); contrôle abiotique cellules tuées (*).



et s'est maintenue à 1×10^9 ufc/mL jusqu'au troisième jour puis elle a diminuée à 3×10^8 ufc/mL au quatrième jour. Un pourcentage d'enlèvement du phénanthrène de 82 a été obtenu après 5 jours d'incubation. Des variations de la concentration en phénanthrène ont été observées dans le cas des deux contrôles abiotiques (non inoculé et cellules tuées).

La concentration de l'intermédiaire soit l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque est passée de 2,1 à 20,7 mg/L entre le premier et le deuxième jour, ce qui appuie les observations précédentes sur l'activité élevée enregistrée après le premier jour d'incubation. Puis, la concentration de cet intermédiaire a par la suite augmentée à 28,1 mg/L après 3 jours pour atteindre 35,3 mg/L après 5 jours d'incubation.

15. TOXICITÉ

Une diminution de la toxicité a été mesurée au cours de l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6. Au temps zéro, le nombre d'unités toxiques était de 15,6 comparative-ment à 10,4 après 5 jours d'incubation. Il y a donc eu diminution des unités toxiques après 5 jours d'incubation. La toxicité de l'intermédiaire l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque n'a pu être déterminée dû à la faible reproductibilité des résultats obtenus avec ce produit (résultats non présentés).

16. MINÉRALISATION

La production de CO₂ marqué à partir de [9-¹⁴C] phénanthrène a été déterminée dans le but de vérifier si la souche Phe-6 minéralise ce HAP (Tableau XX). Une radioactivité de base a été observée au temps zéro, tant pour la culture que pour le contrôle abiotique. Une augmentation de la radioactivité est survenue dans la culture principalement entre le 3^{ème} et 7^{ème} jour d'incubation où des valeurs de 539,5 et 6257,3 cpm C¹⁴ ont été respectivement obtenues. L'augmentation de la radioactivité a été notée jusqu'au 17^{ème} jour d'incubation, mais cette augmentation a été plus faible entre le 12^{ème} et 17^{ème} jour d'incubation. La radioactivité a été plutôt stable dans le contrôle abiotique. Ces résultats suggèrent donc qu'il y a eu production de CO₂ marqué lors de la dégradation du [9-¹⁴C] phénanthrène par la souche Phe-6. Ainsi, la souche Phe-6 minéraliserait le phénanthrène. L'enlèvement du phénanthrène non marqué a été suivi dans des cultures en parallèle à titre de contrôle positif et un enlèvement de 100% a été observée après 12 jours d'incubation (résultats non présentés).

17. PERFORMANCE DE LA SOUCHE PHE-6 EN SOL

La capacité d'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 a été vérifiée en sol (Tableau XXI). La concentration du phénanthrène dans l'échantillon de sol de la sablière Thouin a été évaluée à 686 mg/L. Des pourcentages d'enlèvement du phénanthrène de 48 et 84 ont été obtenus après

Tableau XX. Production de CO₂ marqué (C¹⁴) par la souche Phe-6 lors de la dégradation du [9-¹⁴C] phénanthrène en fonction du temps d'incubation

Échantillon provenant de	Coups par minute ^a (C ¹⁴) Jours d'incubation				
	0	3	7	12	17
Culture	99,9	539,5	6257,3	11150,9	15241,4
Contrôle abiotique	97,1	110,0	113,3	80,8	90,2

a : valeurs obtenues de duplicata

Tableau XXI. Enlèvement du phénanthrène du sol par la souche Phe-6 en fonction du temps d'incubation

Échantillons	Phénanthrène ^a (mg/L) (% Enlèvement ^b)	
	Jours d'incubation	
	30	60
Sol	346 (48)	100 (84)
[Sol+Phe-6]+HgCl ₂	666	644
Sol+Phe-6	164 (75)	57 (91)
Sol stérile	469 (0)	N.D. (N.D.)
Sol stérile+Phe-6	456 (3)	N.D. (N.D.)
[Sol stérile + Phe-6]+HgCl ₂	468	N.D.

a: valeurs obtenues de duplicata

b: calculé par rapport au contrôle abiotique considéré comme valeur de référence (100%) au temps déterminé

N.D.: non déterminé

Sol au temps zéro: 686 mg/L phénanthrène

respectivement un et deux mois d'incubation comparativement à 75 et 91 suite à l'ajout de la souche Phe-6 au sol.

Des essais ont aussi été effectués avec du sol stérilisé au chloroforme, dans le but de vérifier le pourcentage d'enlèvement effectué par la souche Phe-6 seule. Les résultats obtenus ont révélé que sous ces conditions, la souche Phe-6 n'a pas été active puisqu'une concentration de phénanthrène semblable variant entre 456 et 469 mg/L a été retrouvée dans les différentes cultures incluant les contrôles, après un mois d'incubation. Aucune flore dégradant potentiellement le phénanthrène n'a été retrouvée dans le sol stérile, aussi bien au temps zéro qu'après un mois d'incubation. Dans le cas du sol stérile inoculé avec la souche Phe-6, cette dernière a été évaluée à 1×10^6 ufc/mL au temps zéro et à 3×10^6 ufc/mL après un mois.

L'enlèvement de d'autres HAPs présents dans le sol des microcosmes n'a pas été suivi compte tenu de la difficulté, lors de la programmation du four du chromatographe à phase gazeuse, d'identifier et de séparer les différents pics de ces HAPs.

DISCUSSION

1. OBSERVATION DES HALOS ET DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN

D'après les résultats obtenus par la technique de vaporisation sur milieu solide la microflore indigène du sol de la sablière Thouin pourrait potentiellement dégrader l'acénaphthylène, le fluorène, le phénanthrène et l'antracène. Similairement, Foght et Westlake (1988) ont isolé des colonies formant des halos sur milieu solide en présence du phénanthrène et de l'antracène. Quant à Moeller et Ingvorsen (1993) et Grifoll et al. (1992), ils ont respectivement isolé des colonies formant des halos en présence de phénanthrène et de fluorène. Contrairement à nos résultats, Boldrin et al. (1993) ont observé des colonies formant des halos en présence de pyrène. Il est à noter que la vaporisation d'une solution de HAP ne sélectionne pas les bactéries pouvant potentiellement dégrader ce HAP mais elle les met en évidence. Cependant, la grande concentration de la microflore totale est un facteur limitant l'observation des halos. En fait, elle n'est possible qu'avec des dilutions élevées des échantillons telles que 10^{-3} et 10^{-4} compte tenu de l'abondance de la microflore totale. De plus, les résultats semblables obtenus en terme de dénombrement sur le milieu de culture complexe BHI et le milieu minimal Bushnell-Haas démontrent que la microflore indigène du sol de la sablière Thouin possède une faible exigence nutritionnelle.

Le fait de ne pas observer de halo dans les cas du pyrène, chrysène, benzantracène et benzopyrène ou seulement quelques-uns au hasard pour l'antracène ne signifient pas nécessairement que les bactéries pouvant potentiellement dégrader ces HAPs sont absentes ou en très faibles concentrations. Comme le rapporte Frostegard et al. (1993), seulement une faible proportion des bactéries du sol peuvent former des colonies sur milieu solide. En plus, l'utilisation de solutions de chrysène, benzantracène et de benzopyrène rend plus difficile l'observation des halos, compte tenu que leur plus faible solubilité entraîne la vaporisation d'une plus grande quantité de la solution ce qui peut entraîner un dépôt non uniforme du HAP sur la gélose.

Le fluorène et le phénanthrène ont été retenus pour évaluer la capacité de dégradation de la microflore indigène du sol de la sablière et de deux réacteurs. De façon similaire, MacGillivray et Shiaris (1993) ont évalué les microflores de différents sites contaminés en utilisant le phénanthrène. La concentration des microflores dégradant potentiellement le fluorène et le phénanthrène qui a été retrouvée dans le réacteur non performant (No 15) est inférieure à celle obtenue avec le sol non traité de la sablière. Ce résultat est en accord avec la non performance du réacteur No 15 à dégrader les HAPs.

Le dénombrement bactérien du réacteur No 2 ne peut être comparé avec celui du sol non traité de la sablière puisqu'il s'agit dans chacun des cas de mélanges de sols différents. Toutefois, la bonne performance de ce réacteur à enlever le fluorène laissait supposer une microflore plus importante pouvant potentiellement dégrader ce HAP que celle retrouvée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le prélèvement pour l'énumération a été effectué après que cette microflore ait passé par une phase de décroissance.

2. ISOLEMENT ET CONSERVATION

Huit des neuf souches isolées retenues appartiennent au genre *Pseudomonas*. Ceci n'est peut-être pas étonnant compte tenu que Alexander (1977) a rapporté que les *Pseudomonas* représentent le principal genre bactérien présent dans le sol.

Le repiquage sur milieu solide ne s'est pas révélé être un bon moyen de conservation à long terme puisque même en présence du HAP, la majorité des souches ont perdu leur capacité de l'utiliser après le sixième repiquage. De plus, la perte de cette capacité est plus rapide si le HAP est absent du milieu puisque la moitié des souches n'utilisaient plus le HAP après seulement le deuxième repiquage. Ces observations sont semblables à celles de Kiyohara et al. (1982) qui ont rapporté la disparition du phénotype Phn⁺ (phénanthrène positif) lorsqu'une culture bactérienne est

conservée sur milieu solide pour une longue période de temps ou si des repiquages en milieu liquide se font en absence du HAP. Guerin et Jones (1988a) ont également observé la perte du phénotype Phn⁺ s'il y a absence de HAP dans le milieu de culture.

La congélation à -70°C permet de conserver la capacité de former des halos sur milieu solide pour chacune des différentes souches bactériennes en présence de leur HAP respectif et ce même après des temps de congélation de six mois, tout en maintenant une concentration élevée des unités viables soit 10⁸ ufc/mL.

3. ACTIVITÉ EN MILIEU LIQUIDE

Comme le mentionnent Shiaris et Cooney (1983), une souche bactérienne ne peut être considérée comme dégradant un HAP uniquement à la suite de l'observation de halos sur milieu solide en présence de ce HAP. La capacité de cette souche à utiliser un HAP doit donc être confirmée en milieu liquide.

Les faibles diminutions de 5 et 9% de la concentration du phénanthrène avec les contrôles abiotiques non inoculé et cellules Phe-6 tuées respectivement, indiquent que l'enlèvement du phénanthrène dans les cultures n'est pas relié à la volatilisation de ce composé ni à son adsorption aux cellules bactériennes, mais plutôt à l'activité bactérienne de la

souche Phe-6. Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche Phe-2, ce qui indique que l'enlèvement du phénanthrène dans le cas de cette souche est aussi relié à l'activité bactérienne.

Six des neuf souches isolées ont donc été retenues comme pouvant potentiellement dégrader un HAP suite aux essais sommaires effectués en milieu liquide. Pour leur part, MacGillivray et Shiaris (1993) ont testé l'activité en milieu liquide de 13 levures envers le phénanthrène et seulement 5 d'entre elles se sont révélées comme pouvant dégrader ce HAP. Ces deux résultats correspondent aux observations faites par Atlas (1981) selon lesquelles parfois de forte et de faible corrélations ont été établies entre le nombre de souches formant des halos sur milieu solide et le pourcentage d'entre elles pouvant utiliser le HAP en milieu liquide.

4. ENRICHISSEMENT EN MILIEU LIQUIDE

Le procédé d'enrichissement en milieu liquide a révélé que la microflore indigène du sol de la sablière Thouin renferme des microorganismes pouvant potentiellement dégrader l'anthracène, le chrysène et le benzanthracène. L'isolement des souches en culture pure n'a pas été effectué pour ces HAPs, vu le manque de temps. A la lumière des résultats obtenus pour les essais en milieu liquide avec les souches isolées en culture pure et avec les enrichissements, six des

huit HAPs étudiés ont été enlevés par la microflore du sol de la sablière Thouin.

Contrairement à ce qui a été effectué dans ce travail, dans la littérature il n'y a pas de suivi de l'enlèvement des HAPs lors des enrichissements en milieu liquide. La procédure suivie par Janigani et al. (1993), Mueller et al. (1990) et Stucki et Alexander (1987) a plutôt été la suivante: les repiquages sont effectués après des temps d'incubation variant de 24 heures à 7 jours, après quoi des dilutions des cultures sont ensemencées sur milieu solide et les colonies obtenues sont par la suite testées en milieu liquide. Contrairement à nous, les HAPs utilisés lors de ces enrichissements servaient de seule source de carbone dans les milieux de culture. Par contre, l'utilisation d'extrait de levures comme nous l'avons fait lors d'un procédé d'enrichissement a été rapportée par Grifoll et al. (1992) et Horowitz et al. (1975).

5. SÉLECTION D'UNE SOUCHE

Parmi les souches isolées retenues, les souches Ace-1 et Phe-6 ont présenté les meilleurs pourcentages d'enlèvement de leur HAP respectif, soit 71 et 52 respectivement. Cependant, la souche Ace-1 n'a pas été sélectionnée compte tenu de la volatilité de l'acénaphthylène qui rend difficile le suivi de l'enlèvement de ce HAP dans le temps.

6. OPTIMISATION DE L'ACTIVITÉ

Les essais exploratoires ont révélé que l'ajout des suppléments au milieu de culture B.H. était nécessaire pour obtenir l'enlèvement significatif du phénanthrène par la souche Phe-6. En effet, il a été démontré que la souche Phe-6 ne peut utiliser significativement le phénanthrène comme seule source de carbone puisque 18% d'enlèvement de ce HAP ont été obtenus après 21 jours d'incubation avec le milieu B.H. et que ce milieu ne soutient pas la croissance bactérienne (Tableau XII). Contrairement à nous, Boldrin et al. (1993) ont montré qu'une souche de *Mycobacterium* en présence de phénanthrène comme seule source de carbone, a enlevé 76 et 82% du HAP après 5,4 et 5,9 jours d'incubation, respectivement. Cependant, cette souche ne peut utiliser le fluorène comme seule source de carbone et l'ajout de protéose peptone et d'extrait de levures à des concentrations de 0,05% (p/v) au milieu de culture a été nécessaire pour obtenir 58% d'enlèvement de ce HAP après 21 jours d'incubation. Également, Weissenfels et al. (1990) ont étudié une souche de *Pseudomonas paucimobilis* qui dégrade le phénanthrène comme seule source de carbone à un rythme de 1,0 mg/mL par jour. Ils ont aussi rapporté que les souches *Pseudomonas vesicularis* et *Alcaligenes denitrificans* dégradent le fluorène et le fluoranthène alors que ces HAPs sont les seules sources de carbone. Grifoll et al. (1992) ont obtenu avec une souche d'*Arthrobacter* 100% d'enlèvement du fluorène, seule source de carbone, après 2,5 jours d'incuba-

tion mais le milieu doit être supplémenté avec de la vitamine B₁₂ ou de l'extrait de levures comme facteur de croissance.

Le phénanthrène doit être biodisponible pour servir de source de carbone aux bactéries mais ce HAP est faiblement soluble dans la phase aqueuse. Certaines bactéries peuvent croître directement à la surface d'un composé comme une souche de *Pseudomonas* rapportée par Zilber et al. (1980) qui peut croître à la surface de n-tétracosane. D'autres bactéries sécrètent un biosurfactant comme la souche de *Pseudomonas aeruginosa* rapportée par Jain et al. (1992).

L'utilisation du milieu B.H.500V a permis l'optimisation de l'activité de la souche Phe-6 envers le phénanthrène en permettant un pourcentage d'enlèvement plus élevé après une plus courte période de temps. De plus, la croissance bactérienne dans le milieu B.H.500V est supérieure à celle dans les milieux B.H.025V. Compte tenu qu'un pourcentage d'enlèvement équivalent à celui du milieu B.H.500V a été obtenu avec le milieu B.H. supplémenté à 0,5% (p/v) E.L. et P.P. et du mélange de vitamines, il semble donc que l'amidon ne joue pas un rôle important dans l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6. Ainsi, la composition du milieu B.H.500V pourrait être simplifiée en éliminant l'amidon. Cependant, le protéose peptone semble être un supplément important puisque 42% d'enlèvement ont été obtenus avec le milieu B.H. supplé-

menté à 0,5% (p/v) P.P. et du mélange de vitamines, mais l'ajout d'extrait de levures à ce milieu permet tout de même d'obtenir un pourcentage d'enlèvement supérieur soit 57. Ces résultats indiquent que l'extrait de levures et le protéose peptone sont des suppléments importants pour optimiser l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6. Similairement à nous, Ijah et Ukpe (1992) ont rapporté que l'ajout de peptone et d'extrait de levures augmentait le pourcentage d'enlèvement de l'huile brute par une souche de *Bacillus*. Également, Constanti et al. (1994) ont observé qu'une souche de *P. putida* peut oxyder le dibenzothiophène (DBT) en présence d'extrait de levures mais cette oxydation ne peut se faire si le DBT est la seule source de carbone.

L'ajout du mélange de vitamines seul de même que l'ajout du double de la concentration de vitamines, ne favorisent pas l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6. Il s'agit d'un résultat différent de celui obtenu par Grifoll et al. (1992) avec une souche d'*Arthrobacter* en présence de vitamines B₁₂ et de fluorène.

Weissenfels et al. (1990) et Casarini et al. (1988) ont rapporté une augmentation d'enlèvement de HAP lorsque le pH du milieu de culture ou du sol variait entre 7,0 et 7,5. Dans notre cas, le pH du milieu de culture s'est aussi avéré un paramètre important pour optimiser l'activité de la souche

Phe-6 envers le phénanthrène. En effet, des pourcentages d'enlèvement de 81 et 85 ont été obtenus avec le milieu B.H.500V où le pH du milieu a été ajusté quotidiennement, tandis qu'un pourcentage d'enlèvement inférieur, soit 67, a été obtenu avec le même milieu lorsque le pH n'a pas été ajusté pendant l'incubation et est demeuré alcalin. L'ajout de lactose au milieu B.H.500V n'a pas contribué à abaisser le pH de la culture puisqu'il n'y a pas eu production de composés acides étant donné que la souche Phe-6 n'utilisait aucun sucre tel que démontré dans des tests biochimiques effectués en parallèle. La fréquence des ajustements du pH, plus particulièrement lors des trois premiers jours d'incubation où les fluctuations du pH sont les plus grandes, peut expliquer les différences de pourcentages d'enlèvement du phénanthrène obtenus avec les mêmes milieux lors de différents essais. L'alcalinité générée lors de l'incubation des cultures en milieu B.H.500V pourrait expliquer les baisses de concentration bactérienne observées en cours d'incubation. Cette alcalinité semble être reliée au métabolisme des suppléments puisque le pH demeure plutôt stable dans le milieu B.H.025V. La transformation des acides aminés, par exemple, de l'extrait de levures et du protéose peptone en composés alcalins expliquerait cette augmentation du pH du milieu de culture au cours de l'incubation.

L'optimisation de l'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 est un point majeur dans ce travail puisque la réduction du temps d'incubation de 42 à 5 jours a facilité l'étude de cette souche. L'extrait de levures et de protéose peptone servent alors de sources de carbone pour soutenir la croissance bactérienne. À notre connaissance, c'est la première fois avec une souche de *P. putida* que l'ajout de suppléments au milieu au culture, tel que l'extrait de levures et de protéose peptone, augmente le rendement d'enlèvement d'un HAP par une telle souche.

7. MILIEU OPTIMISÉ ET SOUCHE FLU-4

L'utilisation du milieu optimisé pour la souche Phe-6 a permis de démontrer une augmentation de l'activité de la souche Flu-4 dans ces conditions. C'est donc dire que l'optimisation qui a été réalisée pour une souche pourrait aussi servir pour une autre souche. À notre connaissance, il n'y a pas d'essai comparable dans la littérature.

8. SPECTRE D'ACTIVITÉ

Le pourcentage d'enlèvement du fluorène de 71 par la souche Phe-6 suggère que celle-ci peut utiliser ce HAP en plus du phénanthrène. Les pourcentages d'enlèvement de 36 et 26 obtenus respectivement lorsque le phénanthrène et le fluorène sont en mélange dans le même milieu de culture, indique que la souche Phe-6 utilise simultanément les HAPs pour lesquelles

elle possède une activité. Par contre ceci entraînerait une baisse des pourcentages d'enlèvement pour chacun de ces HAPs comparativement aux pourcentages obtenus lorsque ces mêmes HAPs sont présents seul dans le milieu. Yang et al. (1994) ont également observé que ces deux HAPs pouvaient être enlevés par une souche de *P. putida*. Grifoll et al. (1992) ont eux aussi observé l'enlèvement du phénanthrène et du fluorène par une souche d' *Arthrobacter*. Mais dans les deux cas, ces auteurs n'ont pas étudié l'enlèvement de ces HAPs en mélange.

L'absence d'enlèvement significatif pour l'anthracène, le benzanthracène et le benzopyrène a révélé que la souche Phe-6 n'a pu utiliser ces HAPs dans nos conditions de culture. Contrairement à Thouand et Block (1993) qui préconisent l'adaptation de l'inoculum dans une pré-culture en présence du composé à étudier avant de procéder au suivi de l'enlèvement de ce composé par les souches bactériennes, aucun procédé d'adaptation n'a été effectué dans le but d'acclimater la souche Phe-6 à ces HAPs. De plus, les temps d'incubation de 5 et 10 jours étaient relativement courts pour permettre l'enlèvement de ces HAPs, surtout ceux de 4 et 5 noyaux.

Kiyohara et al. (1994) ont observé, comme nous, une souche de *P. putida* qui utilise le phénanthrène mais pas l'anthracène. Par contre, Foght et Westlake (1988), Jeffrey et al. (1975) et Dean-Raymond et Bertha (1975) ont isolé des

souches de *P. putida* qui utilisent le phénanthrène et l'anthracène. De plus, Heitkamp et Cerniglia (1988a) ont observé une souche bactérienne à Gram-positif qui minéralise, en plus du phénanthrène, des HAPs à 4 noyaux comme le pyrène et le 6-nitrochrysène.

McKenna et Heath (1976) ont observé la co-oxydation de 27 et 50% du benzanthracène et du benzopyrène respectivement avec une souche de *Flavobacterium* en présence de phénanthrène qui sert alors de substrat après un temps d'incubation de 4 semaines. Cependant, ces auteurs ont répété cette expérience avec une souche de *Pseudomonas* et comme nous ils n'ont alors observé aucune co-oxydation.

Contrairement à Gough et al. (1992) qui possèdent une souche de *Pseudomonas fluorescents* qui utilise des composés aliphatiques, aucun enlèvement des composés aliphatiques hexadécane et tétradécane n'a été réalisé par la souche Phe-6 dans les conditions de culture utilisées. Cependant, Foght et Westlake (1988) ont isolé une souche de *Pseudomonas* qui présentait un large spectre d'activité pour l'enlèvement des HAPs mais qui n'utilisait pas les composés aliphatiques.

La capacité d'une souche bactérienne à utiliser une variété de HAPs et d'autres hydrocarbures comme les aliphatiques, peut varier d'une souche à l'autre et dépend de la

présence de systèmes enzymatiques aptes à métaboliser ces composés. Selon Foght et Westlake (1988), il est possible que des oxygénases constitutives possédant une plus large spécificité, plutôt qu'une série d'oxygénases à substrat spécifique, seraient responsables du spectre d'action plus large chez une souche bactérienne. De plus, l'utilisation de portions communes de voies métaboliques entre certains HAPs, pourrait expliquer que plusieurs HAPs puissent être métabolisés par une même souche. En effet, Dean-Raymond et Bertha (1975) ont rapporté qu'il existerait un métabolisme bactérien commun entre le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène. Yang et al. (1994) ont également observé un système enzymatique similaire chez une souche de *Pseudomonas putida* pour l'utilisation du naphthalène et du phénanthrène, mais l'utilisation du fluorène impliquerait un système enzymatique différent. Selon ces auteurs, un même groupe de gènes coderaient pour la première partie des voies métaboliques du naphthalène et du phénanthrène. De nombreuses recherches se font actuellement concernant l'identification de plasmides pour mieux comprendre l'interrelation entre les systèmes enzymatiques des HAPs.

Un fait intéressant à souligner, est qu'il n'y a pas de baisse dans les pourcentages d'enlèvement du phénanthrène par la souche Phe-6 lorsque celui-ci est en mélange avec le benzanthracène et le benzopyrène ou avec l'hexadécane et le tétradécane. Ces composés ne semblent donc pas affecter

l'activité métabolique de la souche Phe-6. Constanti et al. (1994) ont obtenu des résultats similaires avec des souches de *Rhodococcus* et d'*Acinetobacter* dont le rendement n'est pas affecté par la présence de dibenzothiophène (DBT). Il apparaît donc important d'étudier le spectre d'activité d'une souche bactérienne en présence d'un mélange de HAPs ou de d'autres composés pour ainsi mieux évaluer les capacités de cette souche dans des conditions en sol où les polluants sont présents en mélange.

9. EFFET DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE HAP SUR L'ACTIVITÉ D'ENLÈVEMENT

Il a été démontré que l'ajout de concentrations importantes de phénanthrène tel que 1,000 mg/L, n'influencent pas l'activité d'enlèvement de ce HAP par la souche Phe-6. Ceci serait dû au faible taux de dissolution du phénanthrène, c'est-à-dire que la concentration dissoute dans le milieu liquide devrait être la même indépendamment de la concentration initiale ajoutée au milieu. Wodzinski et Coyle (1974) ont observé que la concentration de phénanthrène solide dans le milieu n'affecte pas le taux de croissance des bactéries qui peuvent enlever ce HAP ce qui les fait supposer que ces bactéries utilisent le phénanthrène sous forme dissoute.

10. CONFIRMATION ET ENLÈVEMENT DE L'INTERMÉDIAIRE

La co-élution de l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque (1,2 HN) avec l'échantillon de culture permet de confirmer l'identification de l'intermédiaire obtenu lors de l'utilisation du phénanthrène par la souche Phe-6. Ceci est en accord avec Guerin et Jones (1988b) qui ont rapporté que l'acide 1,2 HN est le principal produit de transformation du phénanthrène. De plus, la souche Phe-6 s'est révélée capable de transformer cet intermédiaire, ce qui suggère que cette souche peut poursuivre la transformation. Kiyohara et al. (1994) et Boldrin et al. (1993) ont également observé l'utilisation de l'acide 1,2 HN par une souche de *P. putida* et une souche de *Mycobacterium*, respectivement.

Une certaine concentration d'acide 1,2 HN semble s'accumuler lors de l'utilisation du phénanthrène par la souche Phe-6 comme c'est le cas en général pour les cultures pures selon Guerin et Jones (1988b), alors qu'en présence de cultures mixtes il n'y a pas d'accumulation d'intermédiaire. Cependant, Guerin et Jones (1988a) ont isolé une souche de *Mycobacterium* qui n'accumule pas l'acide 1,2 HN lors de l'utilisation du phénanthrène. L'ajout de protéose peptone au milieu de culture B.H.500V après 5 jours d'incubation n'a pas permis de réduire l'accumulation de l'intermédiaire, suggérant que cette accumulation n'était probablement pas due

au ralentissement du métabolisme. Il est possible que ce soit les vitesses de réactions qui soient en cause.

11. CINÉTIQUE D'ENLÈVEMENT DU PHÉNANTHRÈNE PAR LA SOUCHE PHE-6

Les faibles variations de la concentration de phénanthrène obtenues dans le cas du contrôle abiotique cellules tuées, confirment les observations faites précédemment en milieu liquide à savoir que l'enlèvement du phénanthrène dans la culture biotique est due à l'activité bactérienne de la souche Phe-6. En général, les variations observées dans les contrôles abiotiques seraient dues à la volatilisation du HAP.

Les concentrations de l'acide 1,2 HN obtenues après 2 et 5 jours d'incubation dans l'expérience sur la cinétique d'enlèvement sont supérieures à celles observées précédemment (Tableau XVIII). Ces variations pourraient être reliées aux différentes techniques d'extraction utilisées lors de ces deux expériences. Il est possible que la technique utilisant tout le contenu de l'erlenmeyer ait permis de recueillir une plus grande concentration de l'intermédiaire comparativement à la technique effectuée à partir du prélèvement de 1 mL du milieu de culture, compte tenu de la meilleur représentabilité de la première méthode. Les expériences sur la cinétique d'enlèvement ont permis de confirmer que l'acide 1,2 HN s'accumulait

dans la culture et de préciser que cette accumulation survenait dans les trois premiers jours d'incubation.

En dépit d'une croissance très rapide de la souche Phe-6 durant la première journée d'incubation, soit de 10^6 à 10^9 ufc/mL, il n'y a pas eu d'enlèvement important du phénanthrène durant cette période. La majorité de l'enlèvement survient dans la phase stationnaire de croissance, soit entre la première et troisième journée. Puis l'activité ainsi que la population microbienne diminuent jusqu'au jour 5. Il existe deux points de comparaison, soit Grifoll et al. (1992) et Guerin et Jones (1988a) qui ont respectivement obtenu 100% d'enlèvement du fluorène après 2,5 jours d'incubation avec une souche d'*Arthrobacter* et 80% d'enlèvement du phénanthrène après 13 jours d'incubation avec une souche de *Mycobacterium*. Mais contrairement à nous, dans chacun des cas l'utilisation des HAPs s'est produite durant la phase de croissance, ce qui appuie le fait que ces souches d'*Arthrobacter* et de *Mycobacterium* utilisent respectivement le fluorène et le phénanthrène comme seule source de carbone. D'ailleurs, il n'y a pas d'augmentation de la biomasse bactérienne de la souche d'*Arthrobacter* au cours de la période d'incubation en absence de fluorène.

12. TOXICITÉ

Les résultats obtenus montrent que le phénanthrène possède une certaine toxicité et il semble que l'enlèvement de ce HAP par la souche Phe-6 entraîne une baisse de cette toxicité de l'ordre de 30% au cours de l'incubation. Cette baisse pourrait être expliquée par la production d'intermédiaires moins toxiques, ou par la minéralisation d'une partie du phénanthrène.

13. MINÉRALISATION

La production de CO₂ marqué vient d'abord de l'ouverture du cycle du [9-¹⁴C] phénanthrène et de la poursuite du catabolisme de ce HAP au-delà de la formation de l'acide 1,2 HN. Cependant, l'accumulation de cet intermédiaire dans le milieu liquide peut réduire d'autant la quantité de CO₂ marqué détectée. En effet, Keuth et Rehm (1991) à partir d'une étude de dégradation du phénanthrène par une souche d'*Arthrobacter polychromogenes*, ont récupéré 47,7% de C¹⁴ sous forme de CO₂ marqué et 47,8% dans la fraction aqueuse. Également, Stucki et Alexander (1987) ont observé qu'une souche de *Flavobacterium* convertissait 90% de l'anthracène en produits hydrosolubles et que le taux de minéralisation était bas. Dans notre travail, le CO₂ marqué produit a été évalué en coups par minute (cpm C¹⁴) plutôt qu'en pourcentage de C¹⁴ récupéré et il n'y a pas eu de recherche d'effectuer pour évaluer la radioactivité présente dans la phase aqueuse. La forte hausse de radioacti-

tivité enregistrée entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour d'incubation montre qu'il y a production de CO₂ marqué et donc minéralisation du phénanthrène par la souche Phe-6.

Foght et Westlake (1988) ont également observé la minéralisation du phénanthrène par une souche de *Pseudomonas*. De plus, la souche Phe-6 hybride fortement avec le gène Xyl E qui code pour l'enzyme catéchol-2,3-dioxygénase, ce qui suggère que ce *P. putida* posséderait le gène pour ouvrir le noyau catéchol qui serait la dernière étape de la voie métabolique du phénanthrène (Villemure, communications personnelles). Cette observation supporte l'hypothèse qu'il y aurait minéralisation du phénanthrène par la souche Phe-6. Selon Rossello-Mora et al. (1994), le catéchol est la molécule centrale où converge la voie métabolique de plusieurs HAPs et il y a ouverture de cette molécule soit par la voie ortho ou meta.

14. PERFORMANCE DE LA SOUCHE PHE-6 EN SOL

L'inoculation de la souche Phe-6 dans le sol de la sablière Thouin a permis d'augmenter l'enlèvement du phénanthrène dans ce sol et suggère que la souche Phe-6 n'est pas affectée par la compétition avec la microflore indigène du sol. Cependant, l'écart entre les pourcentages d'enlèvement de ce HAP entre le sol non inoculé et le sol inoculé, est plus marqué après les premiers jours d'incubation. C'est-à-dire que l'avantage de l'inoculation de la souche Phe-6 résiderait

dans un enlèvement plus rapide du HAP. Dans le contrôle abiotique (sol inoculé traité au $HgCl_2$) seulement de faibles variations de la concentration du phénanthrène ont été observées, confirmant que l'enlèvement de ce HAP dans les microcosmes précédents est dû à l'activité des microorganismes.

Heitkamp et Cerniglia (1989) et Foght et Westlake (1988) ont pour leur part observé respectivement une augmentation de l'enlèvement d'un mélange de HAPs, incluant le phénanthrène, suite à l'inoculation d'une souche de *Mycobacterium* et de *Pseudomonas* dans un microcosme. Brodkorb et Legge (1992) ont observé une augmentation de la minéralisation du phénanthrène suite à l'inoculation du champignon *Phanerochaete chrysosporium* dans un sol contenant ce HAP. Dans le cas de l'essai utilisant du sol stérilisé, la baisse des concentrations de phénanthrène, tant dans le sol non inoculé que le sol inoculé après 30 jours d'incubation, pourrait s'expliquer par une certaine polymérisation du HAP due au traitement au chloroforme, ce qui entrainerait la non détection de ce HAP par le GC (Milhot, communications personnelles). Également, la présence de chloroforme résiduel dans les porosités du sol pourrait avoir un effet bactériostatique sur la souche Phe-6, comme semble l'indiquer le dénombrement de la flore pouvant potentiellement dégrader le phénanthrène après un mois d'incubation. Moeller et Ingvorsen (1993) ont également

observé qu'une souche d'*Alcaligenes* inoculée dans un sol stérilisé au chloroforme était incapable d'enlever le phénanthrène comparativement au rendement de cette souche dans un sol n'ayant pas été stérilisé mais l'explication de ce phénomène n'a pas été donnée par ces auteurs. Il apparaît clairement des résultats obtenus, que la souche Phe-6 peut jouer un rôle important lors du traitement du sol de la sablière Thouin.

CONCLUSION

Le sol de la sablière Thouin possède des microorganismes pouvant enlever six des huit HAPs étudiés soit l'acénaphthylène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le chrysène et le benzanthracène.

Il a été démontré que l'activité d'enlèvement du phénanthrène par la souche de *P. putida* nécessite l'ajout de suppléments au milieu de culture Bushnell-Haas, tels que l'extrait de levures et le protéose peptone à des concentrations de 0,5% (p/v) et un mélange de vitamines. Cette souche bactérienne utilise donc le phénanthrène par co-métabolisme.

Dans les conditions de culture employées, cette souche peut utiliser le fluorène en plus du phénanthrène et il y a enlèvement de chacun de ces deux HAPs lorsqu'ils sont ajoutés en mélange au milieu de culture. De plus, l'enlèvement du phénanthrène par cette souche bactérienne n'est pas affecté par la présence de d'autres HAPs comme le benzanthracène et le benzopyrène et par la présence de composés aliphatiques comme l'hexadécane et le tétradécane.

L'ajout de phénanthrène marqué au ^{14}C a permis de démontrer que la souche de *P. putida* minéralise le phénanthrène, ce qui augmente l'intérêt pour cette souche.

De plus, l'inoculation de cette souche dans un microcosme supplémenté avec le milieu de culture optimisé, a augmenté l'enlèvement du phénanthrène dans le sol, ce qui indique que la souche de *P. putida* n'est pas inhibée par la compétition avec la flore indigène du sol.

La souche Phe-6 isolée de la sablière Thouin est une souche intéressante puisqu'elle possède des caractéristiques qui pourraient lui permettre de jouer un rôle important lors du traitement de ce sol contaminé.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement:

- docteur Jean-Guy Bisailon pour avoir accepté de diriger ce travail, pour sa grande disponibilité, sa capacité d'écoute, ses qualités pédagogiques et son appui constant tout au long de ma maîtrise.
- Louis Racine pour sa grande collaboration et son assistance technique au laboratoire.
- Sylvain Milhot, Guy McSween et Rita Alary pour leur aide précieuse et leurs conseils pertinents.
- docteur Gilles Paquette pour son assistance avec le Microtox.
- Patricia Lirette pour son aide précieuse.
- Diane Sauvé pour sa collaboration soutenue.
- Ginette Boulanger pour avoir finalisé la présentation de ce mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. 2nd ed. Wiley. New York. 467 p.

Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*. 221: 132-138.

Anonyme. 1988. Politique de réhabilitation des terrains contaminés, Gouvernement du Québec, Éditeur officiel du Québec, 54 p.

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

Antai, S.P. 1990. Biodegradation of Bonny Light Crude Oil by *Bacillus Sp.* and *Pseudomonas Sp.* *Waste Manage.* 10: 61-64.

Atlas, R.M. et R. Bartha. 1972. Degradation and Mineralization of Petroleum in Sea Water: Limitation by Nitrogen and Phosphorus. *Biotechnol. Bioeng.* 14: 309-318.

Atlas, R.M. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180-209.

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

Austin, B. , J.J. Calomiris, J.D. Walker et R.R. Colwell. 1977. Numerical Taxonomy and Ecology of Petroleum-Degrading Bacteria. *App. Environ. Microbiol.* 34: 60-68.

Barr, D.P. et S.D. Aust. 1994. Mechanisms White Rot Fungi Use To Degrade Pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28: 78-87.

Bauer, J.E. et D.G. Capone. 1988. Effects of co-occurring aromatic hydrocarbon on the degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1649-1655.

Bogardt, A.H. et B.B. Hemmingsen. 1992. Enumeration of Phenanthrene-Degrading Bacteria by an Overlay Technique and Its Use in Evaluation of Petroleum-Contaminated Sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2579-2582.

Boldrin, B., A. Tiehm et C. Fritzsche. 1993. Degradation of Phenanthrene, Fluorene, Fluoranthene, and Pyrene by a *Mycobacterium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1927-1930.

- Bossert, I. et R. Bartha. 1984a. The fate of petroleum in soil ecosystems. Dans: Petroleum Microbiology, R.M. Atlas ed, New York, Macmillan, 453-473.
- Bossert, I. W.M. Kachel et R. Bartha. 1984b. Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. Appl. Environ. Microbiol. 47: 763-767.
- Brodkorb, T.S. et R.L. Legge. 1992. Enhanced Biodegradation of Phenanthrene in Oil Tar-Contaminated Soils Supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3117-3121.
- Casarini, D.C.P. R.M. de Macedo, R.C. de A. Cunha et J.C.O. Mauger. 1988. The Development Of Assessment Techniques To Evaluate The Biodegradation Of Oily Sludge In A Landfarming System. Wat. Sci. Tech. 20: 231-236.
- Castaldi, F.J. et D.L. Ford. 1992. Slurry Bioremediation of Petrochemical Waste Sludges. Wat. Sci. Tech. 25: 207-212.
- Cerniglia, C.E. 1984. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Adv. Appl. Microbiol. 30: 31-71.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.
- Cerniglia, C.E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Cur. Opinion Biotechnology. 4: 331-338.
- Cerniglia, C.E., W.L. Campbell, J.P. Freeman et F.E. Evans. 1989a. Identification of a Novel Metabolite in Phenanthrene Metabolism by the Fungus *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2275-2279.
- Cerniglia, C.E. et M.A. Heitkamp. 1989b. Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Dans: Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment, eds Varanasi V. Boca Raton: CRC Press. 41-68.
- Chakrabarty, A.M. 1972. Genetic Basis of the Biodegradation of Salicylate in *Pseudomonas*. J. Bacteriol. 112: 815-823.
- Comeau, Y, C.W. Greer et R. Samson. 1993. Role of inoculum preparation and density on the bioremediation of 2,4-D-contaminated soil by bioaugmentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 681-687.
- Constanti, M., A. Bordons et J. Giralt. 1994. Degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas putida*. Lett. Appl. Microbiol. 18: 107-111.

Cundell, A.M. et R.W. Traxler. 1974. Hydrocarbon-degrading Bacteria Associated with Arctic Oil Seeps. *Dev. Ind. Microbiol.* 15: 250-255.

Dagley, S. 1981. New perspectives in aromatic catabolism. Dans: Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds, eds. T. Leisinger et al., New York, Academic Press, 181 p.

Dean-Raymond, D. et R. Bartha. 1975. Biodegradation of Some Polynuclear Aromatic Petroleum Components by Marine Bacteria. *Dev. Ind. Microbiol.* 16: 97-109.

Efroymsen, R.A. et M. Alexander. 1991. Biodegradation by an *Arthrobacter* Species of Hydrocarbons Partitioned into an Organic Solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1441-1447.

Erickson, D.C., R.C. Loehr et E.F. Neuhauser. 1993. PAH Loss During Bioremediation of Manufactured Gas Plant Site Soils. *Wat. Res.* 27: 911-919.

Evans, W.C., H.N. Fernley et E. Griffiths. 1965. Oxidative Metabolism of Phenanthrene and Anthracene by Soil *Pseudomonas*. *Biochem. J.* 95: 819-831.

Fedorak, P.M., J.M. Foght et D.W.S. Westlake. 1982. A Method For Monitoring Mineralization Of ¹⁴C-LABELED Compounds In Aqueous Samples. *Water Res.* 16: 1285-1290.

Fedorak, P.M. et D.W.S. Westlake. 1981. Microbial degradation of aromatics and saturates in Prudhoe Bay crude oil as determined by glass capillary gas chromatography. *Can. J. Microbiol.* 27: 432-443.

Foght, J.M. 1990. Mineralization of [¹⁴C] hexadecane and [¹⁴C] phenanthrene in crude oil: specificity among bacterial isolates. *Can. J. Microbiol.* 36: 169-175.

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

Foster, J.W. 1962. Hydrocarbons as substrates for microorganisms. *Antoine van Leewenhock J. Microbiol. Serol.* 28: 241-274.

Frostegard, A, E. Baath et A. Tunlid. 1993. Shifts In The Structure Of Soil Microbial Communities In Limed Forests As Revealed By Phospholipid Fatty Acid Analysis. *Soil. Biol. Biochem.* 25: 723-730.

- Gibson, D.T. 1978. Microbial Transformations of aromatic pollutants. Dans: Transformations and Biological Effects, eds. O. Hutzinger et al., New York, Pergammon Press, 187 p.
- Gibson, D.T. 1982. Microbial degradation of hydrocarbons. Toxicol. Environ. Chem. 5: 237-250.
- Goldstein, R., R. Mallory et M. Alexander. 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. 50: 977-983.
- Gough, M.A., M.M. Rhead et S.J. Rowland. 1992. Biodegradation studies of unresolved complex mixtures of hydrocarbons: model UCM hydrocarbons and the aliphatic UCM. Org. Geochem. 18: 17-22.
- Grifoll, M., M. Casellas, J.M. Bayona et A.M. Solanas. 1992. Isolation and Characterization of a Fluorene-Degrading Bacterium: Identification of Ring Oxidation and Ring Fission Products. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2910-2917.
- Grosser, R.J., D. Warshawsky et J. Robie Vestal. 1991. Indigenous and Enhanced Mineralization of Pyrene, Benzo[a]pyrene, and Carbazole in Soils. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3462-3469.
- Guerin, W.F. et G.E. Jones. 1988a. Mineralization of Phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 54: 937-944.
- Guerin, W.F. et G.E. Jones. 1988b. Two-Stage Mineralization of Phenanthrene by Estuarine Cultures. Appl. Environ. Microbiol. 54: 929-936.
- Gunulan-Fournier, J.C. 1993. Effect of microbial competition on the survival and activity of 2,4-D degrading *Alcaligenes xylofidans* subsp. *denitrificans* added to soil. Lett. Appl. Microbiol. 16: 178-181.
- Hanson, K.G. J.D. Desai et A.J. Desai. 1993. A Rapid And Simple Screening Technique For Potential Crude Oil Degrading Microorganisms. Biotechnology Techniques. 7: 745-748.
- Hattori, T. et R. Hattori. 1976. The Physical Environment In Soil Microbiology: An Attempt To Extend Principles Of Microbiology To Soil Microorganisms. CRC Crit. R. Microbiol. 4: 423-461.
- Heitkamp, M.A. 1987. Environmental and microbiological factors affecting the biodegradation and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. Ph.D. diss., University of Arkansas, Arkansas.

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

Heitkamp, M.A. et C.E. Cerniglia. 1988b. Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Bacterium Isolated from Sediment below an Oil Field. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1612-1614.

Heitkamp, M.A. et C.E. Cerniglia. 1989. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by a *Mycobacterium sp.* in Microcosms Containing Sediment and Water from a Pristine Ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1968-1973.

Hoff, R.Z. 1993. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. *MPNBAZ.* 26: 476-481.

Horowitz, A., D. Gutnick et E. Rosenberg. 1975. Sequential Growth of Bacteria on Crude Oil. *Appl. Microbiol.* 30: 10-19.

Horvath, R.S. 1972. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.* 36: 146-155.

Hulbert, M.H. et S. Krawlec. 1977. Cometabolism: a critique. *J. Theor. Biol.* 69: 287-291.

Ijah, U.J.J. et L.I. Ukpe. 1992. Biodegradation of Crude Oil by *Bacillus Strains 28A and 61B* Isolated from Oil Spilled Soil. *Waste Manage.* 12: 55-60.

Irvine, R.L., P.S. Yocum, J.P. Early et R. Chozick. 1993. Periodic Process For In Situ And On-Site Bioremediation Of Leachates And Soils. *Wat. Sci. Techn.* 27: 97-104.

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

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

Janigani, K.L., S.R. Wate et S.R. Joshi. 1993. Morphological and Biochemical Characteristics of Bacterial Isolates Degrading Crude Oil. *J. Environ. Sci. Health.* A28: 1185-1204.

Jeffrey, A.M., H.J.C. Yeh, D.M. Jerina, T.R. Patel, J.F. Davey et D.T. Gibson. 1975. Initial Reactions in the Oxidation of Naphthalene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry.* 14: 575-583.

Jenkins, M.B. et L.W. Lion. 1993. Mobile Bacteria and Transport of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Porous Media. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3306-3313.

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

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

Ju, M. et J.S. Devanny. 1993. Effects of Pulverization on Soil Bioremediation. *Hazard. Waste Hazard. Mater.* 10: 357-364.

Keck, J., R.C. Sims, M. Coover, K. Park et B. Symons. 1989. Evidence For Cooxidation Of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons In Soil. *Wat. Res.* 23: 1467-1476.

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

Kiyohara, H. et K. Nagao. 1978. The Catabolism of Phenanthrene and Naphthalene by Bacteria. *J. General Microbiol.* 105: 69-75.

Kiyohara, H., K. Nagao et K. Yana. 1982. Rapid Sreen for Bacteria Degrading Water-Insoluble, Solid Hydrocarbons on Agar Plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 454-457.

Kiyohara, H., N. Takizawa et K. Nagao. 1992. Natural Distribution of Bacteria Metabolizing Many Kinds of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 49-51.

Kiyohara, H., S. Torigoe, N. Kaida, T. Asaki, T. Iida, H. Hayashi et N. Takizawa. 1994. Cloning and Characterization of a Chromosomal Gene Cluster, *pah*, That Encodes the Upper Pathway for Phenanthrene and Naphthalene Utilization by *Pseudomonas putida OUS82*. *J. Bacteriol.* 176: 2439-2443.

Lapinskas, J. 1989. Bacterial Degradation of Hydrocarbon Contamination in Soil and Groundwater. *Chem and Ind.* 23: 784-789.

Leahy, J.G. et R.R. Colwell. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305-315.

Lewis, R.F. 1993. Site Demonstration of Slurry-Phase Biodegradation of PAH Contaminated Soil. *Air and Waste.* 43: 503-508.

- MacGillivray, A.R. et M.P. Shiaris. 1993. Biotransformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Yeasts Isolated from Coastal Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1613-1618.
- Mackay, D. et W.Y. Shiu. 1977. Aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *J. Chem. Eng. Data.* 22: 399-402.
- Manilal, V.B. et M. Alexander. 1991. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 401-405.
- Marinucci, A.C. et R. Bartha. 1979. Apparatus for Monitoring the Mineralization of Volatile ¹⁴C-Labeled Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 1020-1022.
- McKenna, E.J. et R.D. Heath. 1976. Biodegradation of polynuclear aromatic hydrocarbon pollutants by soil and water microorganisms. Research Report no.113. Water Resources Center, University of Illinois, Urbana-Champaign.
- Microbics Corporation. 1990. Microtox[™] manual, How to run toxicity tests using the Microtox model 500.
- Miller, E.C. et J.A. Miller. 1981. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer.* 47: 2327-2345.
- Moeller, J. et H. Ingvorsen. 1993. Biodegradation of phenanthrene in soil microcosms stimulated by an introduced *Alcaligenes sp.* *FEMS Microbiol. Ecol.* 102: 271-278.
- Morgan, P. et R.J. Watkinson. 1989. Hydrocarbon Degradation In Soil And Methods For Soil Biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnology.* 8: 305-333.
- Morgan, P. et R.J. Watkinson. 1990. Assessment of the Potential for In Situ Biotreatment of Hydrocarbon-Contaminated Soils. *Wat. Sci. Tech.* 22: 63-68.
- Morgan, P. et R.J. Watkinson. 1992. Factors Limiting The Supply And Efficiency Of Nutrients And Oxygen Supplements For The In Situ Biotreatment Of Contaminated Soil And Groundwater. *Wat. Res.* 26: 73-78.
- Mueller, J.G., P.T. Chapman, B.O. Blattmann et P.H. Pritchard. 1990. Isolation and Characterization of a Fluoranthene-Utilizing Strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1079-1086.

Mueller, J.G., S.M. Resnick, M.E. Shelton et P.M. Pritchard. 1992. Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe Bay crude oil. *J. Indus. Microbiol.* 10: 95-102.

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

Okpokwasili, G.C., C.C. Somerville, M. Sullivan, D.J. Grimes et R.R. Colwell. 1986. Oil and Chemical Pollution. 3: 117-129.

Patel, T.R. et D.T. Gibson. 1974. Purification and properties of (+)-*cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 119: 879-888.

Perry, J.J. 1979. Microbial cooxydation involving hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 43: 59-72.

Phillips, G.J. et J.E. Stewart. 1974. Distribution of hydrocarbon-utilizing bacteria in Northwestern Atlantic waters and coastal sediments. *Can. J. Microbiol.* 20: 955-962.

Ramadan, M.A., O.M. El-Tayeb et M. Alexander. 1990. Inoculum Size as a Factor Limiting Success of Inoculation for Biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1392-1396.

Rossello-Mora, R.A., J. Lalucat et E. Garcia-Valdes. 1994. Comparative Biochemical and Genetic Analysis of Naphthalene Degradation among *Pseudomonas stutzeri* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 966-972.

Sherrill, T.W. et G.S. Sayler. 1980. Phenanthrene Biodegradation in Freshwater Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 172-178.

Shiaris, M.P. et J.J. Cooney. 1983. Replica Plating Method for Estimating Phenanthrene-Utilizing and Phenanthrene-Cometabolizing Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 706-710.

Sims, R.C. 1990. Soil Remediation Techniques at Uncontrolled Hazardous Waste Sites. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 40: 704-732.

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

Singleton, I. 1994. Microbial Metabolism of Xenobiotics: Fundamental and Applied Research. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 59: 9-23.

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

Smith, M.R. 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. Biodegradation. 1: 191-206.

Soli, G. et E.M. Bens. 1973. Selective Substrate Utilization by Marine Hydrocarbonoclastic Bacteria. Biotechnol. Bioeng. 15: 285-297.

Song, H.G., X. Wang et R. Bertha. 1990. Bioremediation Potentiel of Terrestrial Fuel Spills. Appl. Environ. Microbiol. 56: 652-656.

Stephenson, D. et T. Stephenson. 1992. Bioaugmentation For Enhancing Biological Wastewater Treatment. Biotech. Adv. 10: 549-559.

Stucki, G. et M. Alexander. 1987. Role of Dissolution Rate and Solubility in Biodegradation of Aromatic Compounds. Appl. Environ. Microbiol. 53: 292-297.

Tabak. H.H., J.R. Haines, A.D. Venosa, S. Desai et W. Nisama-neepong. 1991. Enhanced degradation of the Alaskan weathered crude oil ulkane and aromatic hydrocarbons by indigenous microbiota through application of nutrients. Dans: Gas, Oil, Coal, & Environmental Biotechnology III, Ed. Cavit Akin et Jared Smith, 3-38.

Takizawa, N., N. Kaida, S. Torigoe, T. Morotani, T. Sawada, S. Satoh et H. Kiyohara. 1994. Identification and Characterization of Genes Encoding Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dioxygenase and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dihydrodiol Dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176: 2444-2449.

Thomas, J.M., J.R. Yordy, J. A. Amador et M. Alexander. 1986. Rates of Dissolution and Biodegradation of Water-Insoluble Organic Compounds. Appl. Environ. Microbiol. 52: 290-296.

Thouand, G. et J.C. Block. 1993. The Use of Precultured Inocula for Biodegradation Tests. Environ. Technol. 14: 601-614.

Van Elsas, J.D., J.T. Trevors, L.S. VanOverbeek et M.E. Starodub. 1989. Survival of *Pseudomonas fluorescens* containing plasmids RP4 or pRK2501 and plasmid stability after introduction into two soils of different texture. Can J. Microbiol. 35: 951-959.

Vecchioli, G.I., M.T. Del Pauno et M.T. Paineira. 1990. Use of Selected Autochthonous Soil Bacteria to Enhance Degradation of Hydrocarbons in Soil. *Environ. Pollut.* 67: 249-258.

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

Volkering, F., A.M. Breure et J.G. van Anandel. 1993. Effect of micro-organisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 535-540.

Walker, J.D., H.F. Austin et R.R. Colwell. 1975. Utilization of hydrocarbon substrates by petroleum-degrading microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 21: 27-39.

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

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

Wang, X. et R. Bartha. 1990. Effects of Bioremediation on Residues, Activity and Toxicity in Soil Contaminated by Fuel Spills. *Soil. Biol. Biochem.* 22: 501-505.

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

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

Wiesel, I., S.M. Wübker et H.J. Rehm. 1993. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 110-116.

Wilson, S.C. et K.C. Jones. 1993. Bioremediation of Soil Contaminated with Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Environ. Pollution.* 81: 229-249.

Wodzinski, R.S. et D. Bertolini. 1972. Physical State in Which Naphthalene and Bibenzyl are Utilized by Bacteria. *Appl. Microbiol.* 23: 1077-1081.

Wodzinski, R.S. et J.E. Coyle. 1974. Physical State of Phenanthrene for Utilization by Bacteria. *Appl. Microbiol.* 27: 1081-1084.

Wodzinski, R.S. et M. Johnson. 1968. Yields of Bacterial Cells from Hydrocarbons. *Appl. Microbiol.* 16: 1886-1891.

Wolin, E.A. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 23: 2882-2886.

Yang, Y., R.F. Cherr et M.P. Shiaris. 1994. Metabolism of Naphthalene, Fluorene and Phenanthrene: Preliminary Characterization of a Cloned Gene Cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *J. Bacteriol.* 176: 2158-2164.

Zilber, I.K., E. Rosenberg et D. Gutnick. 1980. Incorporation of ³²P and Growth of *Pseudomonas* UP-2 on n-Tetracosane. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1086-1093.

Zolbell, C.E. 1969. Microbial Modification of Crude Oil in the Sea. Dans: Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills. Washington, D.C., American Petroleum Institute, p. 317-326.

ABRÉVIATIONS

A.:	Amidon
B.H.:	Milieu de culture Bushnell-Haas.
B.H.V.:	Milieu de culture Bushnell-Haas supplémenté de 250 μ L du mélange de vitamines.
B.H.025:	Milieu de culture Bushnell-Haas supplémenté à 0,025% (p/v) des suppléments protéose peptone, extrait de levures et amidon.
B.H.025V:	Milieu de culture Bushnell-Haas supplémenté à 0,025% (p/v) des suppléments protéose peptone, extrait de levures et amidon en plus de 250 μ L du mélange de vitamines.
B.H.500:	Milieu de culture Bushnell-Haas supplémenté à 0,5% (p/v) des suppléments protéose peptone, extrait de levures et amidon.
B.H. 500V:	Milieu de culture Bushnell-Haas supplémenté à 0,5% (p/v) des suppléments protéose peptone, extrait de levures et amidon en plus de 250 μ L du mélange de vitamines.
E.L.:	Extrait de levures.
GC:	Chromatographe à phase gazeuse.
P.P.:	Protéose peptone.
V.:	Mélange de vitamines.
1,2 HN:	Acide 1-hydroxy-2-naphthoïque.

